UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ DE ELCHE

INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

INHIBIDORES/ACTIVADORES DE LA INFECTIVIDAD IN VITRO DEL RABDOVIRUS DE LA SEPTICEMIA HEMORRÁGICA (VHSV)

VICENTE MAS LLORET

TESIS DOCTORAL 2007

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ DE ELCHE

INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

José Manuel González Ros, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular y Director del Instituto de Biología Molecular y Celular.

INFORMA, que la memoria "**INHIBIDORES/ACTIVADORES DE LA INFECTIVIDAD IN VITRO DEL RABDOVIRUS DE LA SEPTICEMIA HEMORRÁGICA (VHSV)",** presentada por **D. Vicente Más Lloret** para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández. Dando así conformidad a la lectura de la presente tesis doctoral.

Elche, 2 de Febrero de 2007.

Fdo: Prof. Dr. Jose Manuel González Ros

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ DE ELCHE

INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Esta memoria, presentada por **D. Vicente Más Lloret**, para optar al grado de Doctor y que tiene por título: "**INHIBIDORES/ACTIVADORES DE LA INFECTIVIDAD IN VITRO DEL RABDOVIRUS DE LA SEPTICEMIA HEMORRÁGICA (VHSV)"**, ha sido realizada en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández bajo nuestra supervisión.

Elche, 2 Febrero de 2007

Fdo: Dr Amparo Estepa Pérez
Profesor Titular Bioquímica
Universidad Miguel Hernández

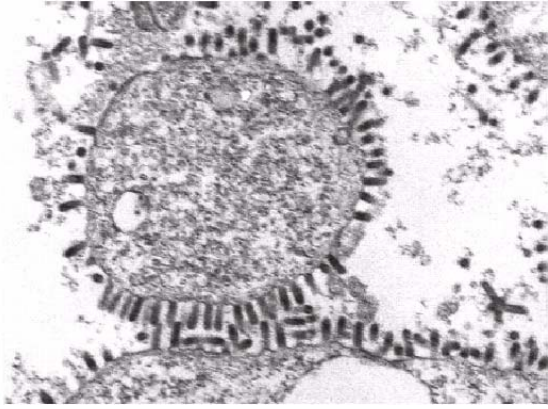
Fdo: Dr Julio Coll Morales
Investigador A1
Instituto de Investigación Agrarias

AGRADECIMIENTOS

LISTA DE ABREVIATURAS

∈	Épsilon, factor de conversión en cantidad de proteína
ßgal	ßgalactosidasa
Å	Anstrong
aa	amino ácido
Ac	Anticuerpo
AchR	Receptor de la Acetilcolina
AcMo	Anticuerpo monoclonal
AcPo	Anticuerpo policlonal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CHSE	*Chinook salmo embryo* (línea celular)
CMV	*Cytomegalovirus*
$DICT_{50}$	Dosis infectiva en cultivo de tejidos que infecta la mitad de los cultivos
EDTA	Etilen Diamino Tetra-Acético
ELISA	Ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas
EPC	*Epithelioma papulosum cyprini* (línea celular)
frg11	Fragmento 11 de la proteína G de VSHV
g	Fuerza centrífuga
G	Proteína G de VSHV
GFP	Proteína verde fluorescente
h	Hora
im	Intramuscular
ip	Intraperitoneal
iv	Intravenosa
Igs	Inmunoglobulinas
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleuquina
Kpb	Kilo pares de bases
kDa	Kilodalton
moi	Multiplicidad de infección viral
MAR	Mutantes de escape a la neutralización con AcMo
min	Minuto
NHI	Necrosis hematopoyética infecciosa
nt	Nucleótido

OD	Densidad óptica
O.I.E.	Organización Internacional de Epizootías
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ARN	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RTG-2	*Rainbow trout gonad* (línea celular)
S	Segundo
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SFB	Suero fetal bovino
Sp.	Especie
TAE	Tampón Tris Acético EDTA
U	Unidad de actividad enzimática
ffp	Unidades formadoras de focos
ufp	Unidades formadoras de placa
IHNV	Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa
IPNV	Virus de la necrosis pancreática infecciosa
RV	Virus de la rabia
VHSV	Virus de la septicemia hemorrágica vírica
VSV	Virus de la estomatitis vesicular del cerdo
VVPC	Virus de la viremia primaveral de la carpa



ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN.....21

1.1. LA FAMILIA DE LOS RABDOVIRUS.....22

1.1.1. Taxonomía y rango de huésped 22

1.1.2 Estructura molecular de los rabdovirus 23

1.1.3. Ciclo de multiplicación 27

- Adsorción y entrada 28
- Expresión génica y replicación..... 32
- Morfogénesis y salida..... 34

1.2. LA PROTEÍNA G DE LOS RABDOVIRUS 35

1.2.1. Estructura de la G_{VSV} 38

1.3. LOS RABDOVIRUS DE PECES.....44

1.3.1. El VHSV 45

- La G_{VHSV}..... 47
- Epidemiología y Patogénesis..... 51

1.4. MODULADORES DE LA INFECTIVIDAD DE VIRUS 53

1.4.1. Péptidos inhibidores de la infectividad..... 53

1.4.2. Péptidos estimuladores de la infectividad vírica..... 55

1.5. QUÍMICA COMBINATORIA COMO FUENTE DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS.....56

2.OBJETIVOS Y ESTRATEGIA.....57

3.MATERIAL Y MÉTODOS.....61

3.1. REACTIVOS.....62

3.1.1. Pepscans de péptidos 15 y 20-mer de la secuencia de aa de GVHSV. 62

3.1.2. Quimioteca de péptidos en α-hélice de 17-mer (αp). ... 62

3.1.3. Quimiotecas de diketopiperazindionas (DKP). 64

3.1.4. Expresión recombinante y purificación de un fragmento de la G_{VHSV} (aa 56-110), el frg 11. 64

3.1.5. Péptidos sintéticos. 66

3.1.6. Anticuerpos utilizados. 67

3.2. ENSAYOS BIOFÍSICOS 67

3.2.1. Preparación de liposomas. 67

3.2.2. Ensayos de agregación de liposomas. 68

3.2.3. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (IR). 68

3.2.4. Microcalorimetría de barrido. 69

3.2.5. Dicroísmo circular (CD). 69

3.3. ENSAYOS DE ELISA 71

3.3.1. Valoración de la interacción entre el VHSV, la G_{VHSV} o péptidos sintéticos y los αp inmovilizados en fase sólida. ... 71

3.3.2. Interacción entre AcMo anti-GVHSV y la G_{VHSV} presente en la superficie de los viriones de VHSV tratados con αp e inmovilizados en fase sólida. 72

3.4. ENSAYOS CELULARES. 73

3.4.1. Líneas celulares 73

- **EPC y EPC-eGFP** 73
- **RTG-2** 74
- **BHK-21 y clon BSR** 74

3.4.2. Ensayos de viabilidad celular. 75

3.4.3. Virus 75

- **VHSV** 75
- **IHNV** 77
- **IPNV** 77
- **VSV** 77
- **SFV** 77

3.4.4. Ensayos de formación de focos (ffu) 77

3.4.5. Ensayos de formación de placas (pfu) 79

- **VHSV** 79
- **VSV y SFV** 80

3.4.6. Ensayos de dilución límite ($TCID_{50}$) 80

3.4.7. Ensayos de unión VHSV-células EPC 81

- **Marcaje de VHSV con biotina ($VSHV_B$)** 81
- **Ensayo de unión $VHSV_B$-células EPC** 81
- **Ensayo de unión VHSV-EPC-eGFP** 82

3.4.8. Influencia del pH del medio en las infecciones *in vitro* con VHSV 83

3.4.9. Efecto de la presencia de 6-DKP-14 durante las infecciones *in vitro* con VHSV en la producción de VHSV intra y extracelular 83

3.4.10. Ensayos de Western-blot 84

3.4.11. Inmunofluorescencias 85

- **Detección de las G_{VHSV} y N_{VHSV}** 86
- **Tinción de microtúbulos** 86

3.4.12. Marcaje de elementos celulares 87

- **Filamentos de actina** 87
- **Endosomas** 88

3.4.13. Análisis de la expresión de ARNms de las GVHSV y N_{VSHV} por RT-PCR. 88

3.4.14. Estimación de la fusión mediada por la G_{VHSV} con ensayos de formación de sincitios. 89

- **Formación de sincitios mediada por la G_{VHSV} presente en la superficie de células infectadas con VHSV ("fusion from within")**. 89
- **Formación de sincitios mediada por la G_{VHSV} presente en la superficie de los viriones ("fusion from without")** 90

3.4.15. Translocación de PS inducida por el frg 11 de la cara interna a la externa de la membrana plasmática. 90

3.5. APROXIMACIÓN A LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA G_{VHSV}. 91

4.RESULTADOS..... 93

4.1. ADECUACIÓN DEL INMUNOENSAYO DE DETECCIÓN DE FOCOS A LA IDENTIFICACIÓN DE MODULADORES DE LA INFECTIVIDAD DEL VHSV. 96

4.2. INFLUENCIA DEL PH DEL MEDIO EN LAS INFECCIONES *IN VITRO* CON VHSV. 100

4.2.1. Variación del número y tamaño de los focos de infección en función del pH del medio 100

4.2.2. Influencia del pH en la unión del VHSV a la superficie de las células (adsorción). 101

4.2.3. Influencia del pH en la propagación *in vitro* de la infección 102

4.2.4. Análisis de la presencia de las proteínas del VHSV en células infectadas a pH 7.5 y 6.5 105

4.2.5. Expresión y capacidad fusogénica de la G_{VHSV} presente en la membrana de células infectadas con VHSV a pH 7.5 y 6.5 106

4.2.6. Reversibilidad del cambio conformacional a pH 7.5 y 6.5 109

4.3. MODULADORES EN LA SECUENCIA DE AMINO ÁCIDOS DE LA G_{VHSV} 111

4.3.1. Cribado del pepscan de péptidos de 15-mer 111

4.3.2. Influencia del frg11 en la infectividad del VHSV 113

- **Localización del frg11 en la secuencia de aa de la G_{VHSV}** 113
- **Propiedades del frg11 purificado** 114
- **Ensayos de agregación del frg11 con liposomas** 116
- **Inducción de sincitios en monocapas de EPC por el frg11**. 116
- **Exposición de PS en la membrana plasmática por el frg11** 119
- **Estructura del frg11 por IR y CD a distintos pH** 120

4.4. MODULADORES EN UNA QUIMIOTECA DE αPÉPTIDOS (αP). 122

4.4.1. Diseño de una quimioteca de αp 122

4.4.2. Cribado de las mezclas de αp. 122

4.4.3. Ensayo de los 4 αp sintetizados. 126

4.4.4. Estructura de αp5 y αp6 127

4.4.5. Análisis de la estimulación de αp5 y αp6 128

- **Tipo de incubación en la estimulación αp** 128
- **Concentración de αp en la estimulación αp** 129
- **Tiempo y temperatura en la estimulación αp** 130
- **Línea celular en la estimulación αp** 131
- **Partícula vírica en la estimulación αp** 132

4.4.6. Interacción de VHSV-αp a nivel molecular 135

- **Ensayos de unión entre VHSV y αp.** 135
- **Mapeo de la interacción αp5 y G_{VHSV}.** 137

4.4.7. INTERACCIÓN VHSV-αp EN LAS ETAPAS TEMPRANAS. 141

- **Unión al receptor celular** 141
- **pH y tipo de vesículas que intervienen en la endocitosis** 143
- **Progresión de la endocitosis** 149
- **Fusión de las membranas celular y vírica.** 157

4.4.8. Aplicaciones al diagnóstico del αp5 158

4.5. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MODULADORES DE LA INFECTIVIDAD DEL VHSV EN LOS COMPUESTOS DE QUIMIOTECAS DE N,N' 2,5 PIPERAZINDIONAS (DKPs) 160

4.5.1. Cribado de las quimiotecas de DKP 161

4.5.2. Viabilidad celular en presencia de las DKP 161

4.5.3. Estudio de la inhibición de la infectividad de VHSV causada por 5-DKP-8 y 6-DKP-14 163

4.5.4. Reducción del tamaño de los focos de infección en cultivos celulares infectados en presencia 5-DKP-8 o 6-DKP-14. 164

4.5.5. Influencia en la actividad antiviral del momento de adición de las 5-DKP-8 y 6-DKP-14. 165

4.5.6. Producción de VHSV en presencia de 5-DKP-8 y 6-DKP-14 166

5.DISCUSION 169

5.1. INHIBICIÓN DEL VHSV POR EL pH 6.5 170

5.2. SECUENCIAS DE LA G_{VHSV} ESTIMULADORES DEL VHSV 173

5.2.1. Análisis de la actividad estimuladora de los péptidos 15-mer y frg11 173

5.2.2. Participación del frg11 en la fusión de membranas. 174

5.3. APÉPTIDOS ESTIMULADORES DEL VHSV 177

5.3.1. Análisis de la actividad estimuladora de αp5 y αp6 . 177

5.3.2. Dianas moleculares de la interacción VHSV-αp5..... 180

5.3.3. Aplicaciones del αp5. 184

5.4 DKP INHIBITORIAS DEL VHSV. 185

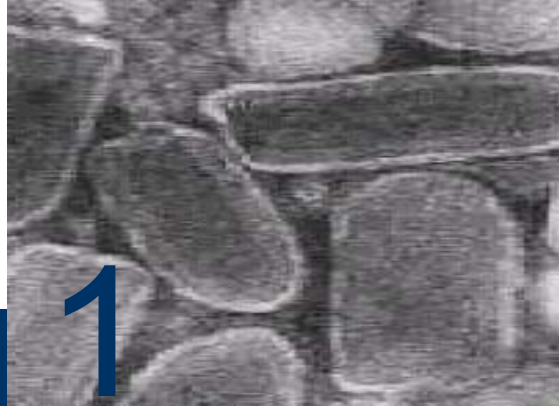
5.5. MODULADORES IDENTIFICADOS 187

6.CONCLUSIONES 191

7.BIBLIOGRAFIA 195

8.PUBLICACIONES 223

INTRODUCCIÓN



1.1.LA FAMILIA DE LOS RABDOVIRUS

1.2.LA PROTEÍNA G DE LOS RABDOVIRUS

1.3.LOS RABDOVIRUS DE PECES

1.4.MODULADORES DE LA INFECTIVIDAD DE VIRUS

1.5.QUÍMICA COMBINATORIA COMO FUENTE DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS

1.1. LA FAMILIA DE LOS RABDOVIRUS

1.1.1. Taxonomía y rango de huésped

La familia *Rhabdoviridae* constituye junto con las familias *Paramyxoviridae, Filoviridae* y *Bornaviridae* el orden *Mononegavirales* que agrupa virus con genomas ARN no segmentados de polaridad negativa (-). En la actualidad se conocen más de 200 rabdovirus que según el rango de huésped, la presencia de genes suplementarios, el lugar de replicación dentro de la célula huésped, etc., se clasifican en 6 géneros : Vesiculovirus, Lyssavirus, Ephemerovirus y Novirabdovirus que causan patologías en animales y Cytorabdovirus y Nucleorabdovirus que afectan a plantas (Walker and Kongsuwan, 1999). De entre todos los rabdovirus, los mas estudiados son el VSV (Bricker et al., 1987) y el RV (Wagner, 1987) que pertenecen a los géneros Vesiculovirus y Lyssavirus respectivamente. El VSV es el agente causal de la enfermedad denominada estomatitis vesicular que afecta al ganado equino, porcino y vacuno aunque también puede infectar humanos causando síntomas muy leves y similares a los provocados por infecciones del virus de la gripe (Fields, Knipe, and Howley, 1996). Se han descrito diversos serotipos del VSV, pero los más importantes son el VSV-New Jersey (VSNJ) y el VSV-Indiana (VSI). Si bien, el VSNJ tiene mayor relevancia en infecciones in vivo que el VSI, ambos serotipos replican eficientemente *in vitro* células BHK-21, Vero, CHO, COS e incluso en líneas celulares de peces, como las EPC. Este amplio rango de huésped del VSV sugiere que su receptor/es celular/es debe de ser moléculas muy ubicuas que se expresan en la superficie de celular de casi todos los tipos celulares (Coil and Miller, 2004). Por ello, la $G_{VSV,}$ que es la responsable de la unión al virus a su receptor celular, es en la actualidad una herramienta muy útil tanto en estudios básicos de Virología como de terapia génica (Banerjee, 1987) y vacunas ADN {Donnelly, 1997 #1484}.

El RV puede infectar cualquier tipo de animal de sangre caliente (Fields, Knipe, and Howley, 1996), incluido el hombre. La infección en humanos se caracteriza por una invasión general del sistema nervioso central que inicialmente se manifiesta por disfunciones del sistema nervioso y parálisis. Posteriormente provoca la entrada del paciente en

coma y su posterior muerte por parada respiratoria. En el caso de cepas muy virulentas, la muerte del paciente puede ocurrir en un tiempo no superior a 7 días desde el inicio de la infección. Al igual que el VSV, la replicación *in vitro* de RV virus es posible en líneas celulares como las BHK-21.

Recientemente se ha definido dentro de la familia *Rhabdoviridae* el género, *Novirabdovirus* (Walker and Kongsuwan, 1999). Dentro de este género ha quedado incluido el VHSV, objetivo central de estudio de esta tesis doctoral. Igualmente se incluye dentro de este género al IHNV. Ambos virus infectan peces teleósteos y son en la actualidad uno de los problemas más graves que afectan a la piscicultura tanto continental como marina. Frente a ellos aún no existen vacunas autorizadas ni tratamientos terapéuticos eficaces.

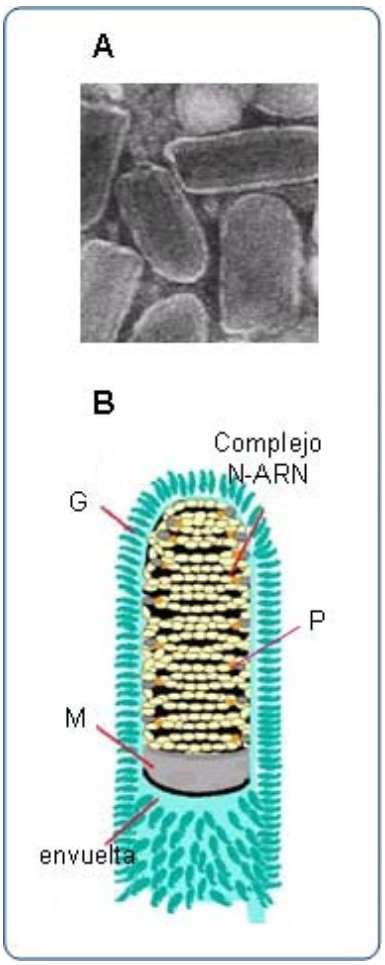


Ilustración 1 . A, Micrografía del virus de la rabia. B, Esquema de la disposición espacial de las distintos componentes que constituyen los rabdovirus *(Rupprecht, Cathleen, and Hemachudha, 2002).*

1.1.2 Estructura molecular de los rabdovirus

Los rabdovirus son virus con envuelta (bicapa lipídica que adquiere el virus durante su salida y que tiene por origen la última célula a la que ha parasitado) y morfología en forma de bala (**Ilustración 1**). El tamaño del virión oscila entre 45-100 nm de diámetro y 100-430 nm de longitud (Wagner, 1987).

Su material genético es ARN monocatenario no segmentado de polaridad negativa (-) con un tamaño de ~ 11000-15000 bases (Hill, 1975) que codifica para 5 proteínas (L, N, P M y G)(**Ilustración 1B** y **Tabla 1**) cada una de ellas codificada por un sólo gen. El orden de los genes en el ARN es 3' N-P-M-G-L 5'. Cada gen codifica una proteína. La N es la proteína de nucleocápsida que empaqueta el ARN (Rupprecht, Cathleen, and Hemachudha, 2002). La ARN polimerasa ARN dependiente que presenta tanto actividad replicasa como transcriptasa {Schnell, 1995 #2831; Banerjee, 1990 #75}. La P, también denominada M1 o NS dependiendo del virus, es una fosfoproteína que interviene tanto en el proceso de replicación (Chen, Das, and Banerjee, 1997; Hwang et al., 1999) como en el de transcripción (Chen, Das, and Banerjee, 1997; Pattnaik et al., 1997) del genoma. Además tiene un papel activo durante la morfogénesis y ensamblaje del virus (Das and Pattnaik, 2005). Las

proteínas N, L y P junto al ARN constituyen la ribonucleocápsida del virus (Banerjee, 1987; Banerjee and Barik, 1992), de un tamaño de 30-70nm de diámetro y con simetría helicoidal (Figura 1B). La M (o M2) es la proteína de la matriz, interviene en los procesos de morfogénesis (Mebatsion, Weiland, and Conzelmann, 1999; Newcomb and Brown, 1981) y salida de los viriónes de la células {Flamand, 1970 #2832; Lyles, 1996 #134; Jayakar, 2004 #339}.

Tabla 1. Proteínas, peso molecular y número de moléculas por virión de rabdovirus

		Moléculas/ virión			
Proteína	**Pm (kDa)**	**VSV[1]**	**RV[2]**	**IHNV[3]**	**VHSV[4]**
L	200-250	50	72	43	14
G	67	1205	1335	166	107
N	50	1258	1325	766	892
P	33	466	691	270	464
M	23	1826	1148	1192	956

(1)(Wagner et al., 1972), (2)(Flamand et al., 1993), (3) (Hsu, Engelking, and Leong, 1985), (4)(Basurco, 1990).

Así mismo, la M de VSV, es responsable de la inhibición de la transcripción {Petersen, 2000 #2835; von Kobbe, 2000 #142} y del redondeamiento (Melki, Gaudin, and Blondel, 1994) observado en las células infectadas con este virus. En cuanto a su localización se cree que puede variar dentro de los rabdovirus. Para el VSV, podría estar localizada tanto en la superficie como en el interior de la ribonucleocápsida (Barge et al., 1993). Para el RV se ha comprobado que se encuentra en la superficie de la ribonucleocápsida favoreciendo la compactación de la misma (Mebatsion, Weiland, and Conzelmann, 1999). La G es la única glicoproteína de superficie que poseen los rabdovirus (Gaudin, 2000a; Wunner, Reagan, and Koprowski, 1984). La G media la

entrada de los rabdovirus en la célula huésped, participando tanto en la unión al receptor celular como en la fusión a pH ácido que se da entre la envoltura del virus y las membrana celular (Coll, 1995a; Gaudin, 2000a). Además, su cola citoplasmática interviene en la salida del virus de la células infectadas (Jayakar, Jeetendra, and Whitt, 2004; Schnell et al., 1998).

En los últimos años, se han dilucidado por cristalografía de rayos X las estructuras parciales o globales de 4 de las 5 proteínas presentes en el virión maduro de VSV, la N_{VSV} (Green et al., 2006), P_{VSV} (Ding et al., 2006), $M2_{VSV}$ (Gaudier, Gaudin, and Knossow, 2002) y G_{VSV} (Roche et al., 2006). La N_{VSV} (**Ilustración 2A**) se dispone alrededor del ARN en forma de anillo, secuestrando en su interior 90 bases del ARN vírico, 9 por monómero de N_{VSV} (Green et al., 2006). Estructuras de este tipo se asocian sucesivamente en el virión formando la estructura helicoidal de la ribonucleocápsida (Green et al., 2006). Los monómeros de N_{VSV} (**Ilustración 2B**) se componen de 2 lóbulos que poseen mayoritariamente estructura secundaria en forma de hélice-α. La interacción ARN-N_{VSV} tiene lugar en una cavidad de carácter hidrofóbico que se existe entre los dos lóbulos de la N_{VSV}.

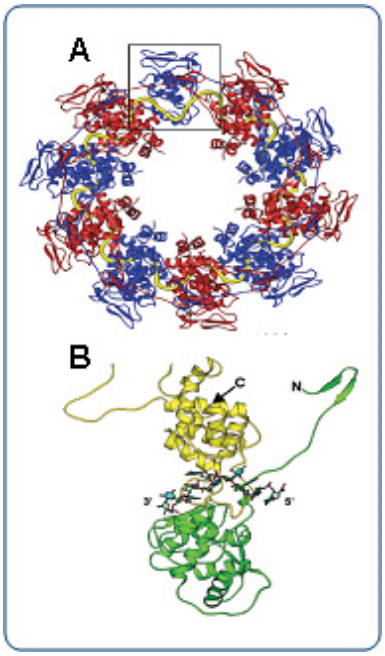


Ilustración 2. Estructura del complejo N-ARN del VSV *(Green et al., 2006): decámero (**A**) y monómero (**B**).*

Tras el alineamiento de las secuencia de 6 N de 6 rabdovirus se ha determinado que la región de interacción de la N con el ARN está muy conservada, lo que sugiere que todos los rabdovirus poseen un mecanismo de empaquetamiento del ARN similar (Green et al., 2006).

En el monómero de P_{VSV}. se han designado tres dominios, el dominio N-terminal (indispensable para la actividad transcripcional), el dominio central de oligomerización (permite a la proteína formar dímeros y/o tetrámeros) y el dominio C-terminal (indispensable para la actividad replicativa) {Ding, 2004 #73}.

La **Ilustración 3B** muestra la estructura monomérica del dominio central de oligomerización (Ding et al., 2006), se estructura en 2 hojas-β conectadas a otras 2 hojas-β mediante una hélice-α. En el cristal obtenido la estructura resuelta correspondió a un dímero (**Ilustración 3A**), que es la forma en la que la P_{VSV} interviene en el proceso de transcripción permitiendo la interacción en extremos opuestos de los dominios de unión

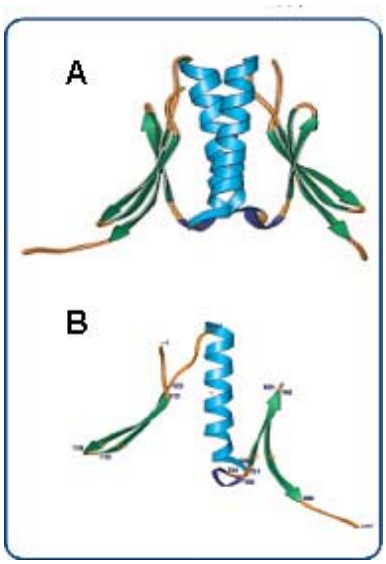


Ilustración 3. Estructura del dominio central de la P_{VSV} *(Ding et al., 2006): dímero (**A**) y monómero (**B**).*

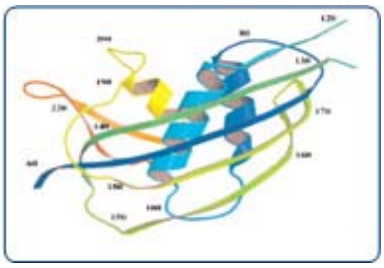


Ilustración 4. Estructura de la M_{VSV} *(Gaudier, Gaudin, and Knossow, 2002)*

a las proteínas N_{VSV} y L_{VSV} (ambos en el C-terminal) (Paul, Chattopadhyay, and Banerjee, 1988). Experimentalmente también se ha descrito la formación de tetrámeros que intervienen en el proceso de replicación (Gao and Lenard, 1995a; Gao and Lenard, 1995b). Los dímeros o tetrámeros se forman gracias a las fuertes interacciones que se producen entre las hélices-α centrales de cada monómero.

La digestión con termolisina de la M_{VSV} da lugar a dos grandes fragmentos aunque sólo uno de ellos se ha podido cristalizar. El fragmento cristalizado se corresponde con lo que se considera el núcleo del monómero de la M_{VSV} (Gaudier, Gaudin, and Knossow, 2002) (**Ilustración 4**). En esta proteína, la región N-terminal está formada por 5 hojas-β antiparalelas empaquetadas con 2 hélices-α y la región C-terminal de 2 hojas-β antiparalelas y una hélice-α conectadas por una región no estructurada de 20 aminoácidos (aa). En el dominio cristalizado la termolisina también corta la región de oligomerización comprendido entre las P 120-129 (no resuelta en la estructura del monómero). En condiciones fisiológicas, la M_{VSV} se encuentra en forma multimérica {McCreedy, 1990 #5} y participa en la compactación de la ribonucleocápsida y también en la salida del virus (Gao et al., 1996). Además, a partir de la estructura resuelta y de ensayos de interacción con liposomas se ha podido comprobar que durante la salida del virus la M_{VSV} interacciona con los lípidos de la membrana plasmática celular, interacción que ocurre mayoritariamente por la región rica en K de su N-terminal (Lenard and Vanderoef, 1990) y adicionalmente por el giro entre las P 120-129 y las cargas positivas de la región más superficial de la proteína (Gaudier, Gaudin, and Knossow, 2002). En las M de diferentes rabdovirus las regiones internas se mantienen conservadas. Por el contrario, tan sólo se observa una similitud del 5 % en las regiones más superficiales. Estos datos sugieren que el plegamiento de las M de los rabdovirus se produce de manera similar (Gaudier, Gaudin, and Knossow, 2002).

Recientemente, se ha determinado la estructura del trímero de la G_{VSV} en su conformación inactiva para fusión (Roche et al., 2006). Esta estructura, analizada en mayor detalle en la sección 1.2, ha permitido

identificar las regiones del monómero de la G_{VSV} (**Ilustración 10, Ilustración 11, Ilustración 12, Ilustración 13**) implicadas en la oligomerización y en la fusión.

1.1.3. Ciclo de multiplicación

Las etapas de ciclo de multiplicación de un rabdovirus, adsorción y entrada, replicación y expresión génica y morfogénesis se esquematizan en la **Ilustración 5**.

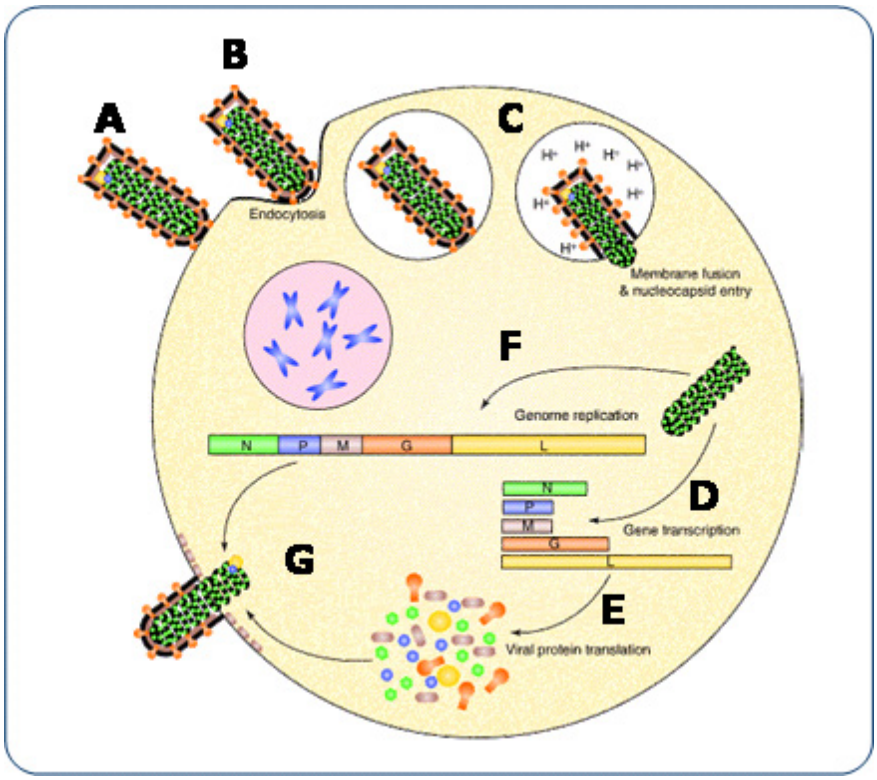


Figura 5. Esquema del ciclo de replicación de un rabdovirus. *Adsorción y entrada que engloba,* ***A****, unión al receptor celular;* ***B****, endocitosis mediada por receptor;* ***C****, fusión de membranas y liberación de las nucleocápsidas en el citoplásma; Expresión génica y replicación que incluye* ***D****, transcripción primaria,* ***E****, traducción de las proteínas víricas. y* ***F****, replicación del genoma. Morfogénesis: ensamblaje y salida de los nuevos viriónes,* ***G****.*

La infección comienza con la unión del virus al su receptor celular específico a través de la G (Bearzotti et al., 1999; Schlegel et al., 1983). Una vez adsorbido, el virus se internaliza utilizando un mecanismo conocido como endocitosis mediada por receptor. Tras la endocitosis y promovida por la G del virus, ocurre la fusión dependiente de pH ácido de la bicapa lipídica endosomal con la del virión. Como consecuencia de este proceso de fusión, se produce la liberación de la nucleocápsidas en el citoplasma de la célula diana y la disociación de ellas de la M para

dejar libres la RNPs. A continuación, se dispara la trascripción primaria del genoma del virus.

Tras la traducción de los mARN virales y la acumulación de las proteínas del virus, comienza la replicación del genoma también en el citoplasma de la célula. Por último, las proteínas recién sintetizadas y los nuevos genomas se ensamblan en la proximidades de la membrana plasmática y el virus sale de la célula por gemación, provocando la lisis celular en estados avanzados de la infección (Wagner, 1975; Wagner, 1987).

- **Adsorción y entrada**

La infección por rabdovirus se inicia como ya se ha indicado antes a través de la interacción de su glicoproteína de superficie, $G_{rabdovirus}$ (Coll, 1999), con un receptor de la superficie celular (**Ilustración 5A**), todavía desconocido para la mayoría de los rabdovirus. Aunque no se conoce con exactitud la naturaleza del receptor, que haya competición entre el VSV y RV por la entrada en algunos tipos celulares sugiere que puede existir un receptor común al menos para los rabdovirus de mamíferos.

Los primeros trabajos encaminados a identificar el receptor celular del VSV, propusieron la PS como el receptor celular del virus (Schlegel et al., 1983). En estos trabajos se observó que extractos obtenidos a partir de preparaciones de membrana plasmática de células Vero competían con VSV por unirse a las células diana del virus. Tras comprobar que el factor responsable de la competición presente en los extractos era resistente a tripsina, neuroaminidasa y temperatura (100º C) pero sensible a tratamiento con fosfolipasa C, se estudió la influencia de distintos fosfolípidos en la infectividad del virus. De todos los fosfolípidos ensayados, la PS fue la única capaz de inhibir la infectividad del VSV. Resultados similares se dedujeron de los estudios realizados con el RV (Superti, Derer, and Tsiang, 1984; Wunner, Reagan, and Koprowski, 1984). Además se determinó que existían dos interacciones distintas entre VSV y las células Vero o lo que es lo mismo dos receptores celulares para VSV con propiedades diferentes (Schlegel, Willigan, and

H.Pastan, 1982). Así, cuando se adicionaba el virus a las células a baja m.o.i se detectaban sitos de unión saturables (aproximadamente unos 7000 sitios por célula). Sin embargo en presencia de concentraciones de virus superiores a las que se necesitan para saturar estos sitios, la entrada de virus a las células aumentaba lo que claramente indica la existencia de otro sitio de unión no saturable. Los resultados obtenidos de ensayos de unión con VSV previamente neutralizado con anticuerpos corroboran igualmente la existencia de dos receptores celulares para algunos rabdovirus ya que el VSV neutralizado también es capaz de infectar las células y su unión a la superficie celular no se inhibe con PS y es sensible a tripsina (Schlegel and Wade, 1983).

La unión/interacción rabdovirus-PS no es exclusiva para VSV y RV. De hecho se ha confirmado la interacción entre distintas regiones de la G_{VHSV} y la PS (Coll, 1997; Hall, Burson, and Huestis, 1998) y se ha demostrado la partipación directa de la PS en la fusión (Carneiro et al., 2002; Carneiro et al., 2006). Sin embargo, dado que en la mayoría de las líneas celulares la PS se encuentre localizada en la cara interna de la membrana plasmática (Boon and Smith, 2002; Williamson and Schlegel, 1994; Zwaal and Schroit, 1997) y que las interacciones entre PS y la $G_{rabdovirus}$ comentadas con anterioridad se observan preferentemente a pH ácido (Carneiro et al., 2002; Carneiro et al., 2006), es difícil asumir que la PS sea el receptor celular de los rabdovirus a pH fisiológico. Además, se ha comprobado que la anexina V (compuesto capaz de interaccionar específicamente con la PS) no disminuye ni la unión ni la infectividad del VSV (Coil and Miller, 2004) así que muy probablemente, la PS favorezca la unión de la partícula vírica a las membranas celulares una vez se encuentra el virus en el entorno ácido que confiere el endosoma. Por lo tanto, en la unión inicial que se da a pH fisiológico entre la G_{VSV} y la célula huésped ha de intervenir algún otro factor.

En el caso del RV, si bien se han descrito diferentes componentes celulares capaces de interaccionar con estos virus, el receptor no se ha identificado. Varios trabajos proponen al receptor nicotínico de la acetilcolina (nAChR) como el receptor celular al que se une la G_{RV} (Bracci et al., 1988; Broughan and Wunner, 1995; Lentz et al.,

1986; Lentz et al., 1982). Sin embargo, el hecho de que los RV sean capaces de infectar neuronas que no expresan nAChR, sugiere que otras moléculas interviene en la unión del RV a la superficie celular y que estas son distintas en función del tipo celular. Hasta el momento, se han postulado como posibles candidatos a receptor del RV, fosfo y glicolípidos (Superti et al., 1984; Wunner, Reagan, and Koprowski, 1984), ácido siálico {Conti, 1986 #31} y un complejo de fibronectina (Broughan and Wunner, 1995). Recientemente, también se han propuesto como posibles receptores de los RV la molécula de adhesión celular CD56 (Tuffereau et al., 1998a) y el factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (Tuffereau et al., 1998b).

Siguiendo una estrategia diferente, también se han realizado estudios encaminados a identificar el receptor celular del VHSV. Concretamente, se generaron AcMo capaces de bloquear la unión e infectividad de VHSV en las líneas células RTG-2 de trucha y CHSE de salmón cuando estas células eran incubadas con los anticuerpos antes de la infección (Bearzotti et al., 1999). Por inmunoprecipitación con estos Ac y a partir de la membrana plasmática de células RTG-2 y CHSE se pudo identificar un complejo compuesto por fibronectina (200 KDa), un miembro de la familia de moléculas de adhesión que forma dímeros covalentes de 400 KDa {Sadaghiani, 1994 #1542} y una proteína de 47 KDa no identificada. Este complejo fue abundante en músculo de trucha y en todos los órganos diana de VHSV. Estos AcMo supuestamente anti-receptor también bloquearon la infección de otros rabdovirus de peces como por ejemplo el SVCV, el rabdovirus de la anguila y serotipos distintos de VHSV e IHNV (Bearzotti et al., 1999). Confirmando lo anteriormente descrito, se ha identificado una nueva forma de fibronectina aislada del pez cebra capaz de mediar la entrada del IHNV (Liu and Collodi, 2002).

Todos estos estudios con VSV, RV y VHSV han puesto de manifiesto la complejidad de la interacción de los rabdovirus con sus células huéspedes y la necesidad de continuar realizando una investigación activa sobre este tema.

Una vez que el virus se ha unido a la superficie celular, tiene lugar la endocitosis mediada por receptor (**Ilustración 5B**), mecanismo

que las células utilizan habitualmente para internalizar componentes del medio extracelular. Esta endocitosis viene seguida de un proceso de fusión de mebranas vírica y endosomal inducido por la bajada de pH que permite la liberación de la nucleocápsidas al interior celular (**Ilustración 5C**).

La endocitosis de los rabdovirus se inicia preferentemente por zonas de la cara interna de la membrana plasmática celular recubiertas con clatrina (Sieczkarski and Whittaker, 2002; Sun et al., 2005). Tras la internalización, las vesículas recubiertas de clatina conteniendo los virus se transportan mediante endosomas por el citoplasma. Este transporte esta facilitado gracias a los filamentos que forman el citoesqueleto de las células (Gottlieb et al., 1993; Kizhatil and Albritton, 1997). Durante el transporte y por acción entre otras de las proteínas Rab (Bucci et al., 2000; Sieczkarski and Whittaker, 2002; Somsel Rodman and Wandinger-Ness, 2000) ocurre la llamada “maduración de los endosomas”, donde se pueden distinguir de manera secuencial: endosomas tempranos, estructuras multivesiculares, endosomas tardíos y lisosomas (Piper and Luzio, 2001; Raiborg, Rusten, and Stenmark, 2003; Uchil and Mothes, 2005). La maduración se caracteriza además de por cambios en la morfología y composición proteica, por una acidificación progresiva del lumen endosomal (Piper and Luzio, 2001). El paso de endosomas tempranos (pH ~6), a los tardíos (pH ~5) se caracteriza por la formación de estructuras multivesiculares aumentando el tamaño y esfericidad del endosoma así como el contenido en proteasas (Piper and Luzio, 2001; Raiborg, Rusten, and Stenmark, 2003). El paso de endosomas tardíos a lisosomas se caracteriza por la perdida de receptores de manosa-6-fosofato (Piper and Luzio, 2001) y una mayor acidificación.

En un principio, y dado que el pH necesario para que se den los cambios conformacionales necesarios para la fusión de VSV (Fredericksen and Whitt, 1996; Rigaut, Birk, and Lenard, 1991, Carneiro, 2001 #3172; Schlegel, Willingham, and Pastan, 1982), RV (Superti, Derer, and Tsiang, 1984) (Gaudin, 2000a; Gaudin, Ruigrok, and Brunner, 1995; Gaudin et al., 1993) y VHSV (Bearzotti et al., 1995b) (Coll, 1995a) (Estepa and Coll, 1997) esta próximo a 6, se asumió que las ribonucleocápsidas de los rabdovirus eran liberadas al citoplasma celular, tras la fusión directa entre los viriónes y la membrana externa de los endosomas tempranos (Khor, McElroy, and Whittaker, 2003; Sieczkarski and Whittaker, 2002). Sin embargo, recientes trabajos DESM que la fusión del virus y la liberación de las ribonucleocápsidas son dos procesos consecutivos pero independientes (Uchil and Mothes, 2005). Inicialmente, se produce la fusión del virus con las vesículas internas de los endosomas (cuerpos multivesiculares), y posteriormente se produce un segundo proceso de fusión ("back-fusion") de estas vesículas internas con la membrana externa del endosoma (Le Blanc et al., 2005; Uchil and Mothes, 2005). Es este segundo proceso de fusión el que permite la liberación de las nucleocápsidas (Le Blanc et al., 2005; Uchil and Mothes, 2005) (**Ilustración 6**).

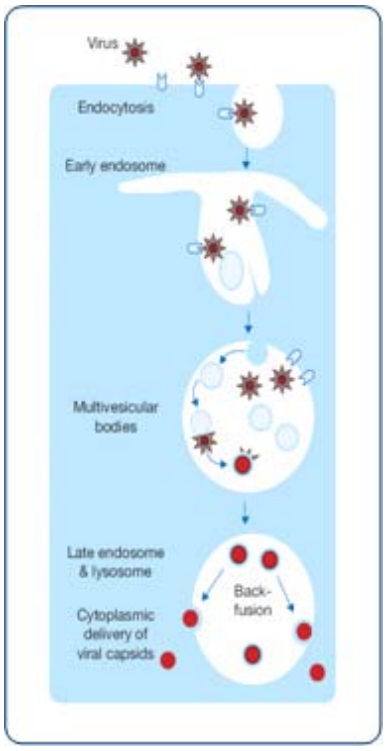


Ilustración 6. Esquema de la liberación de RNPs del VSV en el citoplasma celular. *(Uchil and Mothes, 2005)*

- ## Expresión génica y replicación

Una vez liberadas las nucleocápsidas en el citoplasmas comienza la transcripción primaria del ARN$^-$ del virus por la ARN polimerasa vírica (**Ilustración 5D**) .El proceso de transcripción primaria ocurre en el citoplasma en ausencia de síntesis de proteínas y comienza en el extremo 3' del genoma, rindiendo en primer lugar un ARN de 48 nucleotidos conocido con el nombre de ARN líder. A continuación tiene lugar la síntesis secuencial de los ARNm individuales que codifican para las proteínas N, P, M, G y L. Cada uno de estos ARNm se transcribe a partir de un único promotor situado en el extremo 3' del genoma. El mecanismo de transcripción se conoce como "de parada y arranque". La polimerasa transcribe hasta que encuentra una región intergénica (**Ilustración 7A**) con señales de finalización de la transcripción (parada),

posteriomente en el momento que detecta una región iniciadora de la trascripción (arranque) se transcribe un nuevo mensajero correspondiente a la proteína contigua.

En cada proceso de parada y arranque se produce una atenuación en la eficiencia de transcripción de los genes, de manera que el número resultante de transcritos es mayor para los genes próximos al extremo 3' (próximo al promotor) que para los genes próximos al extremo 5' (alejado del promotor). De acuerdo con este mecanismo, el resultado final del proceso de transcripción primaria en los rabdovirus es la generación de un gradiente de ARNm en el que el número de copias de ARNm de N > P > M > G > L (Wagner, 1987) (**Ilustración 7B**).

Los ARNm individuales resultantes llevan Cap en el extremo 3' y están poliadenilados. La poliadenilación aparentemente ocurre tras la copia repetitiva por parte de la transcriptasa vírica de una secuencia de 7 uridinas presente al final de cada gen.

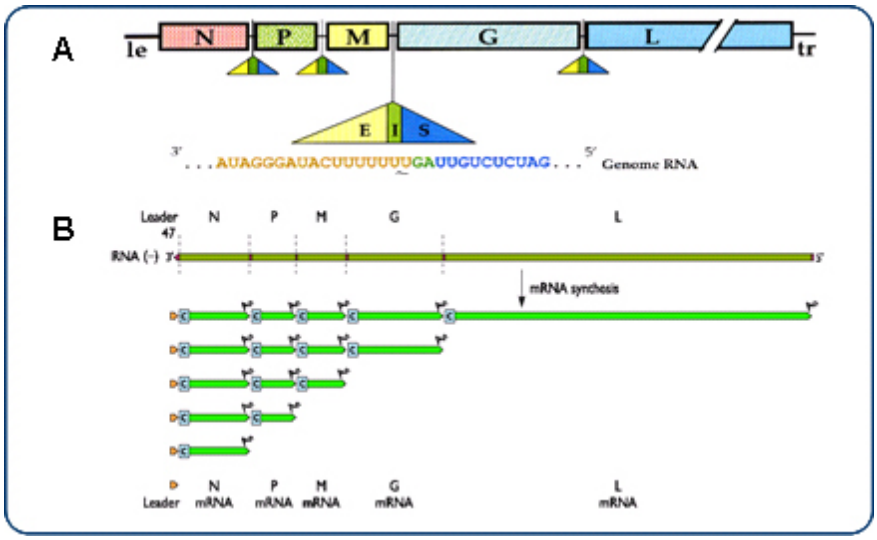


***Ilustración 7. Secuencias intergénicas y fenómeno de atenuación de la transcripción en rabdovirus. A**, Esquema de la localización de las secuencias intergénicas en el genoma VSV y detalle de la secuencia intergénica entre los genes que codifican para las proteínas M y G. **B**, gradiente de mensajeros generado como consecuencia del fenómeno de atenuación de la transcripción en rabdovirus .*

A diferencia de la transcripción, la replicación del ARN vírico requiere que el virus forme una copia única completa de su genoma y para ello es necesario que las señales de parada / arranque en el genoma sean ignoradas. Además la replicación del ARN virico requiere de traducción activa. Esta observación es consistente con un modelo en el que la N recién formada se une selectivamente a la secuencia líder

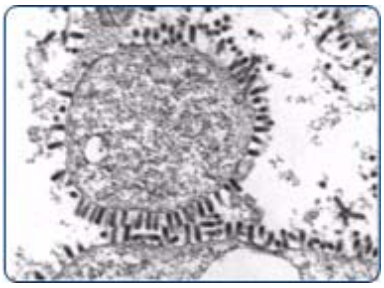


Ilustración 8. Micrografía de la salida de los viriones de VSV en células BHK-21 previamente infectadas. *(Jayakar, Jeetendra, and Whitt, 2004)*

presente en el ARN vírico evitando así que se reconozcan las señales transcripcionales de finalización.

La traducción de los ARNm víricos da lugar a la síntesis de las proteínas que conforman el virus, mientras que las copias de las largas cadenas de ARN permiten la formación del ARN de polaridad negativa (**Ilustración 5E, F**).

- ## Morfogénesis y salida

En las células infectadas por los rabdovirus, el ensamblaje de los nuevos viriones se da en distintas fases. Este proceso se ha estudiado principalmente para el VSV. Actualmente el modelo aceptado y propuesto (Jayakar, Jeetendra, and Whitt, 2004) conlleva las siguientes etapas: (**i**) en primer lugar y en el citoplasma celular, los nuevos genomas de ARN se asocian con las proteínas recién sintetizadas N, P y L dando lugar a las RNPs (**Ilustración 9A**). (**ii**) mientras se ensamblan las RNPs, la G y parte de la M recien sintetizada (10-20%) se transportan hasta la membrana plasmática. La M se localiza en la cara interna de la membrana mientras que la G queda insertada dentro de ella (**Ilustración 9A**). (**iii**) a continuación, las RNPs migran hasta las proximidades de la membrana plasmática donde se compactan gracias a la M (**Ilustración 9B**). La presencia de la M es suficiente para que se complete la salida del visión, sin embargo la presencia de la G favorece este proceso. Mutantes del virus en los que se ha deleccionado la G pierden un 30% en la eficiencia de este proceso. El papel de la G en la salida del virus consiste en favorecer la curvatura y extrusión de lo virus, además de señalizar los sitios de salida del virus. Así, los dominios de la membrana donde se produce la compactación de las RNPs vienen determinados por las zonas de la membrana donde se da una mayor acumulación de G. (**iv**) la interacción de la M-RNPs con el sitio de salida y la progresiva compactación de la RNP desencadena en una evaginación de la membrana donde se localiza internamente la M-RNP (**Ilustración 9C,D**). (**v**) Finalmente y mediante componentes celulares como la Ned4 y la ubiquitina ligasa reclutadas por los motivos PY de la M, se produce la fisión de la membrana y la posterior salida virión (**Ilustración 9E**

Ilustración 8).

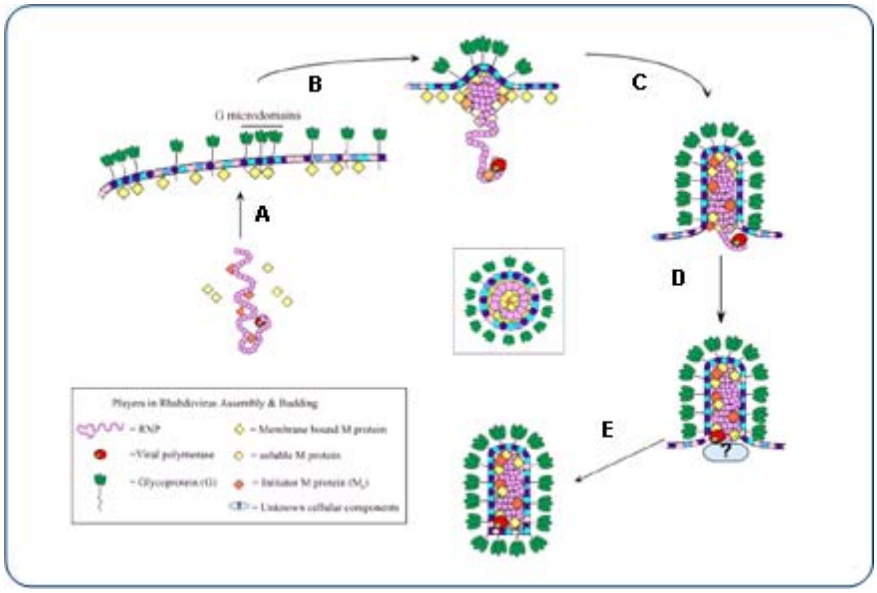


Ilustración 9. Esquema del ensamblaje y salida de los rabdovirus. *(Jayakar, Jeetendra, and Whitt, 2004). (**A**) Formación de las RNPs y transporte de la M y G a la membrana. (**B**) Compactación de las RNPs por la M. (**C**) Evaginación de la membrana plasmática. (**D**) Reclutamiento de proteínas celulares y fisión de la membrana. (**E**) Salida de los viriones.*

1.2. LA PROTEÍNA G DE LOS RABDOVIRUS

Los rabdovirus poseen una única proteína de membrana, la G, que forma homotrímeros que sobresalen del virión a modo de espículas (longitud media de 84 Å) (Gaudin et al., 1993; Gaudin et al., 1992). La $G_{rabdovirus}$ media la unión de los rabdovirus a su receptor(es) celulares (Wunner, Reagan, and Koprowski, 1984) y contiene las propiedades de fusión del virus detectables a pH < 6 en VSV (Konieczko, Whitaker-Dowling, and Widnell, 1994; Whitt et al., 1991; Whitt et al., 1990), RV (Gaudin et al., 1993) y VHSV (Estepa and Coll, 1996a; Lecocq-Xhonneux et al., 1994). Además, tras una infección la $G_{rabdovirus}$ es la diana de los anticuerpos neutralizantes inducidos en el huésped (Benmansour et al., 1991; Cupit et al., 2001; Dietzschold et al., 1987; Engelking and Leong, 1989; Kelley, Emersom, and Wagner, 1972; Lorenzen, Olesen, and Jorgensen, 1990).

La secuencia de la $G_{rabdovirus}$ de los rabdovirus de mamíferos y peces está formada aproximadamente por 500 amino ácidos (aa), contiene 2-6 sitios de N-glicosilación (NXS,T), 6-8 puentes disulfuro altamente conservados (Einer-Jensen et al., 1998; Walker and Kongsuwan, 1999), según algunos autores 2-3 zonas análogas a heptadas hidrofóbicas

repetidas (Coll, 1995b), una región de unión a fosfolípidos, [Coll, 1995 #1185; Coll, 1995 #1187; Nunez, 1998 #1309]; [Carneiro, 2006 #4286] una región transmembranal carboxi-terminal, un dominio citoplasmático carboxi-terminal y un péptido señal (Coll, 1995a). Los carbohidratos suponen el 10% del peso molecular total de la proteína [Coll, 1995 #1186; Reading, 1978 #4585] y se estructuran en torno a un núcleo central rico en manosa al que se une varias ramas. Las ramas se componen de N-acetilglucosamina, ácido siálico, fucosa y galactosa. Se ha comprobado que la glicosilación de la G es necesaria para su correcto plegamiento y posterior transporte a la membrana plasmática. Alteraciones en el patrón de glicosilación provocan un plegamiento anómalo de la G de manera que la proteína forma agregados no funcionales tal y como se demuestra utilizando inhibidores de la N-glicosilación, como por ejemplo la tunicamicina [Gallione, 1983 #4586].

Un alineamiento reciente que incluye las secuencias de G de varios rabdovirus (VSV, RV, VHSV, HRV, IHNV y SVCV) ha mostrado que entre estas proteínas existe tan solo una homología del 18-26% en la secuencia de aa y una identidad de secuencia únicamente del 5% (Einer-Jensen et al., 1998). A pesar de esta escasa homología, el alineamiento de estas mismas secuencias basado en la posición de C conservadas que poseen estas proteínas ha permitido identificar tendencias estructurales similares entre ellas (Walker and Kongsuwan, 1999). Las G del Sonchus Yellow Net Virus y del Rice Transitory Yellowing Virus, dos de los rabdovirus de plantas más estudiados, tampoco tienen mucha homología de secuencia con las de los rabdovirus animales.

Dentro de la clasificación de las proteínas de fusión, la $G_{rabdovirus}$ se ha incluido dentro del tipo III. Presenta ciertas similitudes con las proteínas de fusión pertenecientes a otros grupos, como por ejemplo, estar glicosilada, formar homotrímeros en la superficie virión y sufrir cambios conformacionales a pH ácido que facilitan el proceso de fusión. Sin embargo, y a diferencia del resto de proteínas de fusión, los cambios conformacionales inducidos por el pH son reversibles, no es necesaria la proteolisis para que la $G_{rabdovirus}$ sea activa en fusión, no contiene un péptido de fusión altamente hidrofóbico ni en la región N-terminal (proteínas de

fusión tipo I), ni interno (proteínas de fusión tipo II) y además se inactiva a pH superiores a los óptimos de fusión (Bentz, 1993; Da Poian, Carneiro, and Stauffer, 2005; Epand, 2000; Hernandez et al., 1996; White, 1992).

Los cambios conformacionales inducidos por el pH en la $G_{rabdovirus}$ y la relación de estos con la actividad de fusión han sido estudiados en profundidad por diferentes técnicas bioquímicas y biofisicas (Carneiro, Ferradosa, and Da Poian, 2001; Fredericksen and Whitt, 1996; Gaudin et al., 1993; Roche et al., 2006). Los primeros estudios determinaron que para el RV el pH óptimo de fusión era aproximadamente de 6 (Clague et al., 1990; Fredericksen and Whitt, 1995; Garoff, Hewson, and Opstelten, 1998; Gaudin, de Kinkelin, and Benmansour, 1999; Roche et al., 2006) y que la preincubación de los viriónes a pH 5 inhibía la fusión. Posteriormente se descubrió que esta inhibición era reversible porque reajustando el pH a valores fisológicos, los viriónes de rabia recuperaban otra vez su capacidad para fusionar (Gaudin, 2000b). En la actualidad se conoce que en función del pH, la $G_{rabdovirus}$ puede adoptar al menos tres diferentes conformaciones (Clague et al., 1990; Gaudin et al., 1993) que se mantienen en un equilibrio dinámico (Gaudin, 1997; Gaudin et al., 1993; Roche et al., 2006; Roche and Gaudin, 2002): la nativa que es la conformación que presenta la G_{RV} en la superficie del virión a pH fisológico y la que permite que el virus se una al receptor celular; la activa en fusión (83 Å) a pH comprendidos entre 6,4 y 5,5, altamente hidrofóbica y que interacciona con la membrana diana en las etapas iniciales de la fusión y la inactiva (113 Å), que es la conformación que se adquiere después de la fusión (conformación post-fusión) o cuando a pH ácido la conformación activa en fusión no encuentra una membrana celular diana con la que fusionar y que es antigenicamente distinta a las anteriores (Roche and Gaudin, 2002). Utilizando fluoróforos que detectan cambios en la hidrofóbicidad (Gaudin et al., 1993) se ha podido comprobar que el cambio conformacional que conduce a la conformación activa en fusión a partir de la conformación nativa supone la exposición de sitios hidrofóbicos de la $G_{rabdovirus}$ a la superficie de la molécula. Además, por microscopía electrónica (Brown, Newcomb, and Lawrence-Smith, 1988) se ha podido observar que tras este cambio conformacional en el RV se produce una acumulación de los trímeros de G en la zona apical del virión.

Equilibrios similares entre conformaciones activas e inactivas en fusión también se han observado durante la síntesis y procesamiento de la $G_{rabdovirus}$ en las células infectadas. Tras su síntesis en el retículo endoplásmico, la G_{VSV} se transporta a través de los compartimentos ácidos del aparato de Golgi a la membrana plasmática en conformación inactiva (Doms et al., 1987; Doms et al., 1993; Doms et al., 1988; Gaudin et al., 1995b), de manera que se impide la posible fusión no deseada que pudiera ocurrir durante el transporte. Una vez que la G_{VSV} se ancla en la membrana plasmática de la célula infectada y por tanto a pH fisiológico, la conformación inactiva revierte a la nativa que es la que permite al virus iniciar su ciclo de replicación. Aunque posiblemente estos cambios conformacionales reversibles que sufre la G_{VSV} son dependiente de la protonación de residuos de histidina (Carneiro et al., 2003), hoy por hoy se desconocen las bases moleculares del cambio. La reciente resolución de la estructura cristalina de la G_{VSV} (Roche et al., 2006) muy probablemente sirva de base para poder explicar la reversibilidad de los cambios conformacionales inducidos por el pH en la $G_{rabdovirus}$ y por ello se describe a continuación.

1.2.1. Estructura de la G_{VSV}

Recientemente se ha resuelto la estructura tridimensional del ectodominio de la G_{VSV} (aa 1 al 410), generado por proteolisis controlada con termolisina (G_{th}), en su conformación post-fusión a una resolución de 2,4 Å (Roche et al., 2006). El trímero de G_{th} de 125 Å de longitud y 60 Å de diámetro en su zona apical, tiene una forma parecida a la de un cono invertido (**Ilustración 10A**). Cada uno de los monómero de G_{th} que forman el trímero se pliega en 4 dominios (DI, DII, DIII y DIV) que estructuran la molécula en una cabeza (DI, DII y DIII) y un tallo (DIV) (**Ilustración 10B**).

El DI, localizado en un lateral superior de la cabeza de la molécula de $G_{th,}$ (**Ilustración 10 rojo**), es al igual que DII y DIII discontinuo en secuencia. Contiene 90 residuos distribuidos en dos segmentos (aa 1-17 y 310-383) (**Ilustración 10C**) y se estructura en 3 hojas-ß antiparalelas. Contiene en la posición 320 uno de los dos sitios de N-glicosilación que posee esta proteína. Muy probablemente en la conformación nativa a pH

fisiológico de la G_{VSV} , DI se localice hacia el exterior ya que alguno de los AcMo anti-G_{VSV} neutralizantes reaccionan con él.

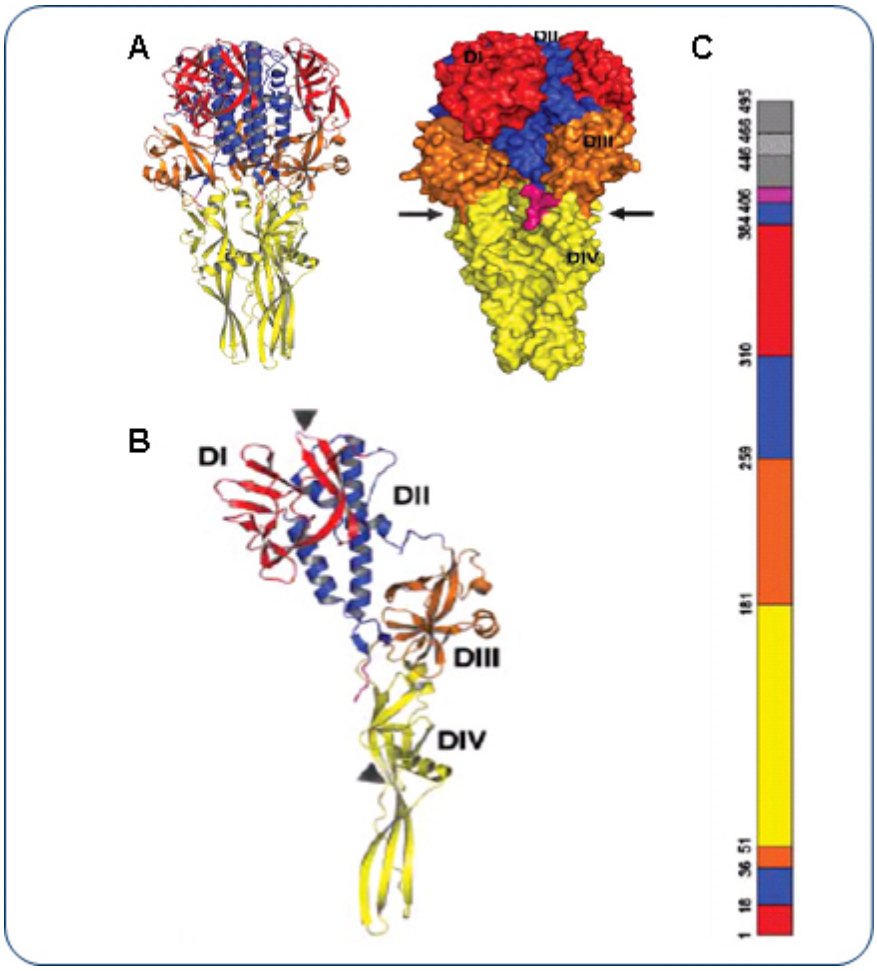


Ilustración 10. Diagrama tridimensional topológico del ectodomino del trímero de la G_{VSV} en su conformación post-fusión resuelta por cristalografía de rayos X *(Roche et al., 2006)***. A,** *Trímero G_{VSV} coloreado por dominios representado por cintas o por superficie molecular.* ***B,*** *Monómero de la G_{VSV} en formato de cintas coloreado por dominios.* ***C,*** *secuencia lineal correspondiente a cada dominio utilizando los mismos códigos de colores. Los números indican el aa de intersección entre los dominios. En gris se muestra la región C-terminal no resuelta en la estructura cristalina {Roche, 2006 #3923}. El triangulo indica la localización de un sitio de glicosilación en DI*

El DII (**Ilustración 10 azul**), también discontinuo en secuencia, está formado por 4 segmentos (18-35, 259-309 y 384-405) (**Ilustración 10**C) y estructurado en 4 hélices-α (A, F, G y H). (**Ilustración 11A**). En el trímero, las hélices F y H forman un bucle de 6 hélices ("six-helix bundle") de estructura semejante al que poseen las proteínas de fusión de tipo I en su conformación post-fusión.

Dado que las interacciones hidrofóbicas que tiene lugar entre las hélices F de los monómeros de G son cruciales para la estabilización y mantenimiento del trímero, se conoce a F como la región de trimerización. En el mantenimiento del trímero, además de las

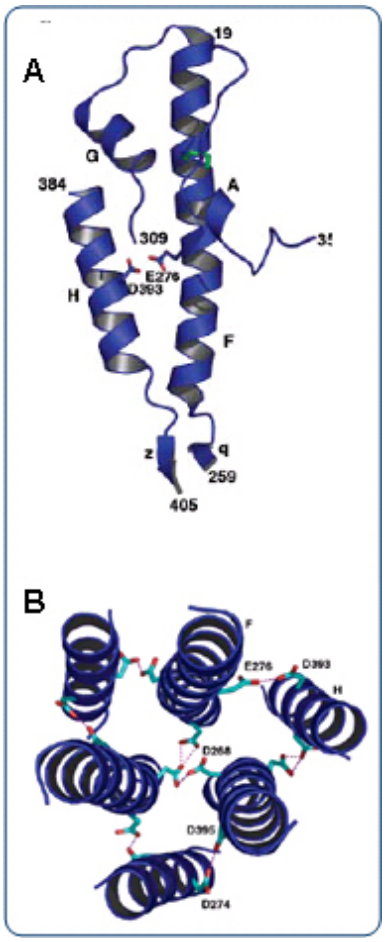


***Ilustración 11. Estructura del D II (dominio de trimerización** (Roche et al., 2006)). **A**, Diagrama del DII en formato de cintas. El puente disulfuro esta señalado en verde. Los residuos ácidos E276 y D393 que estabilizan el dominio a pH 7 están igualmente señalados. **B**, Vista frontal del bucle de 6 hélices mostrando las agrupaciones de residuos ácidos. Los puentes de hidrógeno que se forman entre ellos están dibujados en línea discontinua.*

interacciones entre las hélices F, también intervienen los puentes salinos que se forman entre el E^{286} de un monómero y la K^{290} del siguiente monómero (**Ilustración 11B)** y las interacciones entre los DIV de los tres monómeros (**Ilustración 13B**).

Por la cantidad de aminoácidos protonados a valores de pH acido inferiores a los óptimos de fusión que hay en la región de hélices-α de este DII o dominio de trimerización, se postula alguno de estos aa estén implicados en los cambios conformacionales reversibles que permitan adoptar a la G_{VSV} la conformación nativa desde el estado inactivo, proceso que como se ha comentado con anterioridad es necesario para que la $G_{rabdovirus}$ pueda transportarse a la membrana plasmática de manera inactiva para la fusión. Igualmente permitirían el cambio conformacional del estado nativo al inactivo.

El DIII (**Ilustración 10 naranja**) esta formado por dos segmentos no continuos en la secuencia del monomero de G_{th} (36-50 y 181-258) y aunque posee dos hélices-α está mayoritariamente estructurado en hoja-ß. Su plegamiento es análogo al de los dominios PH y la estructura del dominio esta en parte mantenida por un puente disulfuro (C^{219}-C^{253}) (**Ilustración 12)**. Muchos de los AcMo que reconocen la conformación nativa de la G_{VSV} mapean en esta zona (Roche et al., 2006; Vandepol, LeFrancois, and Holland, 1986) .

El DIV (**Ilustración 10 amarillo**) o dominio de fusión, a diferencia de los 3 anteriores es continuo en secuencia (51-180) y tiene una estructura extendida en hoja-ß que se organiza en torno a dos largas hojas–ß antiparalelas (c y d en la **Ilustración 13A**). El extremo superior del dominio se estabiliza por un puente disulfuro (C^{153}-C^{158}) y en la posición 163 se localiza uno de los posibles sitios de glicosilación de la proteína. En una posición inmediatamente anterior a la zona de unión del DIV con el segundo segmento del DIII hay una hélice-α (C en la **Ilustración 13A**) que esta covalentemente unida por un puente disulfuro (C^{177}-C^{226}) al DIII (**Ilustración 13A**). Entre los extremos superior e inferior de DIV esta situada la hélice-α B (**Ilustración 13A**) que se empaqueta entre las hebras de las hojas-ß c y e mediante interacciones hidrofóbicas. Además, la hélice B se une a la hebra c por un puente disulfuro que se forma entre la C^{59} y C^{92}. Después de la hélice B la cadena adopta una conformación alargada debido a la presencia en la secuencia de un motivo $P^{107}GFPP^{111}$ (**Ilustración 13A, B**) que tiene conformación en hélice de poliprolinas.

El extremo inferior de DIV está formado por dos bucles puntiagudos (cd y Pe) que se mantienen juntos mediante el puente disulfuro que se forma entre las C^{68} y C^{114}. En la punta de ambos bucles hay localizados aminoácidos de carácter hidrófobico, concretamente la pareja de aminoácidos aromáticos WY^{73} en el bucle cd y la pareja YA^{117} en el bucle Pe (**Ilustración 13A**).

Por su disposición apical y su naturaleza hidrofóbica, se han definido las terminaciones de estos bucles como las zonas de interacción de los ectodominios de los monómeros de G_{VSV} con la membrana diana durante el proceso de fusión. De hecho, la sustitución de la A^{117} del bucle Pe por una K destruye la capacidad de la G_{VSV} para fusionar membranas. [Fredericksen, 1996 #1114].

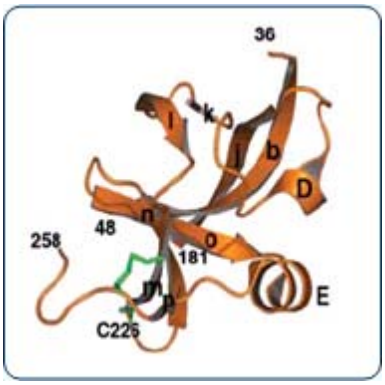


Ilustración 12. Estructura del D III *(Roche et al., 2006)., Diagrama del DIII en formato de cintas. El puente disulfuro esta señalado en verde- También se muestra la C226 que forma un puente disulfuro con la C177 del D IV*

La existencia de un dominio de fusión bipartito había sido previamente sugerida en la G_{VHSV}, un rabdovirus de salmónidos [Gaudin, 1999 #3175]. Sin embargo por i) el reducido número de residuos capaces de interaccionar con membranas en cada monómero, ii) la poca capacidad de penetración en las bicapas de los aminoácidos aromáticos como el W y la Y que mas que penetrar suelen disponerse en la interfase entre las cadenas de ácidos grasos y las cabezas polares de los fosofolípidos de membrana [Wimley, 1992 #4578; Heldwein, 2006 #4564] y iii) los resultados de estudios previos con mutantes de fusión que se describen a continuación y marcajes hidrofóbicos (Durrer et al., 1995; Li et al., 1993; Shokralla, Chernish, and Ghosh, 1999; Zhang and Ghosh, 1994), parece mas que necesaria la participación de otras regiones de la $G_{rabdovirus}$ en el proceso de fusión de membranas.

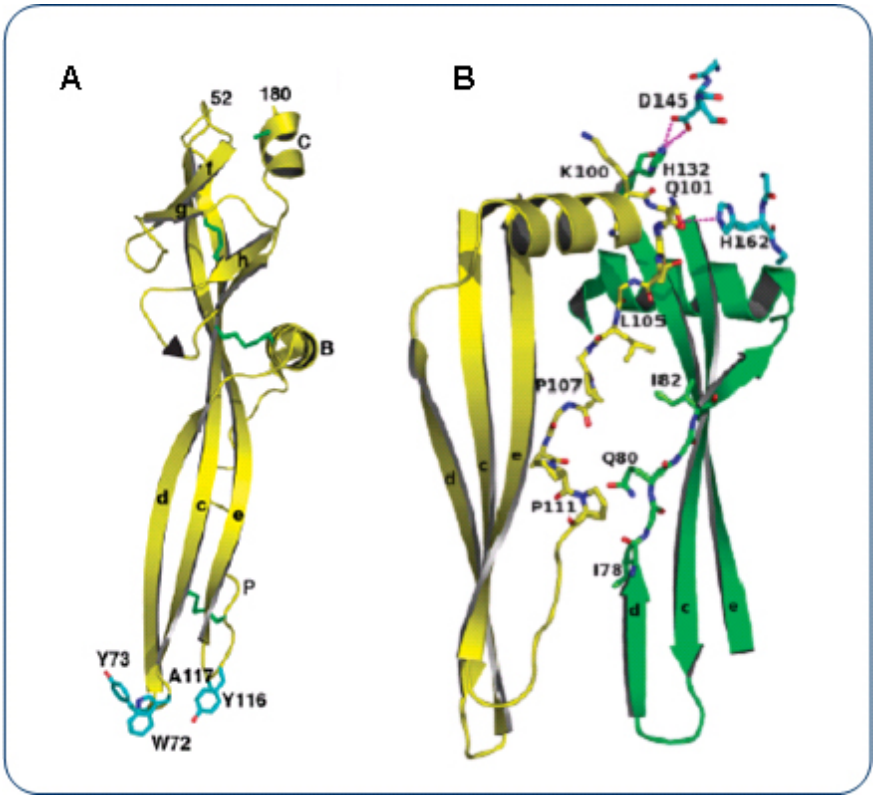


Ilustración 13. Estructura del D IV (dominio de fusión) *(Roche et al., 2006)***. A***, Diagrama del DIV en formato de cintas. El puente disulfuro esta señalado en verde. También se muestra la C 177 que forma un puente disulfuro con la C226 del DIII. Los residuos hidrofóbicos del bucle de fusión están representados en azul. El triángulo negro indica un sitio de glicosilación.* ***B****, Diagrama de cintas mostrando las interacciones entre los DIV de dos monómeros (uno en amarillo y otro en verde). Para clarificar la figura, solo se representan las cadenas laterales de los residuos que participan en la interacción y se ha omitido el segmento de poliprolinas del protómero verde*

La generación de varios mutantes defectivos en fusión por inserción de aa hace mas de una década, ya sugirió que la fusión dependía de varios dominios de la G_{VSV} tales como los adyacentes a los aa 123, 194, 410 ó

415 (Li et al., 1993) además de la región aa 118-136 (Whitt et al., 1990). Utilizando mutagénesis dirigida, finalmente se identificó la región entre los aa 123-137 de la G_{VSV}, que se encuentra dentro del dominio IV o de fusión descrito a partir de la estructura cristalina del ectodominio G_{th} (Roche et al., 2006), como la más importante en la fusión y la que contenía el hipotético péptido de fusión (Zhang and Ghosh, 1994). Sin embargo, otras regiones de la G_{VSV} también están implicadas en la fusión, ya que se han generado mutantes defectivos en fusión en regiones como las definidas por los aa 120-150, aa 134-161, aa 190-210, aa 300-360 y aa 409-419 (Shokralla et al., 1998). Así por ejemplo, cambios en la región 385-418 alteran el pH optimo de la fusión y la región inmediatamente adyacente al domino transmembranal, aa 443-452, también parece estar implicada en el proceso (Jeetendra et al., 2002; Shokralla et al., 1998), tal y como se ha demostrado por estudios espectroscópicos con péptidos derivados de esa región (Maillard et al., 2003). Es decir que los cambios conformacionales asociados a la fusión por el cambio de pH afectan toda la estructura de la G_{VSV} (Carneiro et al., 2002; Carneiro, Ferradosa, and Da Poian, 2001; Carneiro et al., 2006; Carneiro et al., 2003).

Independientemente de que en el proceso de fusión participen o no otras zonas, la resolución de la estructura cristalina de la G_{vsv} en su conformación post-fusión junto con los datos publicados casi al mismo tiempo sobre la estructura de la proteína gB de los herpesvirus [Heldwein, 2006 #4564] ha permitido definir una nueva familia de proteínas de fusión y un nuevo modelo de fusión: una estructura β alargada con dos bucles de fusión insertada en un dominio PH. Además, la homología estructural entre las proteínas Gvsv y gB ha abierto de nuevo el debate sobre la evolución del orden de los *Mononegavirales* contemplándose ahora la posibilidad de que los virus del orden *Mononegavirales* sean capaces de "sustraer genes" de sus huéspedes (probablemente copiando ARNm exógenos durante la síntesis de sus genomas.

1.3. LOS RABDOVIRUS DE PECES

Hasta en momento se han aislado de peces mas de 20 rabdovirus (Frerichs, 1989) pero sólo unos pocos, principalmente los que infectan peces teleósteos, están suficientemente caracterizados y han sido asignados dentro de alguno de los géneros de la familia *Rhabdoviridae* (**Tabla 2**).

Tabla 2. Clasificación de los rabdovirus que infectan a peces teleosteos *{Essbauer, 2001 #4579}.*

Rabdovirus de peces teleósteos	
Miembros del género Novirabdovirus	Virus de la necrosis hematopoyetica infecciosa (IHNV) Virus de la septicemi a hemorrágica vírica (VHSV) Rabdovirus de Hirame (HIRRV)
Miembros tentativos del género Novirabdovirus	Rabdovirus de Snakehead (SHRV) Virus B12 de la anguila(EEV-B12) Virus C26 de la anguila (EEV-C26
Miembros tentativos del género Vesiculovirus	Virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) Pike fry rabdovirus (PFR) Virus americano de la anguila (EVA) Rabdovirus de la enfermedad ulcerativa (UDRV)

Los rabdovirus de peces están generalmente asociados con epizootias y elevadas pérdidas en la industria de la acuicultura y entre todos ellos, destacan por su mayor impacto económico en la piscicultura, el VHSV y el IHNV. Ambos virus pertenecen al género Novirahbdovirus dentro de la familia *Rhabdoviridae* que agrupa a los rabdovirus de peces (tabla 2) cuyo genoma codifica para una proteína no estructural denominada Nv que mapea entre los genes de las proteínas G y L (Biacchesi et al., 2000; Walker and Kongsuwan, 1999). Aunque tienen

un rango de huésped similar y causan una enfermedad con de parecidos síntomas clínicos, no existen entre ellos reacciones cruzadas de seroneutralización.

En la actualidad, no existen vacunas autorizadas (Boudinot et al., 1998; Boudinot et al., 2001; DeKinkelin et al., 1995; Fernandez-Alonso, Rocha, and Coll, 2001; LaPatra et al., 2001; Leong et al., 1995; Lorenzen et al., 2002a; Lorenzen et al., 2002b) ni tratamientos terapéuticos eficaces frente a VHSV o IHNV.

1.3.1. El VHSV

El VHSV es el agente causal de la enfermedad de la septicemia hemorrágica (VHS), que provoca importantes perdidas anuales sobre todo en las poblaciones europeas de salmonidos acuicultivados (Olesen, 1997). En 1991, las perdidas causadas en Europa por el VHSV se estimaron en unos 40 millones de £ {Hill, 1992 #4580} y en el año 2000 tan solo en Dinamarca se perdieron unas 165 toneladas de trucha con un valor comercial de 211 000 €. Teniendo en cuenta estas cifras no es de extrañar que los brotes de este virus sean de obligada declaración a la Oficina InteARNcional de Epizootias (OIE).

La partícula de VHSV tiene un tamaño medio de ~ 170 x 80 nm y su genoma como el de todos los rabdovirus está constituido por una molécula de ARN monocatenario de polaridad negativa que en este caso tiene ~11.000 bases (Hill, 1975) y un peso molecular de 5-6.4 x 10^6 kDa (Enzmann, Maier, and Bigott, 1981). En la actualidad se conoce la secuencia completa del genoma tanto del VHSV (Heike, 1999; Nishizawa, 2002) como del IHNV {Jorgensen, 1995 #877; Morzunov, 1995 #848; Nichol, 1995 #847; Oshima, 1995 #867; Schuetze, 1995 #846} y además se han publicado varios estudios comparativos de secuencias (Kurath, Higman, and Bjorklund, 1995; Morzunov, Winton, and Nichol, 1995; Nichol, Rowe, and Winton, 1995). Con IHNV se han obtenido IHNV infectivos atenuados por genética reversa (Biacchesi et al., 2002; Biacchesi et al., 2000) que podrían permitir en un futuro no muy lejano el desarrollo de vacunas atenuadas tanto frente a IHNV como frente a VHSV.

El VHSV posee 5 proteínas principales: L (190 kDa), G (65 kDa), N (40 kDa), M1 o P (19 kDa) y M2 (25 kDa). Además se ha descrito una proteína relacionada antigénicamente con la N, la Nx (Basurco et al., 1991). En VHSV e IHNV existe además una proteína no estructural, la Nv (12 kDa) no descrita en otros rabdovirus (Basurco and Benmansour, 1995; Basurco, Yun, and Hedrick, 1993; Kurath, Higman, and Bjorklund, 1995) y que como se ha señalado anteriormente da nombre al género Novirabdovirus (3' N-P-M-G-**Nv**-L 5'). Se desconoce su función exacta, sin embargo trabajos recientes han determinado la necesidad de la misma para la correcta replicación tanto del VHSV como del IHNV, ya que en ausencia de Nv no se produce una correcta síntesis del resto de proteínas víricas (Thoulouze et al., 2004).

El análisis filogenético de la secuencia de nucleótidos del genoma de diferentes aislados de VHSV permite dividir a las distintas cepas de VHSV en tres genotipos, los genotipos I, II y III que incluyen respectivamente asilados del continente europeo, de las Islas británicas y de Norteamérica. Sin embargo, los anticuerpos neutralizantes anti-G no son capaces de distinguirlos. A su vez, los aislados de VHSV del genotipo I de acuerdo con sus patrones de neutralización cruzada han sido asignados a cuatro serotipos distintos (Castric et al., 1992; LeBerre, De Kinkelin, and Metzger, 1977; Vestergaard-Jorgensen, 1972) que se corresponden parcialmente con la diversidad genética encontrada entre los aislados del continente europeo (Benmansour et al., 1997). El serotipo I, que es el mas frecuente, está representado por las cepas de referencia 07-71 (Francia) y la F1 (Dinamarca), el serotipo 2 por la cepa He o F2, el serotipo 3 por la cepa 23-75 y el serotipo 4 por la cepa 02-84. En la década de los 80 se aislaron (INIA) y caracterizaron en España cinco brotes de VHSV que resultaron ser todos pertenecientes a serotipo F1 (Basurco and Coll, 1989; Basurco and Coll, 1992). Según consta en la base de datos sobre enfermedades de los animales acuáticos (http://www.collabcen.net/toWeb/aq2.asp) de la OIE desde 1994 no se han vuelto a detectar brotes de VHSV en España, de manera que en la actualidad, España es considerada por la Unión Europea como una zona libre de VHSV.

- **La G_{VHSV}**

La G del VHSV tiene 507 aa y presenta todos los rasgos de secuencia (sitos de N-glicosilación, puentes disulfuro, zonas análogas a heptadas hidrofóbicas repetidas, una región transmembranal, una cola citoplasmática carboxi-terminal, un péptido señal, etc...) previamente descritos para las G de los rabdovirus de mamíferos (**Ilustración 14**), aunque solo tenga con ellas un 8-10% de homología de secuencia (Roche et al., 2006; Walker and Kongsuwan, 1999).

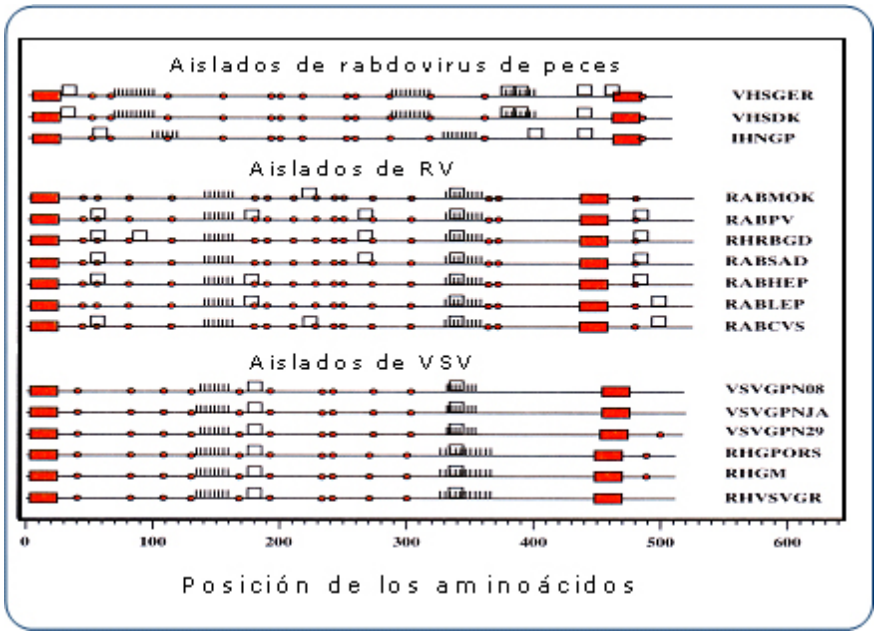


***Ilustración 14. Posición de los elementos estructurales en la secuencia de la G de VHSV** [Coll, 1995 #1186]. Posición que ocupan los sitios de glicosilación, cisteinas, y zonas análogas a heptadas repetidas en la secuencia de la G de dos aislados de VHSV y comparación con las posiciones que estos mismos elementos ocupan en las G de IHNV, otro rabdovirus de peces y de distintos asilados de los rabdovirus de mamíferos VSV y RV .●, Cisternas; □, posibles sitios de N-glicosilación; ▬, región transmembra y peptido señal; ||||, zonas análogas a héptadas repetidas.*

Al igual que las G de VSV o RV, la G_{VHSV} forma homotrímeros que sobresalen del virión a modo de espículas, media la unión del virus a su receptor(es) celulares (Bearzotti et al., 1999), contiene las propiedades de fusión del virus detectables a pH < 6 (Estepa and Coll, 1996a; Lecocq-Xhonneux et al., 1994). y es la diana de los anticuerpos neutralizantes inducidos en el huésped (Benmansour et al., 1991; Lorenzen, Olesen, and Jorgensen, 1990).

Aunque en estos momentos aún no se ha resuelto la estructura tridimensional de la G_{VHSV}, se dispone de muchos datos sobre estructura, localización de los dominios de fusión y propiedades fusogénicas de esta

proteína, todos ellos derivados de ensayos bioquímicos y biofísicos así como del uso de AcMo anti-G y mutantes.

En relación con la **estructura de la G_{VHSV}** se ha podido determinar que las semejanzas más importantes entre la G_{VHSV} y las de rabdovirus de mamíferos están:

i) las regiones de máximo ligamiento de fosfolípidos están flanqueadas por las C que ocupan las posiciones I y III en la secuencia (C:I unida a C:XII, que en la G_{VHSV} se corresponde con C^{64}-C^{315} y C:III unida a C:V, que en la G_{VHSV} se corresponde con C^{110}-C^{152}) (Einer-Jensen et al., 1998),

ii) El bucle que contiene el denominado péptido de fusión tiene una C que le une al otro bucle amino terminal que en el caso de la G_{VHSV} es el identificado como el de ligamiento de fosfolípidos,

iii) existen CP y G conservadas, tales como las C^{64} y P^{65} y la G^{98} en la G_{VHSV} y también está conservado el motivo (F,Y)PXPXXCX(W,Y) en el segundo bucle de fusión,

iv) posee un perfil de hidrofílico/hidrofóbico similar (Rocha et al., 2004a) y

v) existe un dominio hidrofílico de 25 a 45 aa, con una media de 26 % aa cargados, localizado entre las puntas del doble bucle implicado en fusión.

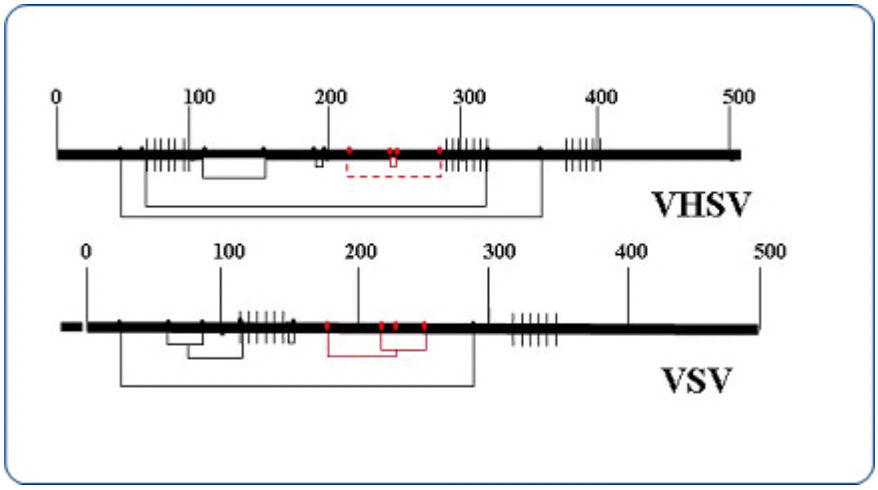


Ilustración 15. Posiciones de los puentes disulfuro y las heptadas no canónicas en la G_{VSHV} *{Einer-Jensen, 1998 #1507}* ***y en la G_{VSV}*** *{Roche, 2006 #3923}. Localización lineal de las C esquematizadas con círculos. Los puentes disulfuro se esquematizan con líneas verticales y horizontales que parten de y unen las C, respectivamente. Las líneas verticales sobre la secuencia esquematizan las localizaciones de las heptadas no canónicas {Coll, 1995 #775}. La numeración muestra sin péptido señal la G_{VSV} y con péptido señal la G_{VSHV}. La barra horizontal que precede la secuencia de la G_{VSV} esquematiza su péptido señal. Los puentes disulfuro alternativos son los C^{177}-C^{224} de la G_{VSV} y el C^{219}-C^{253} de la G_{VSV} (destacados en rojo).*
Abajo, localización tridimensional en la G_{VSV} de las C que forman los puentes disulfuro (una en azul y su pareja en negro). Los puentes disulfuro C^{24}-C^{284} en GVSV y C^{49}-C^{359} y C^{64}-C^{315} en G_{VSHV} mantienen unida la parte amino terminal con la hélice-α principal en la cabeza. Los C^{68}-C^{114} en G_{VSV} y C^{110}-C^{152} en G_{VSHV}, mantienen unidas las dos puntas de los bucles de fusión en la parte final del tallo.

La estructura tridimensional de la G_{VSV} ha permitido comprobar la importancia de los puentes en el mantenimiento de arquitectura espacial la de $G_{rabdovirus}$. La **Ilustración 15 y Ilustración 16** muestran la localización lineal y en la estructura tridimensional respectivamente de las C en la G_{VSV} cristalizada (Roche et al., 2006). Además en la Figura 15 se compara sobre la secuencia lineal esta localización con la deducida utilizando espectrometría de masas para las C de las G_{VHSV} (Einer-Jensen et al., 1998). Existe, un puente disulfuro equivalente en las secuencias de la G_{VSV} y G_{VHSV} (C^{24}-C^{284} en G_{VSV} y C^{49}-C^{359} en G_{VHSV}).que en ambas proteínas mantiene juntas posiciones apartadas en la secuencia ~ 300 aa. Concretamente, mantiene unida la parte amino terminal con la α hélice principal de la cabeza en la estructura tridimensional. Además existen otros dos puentes disulfuro que unen 30-50 aa equivalentes en las dos Gs. El primero (C^{68}-C^{114} en G_{VSV} y C^{110}-C^{152} en G_{VHSV}), mantiene unidas las dos puntas de los 2 bucles de fusión en la parte final del tallo mientras que el segundo (C^{153}-C^{158} en G_{VSV} y C^{192}-C^{197} en G_{VHSV}) mantiene una pinza de 5 aa en la parte ascendente de la secuencia del tallo. Aparentemente estos dos puentes disulfuro dan estabilidad a la estructura de doble bucle, estructura implicada en la fusión según abundantes evidencias tanto en la G_{VSV} (Shokralla, Chernish, and Ghosh, 1999; Zhang and Ghosh, 1994) como en la G_{VHSV} (Estepa and Coll, 1996a; Rocha et al., 2004a).

En G_{VSV} existe además en esta región un puente disulfuro entre C^{59} y C^{92} localizado entre la hélice-α hidrofílica y la secuencia ascendente del tallo, que parece estar situado para aumentar la estabilidad del doble bucle.

Los puentes disulfuro más diferentes son los implicados entre 4 C localizadas en la región entre los aa 177 y 285, región que se corresponde con la localizada en la base de la cabeza de la $G_{rabdovirus}$ en la estructura tridimensional. Las 4 C están presentes tanto en la G_{VSV} como en la G_{VHSV} pero forman puentes disulfuro alternativos. Así, mientras que al puente C^{177}-C^{224} de la G_{VSV} le correspondería el homólogo C^{215}-C^{251} en la G_{VHSV}, sin embargo se encuentra presente el C^{215}-C^{285}, si bien precisamente la existencia de este puente en la G_{VHSV} no se pudo demostrar con la misma claridad que la de los otros (Einer-Jensen et al., 1998). De manera semejante, mientras que al puente C^{219}-C^{253} de la G_{VSV} le correspondería el

Ilustración 16. Localización tridimensional en la G_{VSV} de las C que forman los puentes disulfuro *(una en azul y su pareja en negro). Los puentes disulfuro C^{24}-C^{284} en GVSV y C^{49}-C^{359} y C^{64}-C^{315} en G_{VSHV} mantienen unida la parte amino terminal con la hélice-α principal en la cabeza. Los C^{68}-C^{114} en G_{VSV} y C^{110}-C^{152} en G_{VSHV}, mantienen unidas las dos puntas de los bucles de fusión en la parte final del tallo. Los puentes disulfuro alternativos son los C^{177}-C^{224} de la G_{VSV} y el C^{219}-C^{253} de la G_{VSV} (destacados en rojo).*

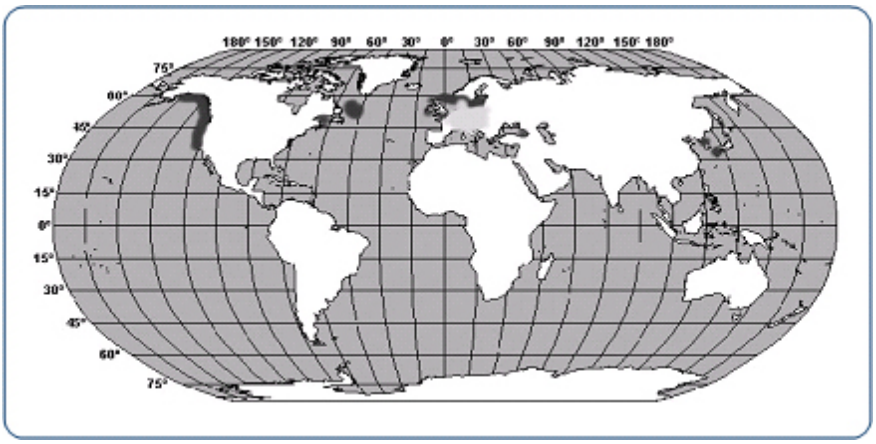


Ilustración 17. Distribución geográfica del VHSV *{Skall, 2005 #4582}. Los colores oscuros señalan áreas de donde el VHSV ha sido aislado de especies marinas. Los colores claros señalan las regiones de donde proceden los aislados de trucha (regiones de donde se consideraba que era endógeno el VHSV hasta que en 1988 fue aislado en USA)*

C^{251}-C^{224} en la G_{VHSV}, sin embargo se encuentra presente el C^{251}-C^{256}. Debido a que la estructura de puentes disulfuro obtenida por cristalografía de la G_{VSV} se corresponde con la de pH acido mientras que la obtenida por análisis de fragmentos para la G_{VHSV} se obtuvo a alto pH, es posible que las diferencias observadas se deban a un intercambio de puentes disulfuro inducido por el cambio de pH. Intercambios de puentes disulfuro en equilibrio ya se propusieron para explicar la existencia de 2 fragmentos CNBr de la G_{RV} unidos a un solo fragmento (fragmentos que contenían las C de la G_{RV} equivalentes a las C de la G_{VSV}: C^{24} y C^{253} unidas alternativamente a la C^{177})(Dietzschold et al., 1982). También se han propuesto intercambios entre puentes disulfuro (inducidos por cambios de pH, cambios conformacionales o enzimas específicas) para explicar las distintas conformaciones en proteínas implicadas en fusión en otros virus (Glomb-Reinmund and Kielian, 1998). Alternativamente, las diferencias observadas pueden ser debidas a diferencias intrínsecas de cada uno de los rabdovirus VSV y VHSV.

El análisis de los **mutantes afectados en fusión en la G_{VHSV}** en la región estudiada incluyó tanto péptidos correspondientes a las zonas de máximo ligamiento de fosfolípidos, péptidos p2 (aa 82-109) [Estepa, 1996 #635; Estepa, 1996 #4047] tanto sintéticos mutantes como mutantes generados por mutagénesis dirigida en 16 posiciones en la G_{VHSV} (Rocha et al., 2004a; Rocha et al., 2004b). La interacción con PS no se alteró en ninguno de los p2 mutantes analizados, con excepción de las posiciones 96 y 102 en las que se incrementó débilmente su

capacidad de ligamiento. La capacidad de interacción del p2 con PS, no parece depender de la secuencia de aa sino de la presencia de un cierto número de aa hidrofóbicos. Los 16 mutantes obtenidos en la G_{VHSV} se expresaban en el citoplasma de células EPC transfectadas y excepto el I82S, también en sus membranas. De estos 15 mutantes, 11 resultaron afectados en fusión y otros 4 (P79A , L85S, R103A y T135E) fueron capaces de fusionar si bien con menor actividad que el no mutante. Todos los mutantes localizados en el hipotético péptido de fusión (posiciones F147, P148 y W154 en G_{VHSV}) homólogo al identificado en G_{VSV} (**F**,Y)**P**XPXXCX(**W**,F) (Jeetendra et al., 2002; Li et al., 1993; Shokralla et al., 1998; Whitt et al., 1990; Zhang and Ghosh, 1994), fueron incapaces de formar sincitios (Rocha et al., 2004a). Además por primera vez, se describieron mutantes defectivos en fusión (P86A, G98A, A96E, R107A, P86AG98A y G98AH99S), situados en el dominio de ligamiento de fosfolípidos de una $G_{rabdovirus}$ (Rocha et al., 2004a; Rocha et al., 2004b). La no alteración de la fusión en el mutante T135E, situado en una hélice-α hidrofílica localizada entre los dos bucles del tallo en la estructura de G_{VSV} (Roche et al., 2006), sugirió muy bajas probabilidades de interacción de esta posición con los lípidos de la membrana, por el contrario la falta de fusión en el mutante F115K, sugirió su localización dentro de la membrana. Ambas hipótesis, coinciden con las conclusiones más coherentes de la estructura de la G_{VSV} recientemente dilucidada (Roche et al., 2006).

- **Epidemiología y Patogénesis**

La especie mas susceptible al VHSV es la trucha arco iris acuicultivada de donde fue aislado por primera vez en Dinamarca en 1963 (Jensen, 1963). Posteriormente, el VHSV ha sido aislado de numerosas especies marinas y en la actualidad, se cifran en al menos 48 el numero de especies distintas, todas distribuidas por el hemisferio norte (USA, Canadá, Japón Corea y Europa) (Figura 11), de donde se ha aislado el virus {Skall, 2005 #4582}. Entre ellas salmón chinock (Hopper, 1989), salmón coho (Eaton et al., 1991), rodaballo (Schlotfeldt et al., 1991), bacalao (Meyers et al., 1992), y platija japonesa (Isshik et al., 2001).

Además, se han demostrado infecciones experimentales en trucha de río, salmón atlántico y salvelino {Rasmussen, 1965 #4581}, lubina (Castric and DeKinkelin, 1984), y rodaballo {Castric, 1984 #1253; Snow, 1999 #1969} entre otras.

VHSV afecta a peces de todas las edades aunque la mortalidad es mucho mas elevada en alevines, en un rango de temperaturas de 4 a 18°C, siendo los brotes más frecuentes a 10°C [Meier, 1994 #265]. En el caso de las infecciones experimentales de rodaballo con VHSV, se ha comprobado que la mortalidad depende de la dosis, llegando al 100% con dosis superiores a 104 unidades formadoras de placas (pfu / ml). Asimismo, se observó que incluso a 18°C, el virus continuaba siendo infectivo, mientras que a temperaturas superiores la mortalidad era nula [Castric, 1984 #1253]. La transmisión del virus es horizontal [Wolf, 1988 #4581] y aunque la transmisión vertical no ha sido probada si se ha detectado VHSV en la superficie del huevo [Peters, 1986 #936].

VHSV produce lesiones especialmente en el riñón, hígado, bazo y músculo, siendo el riñón anterior, principal órgano hematopoiético en los peces, el órgano más afectado [De Kinkelin, 1979 #4582]. Aunque durante mucho tiempo se ha sugerido que los las células endoteliales del intestino y branquias y los leucocitos eran los sitios de entrada/replicación primaria del virus [Chilmonczyk, 1980 #4583; Wolf, 1988 #4581; DROLET, 1994 #4584] en la actualidad se ha demostrado que la base de las aletas son el primer portal de entrada para VHSV en salmónidos y que a tiempos cortos post-infección solo allí puede detectarse replicación del virus. [Harmache, 2006 #4099]. Sin embargo, aún no se han identificado los mecanismos implicados en la transmisión del virus desde las aletas al resto del cuerpo. Cuarenta y ocho post-infección puede detectarse el virus en riñón (Chilmonczyk, 1980; Konrad et al., 1989), y bazo (Chilmonczyk, 1980). También mediante estudios inmunohistológicos en trucha arcoiris (Oncorhynchus mykiss) el virus ha podido ser identificado a distintos tiempos post-infección en branquias, timo, hígado, bazo, corazón, píloro, riñón anterior, riñón posterior y cerebro (Konrad et al., 1989).

La importancia de la sintomatología causada por los varía de las infecciones agudas a las crónicas [DeKinkelin, 1980 #503]. La sintomatología aguda de la enfermedad, asociada siempre a una alta y rápida mortalidad, se caracteriza por peces letárgicos, oscuros, exoftálmicos (**Ilustración 18A**) y anémicos [Essbauer, 2001 #4579]. Las hemorragias son evidentes en los ojos, piel, branquias y la base de las aletas. Internamente, se observan hemorragias puntiformes en los tejidos perioculares, músculo esquelético y vísceras (**Ilustración 18B**). El hígado aparece moteado y hemorrágico y los riñones se manifiestan enrojecidos y más delgados [Ghittino, 1965 #3589] de lo normal.

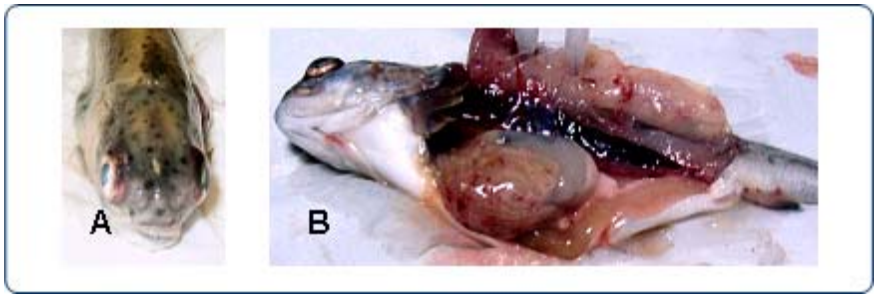


***Figura 18. Peces infectados con VHSV. A**, trucha arco iris mostrando exoftalmia y **B**, hemorragias internas puntiformes en órganos internos*

Finalmente se observa una natación incontrolada y un aumento de la frecuencia de los movimientos respiratorios. En infecciones latentes la mortalidad es muy baja y los peces tienen una apariencia normal aunque pueden estar hiperactivos. Clínicamente, tanto los peces infectados como los portadores son reservorios de VHSV que es diseminado a través de las heces, orina y fluidos sexuales [Essbauer, 2001 #4579].

1.4. MODULADORES DE LA INFECTIVIDAD DE VIRUS

1.4.1. Péptidos inhibidores de la infectividad

En la mayoría de los virus con envuelta, la disminución del pH en el endosoma provoca primero la proteolisis de la glicoproteína vírica que provoca la liberación del péptido de fusión y después un cambio conformacional irreversible en la correspondiente proteína vírica de membrana (Hernandez et al., 1996; White, 1990). En el caso de los rabdovirus, la disminución del pH en el endosoma provoca un cambio de

conformación que expone péptidos hidrofóbicos en la superficie de la $G_{rabdovirus.}$ La situación es distinta porque su péptido de fusión es bipartito e interno (Gaudin et al., 1999; Roche et al., 2006; Zhang and Ghosh, 1994) y los cambios conformacionales inducidos como consecuencia de la disminución del pH son reversibles (Bentz, 1993; Da Poian, Carneiro, and Stauffer, 2005; Gaudin, 2000a; Gaudin et al., 1996; Gaudin et al., 1993; Gaudin et al., 1991; Roche et al., 2006)

Se han descrito numerosos casos de péptidos sintéticos derivados de la secuencia de la glicoproteína de algunos virus con envuelta pertenecientes a diferentes géneros capaces de inhibir su propia infección. Por ejemplo, los péptidos sintéticos correspondientes a las heptadas repetidas amino-terminales o N-péptidos adyacentes al péptido de fusión de la glicoproteína del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), bloquean la infección viral e inhiben la formación de sincitios a concentraciones micromolares (Owens et al., 1990; Wild et al., 1992). Estas inhibiciones eran dependientes de la secuencia de los péptidos ya que sustituciones de aa en las heptadas repetidas de los N-péptidos eliminaban su actividad antiviral (Kazmierski et al., 1996; Wild et al., 1992). Otros péptidos sintéticos correspondientes a la parte C-terminal, adyacente a la región transmembranal C-péptidos y con una tendencia a formar hélices-α, también tienen actividad antiviral incluso superior (concentraciones nanomolares) (Wild, Greenwell, and Matthews, 1993; Wild et al., 1995). Otros trabajos han confirmado la existencia de N- o C-péptidos inhibidores localizados en la secuencia del péptido de fusión de la glicoproteína de HIV (Jiang et al., 1993; Nehete, Arlinghaus, and Sastry, 1993; Slepushkin et al., 1993). Péptidos inhibidores similares a los descritos para HIV se han encontrado en los virus de la influenza (Lambert et al., 1996; Yao and Compans, 1996), respiratorio sincitial (Lambert et al., 1996), paramixovirus (Rapaport, Ovadia, and Shai, 1995; Reitter, Sergel, and Morrison, 1995; Sergel-Germano, McQuain, and Morrison, 1994) y paperas (Lambert et al., 1996; Wild and Buckland, 1997).

Debido a la capacidad de los C-péptidos para asociarse con los N-péptidos (Chen et al., 1995), la actividad antiviral de los C-péptidos podría ser debida a las interacciones con los dominios de péptidos N en la

glicoproteína correspondiente y al revés (Chan et al., 1997; Wild et al., 1995). La estructura de rayos X de esta parte de la molécula de glicoproteína de HIV demostró que 3 N-péptidos forman una triple hélice superenrollada sobre la que se sitúan exteriormente 3 C-péptidos (Chan et al., 1997). Este complejo N+C-péptidos es capaz de formarse en ausencia del resto de la glicoproteína, es estable a altas temperaturas, las mutaciones en sus heptadas repetidas incorporadas a la glicoproteína impiden la fusión de HIV y la adición in vitro de los N- o C-péptidos sintéticos derivados de las secuencias correspondientes son capaces de inhibir la infección viral y la formación de sincitios.

Para rabdovirus, incluidos los rabdovirus de peces y plantas, hasta el momento no se han descrito péptidos inhibidores similares a los encontrados para otros virus. En cuanto a los virus de peces, tan sólo para el reovirus hemorrágico de la carpa se ha descrito un péptido inhibidor de 9-mer procedente de una librería de fagos (Wang et al., 2000)

1.4.2. Péptidos estimuladores de la infectividad vírica

Existen muy pocos trabajos que describan péptidos o molécula de cualquier otra naturaleza capaces de aumentar la infectividad de un virus. Entre ellos los que hacen referencia a la estimulación de la infectividad del virus de la leucemia bovina con péptidos de 2,3-mer {Voneche, 1993 #2017}, para retrovirus murinos con péptidos de 4-mer {Suk, 1983 #2015} y el HIV-1 con péptidos de 23-mer derivados de la secuencia de su glicoproteína {Zanotto, 1995 #2011} o con la quimioquina RANTES (Gordon et al., 1999). Además se ha descrito la estimulación de la fusión (5-6 veces) en un paramixovirus simio al mutar una de las posiciones de su péptido de fusión {Bagai, 1997 #4002}

En el presente trabajo se describen por primera vez péptidos derivados de la secuencia de la G_{VHSV} o derivados de una librería combinatoria capaces de provocar variaciones, en este caso estimulación en la infectividad de rabdovirus.

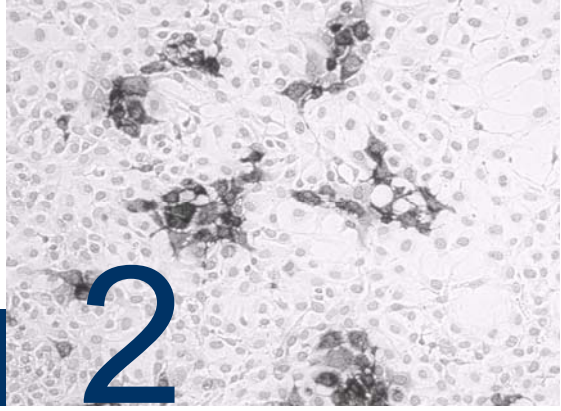
1.5. QUÍMICA COMBINATORIA COMO FUENTE DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS

La química combinatoria constituye en la actualidad la manera más rápida y eficaz de disponer de un número muy elevado de moléculas bioactivas con aplicación en los campos de la biotecnología, medicina, agricultura, acuicultura, medioambiente, etc (Carbonell et al., 2000; Cwirla et al., 1990; Ferrer et al., 1999; Luzzago et al., 1993; Wang et al., 2000).

La ventaja más importante de la estrategia combinatoria, es la posibilidad de cribar millones de moléculas de forma eficiente, siempre que se disponga de un ensayo de actividad biológica de alto rendimiento. Esta es precisamente la limitación fundamental para el desarrollo pleno de esta tecnología innovadora (Lafay et al., 1996; Lenstra et al., 1992). Sin embargo, la aplicación de las quimiotecas combinatorias de origen peptídico en el campo de la virología, se ha resuelto al disponer de ensayos biológicos, que permiten la selección de péptidos capaces de modular los primeros pasos de una infección vírica (Ferrer et al., 1999; Perez-Paya, Houghten, and Blondelle, 1996). Hay que señalar, que el control de las etapas tempranas de las infecciones por virus, en concreto por rabdovirus (Coll, 1999) es, quizás, la única estrategia posible que permita modular la infectividad vírica en función de las necesidades existentes (terapia, diagnóstico, profilaxis, etc...).

Para ilustrar la posible importancia de este tipo de investigaciones basta recordar que los virus continúan siendo una de las primeras causas de mortalidad y morbilidad tanto en poblaciones animales como humanas y que, para la mayoría de las infecciones causadas por estos patógenos, no existen vacunas ni tratamientos terapéuticos. Por tanto, en este proyecto se propone buscar para rabdovirus tanto péptidos activadores como inhibidores de la infectividad (a nivel de entrada de virus o de la posterior fusión de membranas), de los que actualmente se carece, y que están suponiendo un freno en algunos de los avances sobre vacunación, diagnóstico y terapia que ya se han conseguido para otros virus con envuelta, como es el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Ferrer et al., 1999; Lutzke et al., 1995).

OBJETIVOS Y ESTRATEGIA



2

La obtención de fármacos eficaces frente a las infecciones de origen vírico se ha revelado como una ardua y dura tarea entre otras razones porque los virus obligatoriamente dependen para multiplicarse del metabolismo de la célula a la que infectan. Por ello, los fármacos que bloquean la replicación vírica alteran también el funcionamiento de las células normales, y los límites entre las dosis terapéuticas y las dosis tóxicas son muy estrechos.

En la actualidad, los antivirales más utilizados en clínica son aquellos capaces de bloquear la actividad de las enzimas víricas en distintas etapas del ciclo replicativo. Sin embargo, también se han obtenido muy buenos resultados con péptidos derivados de las secuencias de proteínas víricas que impiden la adsorción o la penetración del virus a la célula. Dentro de estos péptidos, cabe resaltar el T-20 (Enfurvitide) {Lazzarin, 2005 #204}, un péptido derivado de la región N-terminal de la glicoproteína de fusión del virus del SIDA (HIV) que es capaz de inhibir la fusión de membranas, necesaria para la entrada del virus en la célula huésped. Desde 2003 ha sido aprobado para su uso clínico y se viene comercializando como Fuzeon™ por la empresa farmacéutica Roche. Además, se dispone de péptidos capaces de interferir con el ciclo de replicación, principalmente la fusión, entre otros para virus de las familias de *Ortomyxoviridae* y *Paramyxoviridae* (Judice et al., 1997; Kazmierski et al., 1996; Shai, 2000).Igualmente, también se han descrito péptidos (muy pocos) con capacidad para aumentar la infectividad de algunos virus y aunque en principio, la utilidad de estos reactivos no es tan obvia como la de los inhibidores, en un futuro podrían ser de gran utilidad para aumentar, la eficacia (en términos de entrada de virus) de las vacunas constituidas por virus atenuados y la sensibilidad en técnicas de diagnóstico, así como para incrementar la eficacia de los vectores víricos utilizados en terapia génica.

Curiosamente, a pesar de que los rabdovirus son uno de los grupos de virus mas estudiados, no se han descrito hasta el momento compuestos capaces de modular (activar/inhibir) su infectividad. En el presente trabajo utilizando como virus modelo, el rabdovirus la Septicemia Hemorrágica Vírica (VHSV), que afecta principalmente a salmónidos, se ha realizado una

búsqueda y caracterización, tanto a nivel molecular como celular, de moduladores de su infectividad. Cabe resaltar la importancia del VHSV en una industria en auge en los últimos decenios, como es la acuicultura. Brotes de este virus (endémico de Europa), producen anualmente a la Unión Europea pérdidas de alrededor 60 millones de euros y aunque en menor extensión también en Estados Unidos. Además, este virus no solo afecta el cultivo de salmónidos (salmón y trucha) sino también a numerosas especies acuicultivadas marinas de valor comercial muy elevado como el rodaballo y la lubina.

Dentro de este contexto, los objetivos de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

- 1. Puesta a punto de un ensayo de infectividad rápido y eficaz que permita analizar la actividad de moduladores de diferente naturaleza química.
- 2. Estudio del mecanismo de acción del pH como modulador de la infectividad del VHSV.
- 3. Búsqueda de moduladores de la infectividad del VHSV entre péptidos pertenecientes a la secuencia de la proteína G de VHSV (G_{VHSV}): pepscan 15-mer de la secuencia de la G_{VHSV} (51 péptidos) y 5 péptidos de regiones de la G_{VHSV} implicadas en la fusión. Caracterización su mecanismo de acción.
- 4. Búsqueda de moduladores de la infectividad del VHSV en otras fuentes de moléculas como las librerías combinatorias o quimiotecas: quimioteca de péptidos 17-mer con tendencia a formar hélices-α (137180 péptidos, αp) y quimioteca de heterociclos (98 derivados de una piperazindiona). Caracterización su mecanismo de acción.

5. Búsqueda de moduladores de la infectividad del VHSV seleccionados de una quimioteca de piperazindionas (98 diketopiperazinas, DKP)

MATERIAL Y MÉTODOS

3

3.1.REACTIVOS

3.2.ENSAYOS BIOFÍSICOS

3.3.ENSAYOS DE ELISA

3.4.ENSAYOS CELULARES

3.5.APROXIMACION A LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA G_{VHSV}

3.1. REACTIVOS

3.1.1. Pepscans de péptidos 15 y 20-mer de la secuencia de aa de GVHSV.

Los péptidos de 15 aa y 20 aa de longitud que cubren la totalidad de la secuencia de la G_{VHSV} (Thiry et al., 1991) del VHSV-07.71 y que solapan en 5 o en 10 aa, respectivamente, fueron sintetizaron por Chiron-Mimotopes (Victoria, Australia). La pureza de los péptidos suministrados fue del 70%, el resto correspondió a péptidos incompletos. Los péptidos sintéticos se diluyeron en HEPES 5 mM pH 7 y se pipetearon en placas de 96 pocillos de poliestireno (Dynatech Plochinger, Alemania) en un volumen de 10 µl/pocillo (concentración final aproximada de cada péptido 300 pmoles/pocillo). Tras añadir agua destilada hasta un volumen de 100 µl/pocillo, las placas se secaron durante una noche a 37 ºC y se guardaron en recipientes herméticos a -20 ºC en presencia de silica gel azul hasta su utilización (Estepa and Coll, 1996a; Estepa and Coll, 1996b)

3.1.2. Quimioteca de péptidos en α-hélice de 17-mer (αp).

La quimioteca o librería combinatoria utilizada en este trabajo fue amablemente cedida por el Dr. Antonio Ferrer Montiel (IBMC-UMH, Elche). La librería esta formada por péptidos de 17-mer con tendencia a formar α-helices (αp) y fue sintetizada utilizando la técnica del 9-fluoroenilmetoxicarbonilo (Fmoc) (Fields and Noble, 1990; Houghten, 1985) en formato de rastreo posicional (Pastor et al., 2002; Perez-Paya, Houghten, and Blondelle, 1996).

Para el diseño de la librería se utilizó como molde, la hélice-α de secuencia: Ser^{1}-Ala^{2}-Ala^{3}-$G1u^{4}$-Ala^{5}-$A1a^{6}$-Ala^{7}-Lys^{8}-$A1a^{9}$-Ala^{10}-Ala^{11}-Glu^{12}-Ala^{13}-Ala^{14}-Ala^{15}-Lys^{16}-Gly^{17} (**Ilustración 19A**). Esta secuencia se escogió como molde porque incluye: i) los residuos S^{1} y G^{17} en las posiciones N-terminal y C-terminal respectivamente, ambos aa con alta tendencia a constituir los extremos de hélices-α (Richardson and Richardson, 1988); ii) dos pares de E-K (residuos 4-8 y residuos 12-16) separados 4 aa entre sí, de tal manera que se facilitara la formación de puentes salinos y la solubilización de los péptidos y iii) residuos de A, aa

con alta tendencia a formar hélices-α (O'Neil and DeGrado, 1990)

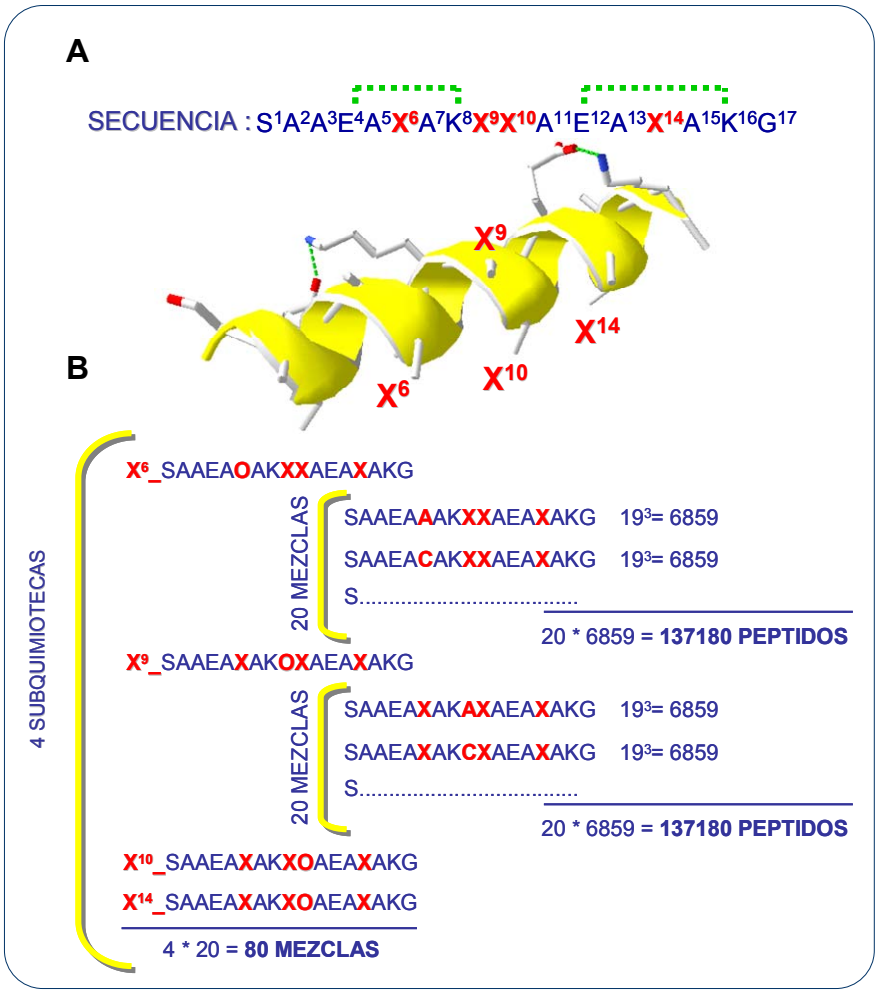


Ilustración 19.Quimioteca de péptidos de 17-mer con tendencia a formar hélices-α (αp). A*, Se muestra la secuencia y modelo estructural teórico de los αp que componen la quimioteca de hélices-α. Las X (X6, X9, X10, X14) corresponden a las posiciones variables introducidas para generar la diversidad de la quimioteca (137180 αp). El modelo estructural teórico se realizó con el programa Swiss PDB Viewer.* ***B****, Se esquematiza el diseño de las 4 subquimiotecas que componen la quimioteca. Las "O", indican la posición fija en cada subquimioteca. Esta posición se fija con cada uno de los 20 aa, lo que genera 20 mezclas de αp por subquimioteca. A su vez cada mezcla se compone de 6859 αp sintetizados en proporciones equimolares, resultado de combinar con 19 aa (todos a excepción de la C) en las 3 posiciones variables restantes ("X").*

La disposición de las posiciones fijas y variables en esta α-hélice molde se designo de manera que los nuevos péptidos resultantes (αp) también tendieran a plegarse en hélice-α y se evitara la formación de estructuras secundarias de otro tipo y de agregados, al mismo tiempo que se permitía la generación de suficiente diversidad de secuencias. Se hicieron variables 4 posiciones de la cara opuesta a los puentes salinos, concretamente las que se correspondían con las A^6, A^9, A^{10} y A^{14} de la hélice molde. Por tanto, el esqueleto sintetizado fue Ser^1-A1a^2-A1a^3-G1u^4-A1a^5-**X^6**-A1a^7-Lys^8-**X^9**-**X^{10}**-Glu^{11}-Ala^{12}-**X^{14}**-Ala^{15}-Lys^{16}-Gly^{17} (Figura 19 A). o $O_5XO_2XXO_3XO_3$ (donde O indica las posiciones fijas y X

representa cualquiera de los 19 L-aa. No se incluyó la C para evitar la formación de puentes disulfuro (Perez-Paya, Houghten, and Blondelle, 1996)). Cada mezcla de péptidos contiene 19^3 (6859) αp diferentes (el número de αp por mezcla se obtiene tras fijar una de las posiciones y combinar en proporciones equimolares las otras tres posiciones variables (X) con los 19 L-aa). La quimioteca se compone de 4 subquimiotecas: SAAEAOAKXXAEAXAKG-NH_2, SAAEAXAKOXAEAXAKG-NH_2; SAAEAXAKXOAEAXAKG-NH_2 y SAAEAXAKXXAEAOAKG-NH_2. (**Ilustración 19B**). Todas las mezclas de la quimioteca se disolvieron a una concentración de 5 mg/ml en un 5% de DMSO.

3.1.3. Quimiotecas de diketopiperazindionas (DKP).

Dos librerías de compuestos discretos basadas en el esqueleto de una 2,5-diketopiperazindiona (DKP) (**Ilustración 20A**) (Carbonell et al., 2000), DKP I y DKP II (una librería de N-óxidos generada a partir de DKP I) fueron utilizadas en este trabajo. La diversidad química de las librerías de DKPs se obtuvo a partir de la combinación de diferentes aminas, R1 y R2 (**Ilustración 20B**), en las posiciones 1,4 N,N' del esqueleto de la 2,5-diketopiperazindiona. Para simplificar la terminología, las aminas R1 se nombraron del 1 al 7 mientras que las aminas R2 del 8 al 14. Los compuestos derivados de DKP I se nombraron como R1-DKP I-R2 y los de DKP II, R1-DKP II-R2. El número total de compuestos obtenidos fue de 98 compuestos, 49 por quimioteca. Las librerías fueron amablemente cedidas por el Dr. Ángel. Messeger (IIAQB-CSIC, Gerona).

3.1.4. Expresión recombinante y purificación de un fragmento de la G_{VHSV} (aa 56-110), el frg 11.

El clonaje y expresión recombinante del frg 11 fue puesto a punto con anterioridad a este trabajo por nuestro grupo (Estepa, Fernandez-Alonso, and Coll, 1999; Rocha et al., 2002). De manera resumida, la secuencia de frg 11 fue obtenida por RT-PCR a partir de RNA del VHSV 0771 utilizando cebadores específicos de la secuencia de la G_{VHSV} (Thiry et al., 1991).

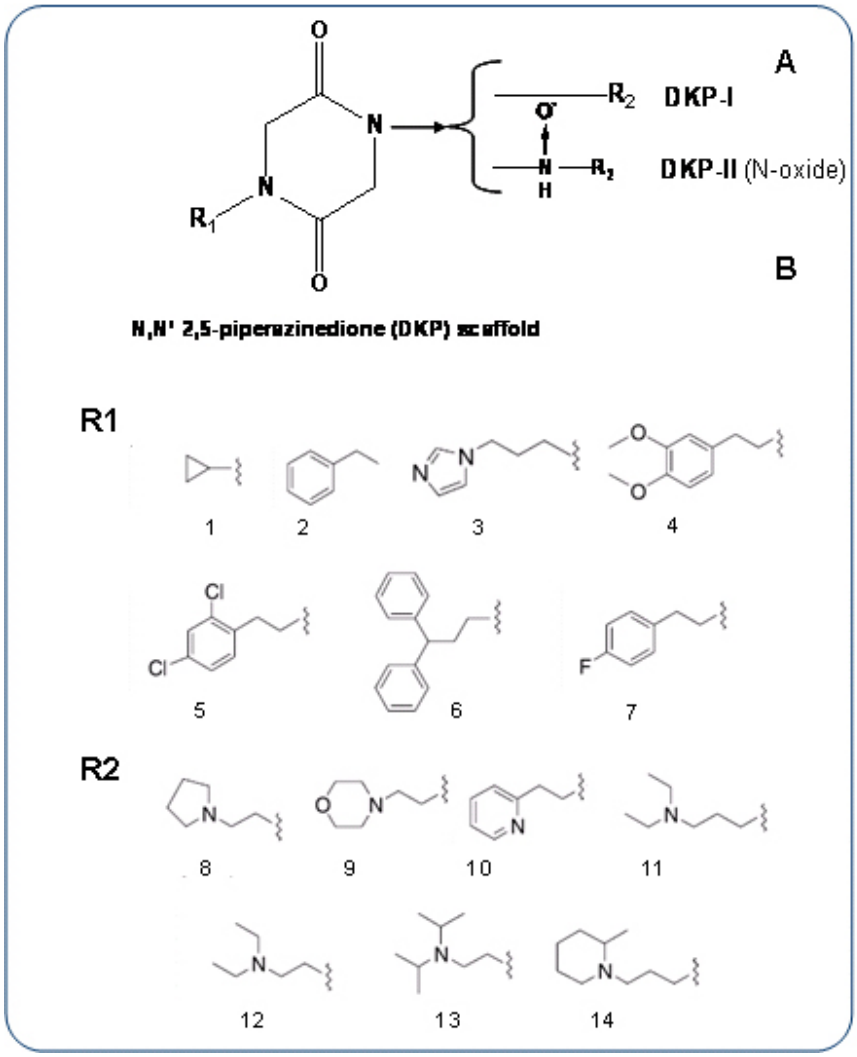


Ilustración 20. Esqueleto común (A) y diversidad (B) de las quimiotecas DKP-I y DKP-II. A, *Estructura química del esqueleto de las 2,5 piperazindionas DKP-I y DKP-II.* ***B****, Aminas R1 y R2 utilizadas para generar la diversidad de cada una de las quimiotecas.* ***R1****:* ***1****, N-cyclopropyl-.* ***2****, N-Phenethyl-.* ***3****, N-(3-(1-Imidazolyl) propyl).* ***4****, N-(3,4-Dimethoxyphenethyl)-.* ***5****, N-(2,4-Dichlorophenethyl)-.* ***6****, N-(3,3-Diphenylpropyl)-.* ***7****, N-(4-fluorophethyl)-.****R2****:* ***8****, N-(2-(1-pyrrolidinyl) ethyl)-.* ***9****, N-(2-(4-Morpholinyl) ethyl)-.* ***10****, N-(2-(2-pyridyl) ethyl)-.* ***11****, N-(3-(diethylamino) propyl)-.* ***12****, N-(2-(diethylamino)ethyl)-.* ***13****, N-(2-(diisopropylamino) ethyl)-.* ***14,*** *N-(3-(2-methylpiperidyl)propyl).*

Posteriormente, esta secuencia se clonó en el plásmido pRSETa (Invitrogen, S.Diego,Ca) de manera que en su N-terminal llevara unido un taq de H, y se expresó finalmente en *E.coli* BL21 DE3. Para su expresión, las bacterias se crecieron en 1 l de LB con ampicilina a 37 ºC. Cuando la

OD_{600} el cultivo fue de 0.7, la temperatura se bajó a 28 ºC y se indujo la expresión añadiendo IPTG (100 mM). Las bacterias crecieron durante 6 h más antes de añadir de nuevo IPTG (100 mM) y de mantener el cultivo 16 h a 28 ºC. Finalmente, las células se centrifugaron y lisaron con 30 ml de tampón de lisis (20 mM Na_2HPO_4, 0.5 M NaCl, 6 M guanidinio HCl, pH 7.8). El lisado se sometió a 25 ciclos de sonicación a 300 W y luego se centrifugó a 20.000 g 30 min. El sobrenadante se aplicó a una columna de afinidad de Ni (ProBond™, Invitrogen) equilibrada con tampón de ligamiento (20 mM NaH_2PO_4, 0.5 M NaCl, 8 M urea, pH 7.8). Tras lavado de la columna con tampón de lavado a pH 6 según instrucciones del fabricante y esta se eluyó con tampón de elución a pH 4. La concentración de las proteínas eluidas se siguió por absorbancia a 280 nm (AB_{280}). Las fracciones con los mayores valores de AB_{280} se mezclaron y se dializaron en 20 mM Tris a pH 4 para aumentar la solubilidad del frg11. Para aumentar la pureza de las fracciones eluidas separándolas de componentes de alto peso molecular, las muestras se pasaron por una columna de Sephadex G-100 en 20 mM Tris pH 4. La concentración y pureza del producto recombinante se determinó por medidas de absorbancia.

3.1.5. Péptidos sintéticos.

El taq de H (péptido amino-terminal añadido al frg11 recombinante por el plásmido pRSETa) MGGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKD (poliH), se sintetizó por Clontech (Palo Alto, California) y fue utilizado como control en todos los ensayos realizados con el frg 11, ya que los intentos de cortarlo del frg11 recombinante con enteroquinasa fueron infructuosos. Los péptidos identificados tras el cribado de la quimioteca de péptidos 17-mer, αp3 (SAAEASAKATAEAEAKG-NH_2), αp4 (SAAEASAKNTAEAEAKG-NH_2), αp5 (SAAEASAKATAEATAKG-NH_2), αp6 (SAAEASAKNTAEATAKG-NH_2) así como el péptido control de secuencia al azar αp28 (SAAEASAKNTAEATAKG-NH_2), se sintetizaron químicamente por Diverdrugs S.L (Barcelona, España). El grado de pureza de los péptidos

fue en todos los casos superior al 95%. Todos se disolvieron a una concentración de 4 µg/µl en DMSO 50%.

3.1.6. Anticuerpos utilizados.

El AcMo de ratón anti-tubulina-α bovina fue suministrado por Molecular Probes (Leiden, Holanda). El AcMo de ratón anti-GFP B-2 fue suministrado por Santa Cruz Biotechnology, Inc. (California). El AcPo de conejo anti-IGs de ratón conjugado con la enzima peroxidasa (RAM-Po), el AcPo de cabra anti-Igs de ratón conjugado con la enzima peroxidasa (GAM-Po), el AcPo de conejo anti-Igs de ratón conjugado con fluoresceína (RAM-FITC), y el AcPo de conejo anti-IGs de ratón conjugado con isotiocianato de tetrametilrodamina (RAM-TRITC) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Missouri, USA). Los AcMo anti-G_{VHSV} I10 (Fernandez-Alonso et al., 1998) , I16 e IH10 (Sanz and Coll, 1992), IP1H3 (Fernandez-Alonso et al., 1998), C10 (Bearzotti et al., 1995b; Gaudin, de Kinkelin, and Benmansour, 1999), 3F1A12 (Lorenzen, Olesen, and Vestergaard-Jorgensen, 1990), los AcMo anti-N_{VHSV} 2C9 (Sanz et al., 1993) y 2D5 (Sanz et al., 1993), el AcPo anti-VHSV B (Fernandez-Alonso et al., 1998), el AcPo anti-G_{VHSV} E (Fernandez-Alonso et al., 1998), el AcMo anti-$M1_{VHSV}$ 1C10 (Sanz et al., 1993) y el AcMo anti-$M2_{VHSV}$ 4E4 (Sanz et al., 1993), fueron suministrados por el Dr. Julio Coll (INIA-Madrid).

3.2. ENSAYOS BIOFÍSICOS

3.2.1. Preparación de liposomas.

Los fosfolípidos (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) ácido fosfatídico (PA), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (G), fosfatidilcolina (PC), 1,2-Dimiristoil-sn-3-ácido fosfatídico (DMPA), 1,2-Dimiristoil-sn-3-fosfatidilserina (DMPS) y 1,2-Dimiristoil-sn-3-fosfatidilcolina (DMPC) disueltos en cloroformo/metanol (vol 2:1) se depositaron en un tubo de ensayo. Los disolventes se eliminaron por evaporación bajo un flujo de nitrógeno libre de oxígeno y seguidamente vacío durante 3 h (Estepa and Coll, 1996a; Estepa and Coll, 1996b). Para la formación de MLVs (Multilamelar Lamelar Vesicles) se resuspendió el lípido seco en NaCl 100 mM, MES 5 mM, citrato sódico 5 mM, Tris 5 mM, EDTA 1 mM a una

concentración de 1 mg/ml. Los MLVs se sometieron a 5 ciclos de congelación y descongelación con la finalidad de asegurar una completa hidratación y mezcla de los fosfolípidos. Por último, para conseguir LUVs (Large Unilamelar Vesicles) se sometió la suspensión de MLVs a 19 ciclos de extrusión (LiposoFasttm) con filtros de policarbonato con un tamaño de poro de 100 nm (Avestin Inc.). En todos los experimentos la concentración de fosfolípidos utilizada fue de 0.14 mM.

3.2.2. Ensayos de agregación de liposomas.

Las variaciones en la densidad óptica a 360 nm (OD_{360}) ocurridas en la suspensión de fosfolípidos como consecuencia de la adición del frg11, αp5, αp6 y αp28 se valoraron después de 1 h de incubación a 37 ºC con un espectrofotómetro Beckman DU-7. Para valorar la OD_{360} del péptido y los liposomas por separado, se prepararon disoluciones control de estos reactivos en DMSO a una concentración final de solvente orgánico igual a la empleada en los ensayos de agregación propiamente dichos (Nunez et al., 1998)

3.2.3. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (IR).

El análisis estructural de los αp5, αp6, αp28 y frg11, disueltos en D_2O:DMSO (9:1) se llevó a cabo en presencia o ausencia de liposomas (preparados según metodología descrita anteriormente) de DMPA, DMPC y DMPS. El tampón utilizado para estos ensayos fue D_2O pH 7.0 o 5.6 tamponada con 10 mM HEPES, 10 mM MES, 130 mM KCl, 20 mM NaCl. Los ensayos en presencia de lípido se llevaron a cabo a una relación lípido-péptido 20:1. En ausencia de lípido, se utilizó una concentración de péptido de 6 µM añadiéndose o no (según se indica) 40% trifluoroetanol. Las muestras se depositaron entre dos ventanas de CaF_2 separadas por un espaciador de teflón de 50 µm de grosor y colocadas en una celda desmontable Harrick Ossining. Los espectros IR se obtuvieron en un espectrofotómetro Nicolet 520 equipado con un detector de sulfato de triglicina deuterado. En ausencia de lípido se estudió la región correspondiente a la banda amida I y en presencia de liposomas se

estudió la influencia de los péptidos sobre la temperatura de transición tras analizar la banda correspondiente a los CH_2. El análisis de los espectros se llevó a cabo según se describió anteriormente (Encinar et al., 1998a; Encinar et al., 1998b; Nunez et al., 1998).

3.2.4. Microcalorimetría de barrido.

Para la realización de este tipo de ensayos se prepararon liposomas (según metodología descrita anteriormente) de DMPA, DMPC y DMPS que se mantuvieron una noche a 4 ºC para asegurar su completa hidratación. Los termogramas se obtuvieron con un Microcal MC-2 differential scanning microcalorimeter, equipado con una interfase digital DA-2. Los péptidos αp5 y αp6, resuspendidos en un solución D_2O:DMSO (9:1), se adicionaron a las preparaciones de fosfolípidos en un relación lípido-péptido 20:1. En la célula de referencia el correspondiente tampón se equilibró a unos 10 ºC durante 15 min en el microcalorímetro antes de comenzar el barrido. Las diferencias entre la capacidad calorífica de las muestras y la célula de referencia se obtuvieron variando la temperatura a una velocidad constante de 45 ºC/h. Las temperaturas de transición y entalpías se calcularon ajustando las transiciones a una componente simple de Van.'t Hoff. Se registraron en los termográmas aquellas temperaturas de transición que se correspondieron con los máximos de capacidad calorífica (Nunez et al., 1998).

3.2.5. Dicroísmo circular (CD).

El frg11 (5 mg/ml en trifluoroetanol) se resuspendió en tampón de dilución (100 mM NaCl, 5 mM Tris, 5 mM citrato, 5 mM MES, 1 mM EDTA) al pH adecuado a una concentración final de de 32.5 μM. Las muestras en este caso se resuspendieron en trifluoroetanol porque el DMSO posee una absorbancia muy elevada a las longitudes de onda utilizadas en este tipo de ensayos. El efecto de la interacción con vesículas de PS sobre la conformación del frg11 se determinó por adición de cantidades crecientes de PS. Después de una hora de incubación a 37 ºC las mezclas frg11-PS se sonicaron (sonicador de baño) y las soluciones obtenidas fueron analizadas por DC. Los espectros de DC se realizaron con un dicrógrafo

JASCO 715 a 25 ºC en cubetas de 1 mm de longitud y a una velocidad de escáner de 0.5 nm/s. La temperatura de la cubeta se mantuvo con un baño con recirculación de agua (Neslab RTE-111). De cada muestra se obtuvieron cuatro espectros. La deconvolución de los datos de DC se realizó de acuerdo con el método “convex constraint analysis” (Nunez et al., 1998).

3.3. ENSAYOS DE ELISA

3.3.1. Valoración de la interacción entre el VHSV, la G_{VHSV} o péptidos sintéticos y los αp inmovilizados en fase sólida.

Para estudiar la interacción de αp en fase sólida con VHSV o GVHSV en fase soluble, los pocillos de placas de poliestireno de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA, USA) se tapizaron durante toda la noche a 37ºC con 1 µg/pocillo de αp3, αp4, αp5, αp6, αp28. Posteriormente, se bloquearon durante 2 h a temperatura ambiente con 2 % de leche Molico en polvo en PBS- (PBS sin Ca++ y Mg++, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM HNa_2HPO_4 y 1,5 mM H_2KPO_4, pH 7,4). Seguidamente se incubaron durante 1 h a 14 ºC con 1 µg/pocillo de VHSV purificado o 3 µg/pocillo de GVHSV soluble purificada a partir de sobrenadantes de células EPC infectadas con VHSV (Perez, Estepa, and Coll, 1998) diluidos (100 µl/pocillo) en tampón diluciones de ELISA pH 7.4 o pH 5.6 (PBS-, 0.1% Tween-20, 0.01% Mertiolato, 0.005 % Rojo fenol, 0.3% Suero de conejo, 0.5% BSA). En los ensayos con G_{VHSV} soluble la incubación se hizo en presencia (1.25-100 µg/pocillo) o ausencia de p24, p25, p26 (péptidos estimuladores obtenidos del pepscan 15-mer), frg11, αp5 o αp28. Transcurrida esta incubación, en los ensayos con VHSV purificado, los pocillos se lavaron 3 veces por baño/inmersión en H_2O y se incubaron durante 1 h 30 min a 14 ºC con una dilución 1:1500 del AcMo anti-N_{VHSV} 2C9 (Sanz et al., 1993). En los ensayos de GVHSV, esta incubación se realizó durante 60 min a 14 ºC con una dilución 1:200 del cóctel de AcMo anti-G_{VHSV} C10 (Bearzotti et al., 1995b; Gaudin, de Kinkelin, and Benmansour, 1999), 3F1A12 (Lorenzen, Olesen, and Vestergaard-Jorgensen, 1990), IP1H3 (Fernandez-Alonso et al., 1998) y I10, una dilución 1:200 del AcPo B, o una dilución 1:200 del AcMo C10 (Bearzotti et al., 1995b; Gaudin, de Kinkelin, and Benmansour, 1999). Todos las diluciones mencionadas de los Ac se realizaron en tampón de ELISA pH 7.4 y en volumen final de 100 µl/pocillo. Una vez concluida estas incubaciones, los pocillos se lavaron 2 veces por baño/inmersión en H_2O y se incubaron durante 45 min con 100 µl/pocillo de una dilución 1:500 de GAM-Po (Sigma,

Missouri, IN USA) en tampón ELISA pH 7.4. Tras 3 lavados por baño/inmersión con H2O, los pocillos se revelaron añadiendo 100 µl/pocillo de 1 mg/ml de orto-fenilendiamina (OPD, Dakopatts, Dinamarca) disueltas en tampón sustrato pH 4.8 (150 mM citrato sódico, 3 mM H_2O_2, 0,24 mM mertiolato) (Coll, 1989) dejando el desarrollo de color durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se frenó la reacción con 100 µl/pocillo 2 M H_2SO_4 y se leyó la absorbancia de las placas en un lector Anthos 2001(10-500) a 492 y a 620 nm. La Abs_{620nm} se utilizó para corregir diferencias individuales de absorbancia entre pocillos. Los resultados se expresaron como $Abs_{492-620nm}$ (Martinez and Coll, 1987; Martinez and Coll, 1988).

Para estudiar la interacción de los péptidos de pepscans de la GVHSV en fase sólida con αp5-biotinilado (αp-biot) en fase soluble, los pocillos se tapizaron durante toda la noche a 37 ºC con 30 nmol/pocillo de los péptidos correspondientes a los 2 pepscans de la G_{VHSV}. Tras bloquear los pocillos, se añadieron 100 µl/pocillo de 3 µM (0.5 µg/pocillo) αp5-biot. El αp5-biot se obtuvo con el Biotin labelled kit de Roche, siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente y tras 3 lavados de la placa por baño/inmersión en H2O destilada, los pocillos se incubaron 30 min a temperatura ambiente con una dilución 1:200 de estreptavidina marcada con peroxidasa. Finalmente, y tras 3 lavados por baño/inmersión con H_2O destilada, se añadió la OPD, registrándose la $Abs_{492-620nm}$.

3.3.2. Interacción entre AcMo anti-GVHSV y la G_{VHSV} presente en la superficie de los viriones de VHSV tratados con αp e inmovilizados en fase sólida.

Para estudiar si la incubación del VHSV con los αp modificaba el patrón de reconocimiento de la G_{VHSV} presente en la superficie del virión por los AcMo anti-GVHSV, los pocillos se tapizaron durante toda la noche a 14 ºC con 100 µl/pocillo de 10 µg/ml de VHSV concentrado sin tratar o previamente tratado durante 3h con 0.375 o 3 µM de αp5. Una vez bloqueados los pocillos, se incubaron durante 90 min a temperatura ambiente con 100 µl/pocillo de diluciones 1:600 del AcMo anti-G_{VHSV} C10 (Bearzotti et al., 1995b; Gaudin, de Kinkelin, and Benmansour, 1999),

1:400 del AcMo anti-G_{VHSV} 3F1A12 (Lorenzen, Olesen, and Vestergaard-Jorgensen, 1990), 1:200 del AcMo anti-G_{VHSV} IH10 (Sanz and Coll, 1992), 1:200 del AcMo anti-G_{VHSV} IP1H3 (Fernandez-Alonso et al., 1998) o 1:1000 del AcMo anti-N_{VHSV} 2D5. Todos las diluciones mencionadas de los AcMo se realizaron en tampón de ELISA pH 7.4 y en 100 µl/pocillo. Tras la incubación con los AcMo y una vez lavados los pocillos, se adicionaron durante 45 min 100 µl/pocillo de una dilución 1:500 de GAM-Po en tampón ELISA pH 7.4. Finalmente tras los lavados correspondientes y la adición de OPD, se leyeron las $Abs_{492-620nm}$.

Para estudiar el reconocimiento de la GVHSV a pH 7.5 y 6.5 por los AcMo anti-GVHSV a distintos pH, los pocillos se tapizaron con 100 µl/pocillo de 10 µg/ml VHSV purificado. Después se incubaron a pH 7.5 o 6.5 durante 30 min a 14 ºC. La adición de 1:600 del AcMo C10 (Bearzotti et al., 1995b; Gaudin, de Kinkelin, and Benmansour, 1999) y 1:400 del 3F1A12 (Lorenzen, Olesen, and Vestergaard-Jorgensen, 1990) se llevó a cabo en un rango de pH de 5.0-7.4. Para ajustar el pH del tampón de ELISA, se añadió 20 mM de HEPES y MES. Finalmente tras los lavados correspondientes y la adición de OPD, se leyeron las $Abs_{492-620nm.}$

Otros detalles de cada experimento se dan en los pies de cada ilustración.

3.4. ENSAYOS CELULARES.

3.4.1. Líneas celulares

- **EPC y EPC-eGFP**

La línea celular derivada de carpa EPC (Fijan et al., 1983) se utilizo en la mayoría de los ensayos. Las células EPC se mantuvieron en frascos de cultivo de 75 cm^2 de superficie (Costar) (~ 25 millones de células EPC) a 28 ºC en una atmósfera de 5 % de CO_2. en medio RPMI-1640 modificado por Dutch con 20 mM HEPES (290 mOsm/Kg) (Gibco BRL-Invitrogen, Barcelona, España), 10% de suero fetal bovino (SFB, Linus-Cultek, Madrid, España), 2 mM de glutamina (Gibco BRL), 1 mM de piruvato sódico (Gibco BRL), 50 µg/ml de gentamicina (Gibco BRL) y 1,2 µg/ml de anfotericina (Gibco BRL) (Estepa, Frias, and Coll,

1992; Estepa, Frías, and Coll, 1992). Para subcultivarlas, las células se despegaron de los frascos con una solución de 0.05 % de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) y se diluyeron 1/3 - 1/5 con medio de cultivo al volumen necesario para sembrar los nuevos frascos o placas. La línea EPC-eGFP (Falco et al 2007) se obtuvo por cotransfección de la células EPC con los plásmidos pCMV-eGFP y pAE6-pac (pac, gen de resistencia a puromicina) de acuerdo con protocolos previamente desarrollados en el laboratorio [Brocal, 2006 #3753]. El mantenimiento y subcultivo de las células EPC-GFP se llevó a cabo de igual modo que el de las EPC.

- **RTG-2**

La línea celular de origen fibroblástico derivada de trucha RTG-2 se mantuvo en frascos de cultivo de 75 cm^2 de superficie (Costar) (~ 12 millones de células RTG-2) a 20 ºC en una atmósfera de 5 % de CO_2 en medio E-MEM (Sigma-Aldrich) suplementado con 10 % SFB (Linus), 2 mM de glutamina (Gibco BRL) y 50 µg/ml de gentamicina (Gibco BRL). Para subcultivarlas, las células se despegaron de los frascos con una solución de 0.05 % de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich), y se diluyeron 1/3 con medio de cultivo al volumen necesario para sembrar nuevos frascos o placas.

- **BHK-21 y clon BSR**

Las células BHK y el clon BSR derivado de ellas se mantuvieron a 37 ºC en 5 % de CO_2 en frascos de cultivo de 75 cm^2 de superficie (Costar) en medio G-MEM (Gibco BRL) suplementado con 5 % de SFB (Biowhittaker), 10% de medio triptosa fosfato (Gibco BRL), 20 mM Hepes (BioWhittaker), 2 mM de glutamina (BioWhittaker), 0.1 µg/ml de de penicilina y 0.1 µg/ml de estreptomicina (Biowhittaker). Se utilizaron frascos de 75 cm^2 de superficie (Costar) y placas de 6 pocillos (Costar). Para subcultivarlas, las células se despegaron de los frascos con una solución de 0.05 % tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) y se diluyeron de 1/10 a 1/20 con medio de cultivo al volumen necesario para sembrar nuevos frascos o placas.

3.4.2. Ensayos de viabilidad celular.

La viabilidad celular de las células EPC en respuesta a distintos tratamientos (DKPs e inhibidores de la endocitosis) se estimó con el kit Cell Titer 96 (Promega, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello las células se crecieron pocillos de placas de 96 pocillos hasta 100 % confluencia y se incubaron con los compuestos en un volumen de 100 µl/pocillo La incubación con las DKP se realizó durante 48 h a 28 ºC y en un rango de concentraciones de 0-400 µM. La incubación con los inhibidores de la endocitosis se realizó durante 2 h 30 min a 28 ºC con los siguientes rango de concentraciones: de 0-50 % para el DMSO (Merck), de 0-0.45 mM para la sacarosa (Sigma-Aldrich), y de 0-240 µM para la Citocalasina B (Sigma-Aldrich), Colchicina (Sigma-Aldrich), Nocodazol (Sigma-Aldrich) y Chlopromazina (Sigma Aldrich). Finalizada la incubación, se añadieron a las células 20 µl/pocillo de la mezcla de MTS/PMS (componentes del kit). Las células se incubaron durante 4 h a 28 ºC y finalmente se leyeron las Abs_{492nm} de cada pocillo. Los ensayos se realizaron por triplicados para los diferentes tratamientos y por hexaplicados para los controles de EPC no tratados. El valor de Abs_{492nm} registrado en los controles de células EPC fue de ~ 1.5 /pocillo.

3.4.3. Virus

- **VHSV**

El VHSV empleado en este trabajo fue el VHSV-07.71 (Bernard, LeBerre, and DeKinkelin, 1983; DeKinkelin and LeBerre, 1979; LeBerre, De Kinkelin, and Metzger, 1977) aislado en Francia de de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss* , Walbaum). La producción y titulación del VHSV se realizó en células EPC según la metodología previamente descrita por DeKinkelin et al (DeKinkelin and LeBerre, 1979). Brevemente, células EPC crecidas a 28 ºC tal y como se indico anteriormente se infectaron a con VHSV en medio de cultivo pH 7,5 con 2% de SFB a una multiplicidad de infección (moi) de 10^{-2}-10^{-4}. Las células infectadas se incubaron a 14 ºC hasta que se observó la lisis completa del tapiz celular (7-10 días). A continuación, los

sobrenadantes de estas células infectadas se clarificaron por centrifugación (3.000 x g, 20 min.) y se guardaron en alícuotas a –70ºC hasta su uso. Para su utilización en algunos ensayos, el VHSV procedente de sobrenadantes clarificados se concentró por ultracentrifugación a 100000 x g durante 45 min [Basurco, 1989 #5].

Además, también se produjo VHSV a partir de células RTG-2. Para ello, células RTG-2 crecidas hasta 100 % confluencia en botes de 75 cm^2 se infectaron con 0.04 ffu/célula de VHSV. Transcurridas 17 h de infección, el sobrenadante de infección se retiró y las células se recogieron con 5 ml de H_2O estéril. Posteriormente se sometieron a 3 ciclos de congelación/descongelación para lisar las células. Finalmente, los lisados se clarificaron por centrifugación a 6000 x g durante 30 min, guardándose el sobrenadante a -70 ºC hasta su uso.

El VHSV se titulo utilizando el ensayo de inmunoensayo de detección de focos (ffu.) descrito posteriormente en el apartado 3.4.7. Para ello, monocapas de células EPC crecidas hasta confluencia en pocillos de placas de 96 pocillos se infectaron con 100 µl/pocillo de distintas diluciones de VHSV. Las diluciones se hicieron en medio de cultivo pH 7,5 con 2 % SFB. Cada una de las diluciones se ensayó por triplicado. Transcurrido el tiempo de infección (24h), se retiro el medio, se lavaron las células infectadas y se tiñeron con el AcMo anti-N_{VHSV} 2C9 (Sanz et al., 1993) y DAB. Tras el recuento de los focos, se calculó el valor medio (n) de ffu/pocillo en la dilución del stock donde se obtuvo un número de focos por pocillo de ~100. El título en ffu/ml se calculó según la fórmula: (n x 1/ Dilución stock) x 10. Para el VHSV concentrado también se realizó una determinación del contenido total de proteínas víricas por el método de Bradford o comparación de geles teñidos de azul de Coomassie utilizando en ambos métodos patrones de concentración conocida. Tras la infección de 10 botes de 150 cm^2 de células EPC, se obtuvieron 500 µl de VHSVc a una concentración de proteína vírica de ~ 5 µg/µl.

- **IHNV**

La cepa del IHNV empleada fue un aislado de salmón chinnok (*Oncorhynchus tshawytscha*) (código ATCC, VR-714). La producción y titulación se realizó utilizando la misma línea celular y el mismo protocolo que el descrito anteriormente para VHSV pero en este caso el virus se título 48 h post-infección (p.i.) y para su detección se empleo un cóctel de AcMo anti-N_{IHNV} (Ristow and Arnzen, 1991) compuesto por los AcMo 1NH17W, 2NCO42C, 2NH105B, 1NCO27G y 14D.

- **IPNV**

La cepa de IPNV utilizada fue el aislado de trucha IPNV-Sp (código ATCC, VR-1318). La producción y titulación de IPNV se realizó siguiendo la metodología descrita anteriormente pero en este caso se utilizó la línea celular RTG-2, el virus se título 36 h p.i. y para su detección se empleo el AcMo anti-IPNV 2F12 (Dominguez, Hedrick, and Sanchez-Vizcaino, 1990).

- **VSV**

El VSV utilizado fue el aislado Orsay del serotipo Indiana (Gibson, Schlesinger, and Kornfeld, 1979). La propagación del virus se realizó en el clon BSR. La titulación de los stocks producidos se llevaron a cabo por ensayos de formación de placas (tiempo de infección de 24 h).

- **SFV**

El SFV utilizado fue amablemente cedido por el Dr. Rafael Blasco (INIA-Madrid). La propagación del virus se realizó en la línea celular BHK-21. La titulación de los stocks producidos se llevaron a cabo por ensayos de formación de placas (tiempo de infección de 48 h).

3.4.4. Ensayos de formación de focos (ffu)

Células EPC o RTG-2, crecidas hasta 100 % de confluencia en pocillos de placas de 96 pocillos (~100000 células EPC/pocillo y 75000

células RTG-2/pocillo) (Lorenzo, Estepa, and Coll, 1996), se infectaron con VHSV, IHNV o IPNV en un volumen de 100 µl/pocillo del medio de cultivo específico para el mantenimiento de cada línea celular pH 7,5 con 2 % de SFB. Dependiendo del ensayo, los virus fueron o no pre-tratados con diferentes compuestos y según el caso las infecciones se realizaron en presencia o ausencia de inhibidores/activadores de la infección. Salvo cuando se indique, las infecciones se realizaron a 14ºC y los inóculos no se retiraron durante el periodo de infección que varió según el ensayo. En los ensayos encaminados a valorar la influencia del pH en la infectividad del VHSV, el medio de cultivo se tamponó con 20 mM de MES para poder ajustar fácilmente el pH a los valores deseados. Tras el periodo de infección, se retiraron los sobrenadantes y las monocapas de células infectadas se lavaron con PBS^+, se fijaron (10 min.) con 100 µ/pocillo de metanol (Merck) pre-enfriado a -20 ºC y se dejaron secar.

Para la detección de los virus se utilizaron AcMo que reconocen específicamente uno de los antígenos víricos. Concretamente, el AcMo 2C9 (Sanz et al., 1993) anti-N_{VHSV} (dilución 1:1500) para la detección de VHSV, un cóctel de AcMo 1NH17W, 2NCO42C, 2NH105B, 1NCO27G, 14D (Ristow and Arnzen, 1991) anti- N_{IHNV} (dilución 1:1000) para la detección de IHNV y el AcMo 2F12 (Dominguez, Hedrick, and Sanchez-Vizcaino, 1990) anti-VP2 para la detección de IPNV (dilución 1:200). Los anticuerpos se diluyeron en tampón ELISA pH 7.4 (PBS^-, 0.1% Tween-20, 0.01% Mertiolato, 0.005 % Rojo fenol, 0.3% Suero de conejo, 0.5% BSA) y se adicionaron en un volumen final de 100 µl/pocillo. Tras 90 min de incubación a temperatura ambiente, las monocapas de células infectadas se lavaron 1 vez por baño/inmersión en H_2O destilada y se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente con 100 µl/pocillo de RAM-Po (Sigma-Aldrich) diluido 1:300 en tampón ELISA pH 7.4. Finalmente, una vez retirado el RAM-Po y después de 3 lavados por baño/inmersión en H_2O destilada, se adicionó DAB (Sigma-Aldrich) (0.8 mg/ml en PBS pH 6.5, 0.1 % de H_2O_2) y se espero hasta observar, con la ayuda de un microscopio invertido (Leica DM IRB) provisto de un ocular x10, la aparición de focos marrones de células teñidas con DAB

(grupos o focos de células infectadas) y/o de células marrones teñidas con DAB (células infectadas aisladas). Una vez lavadas y secadas las placas, se contó el número de focos/células marrones por pocillo utilizando el microscopio anteriormente citado. Cuando fue necesario, además del número de focos por pocillo se estimó el tamaño de los focos (numero de células infectadas en cada foco) y para ello se realizó un recuento del número de células presentes en cada foco en 50-100 focos/pocillo. Las fotografías se tomaron con la cámara Leica DC 250 utilizando el software Qfluoro Leica V1.2.

En ocasiones los focos de células infectadas con VHSV se detectaron por inmunofluorescencia tal y como se describe posteriormente (apartado 3.4.8).

3.4.5. Ensayos de formación de placas (pfu)

- **VHSV**

Los ensayos de formación de placas se utilizaron para titular el VHSV presente en extractos de células RTG-2 infectadas con este virus preparados tal y con se describe en el apartado 3.4.2 de este material y métodos. Monocapas de células EPC crecidas hasta 100% confluencia en pocillos de placas de 24 pocillos (~ 550000 células/pocillo) se infectaron con 200 µl/pocillo de diluciones seriadas extractos de células RTG-2 infectadas con VHSV. Tras 1 hora de incubación a 14 ºC, los inóculos se retiraron y se añadieron 500 µl/pocillo de medio RPMI-1640 pH 7,5, 20 mM HEPES, 20 mM MES, 2 % SFB y 0.75 % metilcelulosa (Sigma-Aldrich), prolongándose la infección hasta la aparición de placas (7-8 días). Las monocapas se fijaron y tiñeron con 0.1 % cristal violeta (Sigma-Aldrich). Finalmente, tras el recuento por inspección ocular de las unidades formadoras de placas (pfu/pocillo), se calculó el valor medio (n) de pfu/pocillo en la dilución donde se obtuvo un número de pfu/pocillo de ~100. El título en pfu/ml se calculó según la fórmula: n x 1/Dilución stock x 10 (Campbell and Wolf, 1969; Jorgensen et al., 1991; Okamoto, Shirakura, and T., 1985).

- **VSV y SFV**

Monocapas de células BSR o BHK-21 crecidas en pocillos de placas de 6 pocillos (~5 x 10^5 células/pocillo) se infectaron con inóculos de ~ 50 pfu/pocillo de VSV o SFV. Tras 1 h de incubación a 37 ºC, los inóculos se retiraron y las células se incubaron con medio de cultivo con 2 % SFB y 0.6 % de agarosa, prolongándose las infecciones durante 24 y 48 h para el VSV y SFV, respectivamente. Transcurrido el tiempo de infección, se retiró el medio con agarosa, y se lavaron las placas con PBS^+. Las células se fijaron con 4% paraformaldehído y seguidamente se tiñeron con 0.5 % de cristal violeta (Sigma-Aldrich) disuelto en formalina. Finalmente, se realizó un recuento por inspección ocular del número de unidades formadoras de placas (pfu/pocillo) obtenido (Wiktor et al., 1973). Las fotografías se tomaron con una cámara COHV High Performance CCD utilizando el programa Scion Image 4.0.2.

3.4.6. Ensayos de dilución límite ($TCID_{50}$)

Monocapas de células EPC crecidas hasta 100 % confluencia en pocillos de placas de 96 pocillos se infectaron con 100 µl/pocillo de diluciones seriadas de extractos de células RTG-2 infectadas con VHSV. Tras 1 hora de incubación a 14 ºC, los inóculos se retiraron y se añadieron 100 µl/pocillo de medio de cultivo pH 7,5 con 2 % SFB. La infección se prolongó hasta se observo efecto citopático (7-9 días) Un vez concluido el periodo de infección las monocapas se fijaron y se tiñeron con 0.1 % cristal violeta (Sigma-Aldrich) en formalina. La detección de lisis celular en cada uno de los 8 replicados de los diferentes inóculos se realizó por inspección ocular. El título de virus dosis infectivas en cultivo de tejido 50% ($TCID_{50}$ / ml) se calculó como el inverso de la última dilución con efecto citopático en el 50 % de los replicados (Hierholzer and Killington, 1996; Svensson, Hjalmarsson, and Everitt, 1999).

3.4.7. Ensayos de unión VHSV-células EPC

- **Marcaje de VHSV con biotina ($VSHV_B$)**

El marcaje de VHSV con biotina se realizó con el "Biotin-Protein Labeling kit" (Roche). Brevemente, 300 µl de una preparación stock de VHSVc con título de 1 x 10^{11} ffu/ml (~1500 µg/ml de proteína) se incubaron con 30 µg/µl de 7-NHS (20 mg/ml) durante 4 h a 14 ºC. A continuación, la mezcla se paso por una columna de Sephadex G-25 y se recogieron fracciones de 500 µl. La presencia de $VSHV_B$ en las fracciones se valoró por Western-blot utilizando para la detección estreptavidina marcada con peroxidasa (Sigma-Aldrich) y el kit comercial de luminiscencia ECL-Plus (Amersham Biosciences). Se comprobó que el ~ 95 % del marcaje del VHSV se localizó en la GVHSV por el desplazamiento de la banda de GVHSV hacia un peso molecular mayor en geles del 10 % de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie. Para comprobar posibles alteraciones de la GVHSV tras el marcaje, se determinó el título del $VHSV_B$ y el nivel de reconocimiento de la GVHSV presente en la superficie de los viriones marcados por los AcMo C10 y 3F1A12 (AcMo que reconocen conformación nativa de la GVHSV) por ELISA. El título del $VSHV_B$ fue de 8 x 10^{10} ffu/ml de un titulo inicial de 1 x 10^{11} ffu/ml. La $Abs_{492\text{-}620nm}$ obtenida por ELISA de ambos AcMo sobre 1 µg/pocillo de $VSHV_B$ en fase sólida fue el ~ 90 % de la obtenida antes de marcar con biotina. Por último se confirmó por citometría de flujo tal y como se describe posteriormente que el marcaje con biotina no alteraba significativamente al virus que la unión de 0.08 ffu/célula de $VHSV_B$ a las células EPC desapareció en presencia de un exceso de 1:20 de VHSV no marcado.

- **Ensayo de unión $VHSV_B$-células EPC**

Todos los ensayos de valoración de la unión del VHSV a las células (adsorción) se realizaron a 4ºC para permitir la unión virus-célula y evitar la internalización de la partícula vírica. Células EPC crecidas en pocillos de placas de 24 pocillos se incubaron con los distintos inóculos de $VHSV_B$ en un volumen de 150 µl/pocillo durante 1 h 30 min. Transcurrida esta incubación las células se lavaron 3 veces para retirar

el virus no unido con 0.5 ml/pocillo de PBS^+ pH 7.4 (0.9 mM $CaCl_2$, 0.5 mM $MgCl_2$ $6H_2O$, 138 mM NaCl, 2.67 mM KCl, 1.76 mM KH_2PO_4, 5.4 mM Na_2HPO_4) y se incubaron durante 45 min a 4 ºC con 300 µl/pocillo de una dilución 1:200 de estreptavidina-FITC (Sigma-Aldrich) en de medio RPMI-1640 sin suero Tras retirar la estreptavidina-FITC y dos lavados con 0.5 ml/pocillo PBS^- (138 mM NaCl, 2.67 mM KCl, 1.76 mM KH_2PO_4, 5.4 mM Na_2HPO_4), las células se recolectaron en un volumen de 1 ml/pocillo de $PBS.^-$ La fluorescencia asociada a las células se analizó por citometría de flujo utilizando el citómetro Coulter Epics XL (Becton Dickinson) y el programa de análisis el Expo 32 (Becton Dickison) . Se analizaron 25.000 células por pocillo. Se considero como "fluorescencia de fondo" el valor de fluorescencia asociado a células EPC incubadas no incubadas con $VSHV_B$ pero tratadas con estreptavidina-FITC.

- **Ensayo de unión VHSV-EPC-eGFP**

Por las mismas razones que en el caso anterior los ensayos se realizaron a 4ºC. Células EPC-eGFP crecidas en pocillos de placas de 6 pocillos (~ 3 x 10^6 células/pocillo) se incubaron con los distintos inóculos de VHSV en un volumen de 1 ml/pocillo durante 1 h 30 min. A continuación, las células se lavaron 3 veces con 2 ml/pocillo de PBS, se recolectaron en 2 ml/pocillo de PBS^- conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) y se centrifugaron a 1000 g durante 10 min. El pellet de células se resuspendió en 300 µl de tampón de muestras de electroforesis (0.12 M TrisHCl pH 6.8, 10 % glicerol, 250 mM β-mercaptoetanol/DTT, 2 % SDS, 0.02 % azul de Bromofenol). Las muestras a si preparadas se calentaron a 100 ºC durante 5 min y se guardaron a -20ºC hasta su uso. La presencia de virus asociado a células se analizó por western-blot utilizando una dilución 1/1500 del AcMo anti-N_{VHSV} 2C9 tal y como se describe posteriormente en el apartado 3.4.10. El AcMo anti-GFP (Santa-Cruz Biotechnology) (dilución 1/10.000) se utilizo para detectar la GFP asociada a cada muestra.

3.4.8. Influencia del pH del medio en las infecciones *in vitro* con VHSV

En un intento por esclarecer el efecto negativo de las variaciones de pH sobre la infectividad del VHSV, se estudio la influencia del pH en la producción de virus intracelular, estimada ésta como la acumulación de proteínas de VHSV en células infectadas a pH ácido y en comparación con las infectadas a pH 7,5. Para ello, células EPC crecidas hasta confluencia en frascos de 160 cm^2 (~ 50 millones de células EPC/ frasco) se infectaron a 14 ºC con VHSV (10 ffu/célula) en un volumen final de 7 ml/frasco de medio de cultivo pH 7,5 con 2 % de SFB y 20 mM MES. Dos h p.i, los inóculos se retiraron y las células se incubaron durante 22 h a 14 ºC con 50 ml/frasco de medio de cultivo a pH 7.5 o 6.5. Transcurrido el tiempo de infección, se retiraron los sobrenadantes, se lavaron los tapices de células infectadas y las células se levantaron de los frascos de cultivo con 10 ml/frasco de PBS^-. Seguidamente las células se centrifugaron a (1000 x g, 45 min, 4 ºC) y el pellet se resuspendió en 400 µl/frasco de tampón de muestras de electroforesis (0.12 M TrisHCl pH 6.8, 10 % glicerol, 250 mM β-mercaptoetanol/DTT, 2 % SDS y 0.02 % azul de Bromofenol). Las muestras así preparadas se calentaron a 100 ºC durante 5 min y se guardaron a -20ºC hasta su uso. La presencia de proteínas del virus en los extractos de células infectadas se analizó por western-blot tal y como se describe posteriormente en el apartado 3.4.10 utilizando Ac anti-VHSV, concretamente: AcPo anti-VHSV B (Fernandez-Alonso et al., 1998), el AcPo anti-G_{VHSV} E (Fernandez-Alonso et al., 1998), el AcMo anti-$M1_{VHSV}$ 1C10 (Sanz et al., 1993), el AcMo anti-$M2_{VHSV}$ 4E4 (Sanz et al., 1993), o el AcMo anti-N_{VHSV} 2C9 (Sanz et al., 1993). Todos los Ac se utilizaron a una dilución 1/200.

3.4.9. Efecto de la presencia de 6-DKP-14 durante las infecciones *in vitro* con VHSV en la producción de VHSV intra y extracelular

Para investigar el mecanismo mediante el cual algunas diketopiperazindionas son capaces de abolir la infectividad del VHSV en

cultivo celular, se realizaron infecciones *in vitro* en ausencia y presencia de 6-DKP-14. En estas infecciones se analizó la presencia de VHSV tanto en el interior de las células infectadas como en los sobrenadantes de infección con el fin de determinar si las DKPs permiten la producción de virus intracelular pero inhiben su salida o si por el contrario el virus sale de las células pero no es infectivo. Para ello, células EPC crecidas hasta 100 % confluencia en pocillos de 96 pocillos se infectaron con VHSV (1 ffu/célula) en un volumen de 100 µl/pocillo de medio de cultivo con 2 % de SFB 14 ºC. Dos h p.i. se retiraron los inóculos, se lavaron las células tres veces con PBS+ para eliminar el virus no internalizado, se añadió 6-DKP-14 (100 µM) y las células infectadas se incubaron 14 ºC durante 24 h más. Finalizada la infección, se retiraron los sobrenadantes, se clarificaron por centrifugación (1000 x g durante 10 min) y se diluyeron en tampón de muestras de electroforesis. Igualmente, se lavaron los tapices de células infectadas, se levantaron las células de los pocillos con 200 µl/pocillo de PBS^{-}.y se lisaron con 3 ciclos de congelación/descongelación. El lisado se clarificó por centrifugación (1000 x g durante 10 min) y el sobrenadante de centrifugación se resuspendió en tampón de muestra de proteínas. Las muestras así preparadas se calentaron a 100 ºC durante 5 min y se guardaron a -20ºC hasta su uso. La presencia de virus en los extractos de células infectadas y en los sobrenadantes de infección se analizó por western-blot tal y como se describe posteriormente en el apartado 3.4.10 utilizando una dilución 1/200 del AcPo B anti-VHSV (Fernandez-Alonso et al., 1998).

3.4.10. Ensayos de Western-blot

Para su análisis por western-blot, las muestras resuspendidas en tampón de muestras de electroforesis y sometidas a tratamiento térmico (100ºC, 5 min) se cargaron en pocillos de geles de del 15% de acrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). En todos los ensayos, los geles se hicieron por duplicado y en cada uno de los geles se incluyeron marcadores de peso molecular (BioRad, Richmond, California) y VHSV concentrado (1 µg/calle) para facilitar la posterior identificación de las

proteínas del virus. Tras la electroforesis (1 h 30 min a 100 V en tampón de electroforesis: 25 mM Tris base pH 8.6, 192 mM glicina, 0.1% SDS), uno de los geles se tiñó con azul de Coomassie (Merck) y el otro se transfirió (1 h a 100 V en tampón de transferencia:25 mM Tris base pH 8.6, 192 mM glicina y 20 % Metanol) a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon durante ~12 h a 4 ºC con BPLTER (PBS^-, 2% leche en polvo Molico, 0.05% Tween-20 y 0.3 % suero de conejo) y a continuación se incubaron durante 2 h a 4 ºC con los Ac Po anti-VHSV o los AcMo anti-proteínas de VHSV diluidos en BPLTER. Tras 1 lavado con BLPTER (10 min en agitación), las membranas se incubaron (45 min a temperatura ambiente) con una dilución 1:500 en BLPTER de RAM-Po (Sigma-Aldrich) y finalmente se lavaron 5 veces. La detección en el caso de las muestras procedentes de infecciones realizadas a distintos pHs se llevó a cabo con 1 mg/ml 4-cloro-1-naftol (Sigma-Aldrich) y 0.015 % H_2O_2 en PBS^-. La reacción con 4-cloro-1-naftol se frenó con lavados por baño/inmersión con H_2O destilada. Las membranas se fotografiaron con la cámara COHV High Performance CCD. La densitometría de las bandas detectadas con el AcPo B se llevó a cabo con el programa Scion Image 4.0.2. Para el resto de las muestras, se utilizó el kit comercial de luminiscencia ECL-Plus (Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el revelado se utilizaron Hyperfilms™ para ECL (Amersham Biosciences) y el procesador X-OMAT 1000 (Kodak). Las bandas se fotografiaron y se densitometraron con el programa Scion Image 4. En los ensayos encaminados a analizar la unión VHSV-EPC-eGFP, los valores de inmunoreactividad de N_{VSHV} obtenidos se corrigieron en función de la densitometría de las bandas de GFP (control interno), según la fórmula: inmunoreactividad de N_{VSHV} x inmunoreactividad de GFP / inmunoreactividad de GFP).

3.4.11. Inmunofluorescencias

La técnica de inmunofluorescencia indirecta se utilizo para detectar la presencia de G_{VHSV} (de membrana) o N_{VHSV} en células infectadas con

VHSV, así como para teñir los microtúbulos que forman parte del citoesqueleto de las células EPC.

- **Detección de las G_{VHSV} y N_{VHSV}**

Monocapas de células EPC o RTG-2, crecidas en placas de pocillos de 96, se infectaron con VHSV tal y como se describió anteriormente. Concluido el periodo de infección, las células se fijaron con 100 µl/pocillo CytoFix™ (BD biociences) cuando se quiso detectar la presencia de G_{VHSV} en la membrana de las células infectadas o con 100 µl/pocillo de metanol pre-enfriado a -20ºC cuando se quiso detectar en estas mismas células la N_{VHSV}. Una vez fijadas, las células se lavaron con PBS^- y se incubaron (90 min a temperatura ambiente) con 100 µl/pocillo de una dilución 1:1500 del AcMo 2D5 anti-N_{VHSV} (Sanz et al., 1993), o de una dilución 1:200 del cóctel de los AcMo anti-G_{VHSV} I16 + 3F1A12 o del AcMo 3F1A12 también anti-G_{VHSV}. Las diluciones de los Ac se realizaron en PBS^- 0.1 % BSA. Después de retirar los anticuerpos y lavar 200 µl/pocillo de PBS^-0.1 % BSA), las células se incubaron con (45 min a temperatura ambiente) 100 µl/pocillo de una dilución 1:200 de RAM-FITC (Sigma-Aldrich) en PBS^- 0.1 % BSA., 0.3% de suero de conejo (Sigma-Aldrich). Finalmente y tras 5 lavados (200 µl/pocillo PBS^- 0.1 % BSA), se adicionaron 100 µl/pocillo de PBS y la fluorescencia se visualizó utilizando un microscopio invertido de fluorescencia (Leica DM IRB) equipado con una cámara digital (Leica DC 250) utilizando el software Qfluoro Leica V1.2.

- **Tinción de microtúbulos**

Monocapas de células EPC crecidas a un 50-70 % de confluencia en pocillos de placas de 96 pocillos, se incubaron durante 30 min a 14 ºC con 100 µl/pocillo de medio de cultivo con 2 % SFB en ausencia o presencia de 2.5 % DMSO (Merck), 30 µM Citocalasina B (Sigma Aldrich), 240 µM Colchicina (Sigma-Aldrich) o 50 µM Nocodazol (Sigma-Aldrich). Seguidamente, las monocapas se lavaron, fijaron con 100 µl/pocillo de CytoFix™ (BD Biociences) (15 min a temperatura ambiente). A continuación las células se lavaron con 200 µl/pocillo de

PBS$^-$, se permeabilizaron con 100 µl/pocillo de 0.1 % de Tritón X-100 (Merck) en PBS$^-$(15 min a temperatura ambiente), se volvieron a lavar con. con 200 µl/pocillo de PBS$^-$, y finalmente se incubaron (6 h a temperatura ambiente) con 100 µl/pocillo del AcMo anti-Tubulin (Molecular Probes) a una concentración de 1 µg/ml PBS. Seguidamente, y previo lavado con 200 µl/pocillo de PBS-, las células se incubaron con una dilución 1:200 de RAM-TRITC (Sigma-Aldrich) en PBS-. Tras 3 lavados con 200 µl/pocillo de PBS$^-$, las células se resuspendieron en 100 µl/pocillo de PBS y se visualizaron con el microscopio invertido de fluorescencia Eclipse T2000-U (Nikon) equipado con una cámara digital (DS-1Qm/H (Nikon)) utilizando el software NIS-elements AR 2.20 (Nikon).

3.4.12. Marcaje de elementos celulares

- **Filamentos de actina**

Células EPC, crecidas a un 50-70 % de confluencia en "cubres" de cristal depositados en el fondo de pocillos de de 6 pocillos, se incubaron (30 min a 14 ºC) con 1 ml/pocillo de medio de cultivo con 2 % SFB en ausencia o presencia de 2.5 % DMSO (Merck), 30 µM Citocalasina B (Sigma Aldrich) (Gottlieb et al., 1993), 240 µM Colchicina (Sigma-Aldrich) o 50 µM Nocodazol (Sigma-Aldrich)(Kizhatil and Albritton, 1997). Seguidamente, las células se lavaron y fijaron (15 min) con 1 ml/pocillo de 3.7 % formaldehído. A continuación se lavaron con 3 ml/pocillo de PBS$^-$ y se permeabilizaron (15 min a temperatura ambiente.) con 3 ml/pocillo de 0.1 % de Tritón X-100 (Merck) en PBS. Después de lavar con 3 ml/pocillo de PBS$^-$, las células se incubaron (3 h a temperatura ambiente) con 1 ml/pocillo de 40 µM phalloidin–FITC (Sigma-Aldrich) en PBS y se volvieron lavar 3 veces (3 ml/pocillo de PBS$^-$). Finalmente, los cubres con células se sacaron de los pocillos de las placas, se montaron sobre portaobjetos utilizando medio de montaje Vectashield H-1000 y las células se visualizaron con el microscopio confocal LSM 5 PASCAL (Zeiss).

- **Endosomas**

Células EPC crecidas hasta 100 % de confluencia en pocillos de placas de 24 pocillos, se incubaron con 500 µl/pocillo de medio de cultivo con 2 % SFB en ausencia o presencia de 40 mM de NH_4Cl durante 5 min a 14 ºC. Seguidamente y sin retirar el medio, se adicionó el fluoróforo Lysotracker-Green DND-26 (Molecular Probes, Oregon, USA) a una concentración de 0.5 µM (5 min a 14 ºC). Después, las células se lavaron con 500 µl/pocillo de PBS- , se despegaron de los pocillos y la florescencia se analizó por citometría de flujo (25000 células/pocillo). El valor de fluorescencia de células EPC sin incubar con el Lysotacker-Green se utilizó como valor de fluorescencia de fondo del ensayo.

3.4.13. Análisis de la expresión de ARNms de las GVHSV y N_{VSHV} por RT-PCR.

Células EPC, crecidas hasta 100 % de confluencia en frascos de 160 cm^2 (~5 10^7 células/frasco), se infectaron con VHSV (5 ffu/célula) en un volumen de 7 ml de medio de cultivo con 2% de SFB a pH 7.5 o 6.5. Dieciocho horas p.i. se retiro el medio de cultivo, se lavaron las monocapas de células infectadas con PBS y se extrajo el ARN total utilizando el kit “Total RNA Isolation System" (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración total de ARN se determinó por densidad óptica a 260 nm y se utilizaron 2µg en la obtención de ADNc. De manera resumida, el ARN se incubó con 1 µl de “random hexamers” (50 µM) (Roche) y 1µl de una mezcla de desoxinucleótidos trifosforilados (dNTPs) durante 5 min a 65 ºC. Tras la incubación, se añadieron 4 µl de tampón de reacción “first strand buffer” (250 mM TrisHCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$), 2µl ditrioeritrol (DTT) 0.1 M y 1µl de transcriptasa inversa (RT)del virus de la leucemia murina (M-MLV RT, Gibco). La reacción de transcripción inversa se dejo transcurrir durante 50 min a 42°C y se detuvo a continuación sometiendo la mezcla de reacción a 70°C durante 15 min. El ADNc resultante se guardo a –20ºC hasta su uso.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron cebadores específicos de las secuencias de las GVHSV y N_{VSHV} (GVHSV-ida ATGGAATGGAACACTTTTTTCTTGGTG y GVHSV-vuelta GGTGACTCGATAAGTCACTCTGTGCAG; N_{VSHV}-ida GAAGATAGGAAGGTGATTGTGG y N_{VSHV}-vuelta GAGTTTCCTGATGGCTGCCTTG (vuelta).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μl, conteniendo dNTPs (200 μM de cada desoxinucleótido trifosfato), 0.1 μM de cada cebador y 2 unidades de la Taq polimerasa (Roche) y 2 μl de ADNc. La amplificación se llevo a cabo en el GenAmp PCR system 2700 cycler y las condiciones de amplificación fueron: 5 min. a 94 ºC ; 30 ciclos: 1 min a 94 ºC; 1 min a 52ºC y 2 min a 72 ºC; 7 min a72 ºC. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa (1 %) teñidos con bromuro de etidio.

3.4.14. Estimación de la fusión mediada por la G_{VHSV} con ensayos de formación de sincitios.

Los ensayos de formación de sincitios se utilizaron para analizar la capacidad fusogénica de la GVHSV presente en la superficie de células infectadas con VHSV o en la superficie de los viriones tras distintos tratamientos.

- **Formación de sincitios mediada por la G_{VHSV} presente en la superficie de células infectadas con VHSV ("fusion from within")**

El ensayo de formación de sincitios a pH ácido mediado por la GVHSV entre células infectadas con VHSV y que por lo tanto expresan esta proteína en la superficie celular se realizo de acuerdo con la metodología previamente descrita (Estepa and Coll, 1997; Rocha et al., 2004b). De manera resumida, células EPC crecidas hasta 100 % confluencia en pocillos de placas de 96 pocillos (~100000 células/pocillo), se infectaron con VHSV en un volumen final de 100 µl/pocillo de medio de cultivo con 2% SFB y 20 mM MES. Veinticuatro

horas p.i se retiraron los sobrenadantes, se trataron las células infectadas con αp5 (2 h 4ºC a una concentración de péptido de 3 μM) se lavaron las células con 100 μl/pocillo de PBS^+ y se indujo la fusión entre las células infectadas añadiendo 100 μl/pocillo de medio de fusión (RPMI-1640, 2 % de SFB 20 mM HEPES y 20 mM MES) a diferentes pH (5.5-8.0). Tras 30 min incubación a 14ºC, las células se lavaron con 100 μl/pocillo de PBS^+ y se incubaron durante 2 h 30 min a temperatura ambiente con 100 μl/pocillo de medio de fusión a pH 7.5. Finalmente, las células se fijaron durante 15 min con 100 μl/pocillo de metanol frío y se dejaron secar a temperatura ambiente y se tiñeron durante 30 min en oscuridad con un solución en PBS^- del colorante Giemsa (Merck) 5 mg/ml (Estepa and Coll, 1997; Rocha et al., 2004b). La extensión de la fusión se estimo por recuento con un ocular 20x de un microscopio invertido (Leica DM IRB) del número de núcleos en sincitios de tres o más núcleos. Se contaron unos 10.000 núcleos/pocillo. Los sincitios se fotografiaron con una cámara digital (Leica DC 250) acoplada al microscopio invertido.

- **Formación de sincitios mediada por la G_{VHSV} presente en la superficie de los viriones ("fusion from without")**

Células EPC crecidas hasta 100 % confluencia en pocillos de placas de 96 pocillos se incubaron durante 1 h a 4 ºC con 2.5 x 10^3 ffu/célula de VHSV tratado o no de manera previa a la infección con αp5 (4 h a 14 ºC con 3 μM) en un volumen final de 100 μl/pocillo de medio de cultivo con 2% SFB. Tras tres lavados con PBS pre-enfriado 4 ºC para retirar el virus no unido, se indujo y valoró la fusión tal y como se describe en los ensayos de formación de sincitios entre células infectadas con VHSV.

3.4.15. Translocación de PS inducida por el frg 11 de la cara interna a la externa de la membrana plasmática.

La exposición de PS inducida por el frg11 se analizó por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia en células EPC que como cualquier membrana biológica modelo presenta una distribución

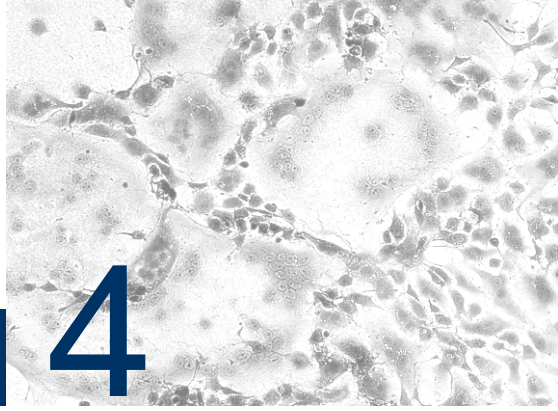
asimétrica del contenido en PS (mayoritario en la cara interna) [Estepa, 2001 #1513]. Células EPC crecidas hasta 100 % confluencia en pocillos de placas de 24 pocillos se incubaron durante 1 h a 14 ºC con diferentes concentraciones de frg11en un volumen final de 300 µl/pocillo de RPMI 1640 (sin bicarbonato tamponado con 20 mM HEPES y 20 mM MES a pH 6. No se realizaron incubaciones con medio de cultivo a pH inferiores para evitar que las células se desprendieran de los pocillos. La exposición de PS en la cara externa de la membrana plasmática se estimó incubando las células tratadas con el frg11 durante 15 min con 10 µg/ml anexina V marcada con fluoresceína FITC (Clontech) y 5 µg/ml de ioduro de propidio (IP). Se utilizó IP para no contabilizar en el análisis, si las hubiere, células en apoptosis que también PS en la cara externa de la membrana. Tras la tinción, las células se lavaron tres veces con PBS+ y levantaron de los pocillos con PBS^- 10 mM EDTA. La fluorescencia asociada a 25000 células/pocillo se estimó con el citómetro de flujo (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y el programa Expo 32. La fluorescencia de células EPC no tratadas con frg11 se consideró el fondo de fluorescencia. Las células con fluorescencia positiva se definieron como aquellas con una fluorescencia mayor que la fluorescencia del 95 % de las células EPC no tratadas con frg11 y que además fueran IP^- (células anexina V-$FITC^+$ IP^-). El porcentaje de células IP^+ no superó el 8 % del total. Además, las células se visualizaron y fotografiaron con un microscopio invertido de fluorescencia (Leica DM IRB) equipado con cámara digital (DC 250).

3.5. APROXIMACIÓN A LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA G_{VHSV}.

La aproximación a la estructura tridimensional de la GVHSV se obtuvo por alineamiento/superposición de la secuencia de aa de la GVHSV y G_{VSV} a partir de los datos de la estructura tridimensional de la G_{VSV} a pH ácido obtenidos por cristalografía de rayos X (Roche et al., 2006). Se utilizó el archivo pdb correspondiente a la G_{VSV} del Banco de datos de estructuras tridimensionales de proteínas RCSB (http://www.rcsb.org/pdb/Welcome.do;jsessionid=WV8HVsDAESnXDAq3h

ah8-w**). El alineamiento se baso en las posiciones conservadas que ocupan las C en la secuencia de las G de 14 rabdovirus pertenecientes a géneros distintos de la familia *Rhabdoviridae* (vesiculovirus, lisavirus, efemerovirus y Novirabdovirus) (Walker and Kongsuwan, 1999) que se utilizaron como guía para alinear todas las demás posiciones. Dado que varios alineamientos son igualmente posibles por la existencia de posiciones vacías (gaps) en algunas regiones de la estructura, las figuras obtenidas deben de considerarse aproximaciones de ± 3 aa. Las estructuras se visualizaron utilizando el visor de Glaxo (Swiss-Pdb viewer).

RESULTADOS



4

4.1. ADECUACIÓN DEL INMUNOENSAYO DE DETECCIÓN DE FOCOS A LA IDENTIFICACIÓN DE MODULADORES DE LA INFECTIVIDAD DEL VHSV

4.2. INFLUENCIA DEL pH DEL MÉDIO EN LAS INFECCIONES *IN VITRO* DE VHSV

4.3. MODULADORES EN LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA G_{VHSV}

4.4. MODULADORES EN UNA QUIMIOTECA DE α-PÉPTIDOS

4.5. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MODULADORES DE LA INFECTIVIDAD DEL VHSV EN LOS COMPUESTOS DE QUIMIOTECAS DE N,N' 2,5-PIPERAZINDIONAS (DKPs)

4.1. ADECUACIÓN DEL INMUNOENSAYO DE DETECCIÓN DE FOCOS A LA IDENTIFICACIÓN DE MODULADORES DE LA INFECTIVIDAD DEL VHSV.

Para adaptar el inmunoensayo de detección de focos de infección en células infectadas con VHSV, inicialmente diseñado (Lorenzo, Estepa, and Coll, 1996) para realizar ensayos de neutralización de VSHV con anticuerpos, a un ensayo que permitiera la identificación rápida de compuestos con capacidad de modular la infectividad del VSHV (cribado de gran número de muestras), se determinó en primer lugar los tiempos de infección óptimos no solo para detectar y cuantificar los focos de infección (número de focos) sino también para estudiar la evolución/desarrollo de la infección con el tiempo (variación con el tiempo del número de células infectadas por foco o tamaño de los focos).

Las infecciones se realizaron con VHSV procedente de sobrenadante de cultivo de células EPC infectadas con VHSV, obtenido tal y como se describe en el material y métodos y con título de 1 x 10^9 ffu/ml. En la línea celular EPC, a la moi. utilizada y en ausencia de moduladores, 12 h p.i., la mayoría de los focos observados en los tapices de células infectadas, son unicelulares, lo que indica que con las condiciones de ensayo y a este tiempo p. i. sólo se pueden detectar las células inicialmente infectadas (**Ilustración 21, Ilustración 22B**) y que se necesitan tiempos mas largos de infección para valorar si los nuevos viriones producidos son capaces de infectar las células vecinas. Veinticuatro h p.i. ya se observan focos formados por varias células infectadas, siendo el tamaño medio de foco de unas 20-30 células (**Figura 21, 22C**). Así pues, 24 h p.i pude evaluarse con este ensayo si los viriones producidos a partir de las células inicialmente infectadas son infectivos. A 36 h p.i., se observaron focos con un número muy elevado de células infectadas (100-110 células/foco) pero también otros con un número reducido de células infectadas (1-10 células/foco) (**Ilustración 21, Ilustración 22D**). Este dato indica que a este tiempo de infección aumenta el tamaño de los focos iniciales y que los viriones producidos infectan células alejadas de los focos iniciales de infección dando lugar

a nuevos focos unicelulares o con un número reducido de células infectadas. A partir de la 48 h p.i. (**Ilustración 22E, F**) no se detectan focos ya que toda la monocapa celular aparece infectada y ya es evidente el efecto citopático.

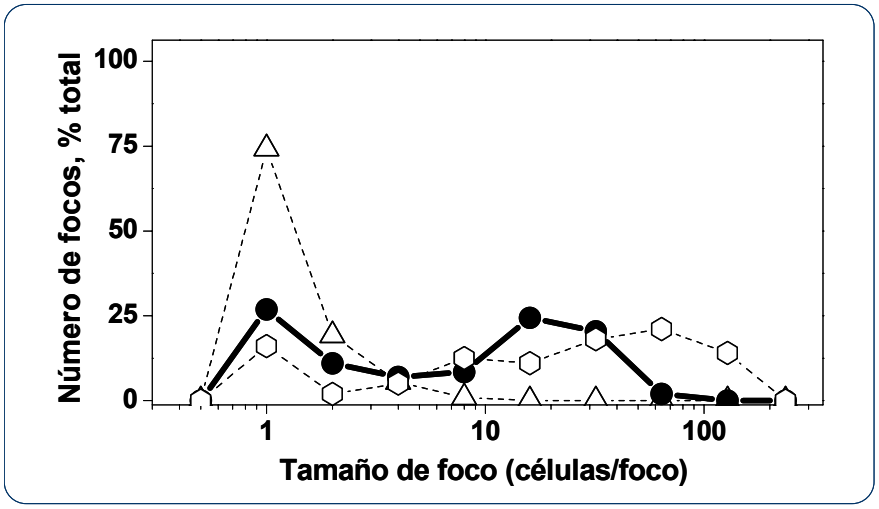


Figura 21. Estudio de la evolución/desarrollo de los focos de infección con el tiempo. *Células EPC se infectaron con VSHV (m.o.i.1.5x10−3 pfu) a 14 ºC de 12 a 60 h. Después, las monocapas de células infectadas se fijaron y se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2C9 y DAB. Se muestra el número de focos por rango de tamaño expresado como un porcentaje según la fórmula: número de focos del rango / número de focos totales x 100. El número total de focos analizados fue de 125 en las infecciones a 12 h (--△--) y de 150 para las infecciones de 24 (—●—) y 36 (--▽--) h. No se muestran las distribuciones de tamaño de foco de la infecciones de 48 y 60 h, ya que al estar la monocapa totalmente teñida, no se pudieron distinguir focos de infección. Los tamaños se agruparon en los siguiente rangos: 1 (1célula/ foco), 2 (2 células/foco), 4 (3-5 células/foco), 8 (6-10 células/foco), 16 (11-21 células/foco), 32 (22-42 células/foco), 64 (43-85 células/foco), 128 (86-170 células/foco), 256 (>170 células/foco).*

A partir de estos resultados, se seleccionó el tiempo de infección de 24 h para ensayos de cribado, ya que de entre todos los tiempos p.i. ensayados en los que se detectan focos formados por varias células infectadas, fue el que mostró una homogeneidad mayor en el tamaño de los focos de infección. Una vez optimizada la duración del ensayo de cribado, se procedió a determinar cual sería en número medio de focos/pocillo (número de unidades infectivas de VSHV por célula con las que se debería realizar la infección) necesario, que además fuera estadísticamente significativo, para poder evaluar la actividad de los posibles inhibidores/activadores, teniendo en cuenta que, i) si el número era muy pequeño en presencia de cualquier inhibidor, por muy baja que fuera su actividad, no se observarían focos y ii) si el número era muy elevado en presencia de un activador seria imposible cuantificar los focos porque toda la placa estaría teñida. Con este propósito, se realizaron ensayos de infección con VHSV a diferentes moi y se cuantifico a cada una de ellas 24 h p.i., tanto el número de focos como el número de células infectadas/foco. El número de focos/pocillo detectado aumentó progresivamente en el rango de moi comprendido entre 1 x 10^{-5}

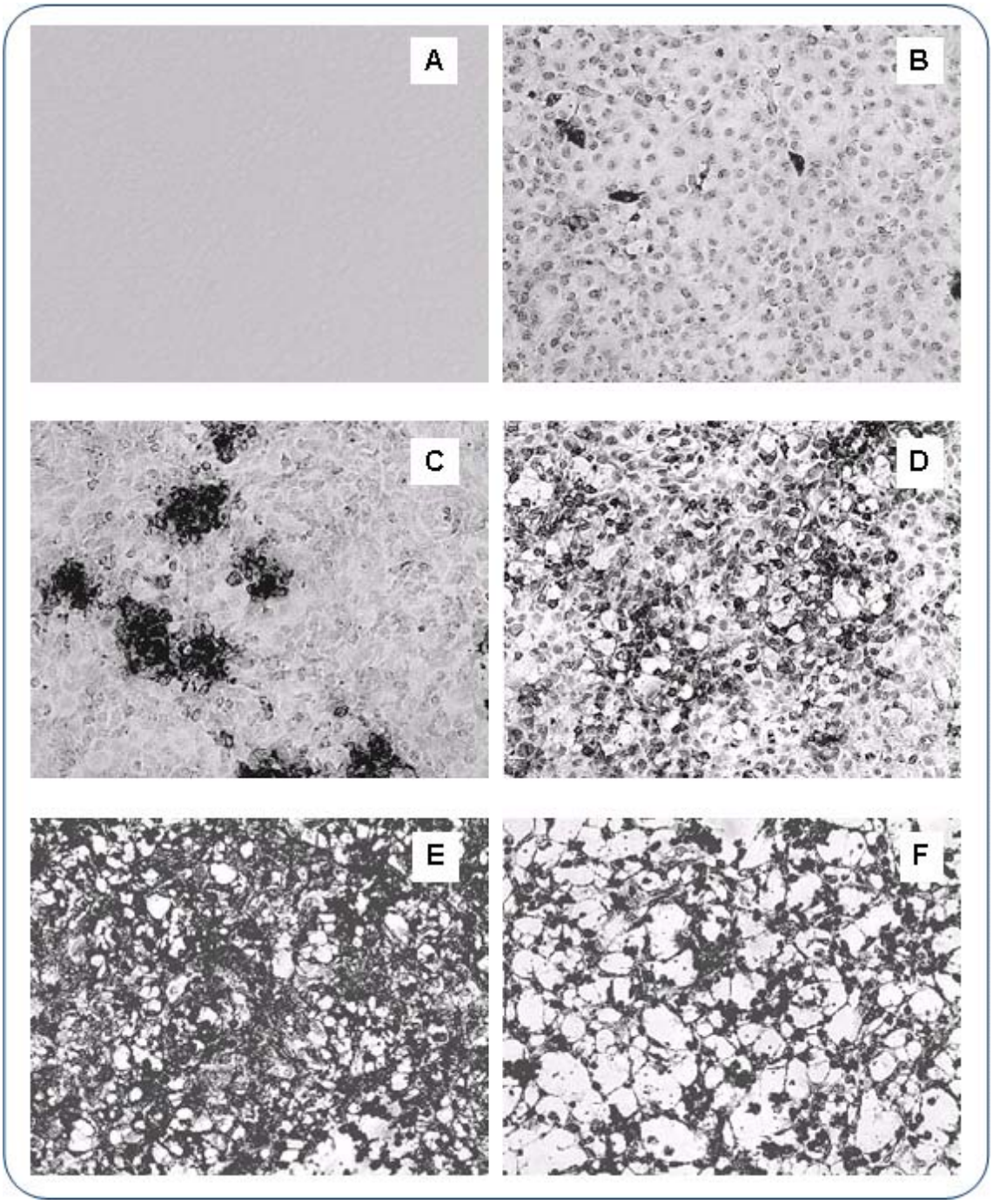


Ilustración 22. Aspecto de tapices de células EPC infectadas con VHSV a distintos tiempos p.i. *Células no infectadas (A),Células infectadas, 12 h p.i. (B), 24h p.i. (C), 36 h p.i. (D), 48 h p.i. (E) y 60 h p.i. (F) .*

y 1.5 x 10^{-3} pfu/célula, observándose ya infección completa del tapiz celular a la moi. de 1 x 10^{-2} pfu/célula (**Ilustración 23**). Además, en este rango de moi se observó una gran homogeneidad en cuanto al tamaño, ya que casi todos tenían de 20-40 células infectadas/foco (**Ilustración 24**).

A partir de estos resultados, para realizar los ensayos de cribado basados en infectividad, se seleccionó la moi de 1 x 10^{-4} pfu/célula (50-100 focos/pocillo) sin descartar que tuvieran que utilizarse moi superiores en el caso de encontrar inhibidores de la infectividad de VHSV muy eficaces.

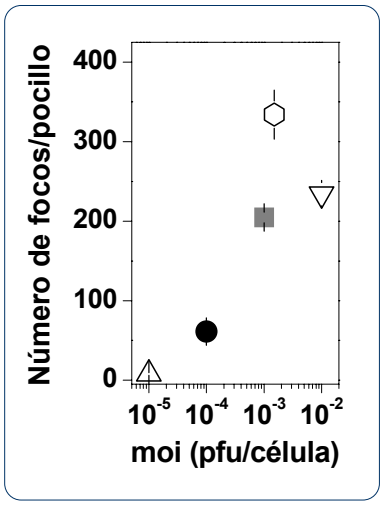


Ilustración 23. Variación del número de focos/pocillo en fución de la moi. *Celulas EPC se infectaron con VHSV a distintas m.o.i. y 24 h p.i. se cuantifico el número de focos/ pocillo que se detectaban utilizando el inmunoensayo de dectección de focos Los datos corresponden a Se las medias y desviaciones estándar del número de focos/pocillo de 2 experimentos distintos cada uno de ellos realizado por triplicado*

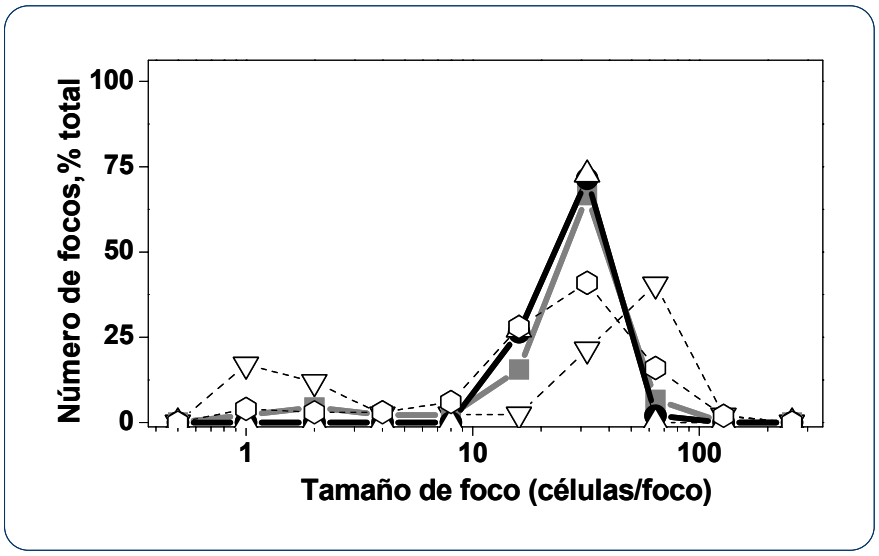


Ilustración 24. Variación del tamaño de los focos en fución de la moi *Celulas EPC se infectaron con VHSV a distintas m.o.i. y 24 h p.i. se cuantifico el número de células infectadas/ foco con el inmunoensayo de dectección de focos El número de focos para cada rango de tamaño se expresó en pocentaje según la fórmula: número de focos del rango / número de focos totales x 100. El número total de focos analizados fue, 22 para la m.o.i. 1x10–5 pfu (--△--), 49 para la la m.o.i. 1x10–4 pfu (—●—), 42 para la m.o.i. 1x10–3 pfu (—■—), 100 para la la m.o.i. 1.5x10–3 pfu (--○--) y 45 para la la m.o.i. 1x10–2 pfu (--▽--).. Los tamaños de los focos de infección (número de células teñidas/foco) se agruparon en los rangos descritos para la* **Ilustración 22**.

4.2. INFLUENCIA DEL pH DEL MEDIO EN LAS INFECCIONES *IN VITRO* CON VHSV.

Una vez establecidas las condiciones experimentales (tiempo de infección y moi) óptimas del inmunoensayo de detección de focos, se procedió a evaluar si cambios en el pH del medio podían, en alguna medida, variar los resultados del ensayo (numero y tamaño de focos de infección), y ser los responsables de las variaciones "inter-ensayo" observadas en algunas ocasiones en el laboratorio. Además, trabajos *in vitro* muy antiguos sobre la infectividad de los rabdovirus [Fiszman, 1974 #3246] señalan al pH de medio de cultivo como un posible inhibidor de la replicación estos virus en cultivo celular.

4.2.1. Variación del número y tamaño de los focos de infección en función del pH del medio

Para evaluar el efecto del pH del medio de cultivo en el número y tamaño de los focos de infección, células EPC se infectaron durante 24 h a 14ºC con VHSV a una moi de 1,5 x 10^{-3} pfu en un volumen final de 100µl de medio de cultivo a distintos pHs. Los resultados obtenidos muestran que en estas condiciones experimentales, el mayor numero de focos de infección (334 ± 30.75 ffu/pocillo) y el mayor tamaño de foco (10-20 células/foco) se obtiene cuando las infecciones se realizan a pH 7,5 (**Ilustración 25**).

A pH superiores o inferiores a 7,5 la infectividad del VHSV se vio claramente inhibida, ya que el número de focos fue menor, siendo la disminución siempre mas acusada a pH ácidos que básicos. Así, el número de focos disminuyo un 50% a pH 6.5 y el tamaño medio de foco pasó de 10-20 a 1-2 células/foco. A pH 6.0-5.5 tan sólo se detectaron ~10 focos/pocillo también de 1-2 células/foco. Igualmente, el aumento del valor del pH del medio de 7,5 a 8 también redujo ~ 50 % el numero de focos aunque el tamaño de foco se mantuvo en 10-20 células/foco (**Ilustración 25**).

Para investigar que etapa/s de infección estaban siendo alteradas por efecto del pH se escogieron como representativos los pH

de 7.5 (pH fisiológico) y 6.5 (pH ácido)

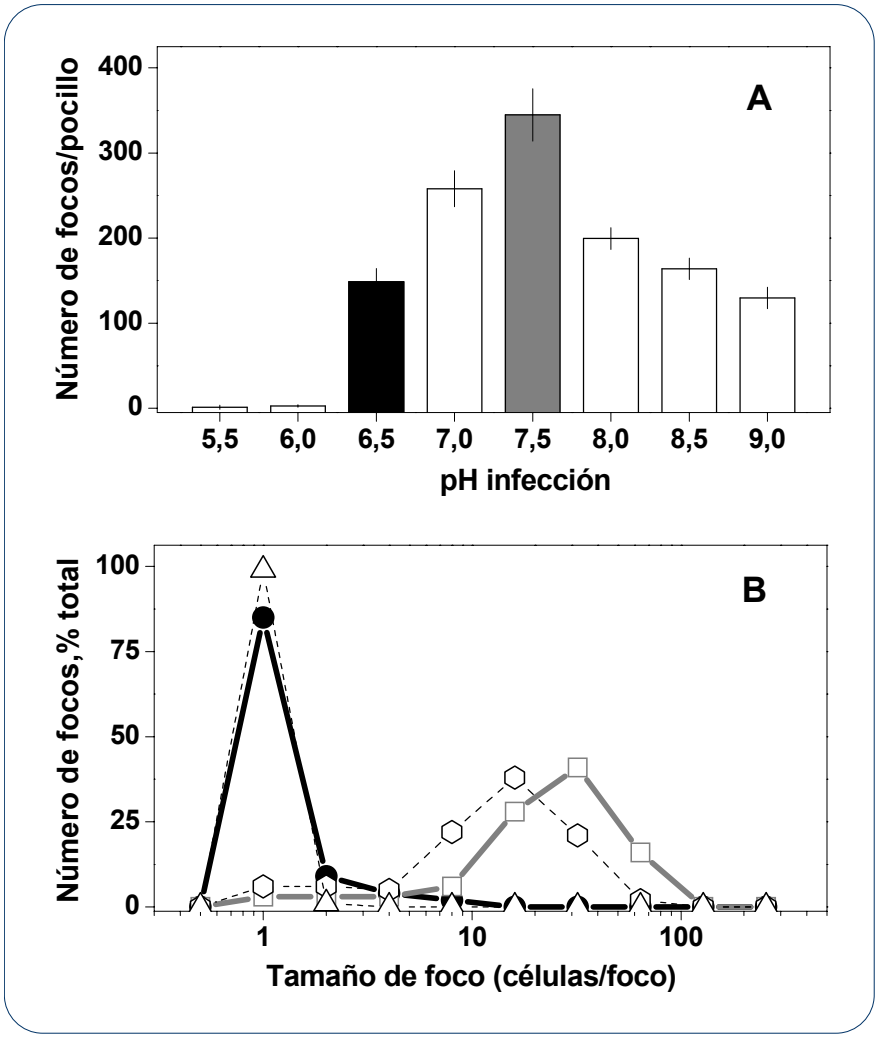


Ilustración 25. Variación del número y tamaño de los focos de infección en función del pH del medio.*Células EPC se infectaron con VSHV a distintos pH y 24 h p.i se procedio al recuento del numero (A) y tamaño (B de los focos de infección. Los tamaños de los focos se agruparon en los siguientes rangos:1 (1 célula/ foco), 2 (2 células/foco), 4 (3-5 células/foco), 8 (6-10 células/foco), 16 (11-21 células/foco), 32 (22-42 células/foco), 64 (43-85 células/foco), 128 (86-170 células/foco), 256 (>170 células/foco). Los datos referidos a el numero de focos son la media de dos experimentos cada uno ralizado por hexaplicado. El tamaño de foco se expresa en porcentaje de acuerdo con la fórmula: número de focos del rango / número de focos totales x 100. --△--, pH 6.0. —●—, pH 6.5. —□—, pH 7.5. --⬡--, pH 8.0.*

4.2.2. Influencia del pH en la unión del VHSV a la superficie de las células (adsorción).

La influencia del pH en la unión del VHSV a células EPC (**Ilustración 26**) se valoro directamente, cuantificando por citometría de flujo el número de células fluorescentes que se obtenía tras incubar las células durante 2 h a 4ºC con VHSV marcado con biotina ($VHSV_B$) a pH 7, 5 y 6,5, e indirectamente, titulando el virus que quedaba en los sobrenadantes de infección tras la adsorción a esos dos pH (virus no unido tras 2 h de incubación a con las células a 4ºC).

En contra de lo esperado, a pH 6.5 el porcentaje de células fluorescentes (30.11 ± 1.83 %) fue ~1.4 veces superior al obtenido a pH 7.5 (20.4 ± 0.86 %) (**Ilustración 26A**), resultado que en principio para indicar que a pH ligeramente ácido la unión del VHSV a las células EPC es algo más eficaz. Este dato fue posteriormente confirmado cuando se valoró cuanto VHSV, respecto al inóculo inicial que fue incubado con las células a pH 7,5 o 6,5 durante 2 h 4ºC, permanencia en los sobrenadantes de infección. Los porcentajes de VSHV recuperado en los sobrenadantes con respecto al inóculo inicial fueron de ~ 53 % a pH 7.5 y ~ 40 % a pH 6.5 (**Ilustración 26B)** independientemente del título del inóculo inicial con el que se realizó la infección.

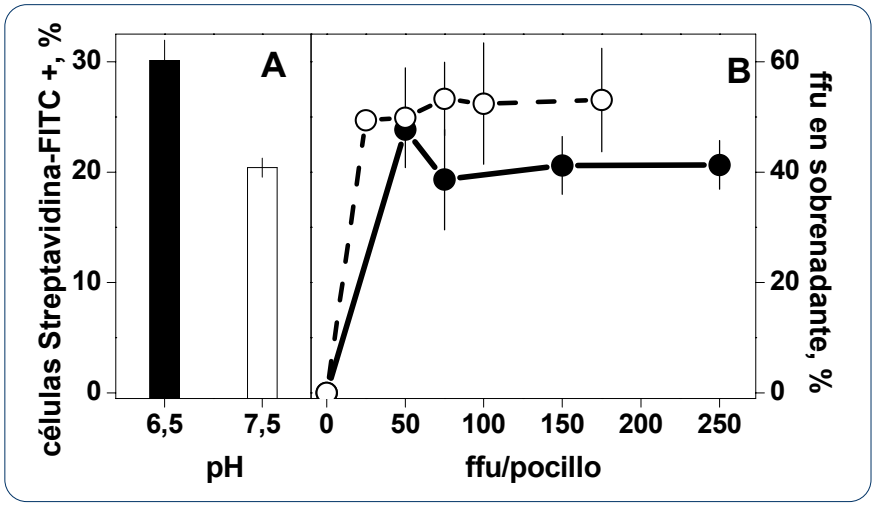


***Ilustración 26**. Influencia del pH de medio de cultivo en la unión del VHSV a células EPC. **A**, Células EPC se incubaron a 4 ºC con VSHV$_B$ en medio a pH 6.5 o pH 7.5 y tras 2 h se retiraron y guardaron los sobrenadantes de infección y se cuantifico el número de células fluorescentes (células con el virus unido a su superficie) a ambos pH. Se representan las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos realizados por duplicado. **B**, Los sobrenadantes de infección del ensayo A se titularon utilizando el inmunoensayo de detección de focos. Para ello, el pH de los sobrenadantes de las infecciones a pH 6,5 tuvo que se primeramente reajustado a pH 7,5. Los resultados se expresan en porcentaje de acuerdo con la fórmula: número de ffu en el sobrenadante / número de en el inóculo inicial x 100. Se representan las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos realizados por duplicado. pH 6.5 (—●—), pH 7.5 (—○—).*

Teniendo en cuenta los resultados de los dos ensayos anteriores, parece posible concluir que la adsorción VHSV-célula no se ve sustancialmente afectada por el pH ácido y que por lo tanto, la inhibición de la infectividad del VHSV por el pH debe ocurrir en alguna otra etapa del ciclo de replicación de este virus.

4.2.3. Influencia del pH en la propagación *in vitro* de la infección

Para analizar la posible influencia del pH en la propagación del VHSV desde las células inicialmente infectadas a las adyacentes, se estudió la evolución temporal del tamaño de los focos de infección en infecciones in

vitro realizadas a pH 7.5 y 6.5. Para ello y con el propósito de evitar las pequeñas diferencias observadas a pH 6,5 y 7,5 en la etapa de adsorción (**Ilustración 26A, B**) en estos ensayos de infectividad, la adsorción se hizo siempre a pH 7,5. El tamaño de los focos se analizo a 12, 24, 48, 60 h p.i. En las infecciones a pH 7,5 (**Ilustración 27B)**, el número de células infectadas/foco aumentó progresivamente con el tiempo de infección de manera que 12 h p.i. la mayoría de los focos contenían 1-2 células infectadas/foco; 24 h p.i. 10-20 células/foco, 36 h p.i. 50-70 células/foco y partir de las 48 h p.i. ya no podían distinguirse focos individuales (toda las células de la monocapa estaban infectadas).

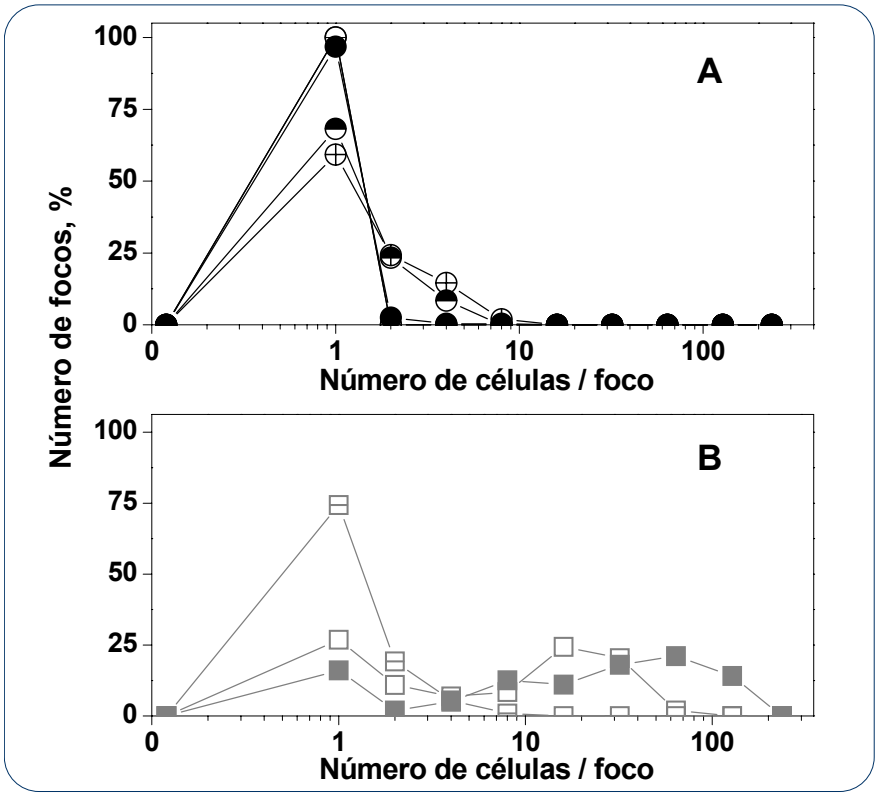


Ilustración 27. Influencia del pH en la propagación in vitro de las infecciones de VHSV. *Células EPC se infectaron a pH 7,5 con VSHV (m.o.i. 0.01 ffu) durante 2 h a 14 ºC. A continuación se lavaron las células para retirar el virus no unido y se adiciono a las células infectadas medio fresco a pH 7.5 (**B**) o 6.5 (**A**). Las infecciones se dejaron transcurrir durante 12, 24 y 36, 48 y 60 h. Los resultados se expresan como porcentaje del número focos en función del tamaño de foco, calculado como: número de focos de un rango de tamaño / número de focos totales x 100. Los datos se obtuvieron a partir de dos exprerimentos independientes realizados por duplicado y el número de focos contados a cada tiempo y pH fue de 88-150 entre los dos exprerimentos. Infecciones a pH 6.5: 12 h p.i. (—⊖—), 24 h p.i. (—○—), 36 h p.i. (—●—), 48 h p.i. (—◓—) y 60 h p.i. (—⊕—) . Infecciones a pH 7.5: 12 h p.i. (—⊟—), 24 h p.i. (—□—) y 36 h p.i. (—■—) . El número de células por foco se agrupó en los siguiente rangos: 1 (1célula/ foco), 2 (2 células/foco), 4 (3-5 células/foco), 8 (6-10 células/foco), 16 (11-21 células/foco), 32 (22-42 células/foco), 64 (43-85 células/foco), 128 (86-170 células/foco) y 256 (>170 células/foco).*

A pH 6.5 (**Ilustración 27A**), el tamaño medio de foco (1-2 células/foco) se mantuvo constate a todos los tiempos p.i. estudiados, lo que parece indicar que el virus es incapaz de propagarse desde las células inicialmente infectadas a las vecinas. Resultados similares fueron obtenidos cuando en vez de la línea celular EPC se empleó en los ensayos, la línea celular de origen fibroblástico RTG-2 (datos no

mostrados). Por lo tanto, el efecto del pH ácido sobre la infectividad del VHSV es independiente de la línea celular utilizada.

La influencia del pH en la propagación *in vitro* del VHSV se confirmó analizando 7 días p.i. el título de VHSV intra y extracelular de infecciones realizadas a pH 7,5 y 6,5 y de infecciones en las que el pH del medio durante el periodo de adsorción fue distinto al pH del medio durante el resto del tiempo de infección. En la **Tabla 3** se muestran las combinaciones entre pHs de adsorción y de infección utilizadas para el estudio.

Tabla 3. Título de VSHV en los sobrenadantes y asociado a células procedente de infecciones realizadas a distintas combinaciones de pHs de adsorción e infección

pH Adsorción + Infección	VHSV (ffu/ml)[a]			
	Sobrenadante	Lisado celular	Lisado celular,%	Efecto citopático
6.5 + 6.5	2.5×10^3	2.7×10^3	52.90	-
6.5 + 7.5	3.0×10^8	8.0×10^4	≤0.0003	+++
7.5 + 7.5	2.5×10^8	$\leq 1.0 \times 10^5$	≤0.0004	+++
7.5 + 6.5	6.7×10^3	5.9×10^3	45.38	-

[a]*Células EPC se incubaron durante 2 h a 14ªC con VHSV (m.o.i 0.01), a pH 7.5 o 6.5 (adsorción.). Transcurrida la incubación se retiraron los inóculos se lavaron las células y se añadió medio fresco a pH 7.5 o 6.5. Siete días p.i., sobrenadantes y lisados de células infectadas se titularon. Antes de titular, el pH de todas las muestras se reajusto a pH 7.5. El porcentaje de virus asociado a células se calculo de acuerdo con la fórmula: Los porcentajes se calcularon según la formula: ffu en lisado celular / ffu sobrenadante + ffu lisado celular x 100.*

Independientemente del cual hubiera sido el pH durante la adsorción, cuando las infecciones trascurrieron a pH 7,5, al cabo de 7 días siempre había efecto citopático (~ 95 % de lisis celular) y prácticamente todo el virus detectable estaba en el sobrenadante de infección (virus extracelular) (**Tabla 3**). Por el contrario, cuando las infecciones trascurrieron a pH 6,5, aunque el pH durante la adsorción hubiera sido 7,5, no se observó nunca efecto citopático y ~50 % del

VHSV detectable estaba asociado a células (virus intracelular). Además, la producción total de virus (intracelular mas extracelular) fue ~ 10^4 veces menor en las infecciones realizadas íntegramente a pH 6,5 en comparación con las realizadas íntegramente a pH 7,5 (**Tabla 3**).

Los resultados de estos experimentos confirman que son etapas del ciclo de multiplicación de VHSV posteriores a la adsorción las que se ven alteradas como consecuencia de la disminución del pH del medio de cultivo a valores inferiores de 7,5.

4.2.4. Análisis de la presencia de las proteínas del VHSV en células infectadas a pH 7.5 y 6.5

En un intento por esclarecer como una ligera acidificación del medio de cultivo impedía la propagación célula-célula del VHSV, se analizó si en las células infectadas a pH ácido, y en comparación con las infectadas a pH neutro, se expresaban y acumulaban de igual manera las proteínas del VHSV. El análisis se llevó a cabo por western blot a partir de células infectas con VHSV (moi, 10 ffu) a pH 7.5 o 6.5 durante 24 h. Se utilizó una moi de infección muy alta para aumentar la posibilidad de que todas las células se infectaran y así estar seguros de que en el caso de encontrar diferencias entre ambos pH, estas no se debieran a que a pH 6.5 no había reinfección desde las células inicialmente infectadas.

Transcurrido el tiempo de infección, los extractos celulares recogidos se separaron en geles de electroforesis de poliacrilamida que se transfirieron membranas de nylon. Para detectar las proteínas de VHSV se utilizó un AcPo anti-VSHV y AcMos anti- cada una de las proteínas del virus a excepción de la L (la polimerasa) (**Ilustración 29**). No se encontraron diferencias significativas en la presencia de N_{VSHV} entre las células infectadas a pH 6,5 y pH 7,5 aunque si en la presencia de las proteínas GVHSV, $M1_{VSHV}$ y $M2_{VSHV}$, que fue siempre menor en las células infectadas a pH 6.5 (**Ilustración 29**). Concretamente, 1.6, 2.2 y 3.6 veces menor a pH 6.5 que a pH 7,5 para las GVHSV, $M1_{VSHV}$ y $M2_{VSHV}$, respectivamente (**Ilustración 30**).

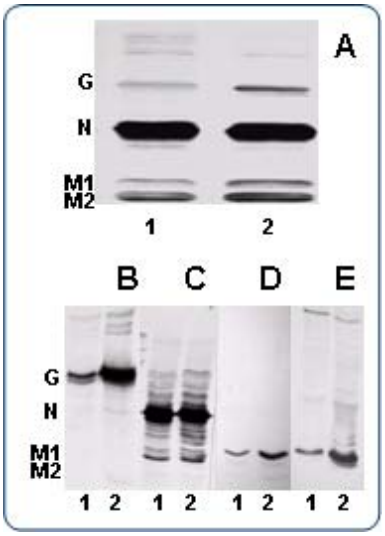


Ilustración 29. Influencia del pH en la presencia de las proteínas del VSHV en células infectadas. *Células EPC crecidas en frascos de cultivo de 600 cm2 se infectaron con VSHV a 10 ffu/célula durante 2 h a 14 ºC a pH 7.5. Después se retiraron los inóculos y las monocapas se incubaron a pH 6.5 o pH 7.5 durante 24 h a 14 ºC. El análisis de la presencia de proteína víricas en las células infectadas se por Western-Blot utilizando el AcPo B (**A**), el AcMo anti-G_{VSHV} I16 (**B**), el AcMo anti-N_{VSHV} 2C9 (**C**), el AcMo anti-$M1_{VSHV}$ 1C10 (**D**) o el AcMo anti-$M2_{VSHV}$ 4E4 (**E**). **A, B, C, D, E,** Fotografías representativas de un experimento. **Calle 1**, infecciones a pH 6.5. **Calle 2,** infecciones a pH 7.5*

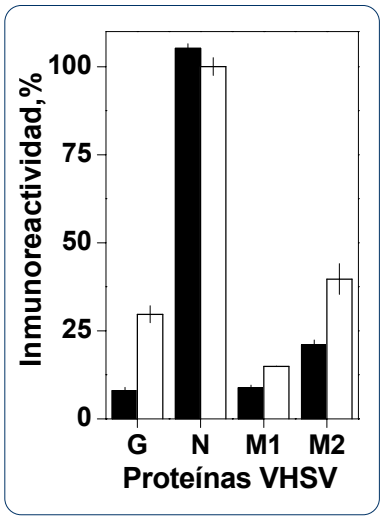


Ilustración 30. Influencia del pH en la acumulación de proteínas del VSHV en las células infectadas. *Densitometría (inmunoreactividad) de las bandas del Western blot mostrado en la figura* ***Ilustración 29A****. Los resultados se expresan en porcentaje de acuerdo con la fórmula: área de cada proteína / área de N_{VSHV} a pH 7.5 x 100. Se representan las medias y desviaciones estándar de las densitometrías de 2 ensayos independientes. Barras negras, infección a pH 6.5. Barras blancas, infección a pH 7.5.*

Para determinar si la disminución y alteración de las proporciones relativas de las proteínas de VSHV a pH 6.5 se correspondía también con alguna alteración de los ARNm que para ellas codifican, se analizo por RT-PCR en células infectadas a pH 7.5 y 6.5 con VHSV la presencia de los ARNm correspondientes a N_{VSHV} y GVHSV (como los más representativos). Después de densitometrar la bandas correspondientes a los ADNc amplificados a partir de geles de agarosa, se observó que mientras la intensidad de la banda correspondiente al ADNc de la N_{VSHV} se mantuvo constante a pH 7.5 y 6.5, la del cADN de la G_{VHSV} fue 2.8 veces inferior a pH 6.5 (datos no mostrados). Por lo tanto, la menor presencia de G_{VHSV} en las células infectadas a pH 6.5 se debe a una menor presencia de transcritos de estas proteínas en estas células.

4.2.5. Expresión y capacidad fusogénica de la G_{VHSV} presente en la membrana de células infectadas con VHSV a pH 7.5 y 6.5

Para investigar si la disminución en la acumulación de la G_{VHSV} en las células infectadas a pH 6.5 se correspondía también con una menor presencia o una ausencia de G_{VHSV} en la membrana plasmática de estas células, que claramente implicaría la producción de viriones con una capacidad infectiva muy reducida, la expresión de la G_{VHSV} se analizó por inmunofluorescencia en células fijadas con parafolmaldehido. Para ello, células EPC y RTG-2 se infectaron a pH 6.5 o 7.5 con VHSV y 24 h p.i. en las células EPC y 36 h p.i. en las células RTG-2, se realizó la inmunofluorescencia utilizando un cóctel de AcMo anti-GVHSV (AcMo lineal I16 + el AcMo conformacional 3F1A12) o el AcMo conformacional 3F1A12.

Con el cóctel de AcMo anti-G_{VHSV} se observó en ambas líneas celulares que las células infectadas expresaban G en la membrana tanto a pH 7.5 como a pH 6.5 (**Ilustración 31ABEF**). Sin embargo, mientras que a pH 7.5 las células que expresaban G_{VHSV} formaban parte de focos de infección, a pH 6.5 eran células aisladas (**Ilustración 31AE)**. Por el contrario, con el AcMo conformacional 3F1A12 sólo se detectaron células expresando G_{VHSV} en la membrana en células infectadas a pH 7.5

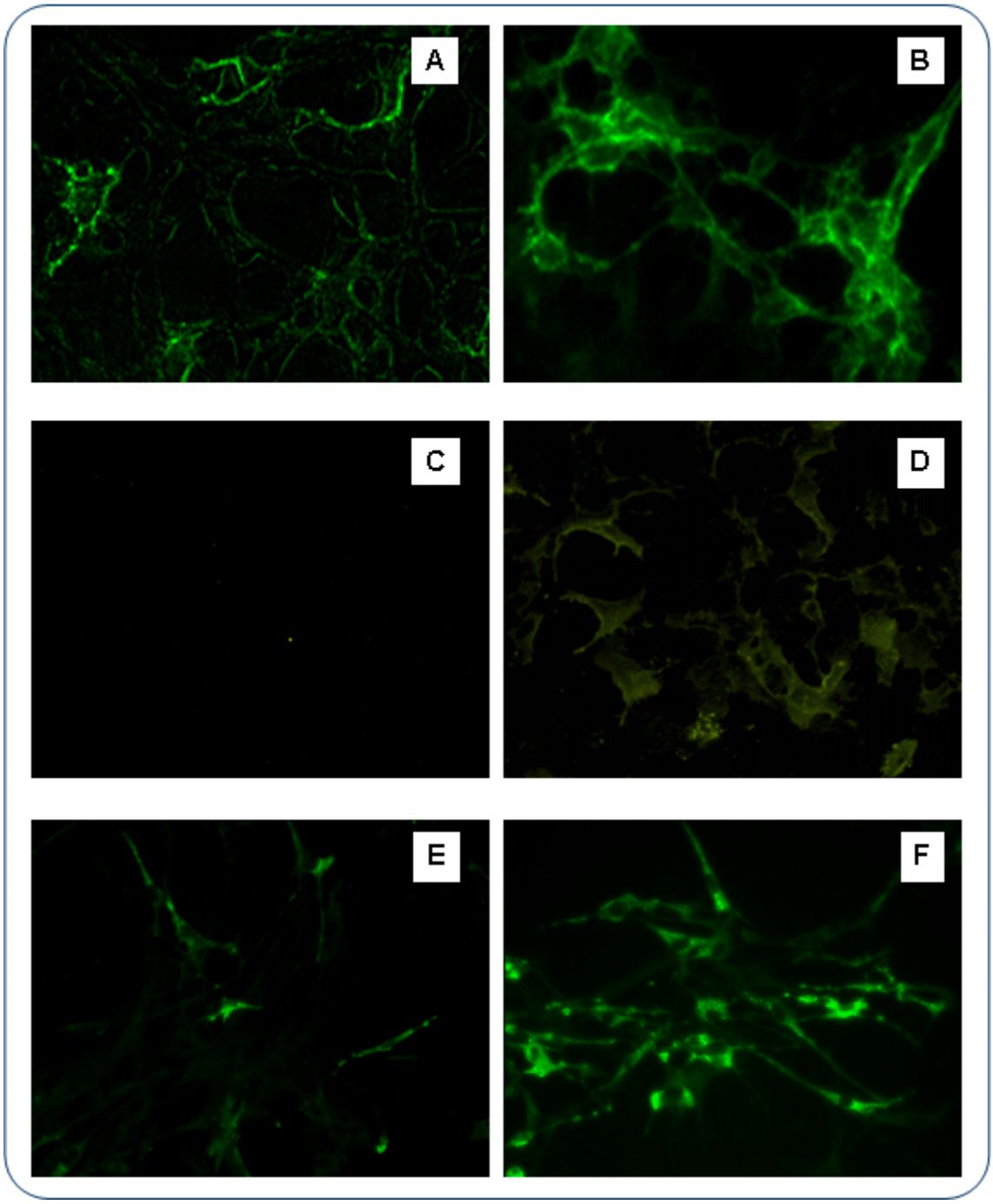


Ilustración 31. Expresión de la G_{VSHV} en la membrana de células infectadas con VHSV a pH 7.5 y 6.5. *Células EPC (**A, B, C, D**) y RTG-2 (**E, F**) se infectaron con 0.01 ffu de VSHV a pH 6.5 (**A, C, E**) o a pH 7.5 (**B, D, F**) durante 24 h para las células EPC y 36 h para RTG-2, . Las monocapas se fijaron con Citofix (4% paraformaldehido) y la expresión de la G_{VSHV} en la membrana de las células infectadas se detectó con una mezcla de AcMo anti-G_{VSHV} I10+3F1A12 (**A, B, E, F**) o con el AcMo anti-G 3F1A12 (**C, D**) y Ac anti-Igs de ratón-FITC.*

(**Ilustración 31D),** lo que sugiere que la G_{VHSV} expresada en la membrana de las células infectadas a pH 6.5 tiene alterada su conformación. En ensayos de ELISA con VSHV en fase sólida se confirmó que el reconocimiento de la G_{VHSV} por los AcMo conformacionales C10 y 3F1A12 fue mayor a pH 7.5 que a 6.5 (**Ilustración 32**).

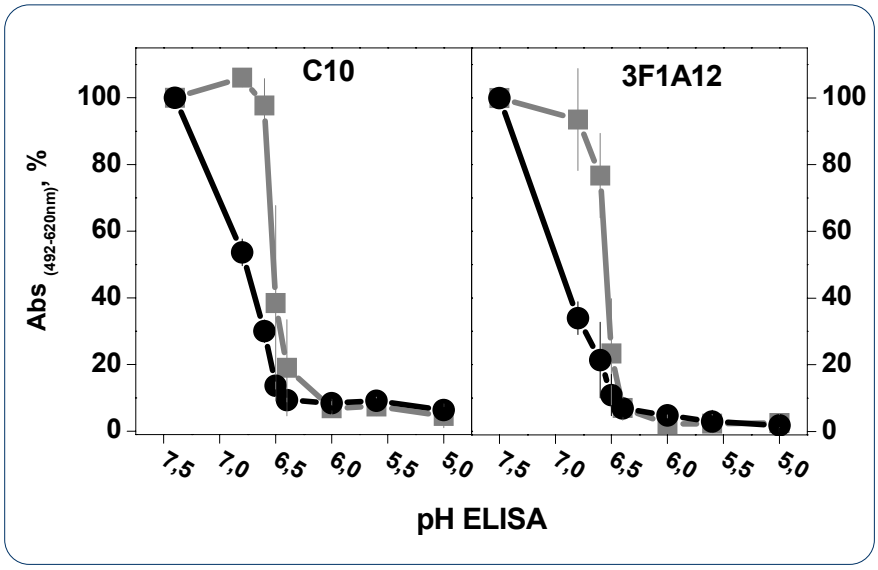


***Ilustración 32. Reconocimiento de la G_{VSHV} con los AcMo conformacionales C10 y 3F1A12 a diferentes pH**. Pocillos se placas de ELISA de 96 pocillos se tapizaron durante toda la noche a 14 ºC con 1 µg/pocillo de VSHV concentrado. Después de bloquear, los pocillos se incubaron durante 30 min en ausencia de AcMo a pH 6.5 (—●—) o pH 7.5 (—■—) y después 60 min en presencia del AcMo C10 o el AcMo 3F1A12 a diferentes pH. Se representan los valores de $Abs_{492-620nm}$ en porcentaje obtenidos según la fórmula: $Abs_{492-620nm}$ a cada pH / $Abs_{492-620nm}$ a pH 7.5 x 100. Los datos son medias y desviaciones estándar de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Una vez restados los fondos de pocillos sin tapizar, el valor de $Abs_{492-620nm}$ obtenido a pH 7.5 fue de: 1.2 ± 0.1 y 1.25 ± 0.13 para el AcMo C10 y el AcMo 3F1A12, respectivamente.*

La posible alteración de la conformación de la G_{VHSV} expresada en la membrana de las células infectadas a pH 6.5 se valoró analizando su capacidad para mediar fusión a pH ácido en tapices de células infectadas ("fusion from within") a distintas moi. La fusión se estimó utilizando ensayos de formación de sincitios. No se detectaron sincitios a pH 6.5 independientemente de la moi utilizada mientras que a pH 7.5, el número de núcleos en sincitios aumento progresivamente con la moi y fue del 100% (todas las células fusionadas) a una moi de 0,1 ffu (**Ilustración 33A**). La pérdida de capacidad fusogénica de la G_{VHSV} a pH 6.5 se pudo recuperar tras ajustar el pH a 7.5 e incubar las células durante 5 min a 14ºC (**Ilustración 33B**), lo que confirma que la ausencia de fusión a pH 6.5 se debe a una alteración de la conformación de la $G_{VHSV,}$ y que a pH 6.5 la G_{VHSV} se expresa y se localiza en la membrana de las células infectadas..

Como conclusión, la inhibición de la infectividad de VHSV a pH 6.5 ocurre, además de por una alteración de las proporciones relativas de las proteínas de VSHV en las células infectadas que reduce la cantidad de viriones producidos, por una inactivación directa por el pH del medio de la G_{VHSV} presente en la superficie de los pocos viriones que salen de estas células.

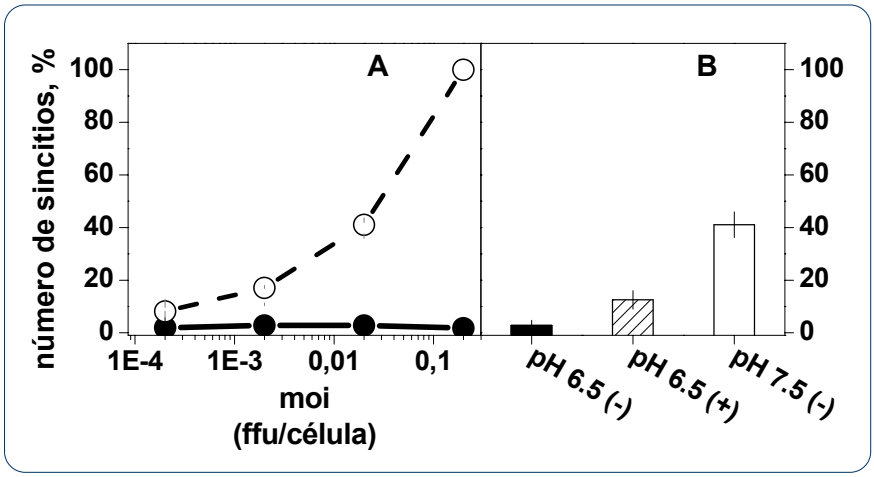


Ilustración 33. Fusión célula-célula mediada por la G_{VHSV} a pH ácido entre células EPC infectadas con VSHV a pH 7.5 y 6.5. A, *Células EPC crecidas en placas de 96 pocillos se infectaron con 0.02 ffu/célula de VSHV a pH 7.5 o 6.5 a 14 ºC,. Veinticuatro h p.i., se lavaron y se incubaron las células infectadas durante 30 min con medio de fusión pH 6 para inducir la fusión. Después las células se incubaron durante 2 h a 20 ºC con medio de fusión pH 7.4. Las monocapas se lavaron y se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa. Los resultados se expresan en porcentaje calculado según la fórmula: número de núcleos en sincitios / número de núcleos totales x 100. Los datos son las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos independientes realizados por triplicado. —■—, pH 7.5. —●—, pH 6.5.* ***B,*** *Porcentaje de fusión obtenido en infecciones similares a pH 7.5 o pH 6.5 donde antes de la fusión, el pH se revirtió a 7.6 (+) o no (-) durante 5 min a 14 ºC. Se representan las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos independientes realizados por triplicado.*

4.2.6. Reversibilidad del cambio conformacional a pH 7.5 y 6.5

Si el efecto del pH 6.5 sobre la conformación de la G_{VHSV} que conduce a su perdida de capacidad para mediar fusión se revertía tras una corta incubación a pH 7.5, es de suponer que los viriones que se producen a partir de las infecciones a pH 6,5 pudieran recuperar su infectividad de manera análoga. Para verificar esta hipótesis, se llevaron a cabo infecciones a pH 7.5 o a 6.5 en las que 12 h p.i. se variaba el pH del medio a 6.5 o 7.5 respectivamente. Tras el cambio de pH las células infectadas se incubaron a 14ºC por un periodo adicional de 12 h. Independientemente del pH inicial de infección (**Ilustración 34A, B**), sólo en las infecciones que transcurrieron a pH 7.5 durante las últimas 12 h de incubación (**Ilustración 34E, F)** se pudo observar que la infección se propagaba desde las células inicialmente infectadas a las adyacentes y por lo tanto aparecían focos de infección formados por varias células

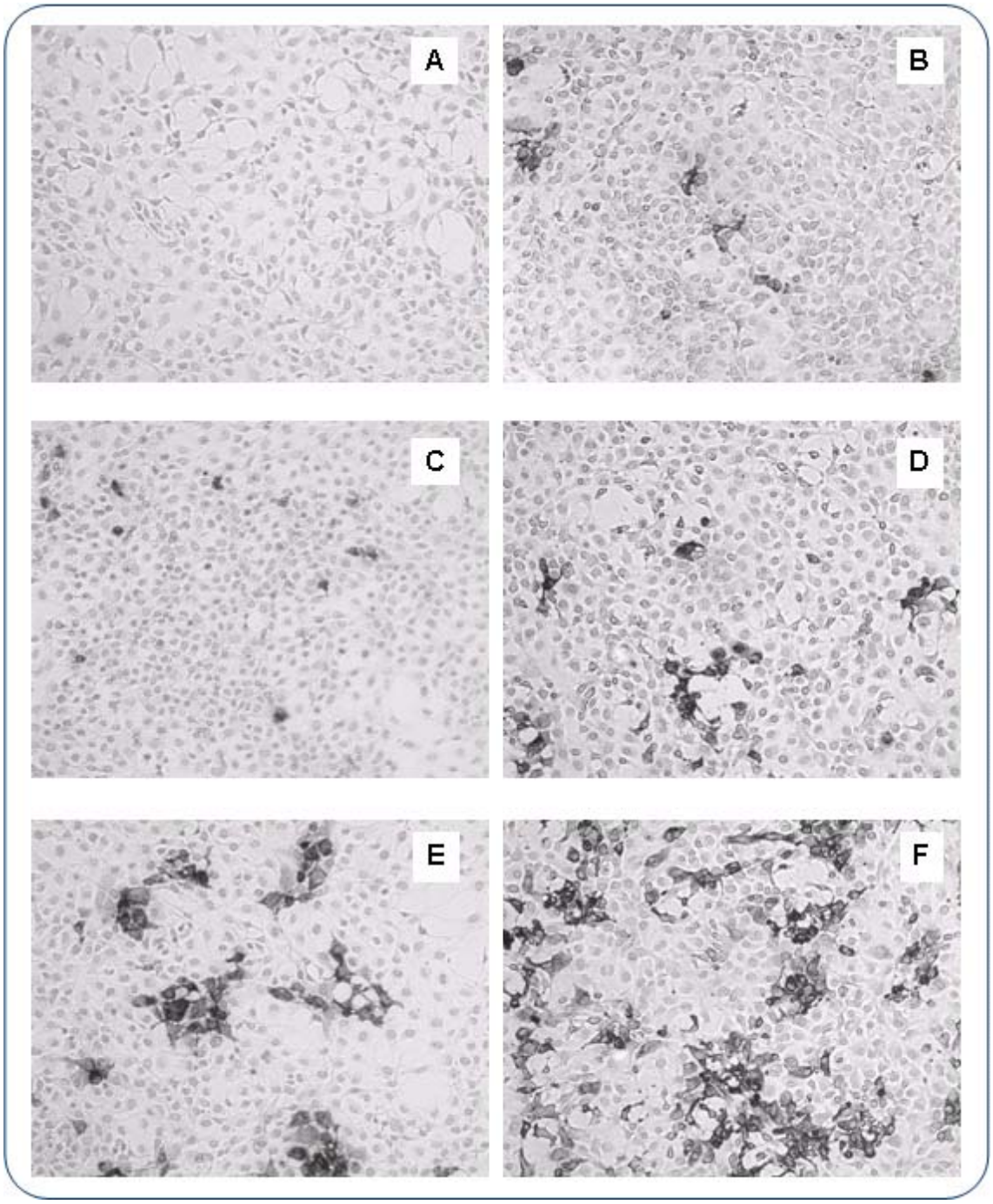


Ilustración 34. Reversibilidad de la inhibición de la infectividad del VSHV por pH 6.5. *Células EPC crecidas en placas de 96 pocillos se infectaron con VSHV a (moi 0.01 ffu/célula) a pH 6.5 (**A, C, E**) o a pH 7.5 (**B, D, F**) . Doce h p.i las células infectadas se fijaron con metanol (**A, B**), se incubaron durante 12 h más a pH 6.5 (**C, D**) o pH 7.5 (**E, F**). Después, las monocapas **C, D, E y F** se fijaron con metanol y se tiñeron con AcMo anti N_{VSHV} 2C9 y DAB. Las fotografías son representativas de uno de los dos experimentos realizados. Dentro de cada experimento, cada una de las condiciones de infección se ensayó por triplicado .*

infectadas. Por el contrarío, aunque las infecciones se realizaran inicialmente a pH 7,5 y 12 p.i. se observaran ya focos de infección, estos focos no aumentaban de número y/o tamaño si las 12 últimas h de infección transcurrían a pH 6.5 (**Ilustración 34C, D**). En consecuencia con estos resultados, podemos afirmar que el efecto del pH en las infecciones in vitro con VHSV es reversible.

4.3. MODULADORES EN LA SECUENCIA DE AMINO ÁCIDOS DE LA G_{VHSV}

4.3.1. Cribado del pepscan de péptidos de 15-mer

Con el propósito de identificar posibles péptidos del VHSV inhibidores/estimuladores de la infectividad de su VHSV, se diseñó y sintetizó un pepscan consistente en 51 péptidos de 15-mer solapantes en 5 aa derivados de la secuencia completa de la GVHSV. El cribado de dicho pepscan se realizó por ensayos de focos utilizando 4 tipos de incubaciones: i) incubación VHSV-péptido a pH 7.4 antes de la infección, ii) incubación VHSV-péptido a pH 5.6 antes de la infección, iii) incubación células EPC-péptido antes de la infección y iv) incubación células EPC-péptido después de la infección. Las infecciones se realizaron a 14 ºC, pH 7.5 durante 24 h y sin retirar los inóculos/péptidos durante la infección.

Tras realizar las incubaciones del VHSV a pH 7.5 o 5.6 con los péptidos 15-mer no se pudo identificar ningún péptido con capacidad inhibitoria de la infectividad del VHSV. Por el contrario y sorprendentemente, en ambos tipos de incubaciones solo se identificaron secuencias capaces de aumentar la infectividad del VHSV. En los ensayos con incubación VHSV a pH 7.5 se identificaron 7 secuencias donde se obtuvo de 2 a 2.5 veces el número de focos obtenido con VHSV (43 $\pm$ 12 ffu/pocillo). Estos 7 péptidos fueron los aa 79-93, 99-113, 199-213, 199-213, 219-233, 239-253 y 379-393 (**Ilustración 35A**). En los ensayos con incubación VHSV-péptido a pH 5.6, el número de péptidos estimuladores se redujo a los aa 99-113 (p24), 199-213 (p25) y 359-373 (p26). El número de focos obtenido en presencia de estos péptidos fue de 4 a 5 veces el número de focos

obtenido con VHSV (37 ± 14 ffu/pocillo) (**Ilustración 35B**). Estos aumentos de la infectividad de VHSV se caracterizaron por el mantenimiento del tamaño de los focos (datos no mostrados).

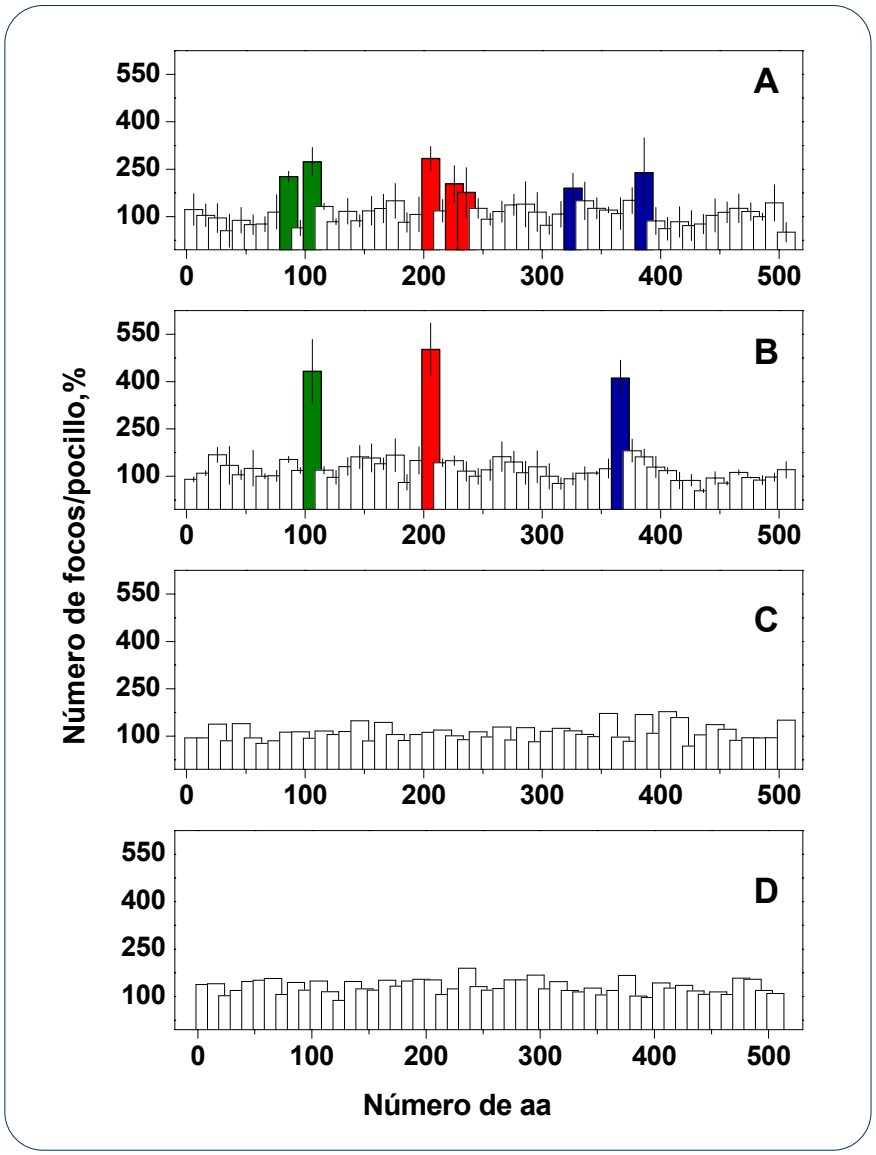


Ilustración 35. Ensayo de focos VSHV del pepscan de péptidos de 15-mer de la G_{VSHV}. *Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron (100µl/pocillo) con VSHV en presencia o ausencia de ~ 3 µM de péptidos de 15-mer solapantes en 5 aa correspondientes al pepscan que cubre la secuencia completa de la GVSHV (aa 1 a 510). El tratamiento con los péptidos se realizó durante 4 h, 14 ºC y 50 µl/pocillo por 4 tipos diferentes de incubaciones: A) VSHV-péptido pH 7.4 antes de la infección. B) VSHV-péptido pH 5.6 antes de la infección. C) células EPC-péptidos antes de la infección. D) células EPC-péptidos despues de la infección. Las infecciones se realizaron a 24 h, 14 ºC, pH 7.4 y no se retiraron los inóculos durante la infección. Las monocapas se fijaron con metanol y se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2C9 y DAB. Los porcentajes se calcularon según la fórmula: número de focos por pocillo en presencia del péptido / número de focos por pocillo en ausencia de péptido x 100. Se muestran las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos por triplicado (A,B) o el valor obtenido de un experimento (C,D). El número de focos/pocillo en el control de VSHV fue de 43 ± 12 ffu/pocillo (A), 37 ± 14 ffu/pocillo (B) y 47 ± 14 ffu/pocillo (C,D). Barras en blanco, número de focos/pocillo similares al control en ausencia de péptido. Barras coloreados, número de focos/pocillo superiores al control en ausencia de péptido.*

En los ensayos con incubación VHSV-péptidos a pH 7.5 con las células EPC antes de la infección (**Ilustración 35C**) o después de la infección (**Ilustración 35D**), no se detectaron variaciones en el número de focos de VHSV (47 ± 14 ffu/pocillo).

Debido a que la mayor estimulación de la infectividad del VHSV se obtuvo cuando la incubación VHSV-péptido se realizó a pH 5.6 (pH de la fusión) antes de la infección, los péptidos identificados podrían ser aquellos que interaccionan con regiones expuestas en la conformación de la G_{VHSV} a pH ácido y por lo tanto relacionados con la fusión.

Ilustración 36. Localización de los principales péptidos activadores en la estructura de la G_{VSV} . *: aa 99-113, p24 (verde), 199-213, p25 (rojo) y 359-373, p26 (azul).*

4.3.2. Influencia del frg11 en la infectividad del VHSV

Como en trabajos previos se estudiaron fragmentos de la GVHSV implicados en fusión (frg11, aa 56-110) y el frg11 contenía uno de los péptidos estimuladores identificados en el pepscan a pH 6.5 (aa 99-113), se evaluó la posible estimulación de la infectividad del VHSV del frg11 por el ensayo de focos de VHSV diseñado para el cribado.

Confirmando estas expectativas, después de incubar 250 μg/ml (~ 261 μM) de frg11 con VHSV a pH 5.6 antes de la infección, se obtuvo 7-8 veces el número de focos obtenido con VHSV. Esta estimulación también se caracterizó por un aumento del número de focos obtenido sin alterar su tamaño (datos no mostrados). Por el contrario, ni la incubación VHSV-frg11 a pH 7.4 antes de la infección, ni la incubación del VHSV con el péptido que contiene la cola de poli-histidinas poliH (añadido al frg11 por necesidades de clonaje y para facilitar su purificación por cromatografía de afinidad) antes de la infección, mostraron alteraciones significativas de la infectividad del VHSV a ninguna de la concentraciones de frg11 o de poliH empleadas (0-250 μg/ml) (**Ilustración 37**).

- **Localización del frg11 en la secuencia de aa de la G_{VHSV}**

Debido al carácter estimulador del frg11 en la infectividad del VHSV y su interacción con fosfolípidos (el p2, aa 82-109, incluido en el frg11 es el péptido de mayor interacción con PS) (Estepa and Coll, 1996a), se estudió la localización estructural del frg11 en la G_{VSV}. El frg11 comprende la región de la G_{VHSV} correspondiente a los aa 56-110 formado por: el p2 (contiene el principal dominio de unión a PS de la G_{VHSV} y la mitad de las heptadas no canónicas amino terminales) y el p9, aa 58-80 (contiene la otra mitad de las heptadas no canónicas amino

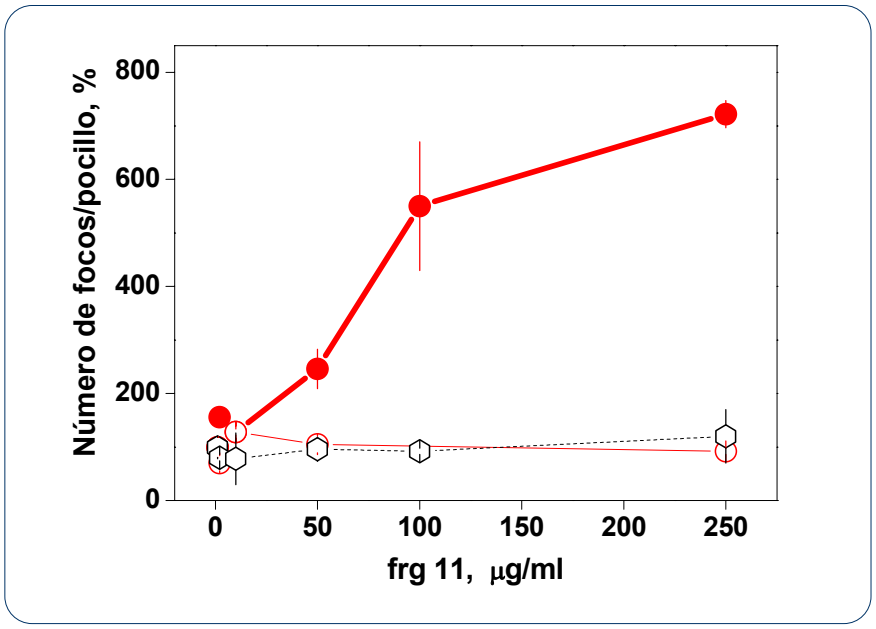


Ilustración 37. Estimulación de la infectividad del VSHV por el frg11. Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron (100µl/pocillo) con VSHV en presencia o ausencia del frg11. El frg11 se incubó con el VSHV antes de la infección durante 2 h a 14 ºC y a pH 7.4 o a pH 5.6. La infección se realizó durante 24 h a 14 ºC y a pH 7.4. Las monocapas se fijaron con metanol y se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2C9 y DAB. Los valores se dan en porcentaje según la fórmula: número de focos por pocillo en presencia de frg11 / número de focos por pocillo en ausencia de frg11 x 100. Se muestran las medias y desviaciones estándar de 3 experimentos por duplicado. El número de focos obtenido en ausencia de frg11 fue de 99.5 ± 19,09 focos/pocillo. —○—, VSHV incubado a pH 7.4 con frg11. —●—, VSHV incubado a pH 5.6 con frg11. --⬡--, VSHV incubado a pH 5.6 con poliH.

terminales) y flanqueado por los puentes disulfuro C64-C315 y C110-C152 (**Ilustración 38B**). Basándose en la reciente determinación de la estructura tridimensional de la G_{VSV} por rayos X (Roche et al., 2006) y en el alineamiento de secuencia de aa propuesto para la G de 14 rabdovirus animales (Walker and Kongsuwan, 1999), se ha podido comprobar que el frg11 recorre la estructura de la G_{VSV} de arriba abajo, recorriendo los 4 dominios propuestos (**Ilustración 38A**).

- **Propiedades del frg11 purificado**

Para producir suficiente frg11 para experimentación, se partió de cultivos de *E.coli* recombinante inducidos con IPTG. La purificación del frg11 se llevó a cabo por cromatografía de afinidad sobre columnas de Ni^+ y una segunda columna de Sephadex G-100. Debido a que no se pudo eliminar del frg11 recombinante el segmento poliH ya que los intentos de corte con enteroquinasa fueron infructuosos, se utilizó como control el péptido poliH sintetizado químicamente. Del 16 % de pureza del frg11 inicialmente presente en el lisado bacteriano, se obtuvo un 88-95 % de pureza en el preparado final del frg11. El rendimiento final obtenido fue de 25-30 mg de frg11 por litro de cultivo bacteriano (**Ilustración 39**).

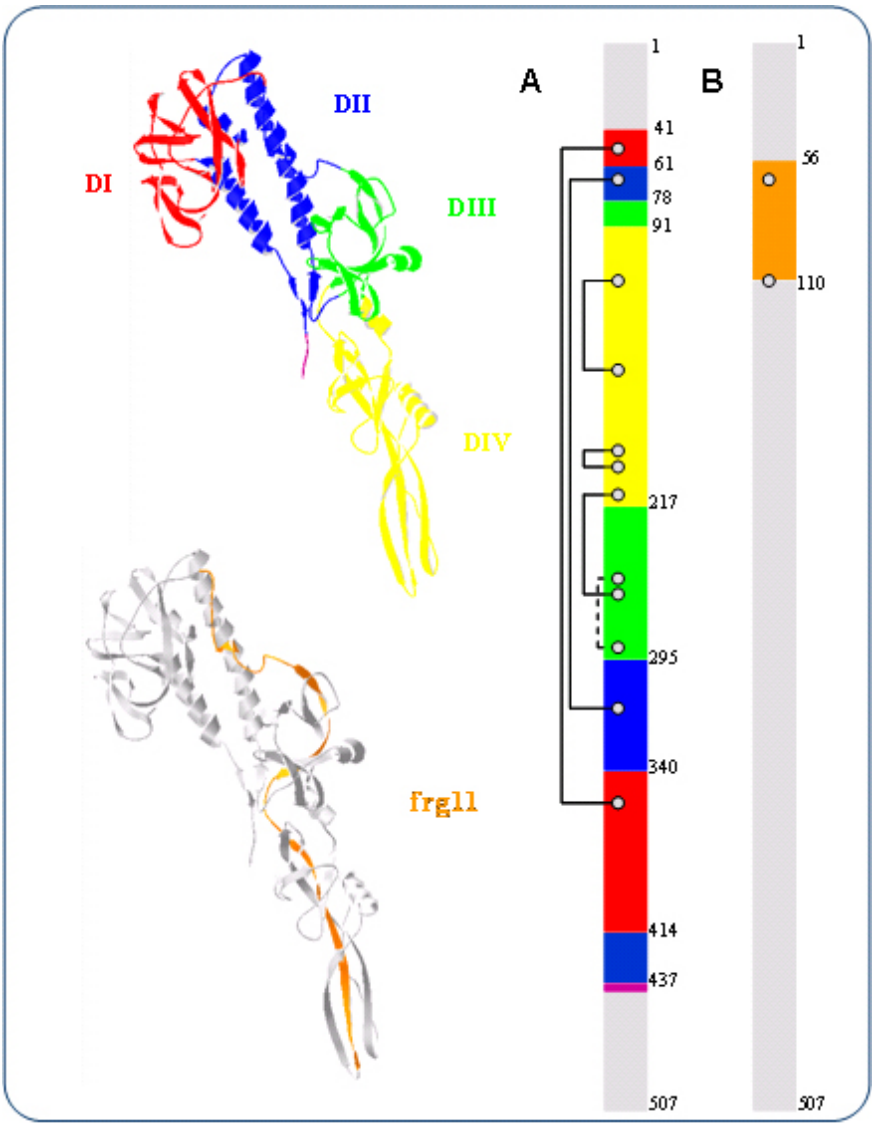


Ilustración 38. Localización en la G_{VSHV} de dominios (D), puentes disulfuro (A) y frg11 (B). *Se esquematiza la localización de los dominios y el frg11 sobre la estructura tridimensional a pH ácido de la GVSV {Roche, 2006 #2799} (**Figuras a la izquierda**) y los puentes disulfuro (**A**) y el frg11 en la secuencia de aa de la G_{VSHV} (**B**). La localización sobre la estructura de la G_{VSV} se basó en el alineamiento de secuencia propuesto para 14 Grabdovirus {Walker, 1999 #201}. **A,** Se muestran en la secuencia lineal de aa los dominios identificados en la estructura tridimensional de la G_{VSV}. ▬, Dominio I. ▬, Dominio II de trimerización. ▬, Dominio III de PH. ▬, Dominio IV de fusión. O, C conectadas por líneas que unen los puentes disulfuro propuestos en la G_{VSHV}. **B,** Localización y secuencia del frg11 aa 56-110 de la GVSHV. (▬), compuesto por los péptidos p2 y p9. Los números indican el aa con el que empieza cada región de la G_{VSHV}.*

Una vez purificado el frg11, se descubrió su tendencia a precipitar cuando se dializaba frente a tampón citrato-fosfato pH 7.6. Para evitar la precipitación del frg11 recombinante se varió el pH utilizado en la diálisis. De todos los pH ensayados (7.6, 6, 5.6, y 4), fue a pH 4 donde se pudo obtener una concentración por encima de 1 mg/ml, mientras que a pH 7.6 no se superaron los 50 μg/ml. Por electroforesis en condiciones desnaturalizantes no reductoras (SDS +, β-Mercaptoetanol -), se demostró que el 94.2 % del frg11 se encontraba en forma monomérica, detectándose una banda mayoritaria de ~ 10 kDa

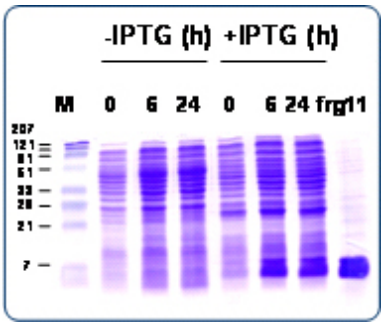


Ilustración 39. Expresión y purificación del frg11. *Fotografía de un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie, obtenido tras la expresión y purificación del frg11, tal y como se describe en material y métodos. Las muestras se tomaron a 0, 6 y 24 h de incubación de las bacterias E.coli recombinantes en ausencia y en presencia de IPTG. M, marcadores en KDa. frg11, después de la purificación por columnas de afinidad.*

(10.3 KDa teóricos). El resto se encontraba en forma multimérica, probablemente como consecuencia de la formación de puentes disulfuro intercatenarios: 2.7 % de dímeros, 1.9 % trímeros y 1.1 % formando agregados no resueltos en la electroforesis. Por el contrario, por electroforesis en condiciones desnaturalizantes reductoras (SDS +, β-Mercaptoetanol +) tan sólo se detectó la banda correspondiente a los ~ 10 KDa (**Ilustración 39**). Por otro lado, una banda de ~ 10 kDa también se obtuvo por Western-blotting llevado a cabo con AcPo anti-frg11 producidos en ratón (no mostrado) y se comprobó la secuencia del correspondiente inserto de la construcción recombinante, confirmando la identidad del frg11.

- **Ensayos de agregación del frg11 con liposomas**

Para investigar la posible implicación del frg11 en la fusión del VHSV se realizaron ensayos de agregación con liposomas tanto de carácter aniónico, fosfatidilserina (PS), ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilglicerol (PG) como de carácter neutro, fosfatidilcolina (PC). Estos ensayos se llevaron a cabo a pH 7.4 (pH fisiológico) y a pH 5.6 (pH óptimo de fusión del VHSV).

La **Ilustración 40** muestra que con liposomas aniónicos y a 8.5 μM de frg11 (máxima concentración de frg11 ensayada) se obtuvo un incremento de ~ 1.2 unidades de densidad óptica (OD) a pH 5.6. Por el contrario, a pH 7.5 se obtuvo un incremento de solo 0.83, 0.65 y 0.39 para la PS, PG y PA respectivamente y no se observaron incrementos de OD tras las incubaciones del frg11 con PC a ninguno de los dos pH ensayados. En comparación con el p2, utilizado en anteriores estudios, el frg11 presentó una capacidad ~ 5 veces mayor de agregar PS (**Ilustración 40**). Por otro lado, el poliH no fue capaz de incrementar la OD en presencia de ninguno de los fosfolípidos antes mencionados.

- **Inducción de sincitios en monocapas de EPC por el frg11**

Para evaluar la capacidad fusogénica del frg11 sobre las células EPC, se ensayó la formación de sincitios en monocapas de células EPC. Al incubar 200 μg/ml de frg11 con células EPC a pH 6.0, se detectó un

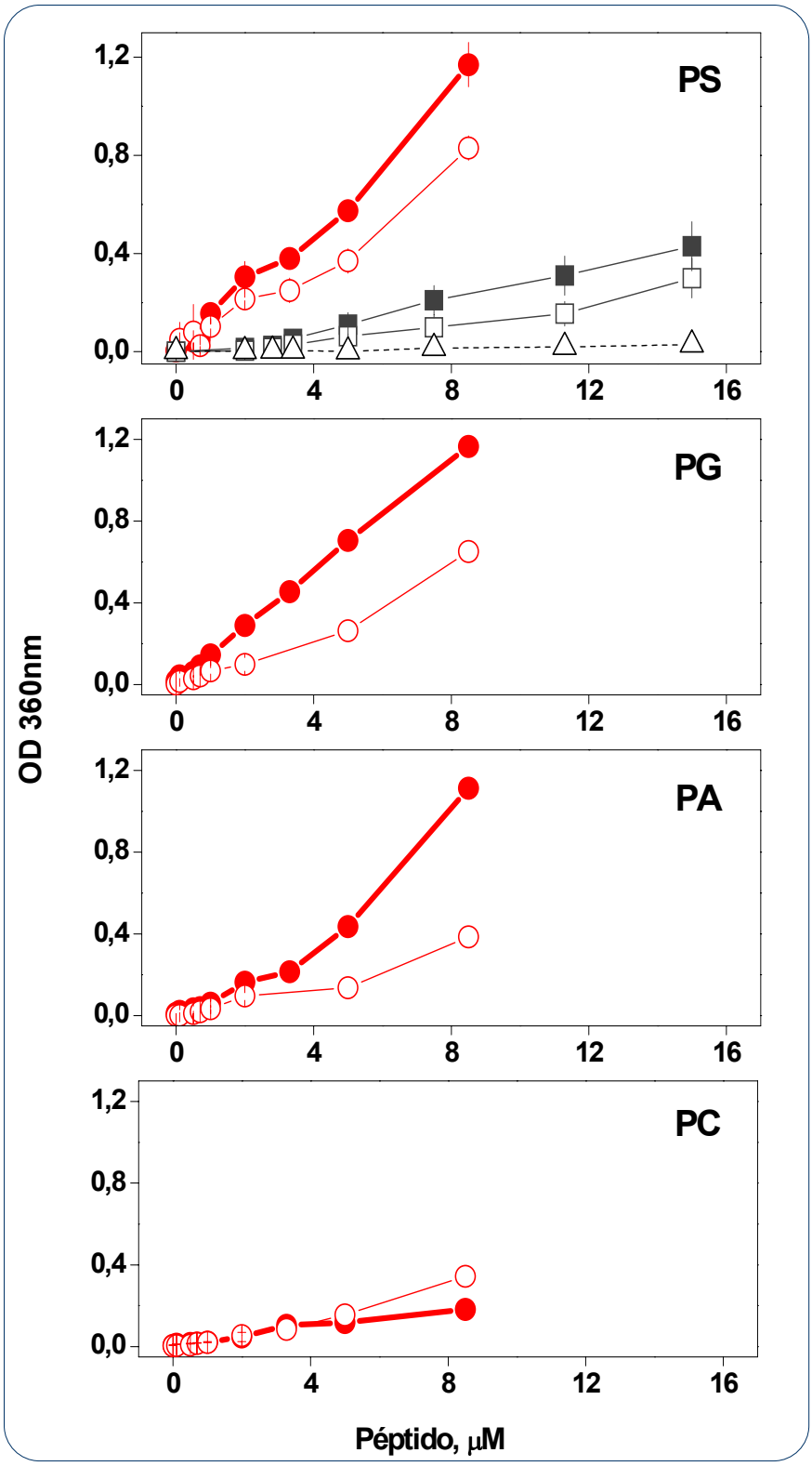


Ilustración 40 Agregación de liposomas inducida por el frg11. *Se incubó el frg11 o el poliH con 0.14 mM liposomas de fosfatidilserina (PS), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilglicerol (PG) o fosfatidilcolina (PC), durante 1 h a 37 ºC y pH 7.6/5.6. Los valores se calcularon según la fórmula: DO_{360nm} en presencia de péptido – DO_{360nm} en ausencia de péptido. Se representa las medias ± desviaciones estándar de 3 ensayos. —○—, liposomas+frg11 a pH 7.6.—●—, liposomas+frg11 a pH 5.6. —□—, liposomas+p2 a pH 7.6. —■—, liposomas+p2 a pH 5.6. --△--, liposomas+poli (H) a pH 5.6. Independientemente del pH o del tipo de liposoma los valores obtenidos para el poliH fueron similares a los obtenidos por este péptido en presencia de PS a pH 5.6 (datos no mostrados).*

aumento de la superficie de las células EPC (**Ilustración 41A**) mientras que con el poliH no se apreciaron cambios en la morfología celular. Además se indujo la formación de sincitios mientras que el poliH no fue capaz de formarlos (**Ilustración 41C, Ilustración 41E**). El aumento de la concentración de frg11 de 50 a 200 μg/ml provocó un aumento del número de núcleos presentes en sincitios del 5 al 10 % del total de núcleos (**Ilustración 41E**).

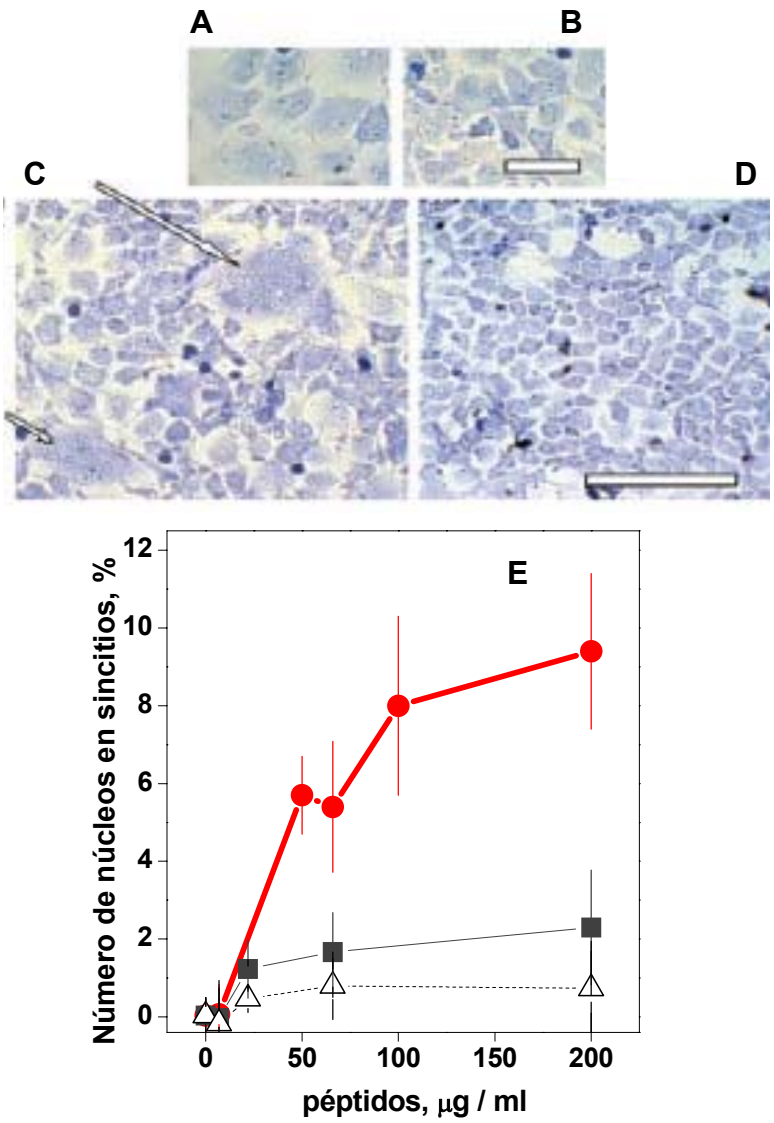


Ilustración 41. Extensión de la superficie celular (A,B) e inducción de sincitios (C,D,) por la adición de frg11 a monocapas de células EPC. *Las monocapas de células EPC en placas de 24 pocillos se incubaron con frg11, p2 o poliH durante 30 minutos a 14 ºC en medio de fusión a pH 6.0. Despues, se lavaron las células y se incubaron durante 2 h con medio de fusión a pH 7.5. Las monocapas de células se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa.* ***A,*** *microfotografía de extensión celular en presencia de 200 μg/ml de frg11.* ***B,*** *microfotografía de células en ausencia de frg11. Barra horizontal, 40 μM.* ***C,*** *microfotografía de sincitios en presencia de 200 μg/ml de frg11. Las flechas señalan los sincitios obtenidos.* ***D,*** *microfotografía de células en ausencia de frg11*
Barra horizontal, 100 μM. E, se muestra el recuento de ~ 400 núcleos/pocillo, de núcleos en sincitios de 3 o más núcleos. Los valores se calcularon según la fórmula: número de núcleos presentes en sincitios / número total de núcleos x 100. Se representan las medias y desviaciones estándar de 3 experimentos por duplicado. —●—, incubación con frg11. —■—, incubación con p2. --△--, incubación con poliH.

- **Exposición de PS en la membrana plasmática por el frg11**

Debido a que se demostró la interacción del frg11 con la PS y a que la PS se localiza preferencialmente en la cara interna de las membranas plasmáticas celulares era posible que la afinidad del frg11 por la PS pudiera provocar una translocación de la PS de la cara interna a la cara externa de la membrana durante la fusión. Es por ello que utilizando anexina (proteína que presenta una alta afinidad por la PS)-FITC, se estudió si el frg11 era capaz de provocar la aparición de fluorescencia en la cara externa de la membrana plasmática de células tratadas con frg11 a pH 6.5 (**Ilustración 42**). Para descartar apoptosis (debido a que también causa la translocación de PS a la cara externa de la membrana plasmática), las células se tiñeron simultáneamente con

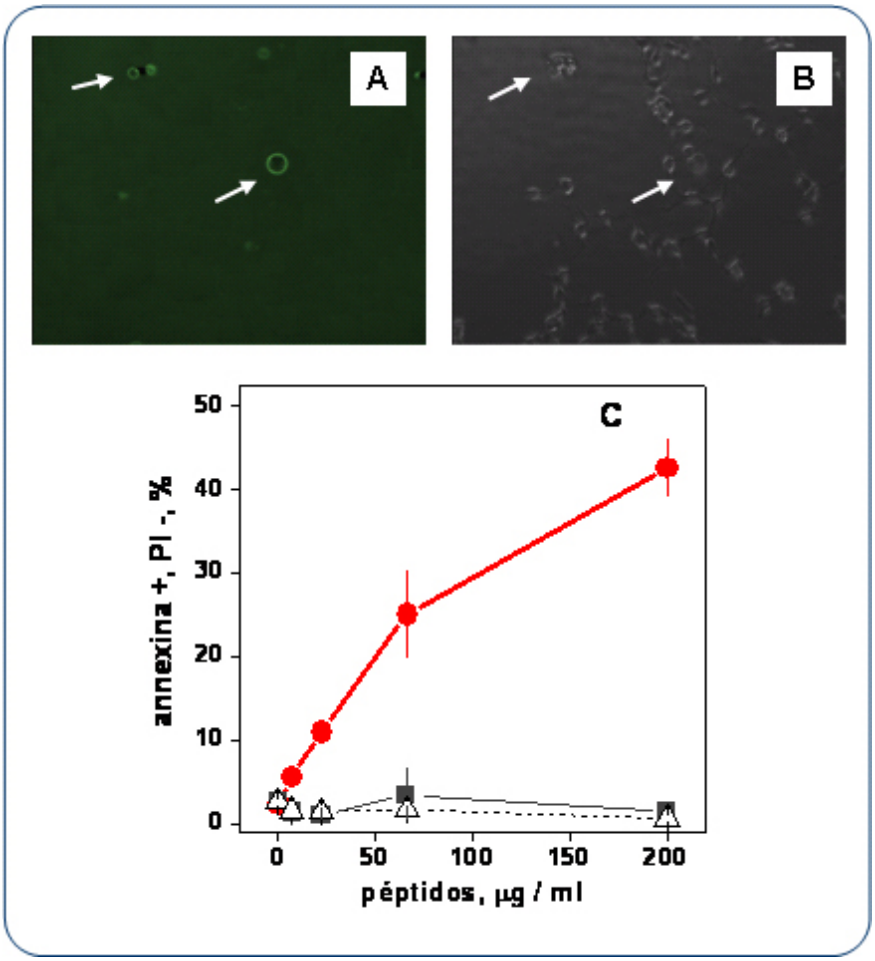


Ilustración 42.Tinción con Anexina-FITC de células EPC tratadas con frg11. *Las monocapas de células EPC en placas de 24 pocillos se incubaron 30 min a pH 6.0 con frg11. Las monocapas se lavaron y se tiñeron con Anexina-FITC + loduro de propidio (IP). Después, se levantaron con PBS- y se analizaron por citometría. Se consideraron positivas para ambos marcajes todas aquellas células que presentaron una fluorescencia superior al 95 % de la presente en los controles de EPC no tratados con frg11. El % de células IP+ (células muertas) no superó el 8 % del total.* ***A,*** *microfotografías de fluorescencia.* ***B,*** *el mismo campo en contraste de fases. Las microfotografías corresponden a células EPC teñidas con Anexina-FITC en presencia del frg11 a una concentración de 65 µg/ml. Las flechas señalan las células donde se ha producido la fluorescencia de membrana de células EPC por la tinción con Anexina-FITC .* ***C,*** *se muestran las medias ± desviaciones estándar del % de células Anexina-FITC+, IP– obtenido en 3 experimentos.* —●—*, incubación con frg11.* —■—*, incubación con p2.* --△--*, incubación con poliH.*

Ioduro de propidio (IP) que solo tiñe los núcleos de las células muertas.

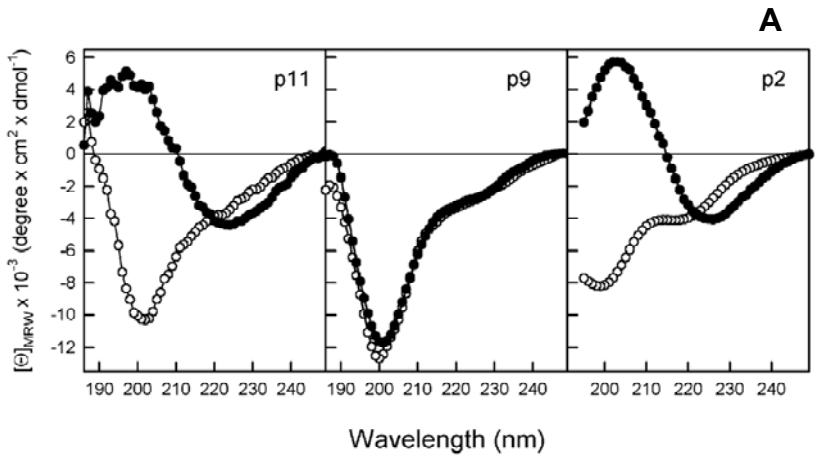
La **Ilustración 42C** muestra que al añadir 200 μg de frg11 por ml a pH 6.5, se obtuvo un ~ 50 % de células anexina-FITC$^+$ IP$^-$, mientras que a 25 μg/ml tan sólo se obtuvo un ~ 5 % de células anexina-FITC$^+$ IP$^-$. Por el contrario, la adición de 200 μg / ml de p2 o poliH no produjeron incrementos en el porcentaje de células anexina-FITC$^+$ IP$^-$.

- **Estructura del frg11 por IR y CD a distintos pH**

La agregación del frg11 a pH fisiológico en tampones citrato/fosfato sugirió que el frg11 sufría cambio conformacionales al variar el pH, por lo que se estudiaron las conformaciones del frg11 a distintos pH por infrarrojo (IR) y por dicroísmo circular (CD). Para estudiar además la posible influencia de las membranas en la conformación del frg11 se realizaron dichos estudios en ausencia y en presencia de liposomas de PS.

El espectro CD del frg11 a pH 5.6 mostró un 34.4 % de estructura en hoja-β (**Ilustración 43A, B**), valor similar al obtenido por IR (**Ilustración 44**). El espectro CD del frg11 a pH 5.6 en presencia de PS mostró un aumento de la estructura en hoja-β hasta el 84 %, a diferencia de lo observado con la estructura de giro-β que disminuyó del 28.2 al 1.7 % (**Ilustración 43A, B**). Al incrementar la relación fosfolípido/frg11 de 11 a 40:1 no se apreciaron variaciones en el espectro de CD. Por el contrario, la adición de PS al poliH, o de PC al frg11 no provocaron cambios significativos en el espectros correspondientes (datos no mostrados). A pH 7.6, no se pudieron obtener espectros de CD debido a la agregación del frg11 tanto en ausencia como en presencia de PS. Que la variación de la conformación se debió a la parte carboxi terminal del frg11 se demostró por la similitud de los espectros entre frg11 y p2 en comparación con p9 (**Ilustración 43A, B**).

La descomposición del espectro de la banda amida mostró un incremento en la banda de 1633-1637 nm al bajar el pH de 7.6 a 5.6, debido al incremento en el contenido de hoja-β del 5.8 ± 1.2 al 25.4 ± 2.7 % (**Ilustración 44**) confirmando los datos obtenidos por CD.



B

	Estructura	frg11	p9	p2
Péptido	Hoja-β	35.3	31.8	28
	No ordenado	36.5	34.7	31
	Giro-β	28.2	33.5	43
Péptido + PS	Hoja-β	84.4	32.2	91
	No ordenado	13.9	34.2	8
	Giro-β	1.7	33.6	1

***Ilustración 43. Conformación del frg11 a pH 7.5 y 5.6 en ausencia (○) o presencia de PS (●) por CD. A**, Espectro de dicroísmo circular (CD) de 100 µg/ml de frg11 a pH 5.6 incubado en ausencia o presencia de PS a una relación molar lípido/péptido de 11:1 (se obtuvieron resultados similares tras utilizar una relación 40:1). El espectro CD a pH 7.6 no fue posible debido a la agregación del frg11. **B**, Se muestra el cálculo de porcentaje de estructura secundaria de los espectros. Para su comparación se muestran también los espectros obtenidos previamente para el p2 (aa 58-80) y p9 (aa 82-109).*

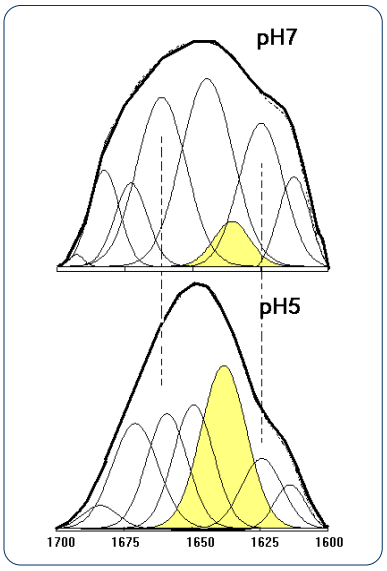


***Ilustración 44. Espectros por FTIR del frg11 a pH 7 y 5.6**. El pico sombreado corresponde con la componente de hoja-β (1633-1637nm). —, espectro de infrarrojo original. --, curva teórica, obtenida por una distribución gaussiana del espectro de infrarrojo. –, descomposición individual de las bandas.*

4.4. MODULADORES EN UNA QUIMIOTECA DE αPÉPTIDOS (αp).

4.4.1. Diseño de una quimioteca de αp

Se diseñó una quimioteca de péptidos de 17-mer con alta tendencia a formar hélices-α en formato de rastreo posicional (**Ilustración 19**), denominados en adelante αp. Para favorecer que los αp presentaran una alta tendencia a formar hélices-α, se incluyeron: i) la S y G en posiciones 1 y 17, respectivamente, aa con propiedades de "end capping" de hélices-α en los extremos N y C-terminal, respectivamente, ii) un alto número de A en posiciones 2,3,4,7,11,13,15, aa con alta tendencia a formar hélices-α y iii) pares de G y K en posiciones 4-8 y 12-16, para permitir la formación de puentes salinos para aumentar la solubilidad y estabilización de las hélices-α (**Ilustración 19A**). Por otro lado, con el propósito de generar toda la diversidad de la quimioteca (137180 αp), se incluyeron cuatro posiciones variables (X) en una de las caras de la α-hélice: residuos 6, 9, 10, 14. Como resultado la quimioteca se organizó en 4 subquimiotecas (**Ilustración 19B**), una por cada residuo variable. A su vez, cada subquimioteca se subdividió en 20 mezclas de 6859 αp cada una. Este número de mezclas se obtiene tras fijar cada una de las posiciones variables (O) con cada uno de los 20 aa. El número de αp por mezcla se obtiene tras combinar las otras tres posiciones variables (X) con 19 aa, todos a excepción de la C. No se incluyó la C en las posiciones X para evitar la formación de puentes disulfuro que podrían romper la formación de las hélices-α.

4.4.2. Cribado de las mezclas de αp.

El cribado de la quimioteca se realizó incubando antes de la infección el VHSV con distintas concentraciones de las mezclas de αp durante 4 h, 14 ºC y a pH 7.4. Ninguna de la mezclas, independientemente de la concentración utilizada, presentó efectos citotóxicos ni provocó variaciones en el pH de los medios durante la infección posterior a 24 h y 14 ºC.

No se detectaron mezclas de αp capaces de inhibir la infectividad del VHSV. Por el contrario, se observaron mezclas de αp con capacidad

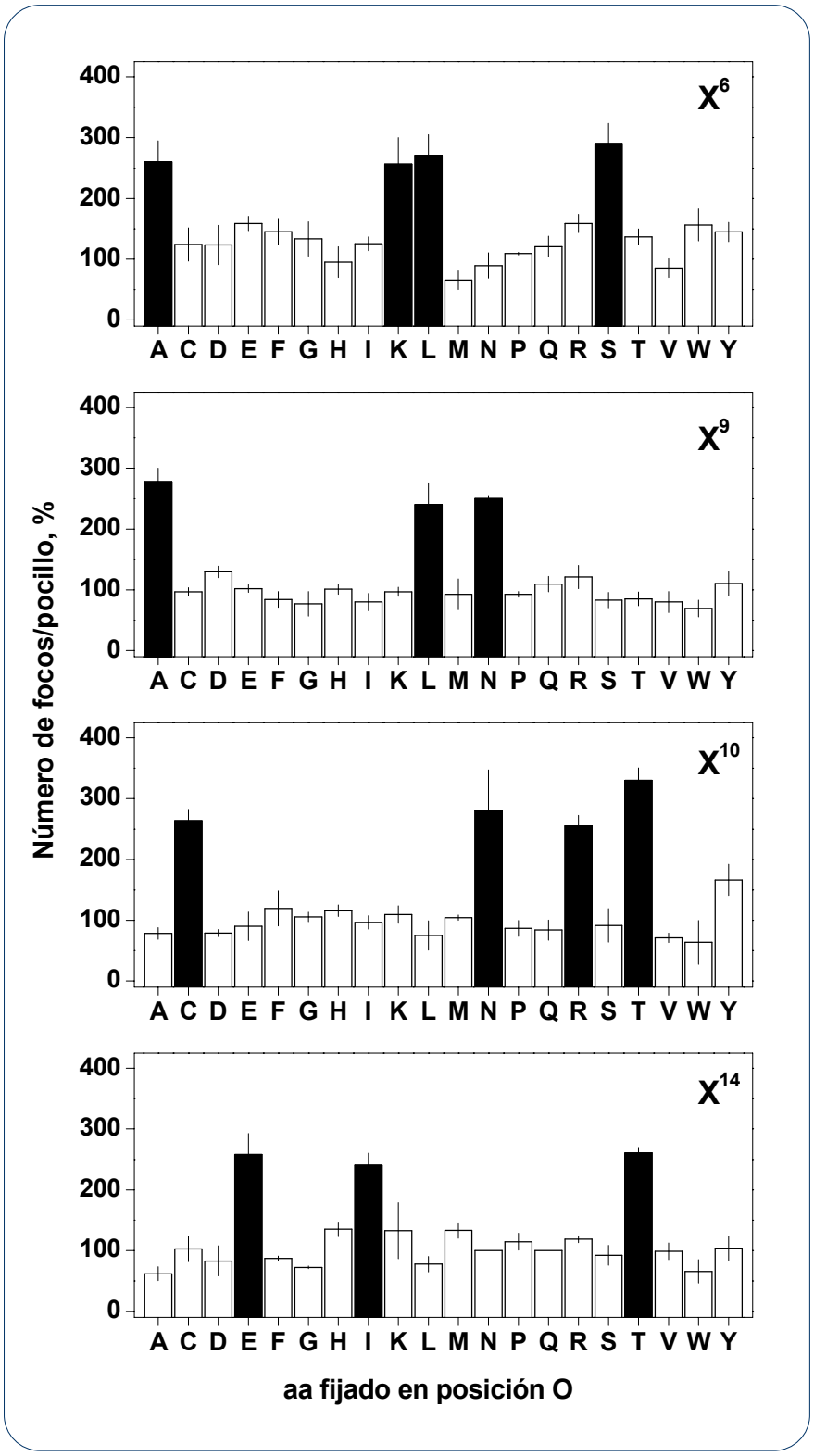


Ilustración 45. Cribado de las mezclas de αp. *Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron con VSHV en presencia o ausencia de 15 µg/ml de las mezclas de αp. El VSHV se incubó 4 h a 14 ºC con las mezclas de αp (50µl/pocillo) antes de la infección. La infección (100µl/pocillo) se realizó durante 24 h a 14 ºC. Las monocapas se fijaron con metanol y se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2C9 y DAB. Los valores se obtuvieron según la fórmula: número de focos por pocillo en presencia de las mezclas de αp / número de focos por pocillo en ausencia de las mezclas de αp x 100. Se representan las medias y las desviaciones estándar de un experimento por duplicado. Los resultados obtenidos se agrupan en 4 subgrupos, 1 por cada una de las 4 subquimiotecas (X6, X9, X10, X14). En el eje de ordenadas se indica el aa (código de una letra) en la posición O de cada mezcla de αp. El número de focos obtenido en el ausencia de αp fue de 37 ± 10.5 focos/pocillo (control). Barras en blanco, número de focos similares al control. Barras en negro, número de focos superiores al control.*

estimuladora de la infectividad del VHSV. La estimulación se caracterizó por un aumento en el número de focos detectado, el mantenimiento del tamaño de los focos y la dependencia entre el número de focos y la concentración de mezcla (datos no mostrados). A 15 µg/ml de αp, se detectaron 14 mezclas de αp que aumentaron 2-3 veces el número de focos. Las mezclas de αp que provocaron un aumento de la infectividad de VHSV a 15 µg/ml fueron aquellas que poseían: el aa A, K, L o S en posición X^6, el aa A, L o N en posición X^9, el aa C, N, R o T en posición X^{10} y el aa E, I o T en posición X^{14} (**Ilustración 45**). Al reducir la concentración de la mezcla de αp a 1-7.5 µg/ml también disminuyó el nivel de estimulación y tan sólo se detectaron 6 mezclas de αp con un nivel de estimulación similar al anterior.

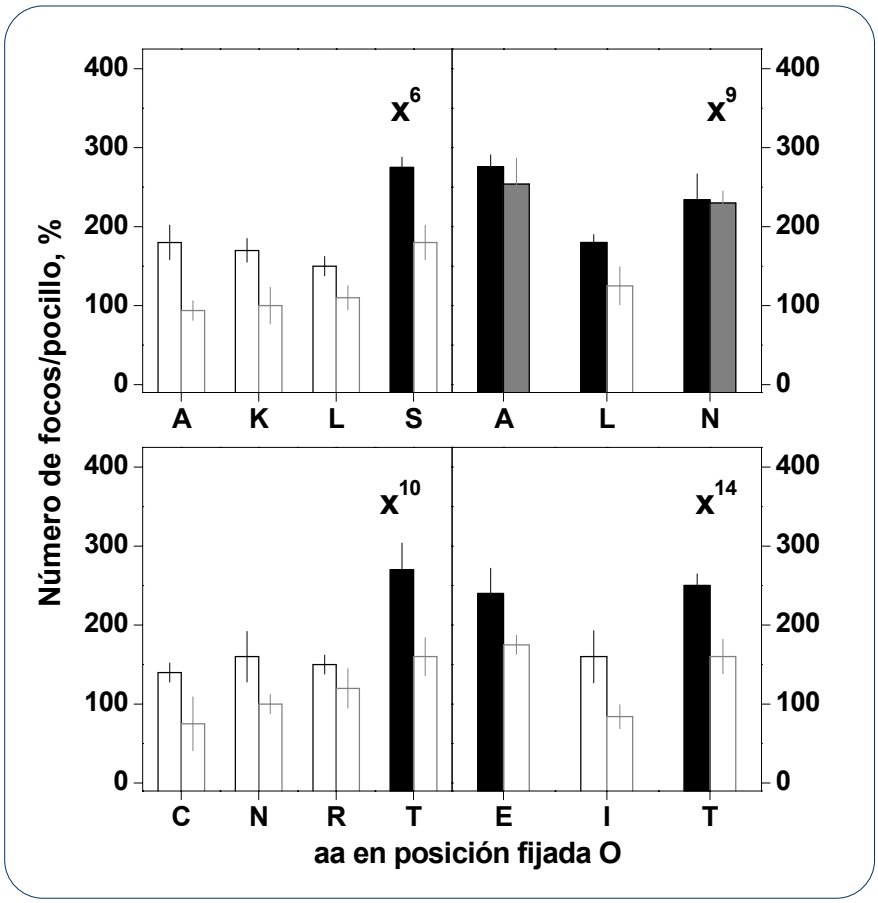


Ilustración 46. Cribado de las mezclas de αp estimuladoras seleccionadas en el primer cribado. *Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron (100µl/pocillo) con VSHV en presencia o ausencia de las mezclas de αp identificadas en el primer cribado. El tratamiento del VSHV con 7.5 (barras a la izquierda) o 1 (barras a la derecha) µg/ml de las mezclas de αp se realizó durante 4 h a 14 ºC (50µl/pocillo) antes de la infección. La infección se realizó durante 24 h a 14 ºC. Las monocapas se fijaron con metanol y se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2C9 y DAB. Los valores se obtuvieron según la fórmula: número de focos por pocillo en presencia de las mezclas de αp / número de focos por pocillo en ausencia de las mezclas de αp x 100 (medias y desviaciones estándar de un experimento por duplicado). Los resultados obtenidos se agrupan en 4 subgrupos, 1 por cada una de las 4 subquimiotecas (**X^6, X^9, X^{10}, X^{14}**). En el eje de ordenadas se indica el aa (código de una letra) en la posición O de cada mezcla. El número de focos obtenido en ausencia de αp fue de 35 ± 12.3 focos/pocillo (control). Barras blancas, número de focos similares al control. Barras negras y grises, número de focos superiores al control.*

Las mezclas de αp que provocaron un aumento de la infectividad de VHSV a 1-7.5 µg/ml fueron aquellas que poseían: el aa A en la posición X^6, el aa A o N en la posición X^9, el aa T en la posición X^{10} y el aa E o T en la posición X^{14} (**Ilustración 46**).

Teniendo en cuenta estos resultados, se sintetizaron las 4 secuencias de αp derivadas de los resultados con la mayor estimulación teórica posible: SAAEASAKATAEAEAKG (αp3), SAAEASAKNTAEAEAKG (αp4), SAAEASAKATAEATAKG (αp5) y SAAEASAKNTAEATAKG (αp6) (**Ilustración 47**).

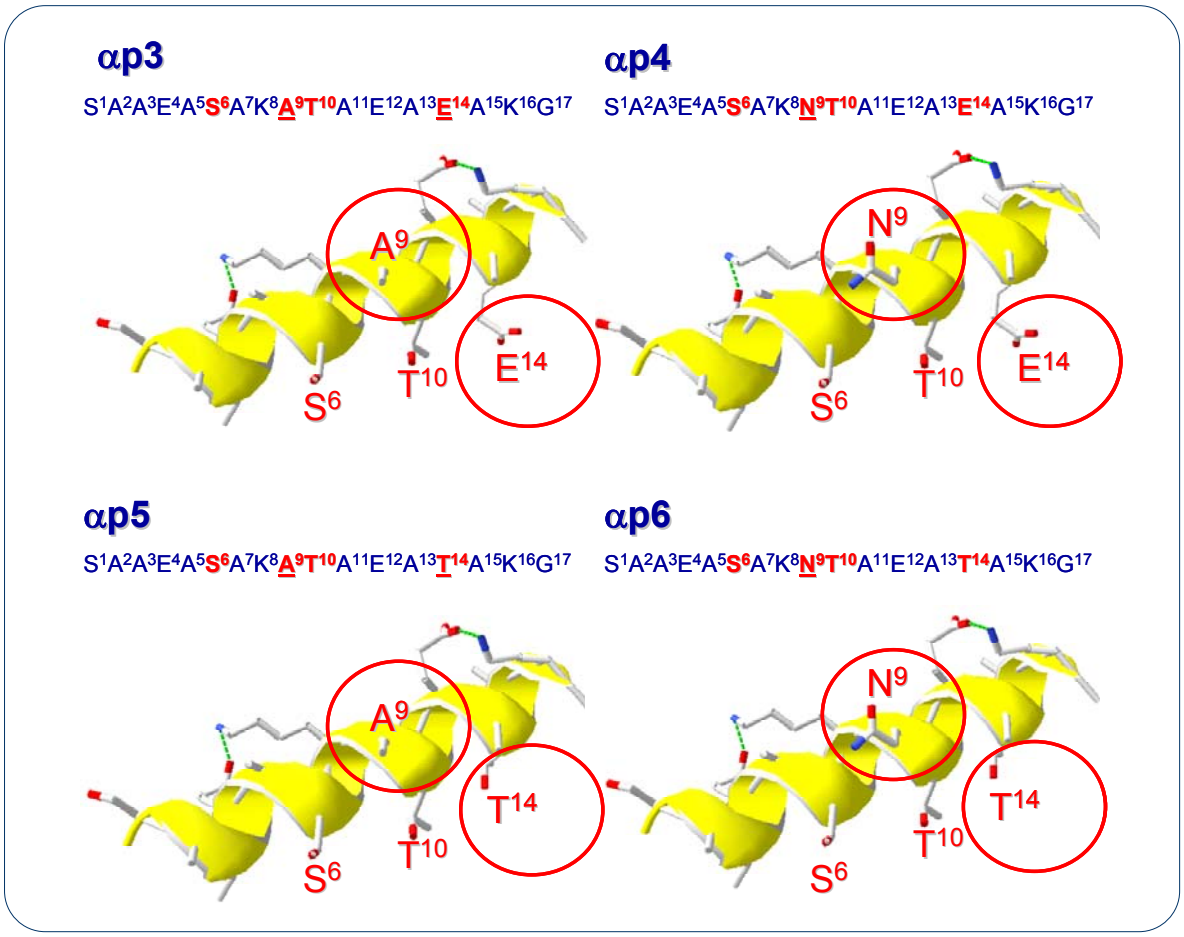


Ilustración 47. Secuencias de aa de los αp sintetizados.
Se indican las secuencias de los αp3, αp4, αp5 y αp6 con los aa identificados como más estimulantes en las posiciones X6, X9, X10, X14 tras el doble cribado de la quimioteca de αp y sus estructuras tridimensionales más probables,. Se muestran en rojo los aa fijados en cada una de las 4 posiciones variables. Círculos rojos en el modelo estructural y subrayado en la secuencia, los aa diferentes entre los 4 αp sintetizados.

4.4.3. Ensayo de los 4 αp sintetizados.

De los 4 αp sintetizados, tan sólo αp5 y αp6 fueron capaces de estimular la infectividad del VHSV. Tanto en infecciones a 12 h (datos no mostrados) como a 24 h (**Ilustración 48A**), el aumento de la infectividad se caracterizó por un aumento en el número de focos obtenido sin variaciones en el tamaño de los focos (6-20 células/foco) (**Ilustración 48B**). Después de la incubación del VHSV con 3 μM (concentración máxima ensayada) de αp5 o αp6, ambos presentaron un nivel de estimulación similar, detectándose 4-5 veces el número de focos obtenido en las infecciones en ausencia de αp (34 ± 5.4 focos/pocillo).

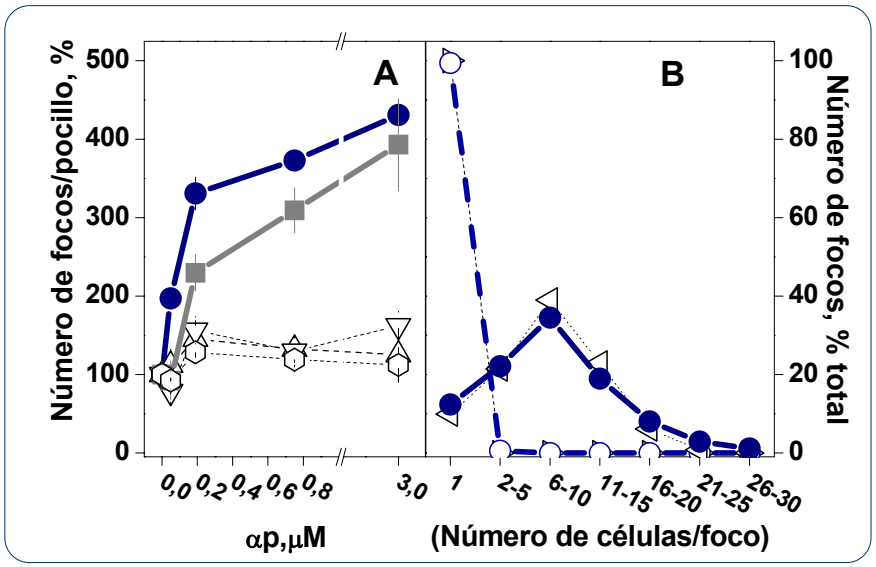


Ilustración 48. Dependencia de la estimulación, de la concentración de αp.
Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron con VSHV en presencia o ausencia de αp3, αp4, αp5, αp6. El tratamiento del VSHV con los αp se realizó durante 4 h a 14 ºC (50μl/pocillo) antes de la infección. La infección se realizó durante 24 h a 14 ºC. El rango de concentraciones de αp fue de 0,1-3 μM. Las monocapas se fijaron con metanol y se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2C9 y DAB. ***A,*** *Los valores se calcularon según la formula: número de focos por pocillo en presencia del αp / número de focos por pocillo en ausencia de αp x 100. Se muestra las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos por triplicados. El número de focos obtenido en ausencia de αp fue de 34 ± 5.4 focos/pocillo. --△--, VSHV-αp3. --▽--, VSHV-αp4. —●—, VSHV-αp5. —■—, VSHV-αp6. --○--, VSHV-poliH.* ***B,*** *Distribución del tamaño de foco según la formula: tamaño de foco por grupo en presencia de 3 μM αp5 / tamaño de foco por grupo en ausencia de αp5 x 100. Se muestra el número de focos en porcentaje del total de analizados para cada rango de tamaño de foco en 150 focos. —●—, VSHV-αp5 a 24 h. ·····◁·····, VSHV. —○—, αp5 a 12 h. ·····▷·····, VSHV a 12 h.*

Al reducirse la concentración de αp, se redujo la estimulación de ambos αp, aunque a 0,1-0,8 μM el αp5 mostró una mayor estimulación que el αp6. Contrariamente a lo esperado, los αp3 y αp4 no fueron capaces de aumentar la infectividad de VHSV a ninguna de las concentraciones ensayadas. Resultados similares a los obtenidos con αp3 y αp4 se obtuvieron con αp7 (péptido irrelevante que se utilizó como control negativo de estimulación, denominado poliH en los ensayos relacionados con el frg11 comentados con anterioridad).

Ninguno de los αp ensayados provocó variaciones en el pH de los sobrenadantes de infección, ni efectos citotóxicos sobre las células EPC.

4.4.4. Estructura de αp5 y αp6

Para comprobar que la tendencia de los αp5 y αp6 a formar hélices-α se correspondía con la realidad, se determinó la estructura de ambos por espectroscopia IR (**Ilustración 49**).

El 40 % de la composición de la banda Amida I en los espectros de los αp5 o αp6 disueltos en D_2O:DMSO:TFE, se caracterizó por la aparición de un pico a 1650 cm^{-1} , pico característico de hélices-α.

La composición de la banda Amida I en los espectros de los αp disueltos en D_2O:DMSO se caracterizó por la aparición de 2 picos a: 1619 cm^{-1} y 1695 cm^{-1}. Estos picos son característicos de estructuras-β intermoleculares indicadoras de agregación.

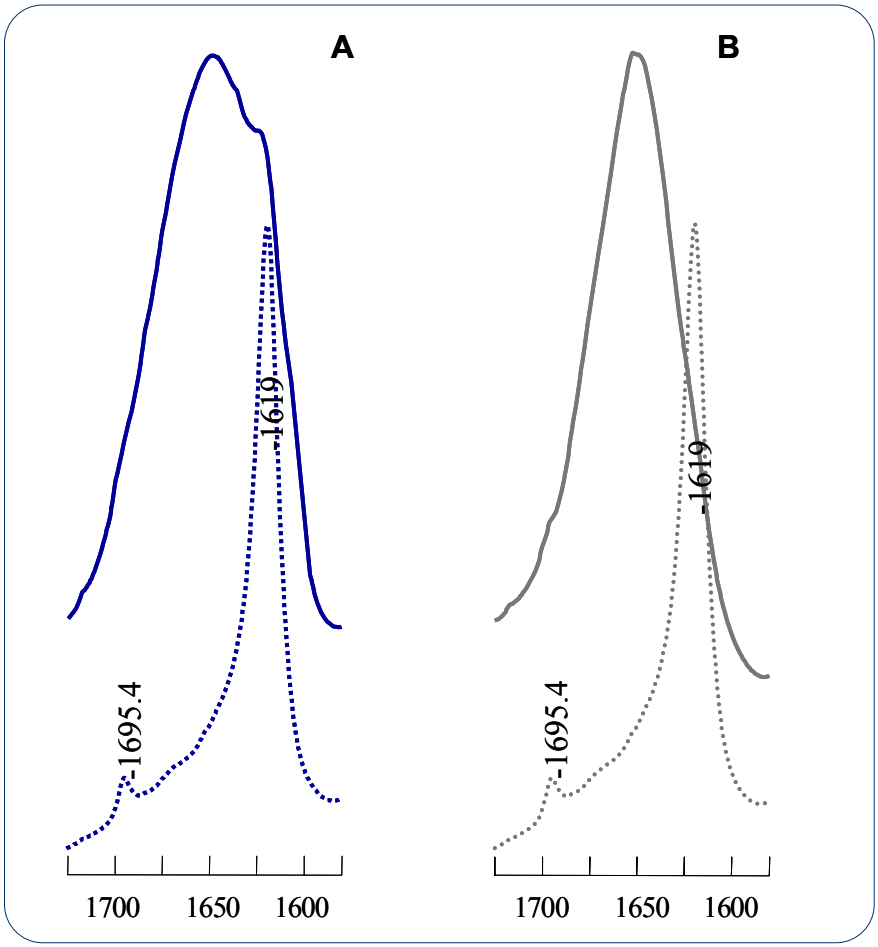


Ilustración 49. Espectro IR de αp5 (A) y αp6 (B).
Banda Amida I obtenida del espectro de infrarrojo (IR). La determinación se llevó a cabo en D2O (····) y en D2O:TFE (60:40) (—). Se indica en vertical la longitud de onda en nm de los picos obtenidos.

4.4.5. Análisis de la estimulación de αp5 y αp6

- **Tipo de incubación en la estimulación αp**

La influencia del tipo de incubación en la estimulación de los αp, se evaluó por 3 tipos diferentes de incubación al empleado en el cribado (incubación de VHSV-αp a pH 7.4 antes de la infección). Los 3 nuevos tipos de incubación ensayados fueron: i) incubación de VHSV-αp a pH 5.6 antes de la infección, ii) incubación de células-αp antes de la infección y iii) incubación de células-αp después de la infección. En todas ellas se utilizó una concentración de αp de 3 μM, la concentración con la que se obtuvo una mayor estimulación en el cribado y no se retiraron los inóculos durante la infección, que se realizó durante 24 h a 14 ºC y a pH

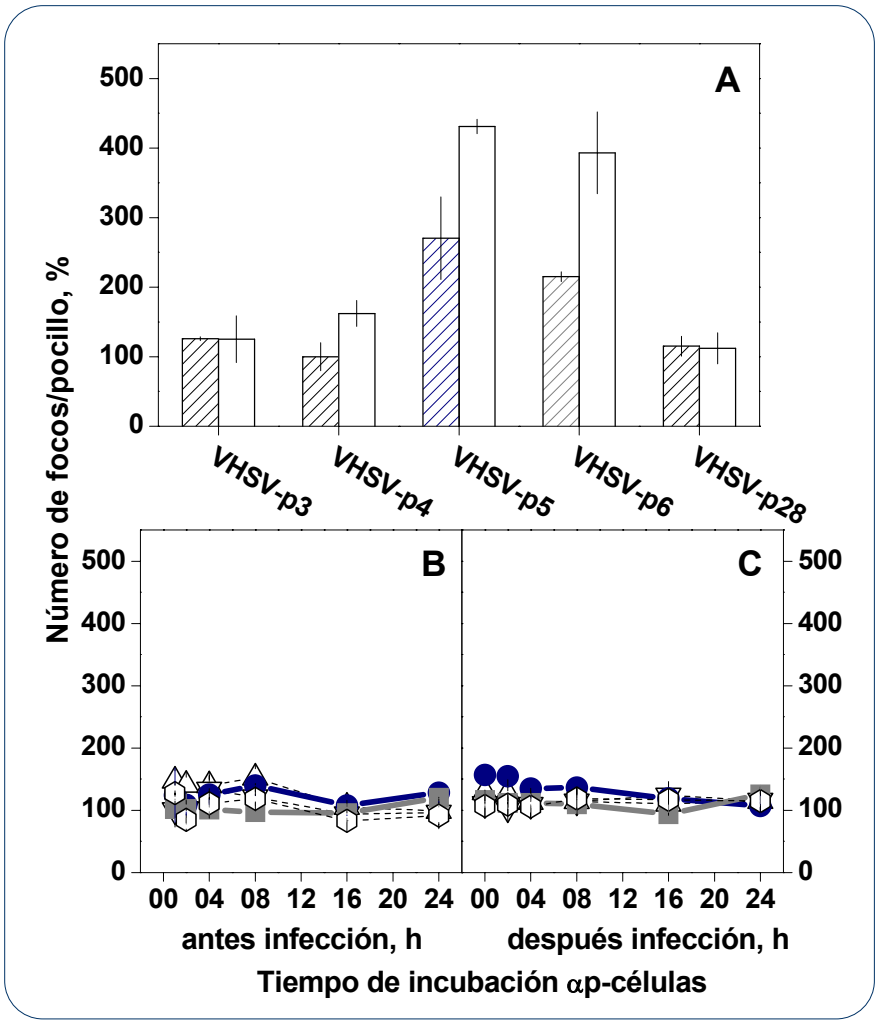


Ilustración 50. Influencia del tipo de incubación en la estimulación de los αp.
Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron (100μl/pocillo) con VSHV en presencia o ausencia de 3 μM de αp3, αp4, αp5, αp6 o αp28. La incubación de los αp se llevó a cabo por 3 tipos de incubación: A, VHSV-αp antes de la infección a pH 5.6 (4 h 4 ºC, 50μl/pocillo). B, células-αp antes de la infección (0-24 h 14 ºC, 100μl/pocillo).C, células-αp despues de la infección (0-24 h 14 ºC, 100μl/pocillo). Las infecciones se realizaron durante 24 h a 14 ºC y pH 7.4.Las monocapas se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2C9 y DAB. Se representan los porcentajes según la fórmula: número de focos por pocillo en presencia del αp / número de focos por pocillo en ausencia de αp x 100, medias y desviaciones estándar de 2 experimentos por triplicado. El número de focos/pocillo en ausencia de αp fue de 53.5 ± 5.38 (A), 40.5 ± 5,27 (B) y 105.5 ± 4.79 (C). Barras rayadas, incubación antes de la infección VSHV-αp a pH 5.6. Barras blancas, incubación antes de la infección VSHV-αp a pH 7.4. --△--, VSHV + αp3. --▽--, VSHV + αp4. —●—, VSHV + αp5. —■—, VSHV + αp6. --⬡--, VSHV + αp28.

7.4.

La **Ilustración 50A** muestra que en la incubación de VHSV-αp5 o VHSV-αp6 a pH 5.6 antes de la infección se obtuvieron 2-3 veces el número de focos obtenido en el control en vez de las 4-5 veces obtenidas a pH 7.4. En la incubación células-αp antes o después de la infección, el número de focos obtenido no aumentó significativamente (**Ilustración 50B, C**).

Por otro lado, αp3, αp4 y αp28 (αp de igual composición de aa pero con distinta secuencia que el αp5), carecieron de estimulación alguna en ninguno de los tipos de incubación ensayados (**Ilustración 50**).

Para ninguno de los αp, ni para los distintos tipos de incubación se detectaron cambios en la distribución de los tamaños de foco (datos no mostrados).

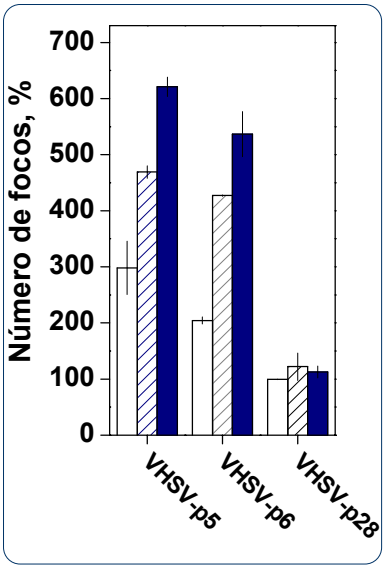


Ilustración 51. Influencia de la concentración de αp en la incubación VSHV-αp
Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron (100μl/pocillo) con VSHV en presencia o ausencia de αp3, αp4, αp5, αp6 o αp28. El tratamiento del VSHV con los αp se realizó antes de la infección durante 4 h a 14 ºC a pH 7.4. La infección se realizó a 3 μM de αp durante 24 h a 14 ºC y a pH 7.4. Las monocapas se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2C9 y DAB. Los porcentajes se obtuvieron según la fórmula: número de focos por pocillo en presencia del αp / número de focos por pocillo en ausencia de αp x 100. Se representan las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos por triplicado. El número de focos/pocillo en ausencia de αp fue de 38.48 ± 13.11. Barras blancas, incubación antes de la infección con 3 μM de αp. Barras rayadas, incubación antes de la infección con 6 μM de αp. Barras azule, incubación antes de la infección con 12 μM de αp. Resultados similares a los obtenidos con el αp28 se obtuvieron con el αp3 y αp4 (datos no mostrados).

- ## Concentración de αp en la estimulación αp

El cribado demostró que existe una dependencia entre la concentración de los αp y su estimulación. Sin embargo, debido a que el cribado se llevó a cabo utilizando las mismas concentraciones de αp en la incubación antes de la infección y durante la infección, no se pudo determinar en qué momento estimulaban los αp. Con el propósito de definir el momento preciso de la estimulación, se llevaron a cabo infecciones a 3.6 y 12 μM αp durante la incubación antes de la infección y manteniendo a 3 μM los αp durante la infección. La **Ilustración 51** muestra que en el caso del αp5, a la concentración de 12 μM se obtuvo ~ 6 veces el número de focos obtenido en el control, mientras que a 3-6 μM se obtuvo un número de focos de solo ~ 3 veces el obtenido en el control. En el caso del αp6, aunque la estimulación fue inferior a la obtenida para el αp5, fue también dependiente de la concentración de αp en la incubación VHSV-αp antes de la infección. Al realizar estos ensayos con el αp3, αp4 o αp28, no se detectó aumento alguno en el número de focos a ninguna de las concentraciones ensayadas (datos no mostrados).

- **Tiempo y temperatura en la estimulación αp**

Para estudiar la influencia del tiempo de incubación VHSV-αp antes de la infección en la estimulación de la infectividad del VHSV, la incubación VHSV-αp antes de la infección se realizó desde 0 a 8 h. Estos ensayos se llevaron a cabo a concentraciones de αp de 0.6 μM (**Ilustración 52A**) y 0.15 μM (**Ilustración 52B**), por debajo del máximo estimulatorio (3 μM). Al adicionar los αp al inicio de la infección (0 h) o a 1 h, no se detectó estimulación alguna de los αp a ninguna de las 2 concentraciones ensayadas. Sin embargo, a medida que se aumentó el tiempo de incubación, ambos αp recuperaron su capacidad estimuladora. La incubación de 0.15 μM αp a 4 h, estimuló ~ 3 veces y 2.5 veces el número de focos para el αp5 y el αp6, respectivamente. La incubación de 0.6 μM αp a 4 h, estimuló ~ 4 veces el número de focos para el αp5 y el αp6. En incubaciones a 8 h y a 24 h (datos no mostrados), independientemente de la concentración utilizada, el número de focos obtenido en presencia de αp5 y αp6 se mantuvo a ~ 4 veces. Tanto el αp28 como los αp3 y αp4, no aumentaron el número de focos (datos no mostrados).

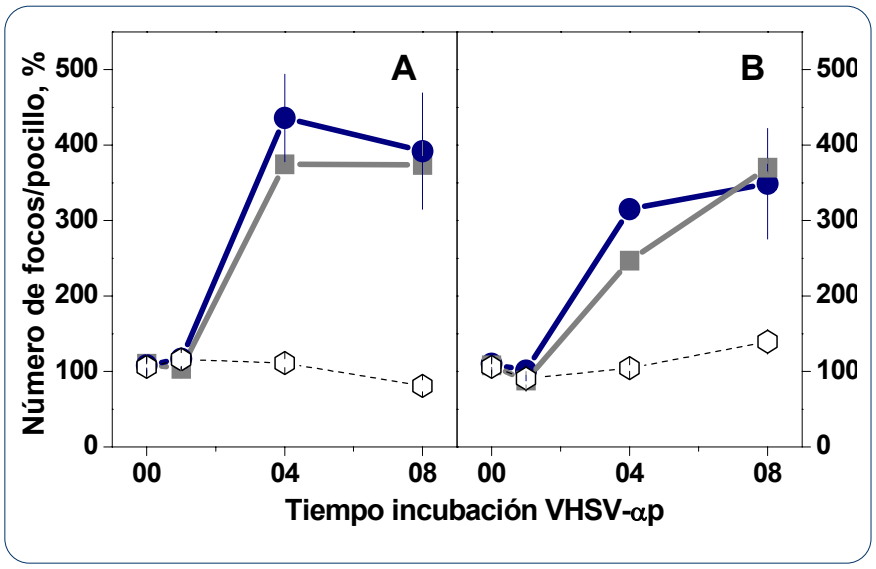


Ilustración 52. Influencia del tiempo de incubación VSHV-αp. *Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron (100μl/pocillo) con VSHV en presencia o ausencia de αp3, αp4, αp5, αp6 o αp28. El tratamiento del VSHV con los αp se realizó antes de la infección durante los tiempos indicados a 14 ºC, pH 7.4 y a 0,6 μM (**A**) y 0,15 μM (**B**) de αp. La infección se realizó durante 24 h a 14 ºC y pH 7.4. Las monocapas se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2C9 y DAB. Los porcentajes se obtuvieron según la fórmula: número de focos por pocillo en presencia de αp / número de focos por pocillo en ausencia de αp x 100 (medias y desviaciones estándar de 2 experimentos por triplicado). El número de focos/pocillo en ausencia de αp fue de 53.32 ± 6.11. —●—, VSHV-αp5. —■—, VSHV-αp6. --○--. VSHV-αp28. Resultados similares a los obtenidos con el αp28 se obtuvieron con el αp3 y αp4 (datos no mostrados)*

Para estudiar la influencia de la temperatura de incubación VHSV-αp en la estimulación de la infectividad del VHSV, se realizaron incubaciones VHSV- αp a 14 ºC (temperatura utilizada en los ensayos

previos) y a 4 ºC, a 3 µM y a 0,15 µM y/o a 1 o a 4 h. La **Ilustración 53** muestra que la estimulación después de la incubación VHSV-αp durante 4 h a 4 ºC solo se redujo un 5-10 % en comparación con la obtenida a 14 ºC, independientemente de la concentración/tiempo utilizada tanto con el αp5 como con el αp6. Tanto el αp28 como los αp3 y αp4 no mostraron estimulación alguna al incubarlos a 4 ºC (datos no mostrados).

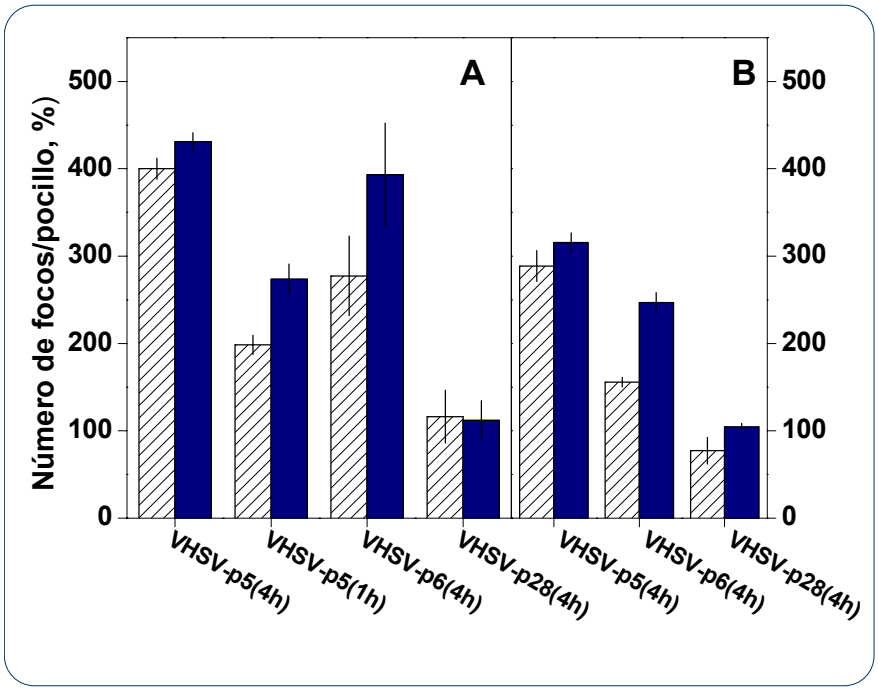


Ilustración 53. Influencia de la temperatura de incubación VSHV-αp. *Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron (100µl/pocillo) con VSHV en presencia o ausencia de αp5, αp6 o αp28. La incubación del VSHV con los αp antes de la infección fue a pH 7.4 y 4 ºC (Barras rayadas) o 14 ºC (Barras azules) y durante 1 o 4 h, según se indica. Las infecciones se realizaron durante 24 h a 14 ºC y pH 7.4. Las concentraciones de αp durante la infección fueron de 3 µM (**A**) o 0,15 µM (**B**). Las monocapas se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2C9 y DAB. Los porcentajes se calcularon según la fórmula: número de focos por pocillo en presencia del αp / número de focos por pocillo en ausencia de αp x 100 (medias y desviaciones estándar de 2 experimentos por triplicado). El número de focos/pocillo en ausencia de αp fue de 38.3 ± 3.2. Resultados similares a los obtenidos con αp28 se obtuvieron con αp3 y αp4 (datos no mostrados).*

- **Línea celular en la estimulación αp**

Para estudiar la influencia de la línea celular en la estimulación de la infectividad del VHSV, se utilizó la línea RTG-2 (materiales y métodos). Esta línea celular fibroblástica y de morfología filamentosa permite la obtención de focos de VHSV a las 36 h post-infección (**Ilustración 54A**).

Las incubaciones del VHSV con ≥ 0,75 µM αp5 y αp6 durante 4 h antes de la infección, aumentaron ~ 3 veces el número de focos obtenido con respecto al VHSV (**Ilustración 54B**). Tampoco se observaron variaciones significativas en cuanto a la distribución de los tamaños de foco en presencia de αp5 y αp6 (datos no mostrados). Por

otro lado, las incubaciones del VHSV con αp3, αp4 o αp28 no alteraron significativamente ni el número (**Ilustración 54B**), ni el tamaño (datos no mostrados) de los focos obtenidos en infecciones con VHSV sobre monocapas de células RTG-2.

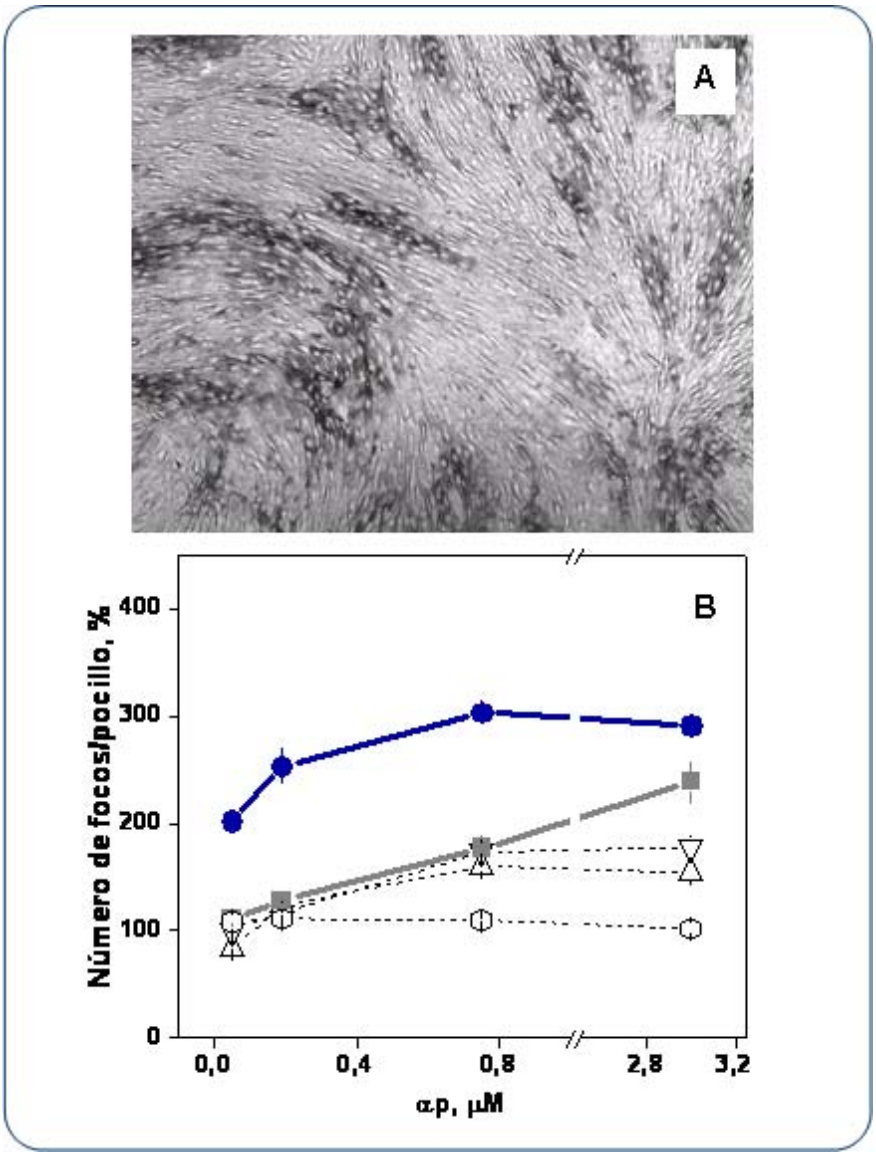


Ilustración 54. Influencia de la línea celular RTG-2. *Las monocapas de células RTG-2 crecidas en placas de 96 pocillos se infectaron (100μl/pocillo) con VSHV en presencia o ausencia de αp3, αp4, αp5, αp6 o αp28 incubados antes de la infección durante 4 h a 14 ºC y a pH 7.4, en 50μl/pocillo. La infección se realizó durante 36 h a 14 ºC. Las monocapas se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2C9 y DAB.* ***A,*** *Microfotografía de monocapas de células RTG-2 infectadas con VSHV (los focos se observan como áreas oscuras).* ***B,*** *Se representan porcentajes según la fórmula: número de focos por pocillo en presencia de αp / número de focos por pocillo en ausencia de αp x 100. Se muestran las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos con triplicados. El número de focos/pocillo en ausencia de αp fue de 63.3 ± 3.05. --△--, VSHV-αp3. --▽--, VSHV-αp4., —●— VSHV-αp5. —■—, VSHV-αp6. --○--, VSHV-αp28.*

- **Partícula vírica en la estimulación αp**

Para estudiar la especificidad de los αp con respecto a la partícula vírica en la estimulación de su infectividad, inicialmente se

estimó la estimulación de los αp con otro Norvirhabdovirus relacionado con el VHSV, el virus de la necrosis hematopoyética vírica (IHNV). El estudio de la estimulación de los αp se llevó a cabo por un ensayo de focos de IHNV sobre monocapas de células EPC basado en la detección de la síntesis de la N_{IHNV} transcurridas 44 h post-infección a 14 ºC. Incubaciones con IHNV incubado antes con 3 µM αp5 y αp6 durante 4 h, aumentaron ~ 3 veces el número de focos de IHNV (**Ilustración 55**), manteniéndose inalterado el tamaño de los mismos (datos no mostrados). Por otro lado, las incubaciones del IHNV con αp3, αp4 o αp28 no provocaron alteraciones significativas en la infectividad del IHNV sobre las células EPC (**Ilustración 55**).

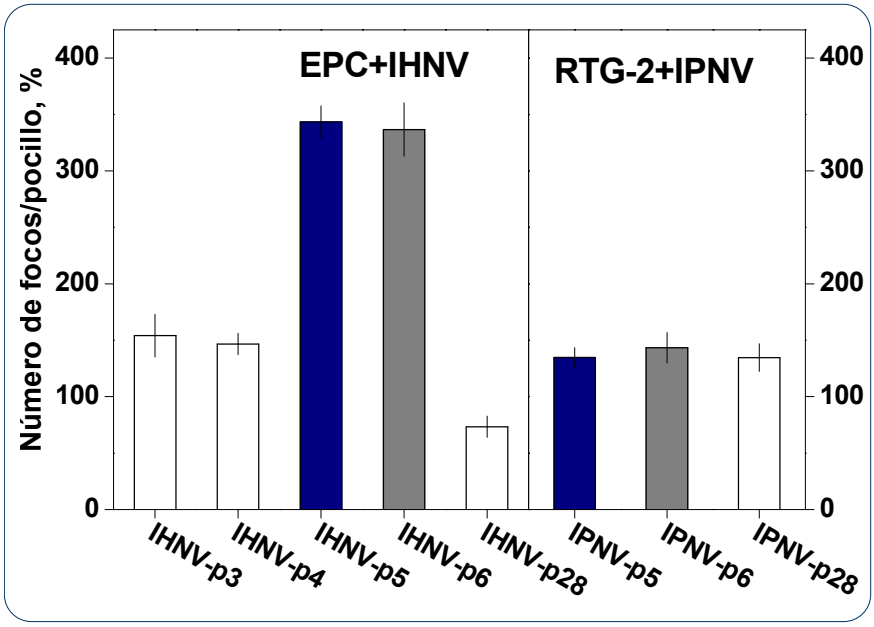


Ilustración 55. Estimulaciones con IHNV- αp e IPNV- αp. *Las monocapas de células EPC o RTG-2 en placas de 96 pocillos se infectaron con IHNV o IPNV, respectivamente, en presencia o ausencia de 3 µM de αp3, αp4, αp5, αp6 o αp28. El tratamiento del VSHV con los αp se realizó antes de la infección durante 4 h a 14 ºC y pH 7.4, en 50 µl/pocillo. La infección se realizó durante 44 (EPC) o 36 (RTG-2) h a 14 ºC. Las monocapas se tiñeron con un cocktail de AcMo anti-NIHNV o el AcMo anti-VP2IPNV y DAB. Los porcentajes se obtuvieron según la fórmula: número de focos en presencia de αp / número de focos en ausencia de αp x 100. Se representan las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos por triplicado. El número de focos/pocillo en ausencia de αp fue de 133.5 ± 13.43 y de 26.11 ± 7.8 para EPC y RTG-2, respectivamente.*

Como alternativa a los Norvirhabdovirus de peces, se estimó la estimulación de los αp frente a un Birnavirus de peces, el virus de la necrosis pancreática vírica (IPNV). La estimulación de los αp sobre el IPNV se evaluó por un ensayo de focos de IPNV sobre células RTG-2 basado en la detección de la síntesis de la $VP2_{IPNV}$ transcurridas 36 h post-infección. A diferencia de lo observado para los Norvirhabdovirus, todas las incubaciones de IPNV ya fueran con αp5, αp6 o αp28 no

provocaron variaciones significativas en la infectividad del IPNV (**Ilustración 55**).

Para comprobar si la estimulación del αp5 observada en 2 rhabdovirus de peces VHSV (**Ilustración 48**) e IHNV (**Ilustración 55**) y no en el Birnavirus de peces IPNV (**Ilustración 55**), era observable en rhabdovirus de otros organismos, se estudió la estimulación de αp5 sobre la infectividad del virus de la estomatitis vesicular (VSV), un rabdovirus de mamíferos muy utilizado como modelo para estudios sobre rabdovirus.

La estimulación de αp5 sobre el VSV se evaluó por el ensayo de formación de placas sobre células BSR crecidas en placas de 6 pocillos. Incubaciones del VSV con el αp5 durante las 4 h antes de la infección provocaron un aumento de ~ 3 veces el número de placas (**Ilustración 56**). Este aumento de la infectividad del VSV se pudo comprobar tanto al realizar los ensayos a una multiplicidad de 30 pfu/pocillo como a 80 pfu/pocillo, obteniéndose en presencia de αp5 valores de infectividad de 70 ± 8.48 pfu/pocillo y 215 ± 7.07 pfu/pocillo, respectivamente.

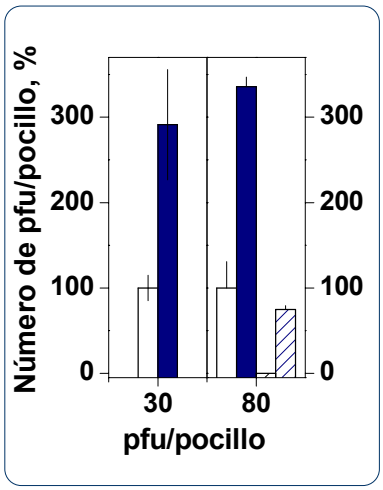


Ilustración 56. Influencia del αp5 en la infectividad del VSV. *Las monocapas de células BSR crecidas en placas de 96 pocillos se infectaron con 30 o 80 pfu/pocillo de VSV (Barras blancas) y VSV-αp5 (Barras azules). El tratamiento de VSV con αp5 se realizó durante 4 h a 37 ºC antes de la infección. La infección se realizó durante 24 h a 37 ºC, retirándose los inóculos despues de 2 h. Para 80 pfu/pocillo las infecciones también se llevaron a cabo en ausencia (Barra rayada izquierda) o presencia (Barra rayada derecha) de 40 mM NH4Cl 2 h despues de la infección. Las monocapas se lavaron y se incubaron con medio con 1 % agarosa (3 ml/pocillo) hasta el final de la infección y despues se fijaron con metanol y se tiñeron con cristal violeta. Se representan los porcentajes según la fórmula: número de pfu por pocillo en presencia de αp5 / número de pfu por pocillo en ausencia de αp5 x 100 y las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos por duplicado.*

Para comprobar si el efecto del αp5 observado sobre VSV era similar al identificado anteriormente en VHSV e IHNV, se analizó su resistencia a tratamientos transitorios con NH_4Cl. La **Ilustración 56** muestra que la infectividad del VSV incubado con NH_4Cl durante 2 h antes de la infección se inhibió totalmente. Por el contrario, la infectividad del VSV-αp5 incubando con NH_4Cl durante 2 h antes de la infección fue detectable (48 ± 2.83 pfu/pocillo) aunque menor de la obtenida en ausencia de NH_4Cl (215 ± 7.07 pfu/pocillo). Por otro lado, como se muestra en la **Ilustración 57,** no se observaron cambios significativos en cuanto al tamaño de placa observado en infecciones con VSV o VSV-αp5.

La estimulación de αp5 también se comprobó sobre la infectividad del virus Semliki Forest (SFV) que posee una proteína de superficie que si bien permite la fusión a pH ácido pertenece al tipo II de proteínas de fusión, por lo que no presenta apenas relación con la $G_{rabdovirus}$. En presencia de αp5 no se observaron variaciones en la infectividad del SFV control (datos no mostrados).

4.4.6. Interacción de VHSV-αp a nivel molecular

- **Ensayos de unión entre VHSV y αp.**

Con el propósito de estudiar la posible interacción entre αp y el VHSV, se realizaron ensayos de unión entre αp en fase sólida y VHSV purificado en fase soluble. Una vez finalizada la incubación entre αp y VHSV, la unión VHSV-αp se detectó por ELISA con el AcMo anti-N_{VSHV} 2C9. La **Ilustración 58A** muestra que a pH 7.4, con 1 μg de αp se obtuvo ~ 4 veces más $Abs_{492\text{-}620nm}$ con αp5 (1.22 ± 0.05) que con αp6 (0.33 ± 0.01). Con 2 μg de αp se obtuvo un nivel similar de unión con αp5 y αp6. Al realizar el ensayo con αp28, αp3 o αp4 en fase sólida, no se obtuvo un incremento significativo de los valores de $Abs_{492\text{-}620nm}$ con respecto a los obtenidos en ausencia de αp (datos no mostrados). A pH 5.6, la $Abs_{492\text{-}620nm}$ disminuyó a 0.17 ± 0.011, ~ 3.5 veces menos que la obtenida a pH 7.4 (**Ilustración 58B**).

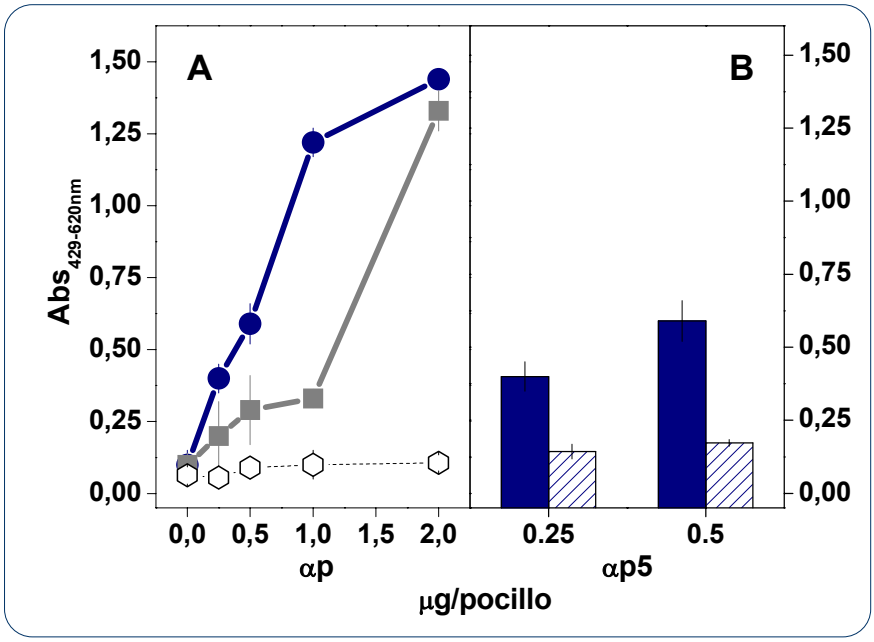


Ilustración 58. Ligamiento entre VSHV (fase soluble) y αp (fase sólida). *Los pocillos se tapizaron con αp3, αp4, αp5, αp6 o αp28. Una vez bloqueados con 2 % de leche durante 2 h, los pocillos se incubaron con 1 μg/pocillo de VSHV purificado durante 1 h a 14 ºC a pH 7.4 (**A,B**) y en el caso de αp5 también a pH 5.6 (**B**). Después, los pocillos se lavaron y se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2C9, AcPo anti-Igs de ratón-peroxidasa y OPD. Se muestra la Abs492-620nm despues de restar el fondo sin αp, las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos con duplicados. —●—, αp5. —■—, αp6. --○--, αp3, αp4 o αp28. Barras negras, incubación a pH 7.4. Barras rayadas, incubación a pH 5.6.*

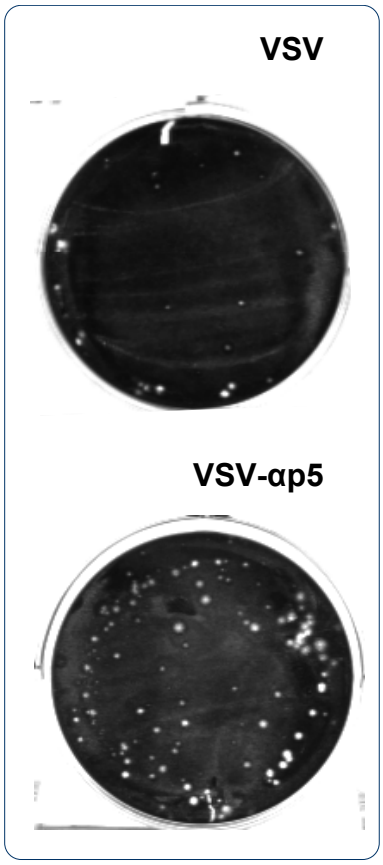


Ilustración 57. Influencia del αp5 en la infectividad del VSV. *Fotografía representativa de los placas de infección obtenidas a 30 pfu/pocillo en ausencia y en presencia de αp5.*

Demostrado que los αp interaccionaban con VHSV, dicha interacción podría tener lugar entre los αp por un lado y la membrana vírica o la G_{VHSV}, por otro.

Para estudiar la posible interacción de los αp con la membrana vírica del VHSV, se realizaron ensayos biofísicos similares a los descritos para la interacción entre el frg11 y liposomas de distinta composición lipídica (PS, PA, PC) (agregación, calorimetría, infrarrojo, etc). Pero no se detectaron interacciones significativas entre αp5 o αp6 y los liposomas utilizados (datos no mostrados).

Para el estudio de la posible interacción entre los αp y la GVHSV se realizaron ensayos de unión en fase sólida. Los αp en fase sólida se incubaron con 3 μg de GVHSV purificada a pH 7.4. Los resultados obtenidos mostraron valores máximos de 1.5-2 $Abs_{492--620nm}$ cuando se utilizó, al menos, 500 ng de αp5 por pocillo. La $Abs_{492--620nm}$ aumentó proporcionalmente con la cantidad de αp5 en fase sólida. Este aumento se detectó únicamente cuando se utilizaron para la detección de la G_{VHSV} los AcMo 3F1A12, IP1H3 y I10 y no con el AcMo C10 (**Ilustración 59A**). Estos resultados confirmados por la inhibición de la $Abs_{492--620nm}$ al añadir 1 μg de αp5 a la fase soluble (**Ilustración 59B**), demuestran la existencia de interacciones entre el αp5 y la GVHSV. También se inhibió la $Abs_{492--620nm}$ al añadir a la fase soluble los péptidos estimuladores correspondientes a las secuencias aa 99-113 (p24) y 199-213 (p25) (identificados por el pepscan de péptidos 15-mer de la GVHSV) y por el contrario, no se inhibió la $Abs_{492--620nm}$ al añadir a la fase soluble, ni el péptido estimulador correspondiente a la secuencia de aa 369-383 (p26), ni el frg11 (aa 56-110) (**Ilustración 59B**). En experimentos similares realizados con el αp6 en fase sólida, la $Abs_{492--620nm}$ fue ligeramente inferior a la obtenida con αp5 pero de características similares a las obtenidas con αp6 (datos no mostrados). En experimentos realizados con αp28 en fase sólida, no se detectó ningún incremento de la $Abs_{492--620nm}$ con ninguno de los AcMo empleados (**Ilustración 59A**).

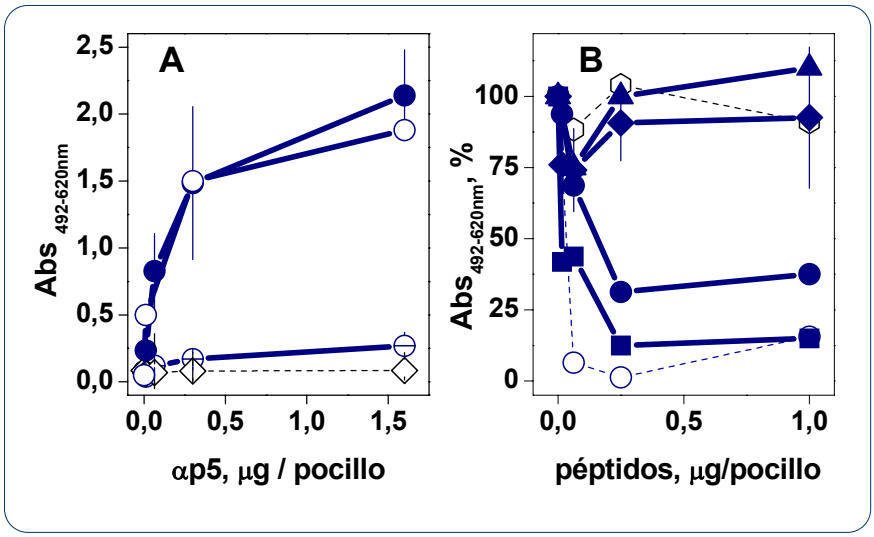


Ilustración 59. Ensayos de ELISA entre G_{VHSV} y αp5. Ligamiento entre G_{VSHV} (fase soluble) y αp (fase sólida)(A). Competición entre αp5, péptidos 15-mer y frg11 por la unión a G_{VHSV} (B). A, *los pocillos se tapizaron con 1 μg/pocillo de αp5, αp6 o αp28. Una vez bloqueados con 2 % de leche durante 2 h, los pocillos se incubaron con 3 μg/pocillo de GVSHV purificada durante 1 h a 14 ºC y pH 7.4. Después se lavaron y se tiñeron con AcPo B (—●—), un cocktail de AcMo (C10, 3F1A12, IP1H3, y I10) (—○—), el AcMo C10 (—⊖—) o sin AcMo (—◇—). Después se incubaron con AcPo anti-Igs de ratón-peroxidasa, y OPD. Se muestra en cada caso la Abs492-620nm una vez restado el fondo sin αp. Se representan las medias y desviaciones estándar de 1 experimento llevado a cabo por duplicado. Resultados inferiores a los obtenidos con el αp5 se obtuvieron con el αp6 (datos no mostrados). La Abs492-620nm con el αp28 y el AcPo B fue similar a la obtenida con el cocktail de AcMo o el AcMo C10 (datos no mostrados).* ***B****, los pocillos se tapizaron con 1 μg/pocillo de αp5. Paralelamente 3 μg de GVSHV se incubaron durante 1 h a pH 5.6 con frg11 (—▲—), p24 aa 99-113 (—●—), p25 aa 199-213 (—■—), p26 aa 359-373 (—◆—) y a pH 7.5 con αp28 (--◇--) y αp5 (--○--). Despues se reajustó el pH de todas las mezclas a pH 7.5 y se adicionaron a los pocillos de ELISA tapizados previamente con αp5. La estimación de la unión de GVSHV al αp5 se detectó AcPo anti-GVSHV, AcPo anti-Igs de ratón-peroxidasa y OPD. Se representan los porcentajes según la fórmula: Abs492-620nm en presencia de péptido / Abs492-620nm en ausencia de péptido x 100, las medias y desviaciones estándar obtenidos de un experimento por duplicado. El valor de Abs492-620nm en ausencia de péptido fue de 1.6 ± 0.3.*

- **Mapeo de la interacción αp5 y G_{VHSV}.**

Con el propósito de localizar la región de interacción G_{VHSV}-αp5 en la G_{VHSV}, se llevaron a cabo ensayos de unión de αp5 biotinilado (αp5-biot) en fase soluble a péptidos en fase sólida derivados de la G_{VHSV} en 2 pepscans distintos, incluyendo cada uno de ellos, la totalidad de la secuencia de la G_{VHSV}: el pepscan de péptidos de 15-mer consistente en 51 péptidos solapantes en 5 aa (**Ilustración 60A**) y el pepscan de péptidos de 20-mer, consistente en 40 péptidos solapantes en 10 aa

(**Ilustración 60B**). Los resultados obtenidos muestran que el αp5-biot interaccionó con péptidos pertenecientes a regiones similares en ambos pepscans.

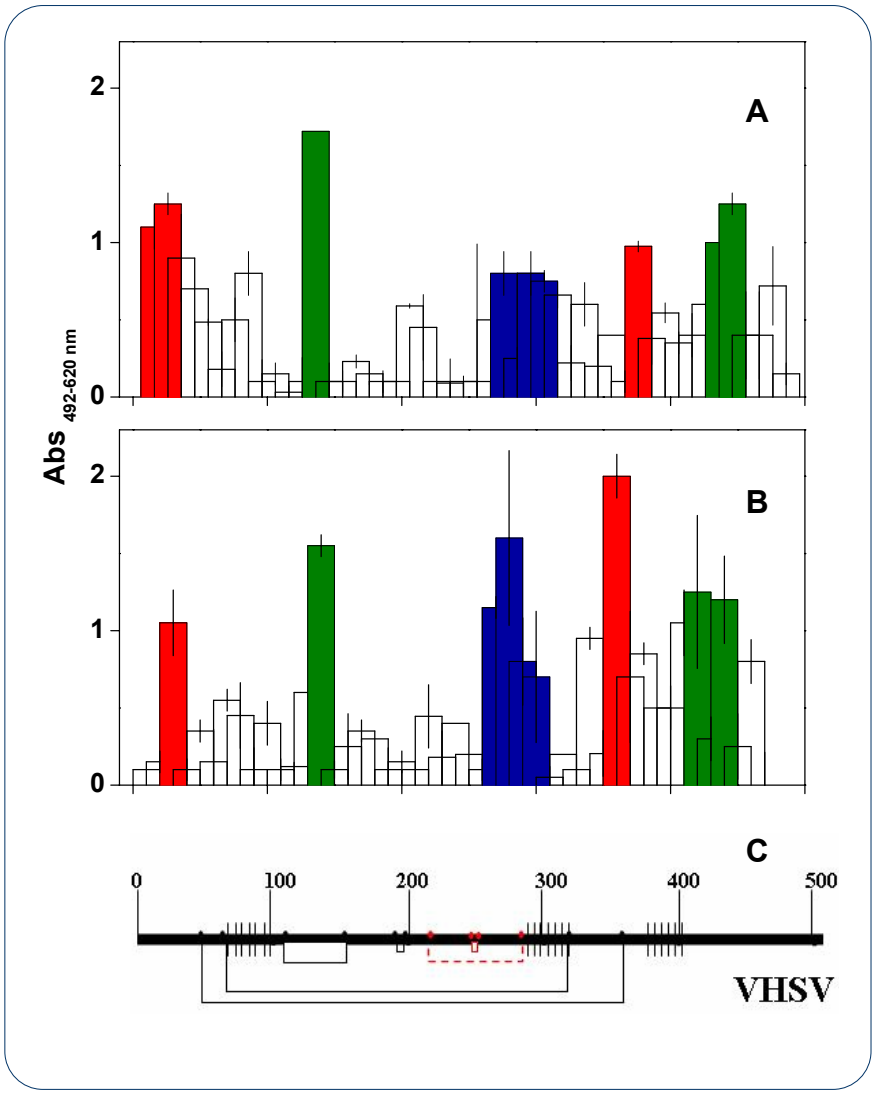


Ilustración 60. Interacción entre αp5-biot y péptidos de los pepscans de la GVSHV (A,B) y localización de los péptidos capaces de unir αp5-biot en la secuencia lineal de la G_{VHSV} (C) . *Los pocillos tapizados con ~ 1µg de péptidos por pocillo de 2 pepscans de la GVSHV se incubaron con 3 µM de αp5-biot durante 1 h a pH 7.4. Despues del lavado, se tiñeron con Streptavidina-peroxidasa y OPD. Se representan para los 51 péptidos del pepscan 15-mer (**A**) y los 40 péptidos del pepscan 20-mer (**B**), una vez restado el fondo sin péptidos, las medias y desviaciones estándar de la Abs492-620nm de un experimento llevado a cabo por duplicado. Barras verdes, región discontinua que se corresponde con los epítopo del AcMo C10 (aa 140 y 433, rombos negros), la primera barra verde se corresponde con la secuencia L129-E143 (verde) (**C**), las segundas barras verdes están fuera de la secuencia dilucidada de la GVSV. Barras azules, región que incluye la zona de unión propuesta para la fibronectina {Bearzotti, 1999 #1516}, que se corresponde con la secuencia L350-N370 (azul) (**C**). Barras rojas, región discontinua localizada en la cara externa de los puentes disulfuro C49-C359 y C64-C315, que se corresponde con la secuencia K270-I290 (rojo)(**C**). Las secuencias S88-A96 (amarillo) (**C**) tienen homología de secuencia con el αp5.*

Teniendo en cuenta su posible localización en el modelo de la estructura tridimensional de la G_{VSV}, las secuencias peptídicas identificadas que presentaban una $Abs_{492\text{-}620nm}$ > 1 se pueden agrupar en 3 regiones:

i) la región discontinua que se corresponde con la localización del epítopo definido para el AcMo C10 (aa 140 y 433) (Bearzotti et al.,

1995a). Identificada por las secuencias del pepscan de 15-mer: 129-143 + 429-443 + 439-453 y las del pepscan de 20-mer: 130-150 + 410-430 + 420-440. Localizadas en la estructura tridimensional de la G_{VSV} como se aprecia en la **Ilustración 61**.

ii) la región que incluye la zona de unión propuesta para la fibronectina, componente mayoritario del receptor de VHSV (Bearzotti et al., 1999). Identificada por las secuencias del pepscan de 15-mer: 279-293 + 289-303 + 299-313, y las del pepscan de 20-mer: 260-280 + 270-290 + 280-300 + 290-310. Localizadas en la estructura tridimensional de la G_{VSV} como se aprecia en la **Ilustración 61**.

iii) la región discontinua localizada en la cara externa de los puentes disulfuro C49-C359 y C64-C315, adyacentes en la estructura tridimensional de la G_{VHSV}. Identificada por las secuencias del pepscan de 15-mer: 9-23 + 19-33 + 369-383 y las del pepscan de 20-mer: 20-40 + 350-370. Localizadas en la estructura tridimensional de la G_{VSV} como se aprecia en la **Ilustración 61**.

Tabla 4. Anticuerpos anti-G_{VHSV} utilizados.

AcMo anti VSHV	Localización Epítopo: aa	Tipo de epítopo	Referencias
C10	G_{VSHV} 140-433	Conformacional neutralizante	{Bearzotti, 1995 #883}
3F1A12	G_{VSHV} 253	Conformacional neutralizante	(comunicación personal)
I16	G_{VSHV} 139-153	Lineal	{Fernandez-Alonso, 1998 #1373}
IH10	G_{VSHV} no mapeado	Lineal	{Sanz, 1992 #433}
IP1H3	G_{VSHV} 339-413	Lineal	{Fernandez-Alonso, 1998 #1373}
2D5	Control negativo anti-N_{VSHV}	Lineal	{Sanz, 1992 #1743}

***Ilustración 61.* Localización de los péptidos capaces de unir αp5-biot (Figura 62) en la estructura tridimensional de la GVSV** {Roche, 2006 #3923} **.** *La secuencia S88-A96 (amarillo) tienen homología de secuencia con el αp5.*

Con el propósito de confirmar los resultados obtenidos en los ensayos de interacción entre αp5-biot y los péptidos de los pepscans de la G_{VHSV}, se realizó un estudio del efecto de los αp en el reconocimiento del VHSV por parte de AcMo anti-G_{VHSV} (**Tabla 4**).

Para ello se diseñaron ELISAS en los que se inmovilizó VHSV purificado en fase sólida, se incubaron con distintas concentraciones de αp y después se reconocieron los epítopos con los AcMo.

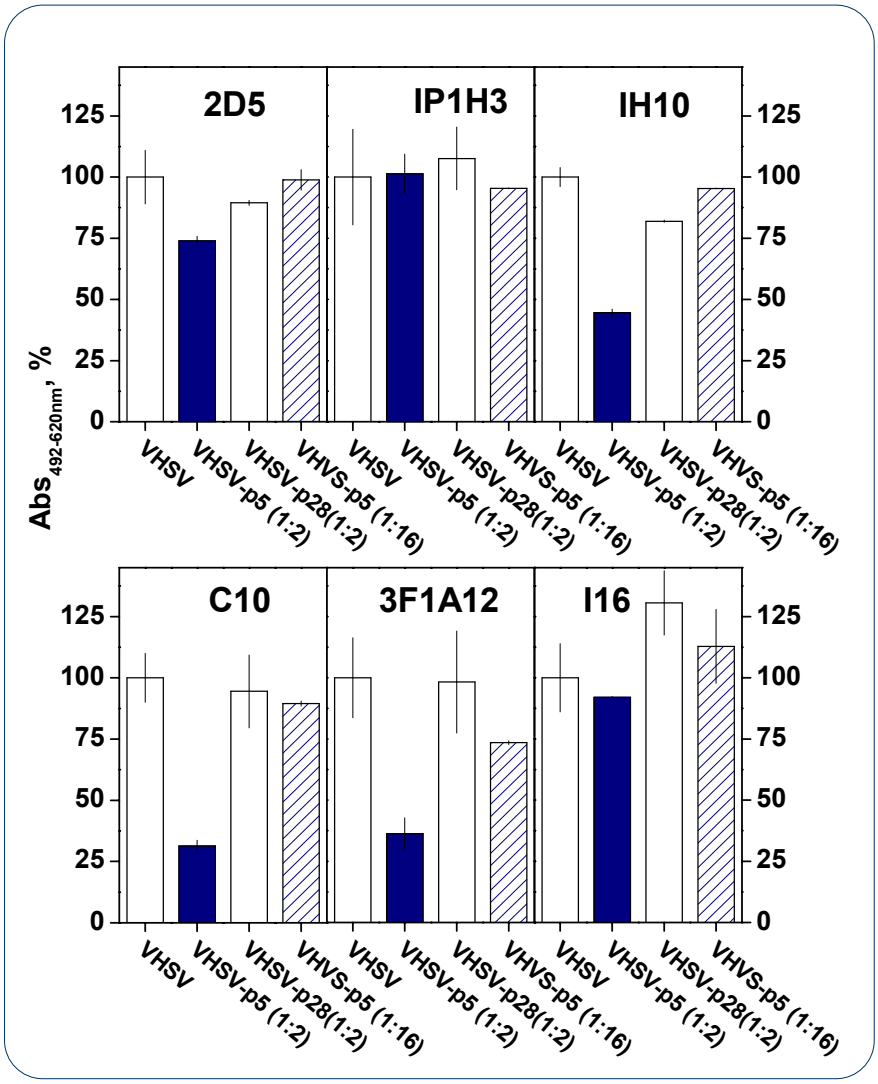


Ilustración 62. **Ensayos de competición entre los αp y AcMo anti-GVSHV**. Los pocillos se tapizaron con 1µg/pocillo de VSHV en presencia de 0.5 (2:1) o 0.0625 (16:1) µg/pocillo de αp5 o en presencia de 0.5 (16:1) µg/pocillo de αp28. Una vez bloqueados con 2 % de leche durante 2 h, se incubaron con los AcMo (**Tabla 4**) y con Ac anti-Igs de ratón-peroxidasa y OPD. Se muestra la Abs492-620nm calculada según la formula: Abs492-620nm en presencia de αp / Abs492-620nm en ausencia de αp x 100. Se representan las medias y desviaciones estándar de 3 experimentos para el AcMo C10, de 2 experimentos para el AcMo 3F1A12, y de un experimento para los AcMo 2D5, IP1H3, IH10, I16, todos por duplicado. Los valores de Abs492-620nm obtenidos para los controles sin αp una vez restados los respectivos fondos de pocillos sin tapizar fueron de 2.34 ± 0.26 para el AcMo 2D5, 0.34 ± 0.07 para el AcMo IP1H3, 0.79 ± 0.03 para el AcMo IH10, 1.14 ± 0.1 para el AcMo 3F1A12, 1.47 ± 0.24 para el AcMo C10 y 0.18 ± 0.03 para el AcMo I16.

La **Ilustración 62** muestra que después de la incubación con 3µM αp5, la unión de los AcMo con el VHSV en fase sólida se afectó un 44.5 ± 1.4 % con el AcMo IH10 (epítopo no mapeado), 31.4 ± 2.4 % con

el AcMo 3F1A12 (epítopo aa 254) y 36.4 ± 6.4 % con el AcMo C10 (epítopos aa 140 y 433), confirmando la implicación de algunas de las regiones identificadas por pepscan. Para el resto de AcMo ensayados los niveles de $Abs_{492-620nm}$ obtenidos en presencia del αp5 fueron similares a los obtenidos en el control en ausencia de αp5. No se detectaron $Abs_{492-620nm}$ distintas del control en ausencia de αp en todos los AcMo ensayados tanto en las incubaciones con 3 μM αp28 como en las incubaciones con αp5 a una concentración de 0.375 μM.

4.4.7. INTERACCIÓN VHSV-αp EN LAS ETAPAS TEMPRANAS.

- **Unión al receptor celular**

Para estudiar la influencia del αp5 en la unión al receptor celular del VHSV, se realizaron ensayos de unión de VHSV biotinilado (VHSV-biot) a las células EPC o de VHSV a células EPC-GFP en presencia o ausencia de αp5. La cantidad de VHSV-biot ligado se estimó por ligamiento de Streptavidina fluorescente. Para estos ensayos se utilizó una temperatura de 4 ºC para permitir la unión del VHSV-biot al receptor celular evitando su internalización dependiente de temperatura. La **Ilustración 63CD** muestra que la preincubación del VHSV-biot con αp5 (VHSV-biot-αp5) no alteraba la estimulación con αp5 puesto que también aumentó el número de focos obtenido con VHSV-biot después de 24 h de infección. La **Ilustración 63A** muestra en el análisis por citometría de las células EPC fluorescentes debido al ligamiento de VHSV-biot, que la preincubación con αp5 no aumentó significativamente ni la intensidad media de fluorescencia de las células EPC, ya que esta pasó de 3.09 ± 0.49 en ausencia de αp5 a 4.96 ± 0.1 en presencia de αp5, ni el número de células EPC fluorescentes que se mantuvo en ~ 40 % de células fluorescentes positivas (**Ilustración 63B**). La unión de VHSV o VHSV-αp5 a células EPC-GFP tampoco demostró diferencias entre la cantidad de N_{VSHV} estimada por Western blots en presencia o ausencia de αp5 (datos no mostrados).

Por otro lado, para comprobar si era posible obtener estimulación añadiendo el αp5 después de la unión del VHSV a su receptor celular y no antes como se había utilizado en todos los experimentos descritos

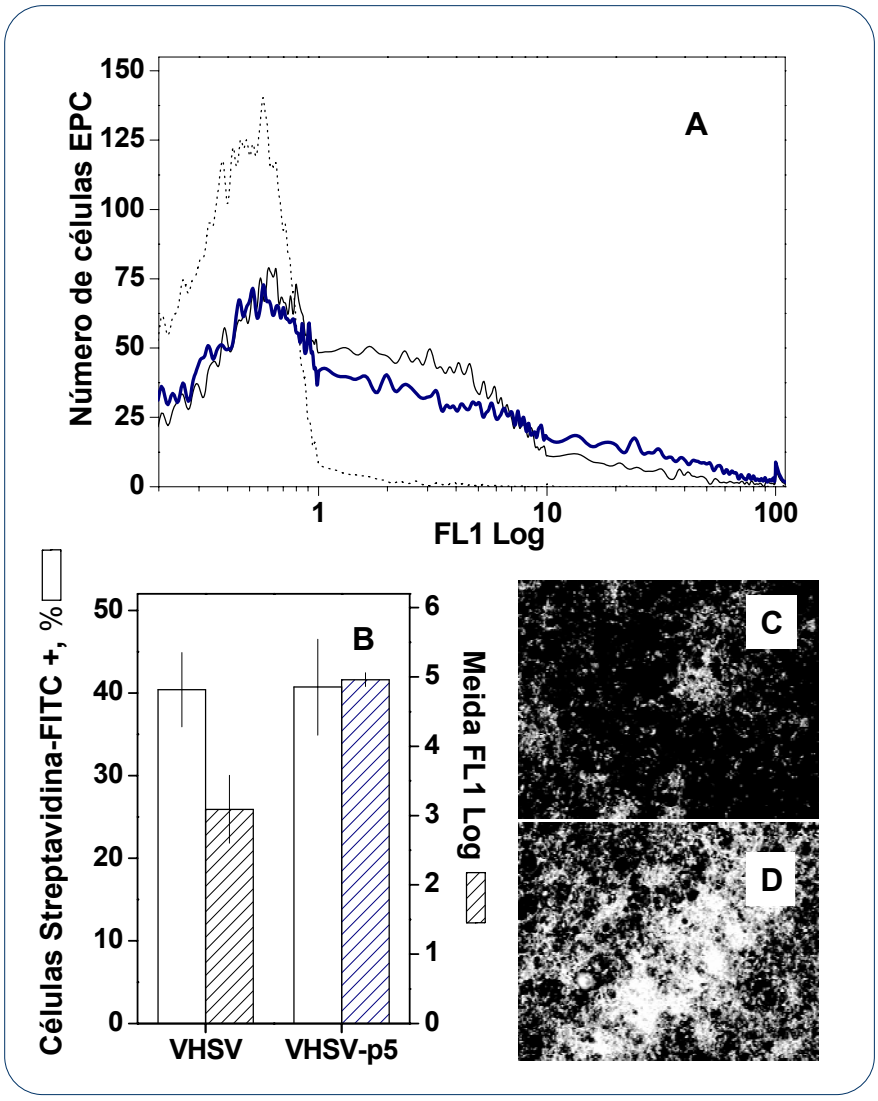


Ilustración 63. Influencia del αp5 en la unión de VSHV-biot a células EPC. *Las monocapas de células EPC en placas de 24 pocillos se incubaron durante 2 h a 4 ºC (150µl/pocillo) con 40000 ffu/pocillo de VSHV-biot en presencia de 3 µM de αp5 o en ausencia de αp5. Las monocapas se lavaron y se tiñeron con streptavidina-FITC durante 45 min a 4 ºC. Despues 25000 células/pocillo se analizaron por citometría.* ***A,*** *Se muestran histogramas obtenidos para las células EPC (····), EPC-VSHV-biot (—, negro) y EPC-VSHV-biot-αp5 (—, azul).* ***B****) Porcentajes de células fluorescentes (Streptavidina-FITC+) y medias del Log de intensidad de fluorescencia (medias y desviaciones estándar de 5 experimentos).* ***C, D,*** *Número de focos fluorescentes obtenido despues de 24 h de infección a 14 ºC. Las monocapas se fijaron con metanol y se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2C9 y anti-Igs de ratón-FITC.* ***C****, EPC-VSHV-biot y* ***D****, EPC-VSHV-biot-αp5.*

hasta ahora, se realizaron ensayos de focos en los que el αp5 se adicionó a los pocillos después de incubar el VHSV con las células. Esta incubación, que se llevó a cabo a 4 ºC y durante distintos tiempos, provocó un aumento de tan sólo 1.5-2 veces el número de focos obtenido en las infecciones en presencia de αp28, no alcanzándose en ningún tiempo de incubación ensayado las 4-5 veces de estimulación de la infectividad de VHSV obtenido por incubación del VHSV con el αp5 antes de la infección (**Ilustración 64**).

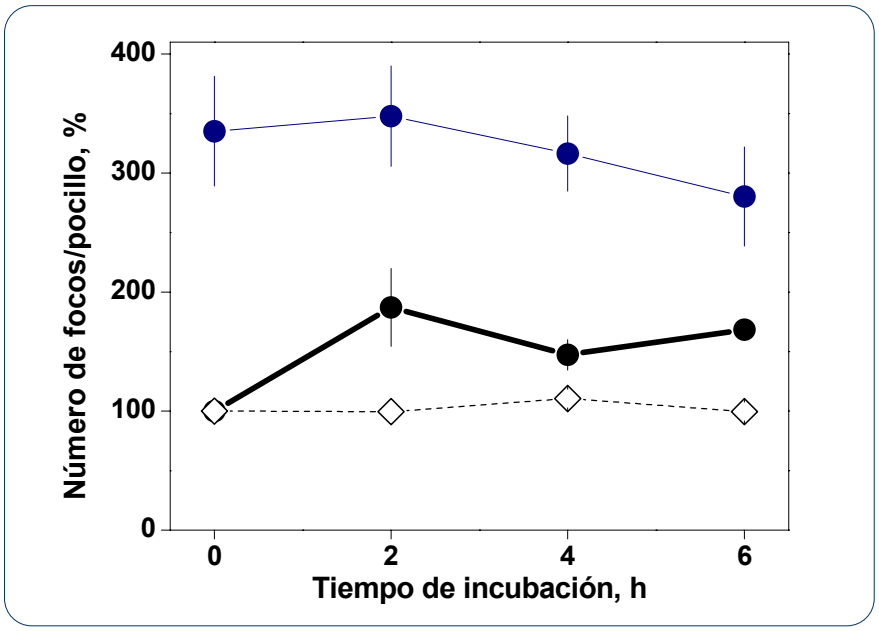


Ilustración 64. Estimulación del número de focos inducida por la adición de αp a distintos tiempos antes (azul) o despues (negro) de la adsorción del VHSV ± αp5 a las monocapas de EPC. *Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se incubaron con VSHV a 0.01 ffu/célula durante 1 h a 4 ºC. Las monocapas se lavaron y se incubaron o no con 3 μM de αp5/αp28 durante los tiempos indicados, después se lavaron y se incubaron durante un total de 22 h a 14 ºC y se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2D5 y anti-Igs de ratón-FITC. Los porcentajes se calcularon según la fórmula: número de focos por pocillo en presencia de αp / número de focos por pocillo en ausencia de αp x 100 (medias y desviaciones estándar de 2 experimentos por duplicado). --◇--, VSHV y αp28 antes o después de la adsorción. —●—, VSHV y αp5 después de la adsorción . —●—, VSHV-αp5 antes de la adsorción.*

- **pH y tipo de vesículas que intervienen en la endocitosis**

La entrada del VSV en su célula huésped requiere endocitosis ácida (ver introducción). Es por ello que se estudió la endocitosis ácida en caso del VHSV en ausencia y presencia de αp5 (VHSV-αp5) utilizando un inhibidor de la acidificación endosomal: el NH_4Cl.

Los ensayos se llevaron a cabo a 0.001 ffu/pocillo de VHSV y se incluyeron controles en paralelo a 0.004 ffu/pocillo (moi 4 veces mayor) para estimar mejor la estimulación producida por el αp5 (~ 4 veces) en cada experimento. La **Ilustración 65A** muestra que al igual que en otros experimentos anteriores, la infectividad del VHSV-αp5 en ausencia de NH_4Cl registró un número de focos de ~ 4 veces el obtenido en el control de VHSV correspondiente a 0.001 ffu/célula y muy similar al obtenido a 0.004 ffu/célula. A medida que se aumentó la concentración de NH_4Cl el número de focos por pocillo se fue reduciendo, no detectándose focos a >10 mM NH_4Cl. El perfil de reducción de focos fue similar en VHSV-αp5 y en VHSV a 0.004 ffu/célula. Por otro lado, infecciones similares con VHSV previamente tratado con αp28 también mostraron perfiles similares a los obtenidos para VHSV (datos no mostrados).

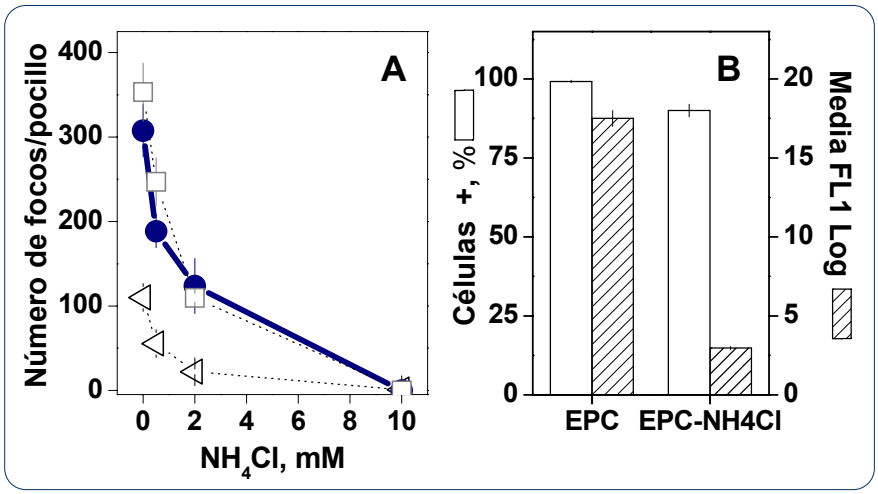


Ilustración 65. Influencia del NH4Cl en la infectividad de VSHV y VSHV-αp5 (A) y comprobación de la inhibición de la acidificación del endosoma por NH4Cl (B). A, *Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron con VSHV o VSHV-αp5. El VSHV se incubó con 3 μM de αp5 durante 4 h a 14 ºC antes de la infección. La infección se realizó durante 24 h a 14 ºC en ausencia o en presencia de NH4Cl. Las monocapas se fijaron con metanol y se tiñeron con AcMo anti-NVSHV 2C9 y DAB. Se representan las medias y desviaciones estándar de 3 experimentos por duplicado. ·····◁·····; 0.001 ffu/célula de VHSV. ·····□·····; 0.004 ffu/célula de VHSV. —●—; 0.001 ffu/célula de VSHV-αp5.* ***B,*** *Las monocapas de células EPC en placas de 24 pocillos se incubaron durante 5 min a 14 ºC con 0.5 μM de Lysotracker-Green DND-26 (indicador del pH endosomal). Despues, 25000 células/pocillo se analizaron por citometría. Se representan las medias y desviaciones estándar del porcentaje de células fluorescentes (barras blancas) y las medias del Log de intensidad de fluorescencia (barras rayadas) obtenidas en 2 experimentos.*

Para confirmar que el NH_4Cl aumentaba el pH endosomal de las células EPC, se estimó el pH de los endosomas de EPC utilizando el Lysotracker Green DND-26, un fluoróforo que marca preferencialmente endosomas de carácter ácido. Utilizando Lysotracker Green DND-26, el valor medio de intensidad de fluorescencia de las EPC estimado por citometría se redujo de 17.5 ± 0.5 a 2.96 ± 0.1 en presencia de 40 mM de NH_4Cl, mientras que el porcentaje de células fluorescentes en ambos casos se mantuvo en ~ 90-99 % (**Ilustración 65B**). Una vez comprobado el requerimiento de la endocitosis de carácter ácido para la entrada de VHSV y VHSV-αp5, se estudió la naturaleza de las vesículas implicadas en las endocitosis correspondientes.

Debido a que para la entrada en la célula huésped de VSV se ha descrito la participación de vesículas de clatrina (Sun et al., 2005), se estudió si este tipo de vesículas también estaba implicado en la entrada de VHSV y VHSV-αp5. Para ello se llevaron a cabo ensayos de entrada de VHSV en presencia de inhibidores de la formación de vesículas de clatrina: Chlorpromazina y sacarosa (Sun et al., 2005). De acuerdo con las condiciones de ensayo publicadas para VSV, la incubación de las células EPC con los inhibidores de vesículas de clatrina se realizó durante 30 min antes de la infección y 2 h después de la infección, retirándose antes de continuar la infección. Para evitar interferencias con las siguientes etapas de la infección estas además se inhibieron con 40 mM de NH_4Cl (**Ilustración 67**).

El rango de concentraciones utilizado (0-30 μM Chlorpromazina y 0-0.45 mM Sacarosa) se escogió después de estimar con el ensayo PMS/TMS la viabilidad de las células EPC en presencia de diferentes concentraciones de Chlorpromazina (**Ilustración 68A**) y Sacarosa (**Ilustración 68B**).

En las condiciones arriba indicadas, después de 24 h tan sólo se observaron al microscopio focos de infección unicelulares correspondientes a las células inicialmente infectadas tanto para VHSV(**Ilustración 66, Ilustración 67A,)** como para VHSV-αp5 (**Ilustración 66, Ilustración 67B**). En ausencia de los inhibidores de vesículas de clatrina el número de focos unicelulares detectados aumentó de 109.96 ± 12.95 ffu/pocillo en infecciones con VHSV o con VHSV-αp28 a 307.7 ± 31.01 ffu/pocillo en infecciones con VHSV-αp5. La infectividad del VHSV a 0.004 ffu/pocillo fue de 353.39 ± 34.38 ffu/pocillo, valor similar al obtenido con VHSV-αp5 **Ilustración 66A, B)**.

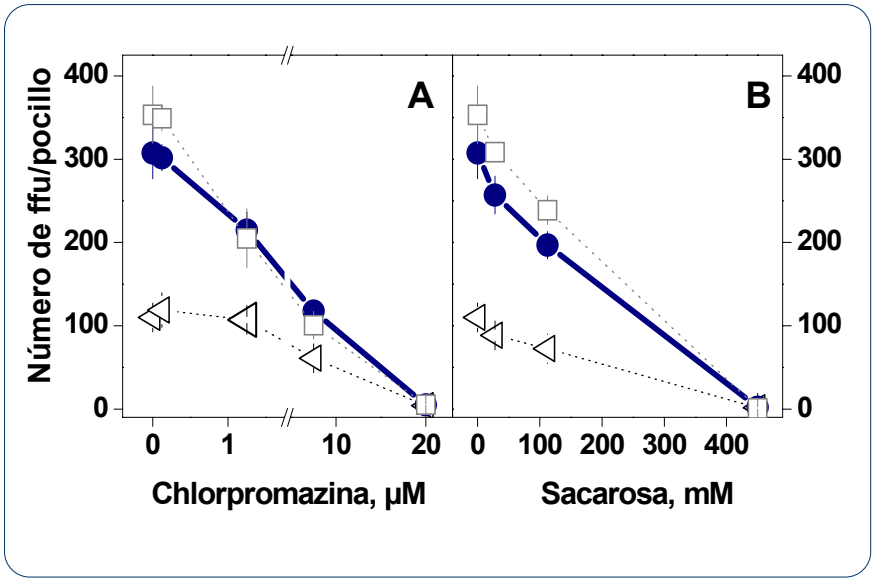


Ilustración 66 . Influencia de inhibidores de la formación de vesículas (Chlorpromazina y Sacarosa) en la entrada del VSHV y VSHV-αp5 en la células EPC. *Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron con VSHV o VSHV-αp5. El VSHV se incubó con 3 μM de αp5 durante 4 h a 14 ºC antes de la infección. El tratamiento con Chlorpromazina (**A**) y Sacarosa (**B**) se realizó durante 30 min antes de la infección y 2 h después de la infección. Después, los inhibidores se retiraron, se lavó la monocapa y se adicionó medio de cultivo conteniendo 40 mM de NH4Cl. La infección se realizó durante 24 h a 14 ºC en ausencia o en presencia de NH4Cl. Las monocapas se fijaron con metanol y se tiñeron con AcMo anti-NVSHV 2D5 y anti-Igs de ratón-FITC. Se representan las medias y desviaciones estándar de 3 experimentos por duplicado. ·····◁·····; 0.001 ffu/célula de VHSV. ·····□·····; 0.004 ffu/célula de VHSV. —●—; 0.001 ffu/célula de VSHV-αp5.*

Una concentración de Chlorpromazina de 0.12 μM no produjo cambios significativos en el número de focos obtenidos con VHSV ni con VHSV-αp5. Al aumentar la concentración de Chlorpromazina a 1.25 μM,

el número de focos de VHSV-αp5 obtenido fue de 215 ± 21.2 ffu/pocillo, manteniéndose constante el obtenido con VHSV (107 ± 4.2 ffu/pocillo). Concentraciones mayores (7,5μM-30μM) afectaron la entrada del VHSV y VHSV-αp5 de manera similar, alcanzándose una inhibición total para ambos a concentraciones de 20 μM o superiores. Por otro lado, al infectar con VHSV a 0.004 ffu/célula se registraron niveles de inhibición similares a los obtenidos para VHSV-αp5 en todas las concentraciones de Chlorpromazina (**Ilustración 66A**). Concentraciones de 20 μM también inhibieron la infectividad del VHSV y VHSV-αp5 al utilizar una moi de 0.02 ffu/célula (**Ilustración 67C, D**).

Las infecciones en presencia de Sacarosa mostraron un comportamiento similar a las de Chlorpromazina. A 450 mM se inhibió totalmente la entrada de todos los inóculos virales tanto en moi_s de 0.001-0.004 ffu/célula (**Ilustración 66B**), como en la moi de 0.02 ffu/célula (**Ilustración 67E, F)**.

Con el propósito descartar cualquier posible efecto de los inhibidores de de vesículas de clatrina sobre la síntesis de N_{VSHV}, se realizaron infecciones similares pero incubando con los inhibidores también después de las 2 h de infección. En la **Ilustración 68C** se muestra como independientemente del inóculo utilizado, incubaciones de este tipo con 20 μM Chlorpromazina o 450 mM sacarosa, no afectaron al número de focos detectados con anti-N_{VSHV}.

Por último, como alternativa al ensayo de detección de N_{VSHV}, el efecto de 20 μM de Chlorpromazina o de 450 mM de sacarosa se confirmó por ensayos con VHSV-biot y Streptavidina-FITC. Las infecciones tanto con VHSV-biot como con VHSV-biot-αp5 en presencia de los inhibidores de vesículas de clatrina, produjeron ~ 20 % de células EPC Streptavidina-FITC positivas (**Ilustración 68D**), valor inferior al ~ 40 % obtenido en las infecciones en ausencia de inhibidores. Las intensidades de fluorescencia asociada a las células se mantuvieron constantes (~ 3)

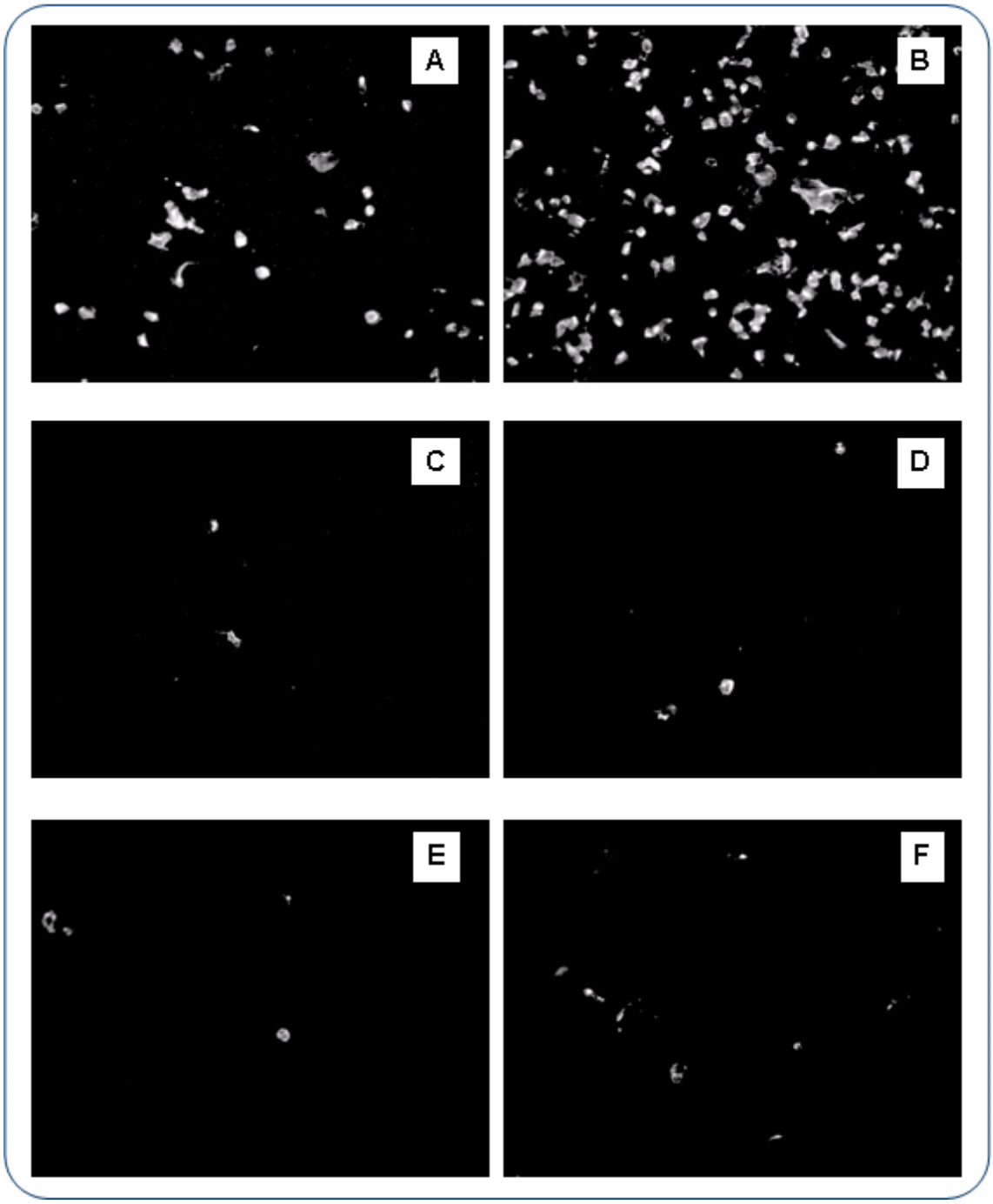


Ilustración 67. Influencia de inhibidores de la formación de vesículas (Chlorpromazina y Sacarosa) en la entrada del VSHV y VSHV-αp5 en la células EPC (2). *Microfotografías:* ***A,*** *VHSV.* ***C****, VHSV + 20 μM Chlorpromazina.* ***E****, VHSV + 0.45 mM Sacarosa.* ***B,*** *VHSV-αp5.* ***D,*** *VSHV-αp5 + 20 μM Chlorpromazina.* ***F,*** *VSHV-αp5 + 0.45 mM Sacarosa. Las infecciones se llevaron de igual modo que las comentadas en la* ***Ilustración 66*** *utilizándose una moi de 0.02 ffu/célula.*

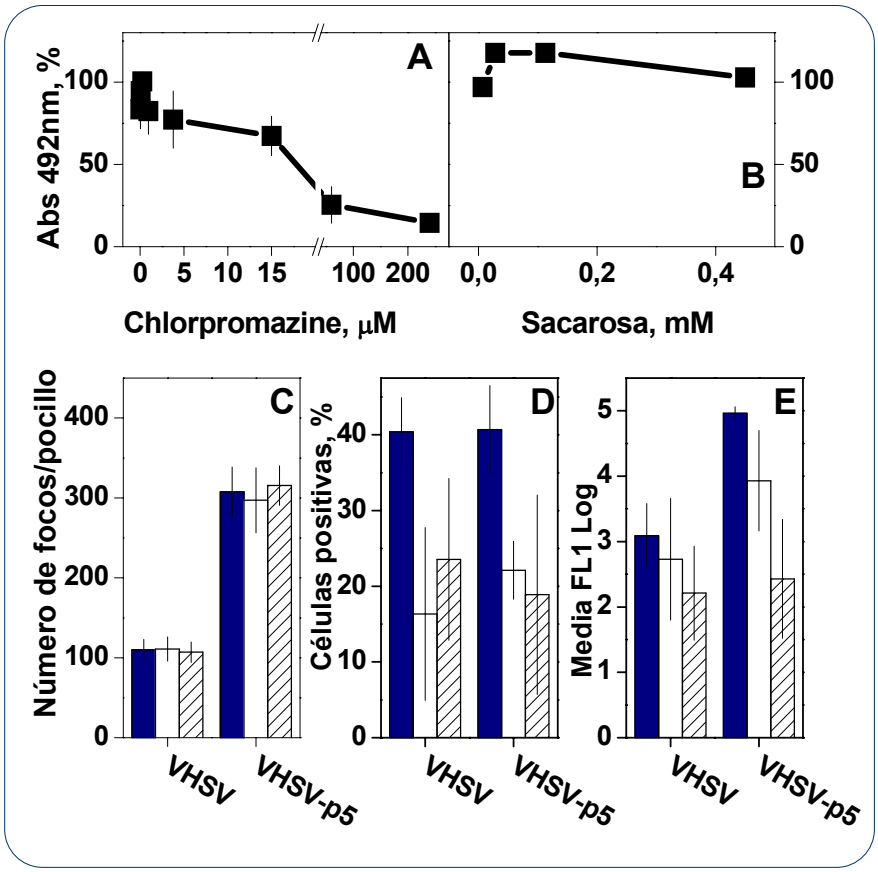


Ilustración 68. Viabilidad celular de las EPC en presencia de inhibidores de la formación de vesículas de clatrina: Chlorpromazina (A) y Sacarosa (B) y unión del VSHV-biot a las células EPC estimada por ensayo de focos (C) o citometría (D,E). A, B*, Las células EPC en placas de 96 pocillos se incubaron con Chlorpromazina y Sacarosa durante 2 h y 30 min a 14 ºC. Las monocapas se lavaron y se estimó la viabilidad celular de las EPC por el ensayo MTS/PMS. Se representan los porcentajes según la fórmula: Abs492nm en presencia de inhibidores / Abs492nm en ausencia de inhibidores x 100, medias y desviaciones estándar de 1 experimento por triplicado. La Abs492nm en ausencia de inhibidores fue de 1.3 ± 0.33.* ***C,*** *Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron con 0.001 y 0.004 ffu/célula de VSHV y 0.001 ffu/célula de VSHV-αp5. El VSHV se incubó con 3 μM de αp5 durante 4 h a 14 ºC antes de la infección. Los inóculos se incubaron durante 2 h a 14 ºC, se retiraron y las monocapas previo lavado se incubaron durante 2 h 30 min con 20 μM Chlorpromazina y 450 mM Sacarosa. Las monocapas se lavaron y se añadió 40 mM NH4Cl durante 22 h a 14 ºC. Despues se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2D5 y anti-Igs de ratón-FITC. Se representan las medias y desviaciones estándar de 1 experimento por duplicado.* ***D,E,*** *Las monocapas de células EPC en placas de 24 pocillos se incubaron durante 2 h a 4 ºC con 40000 ffu/pocillo de VSHV-biot o VSHV-biot-αp5 en presencia o ausencia de 20 μM Chlorpromazina o 450 mM Sacarosa. El VSHV se incubó con 3 μM de αp5 durante 4 h a 14 ºC antes de la infección. El tratamiento con inhibidores se realizó durante 30 min antes de la infección y 2 h despues de la infección. Las monocapas se lavaron y se incubaron con Streptavidina-FITC durante 45 min a 4 ºC y 25000 células/pocillo se analizaron por citometría. Se representa el porcentaje de células fluorescentes y la media del Log de intensidad de fluorescencia asociada a las células, medias y desviaciones estándar de 2 experimentos.* ***Barras azules****, ausencia de inhibidores.* ***Barras blancas****, Chlorpromazina.* ***Barras rayadas****, Sacarosa.*

para VHSV-biot en presencia o ausencia de ambos inhibidores. Las intensidades de fluorescencia para VHSV-biot-αp5 se mantuvieron constantes (4-5) en presencia de Chlorpromazina (**Ilustración 68E**) pero se redujeron (~ 3) en presencia de sacarosa (**Ilustración 68E**).

Todos los resultados comentados en este apartado demuestran que el VHSV requiere vesículas de clatrina para su entrada en las células EPC ya que su entrada se inhibe por inhibidores de clatrina. Debido a que la inhibición se obtuvo tanto en ausencia como en presencia de αp5, es posible concluir que el αp5 no afecta la entrada de VHSV a través de vesículas de clatrina.

- **Progresión de la endocitosis**

Una vez comprobada la necesidad de endocitosis de carácter ácido mediada por vesículas de clatrina para la infección de VHSV y que el αp5 no interfería en dichas etapas, se continuó con el estudio de la progresión de la endocitosis en infecciones con VHSV y VHSV-αp5. Para ello, se realizaron ensayos de entrada en presencia de inhibidores del citoesqueleto, soporte del tráfico endosómico.

Los inhibidores del citoesqueleto que se utilizaron fueron: la Citocalasina B que impide la polimerización de la actina en microfilamentos, el DMSO que cambia la permeabilidad de la membrana, induciendo una redistribución de microfilamentos de actina y el Nocodazol y la Colchicina, inhibidores del ensamblaje de microtúbulos de tubulina (**Ilustración 69, Ilustración 70, Ilustración 71**). Los rangos de concentraciones a utilizar, se seleccionaron entre los que mantenían la viabilidad de células EPC: 0-30 μM Citocalasina B, 0-2 % DMSO, 0-50 μM Nocodazol y 0-240 μM Colchicina (**Ilustración 72AB**).

Para confirmar los efectos de los inhibidores sobre las células EPC se realizaron marcajes tanto de los filamentos de actina (**Ilustración 69**) como de microtúbulos (**Ilustración 70**), con phalloidina-FITC o con un AcMo anti-tubulina, respectivamente. Como era de esperar en ausencia de tratamiento ambos marcajes permitieron observar la morfología característica de los filamentos de actina (**Ilustración 69A**) y de microtúbulos (**Ilustración 70A**). En presencia de

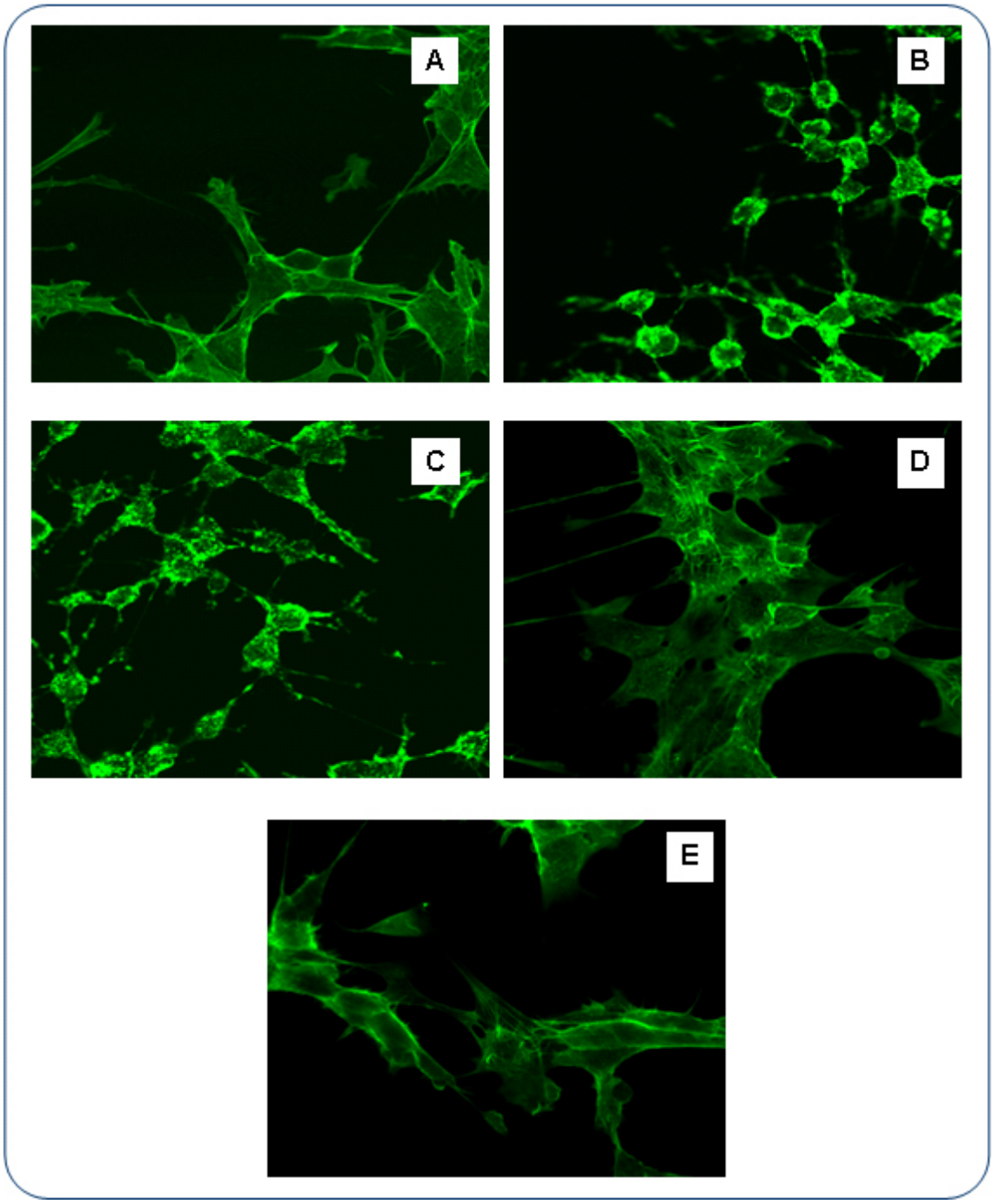


Ilustración 69. Efectos sobre los filamentos de actina de las células EPC de la Citocalasina B, DMSO, Nocodazole y Colchicina. *Las monocapas de células EPC se incubaron durante 30 min a 14 ºC en ausencia (**A**) o presencia de Citocalasina B 30 µM (**B**), DMSO 2.5 % (**C**), Nocodazol 50 µM (**D**) o Colchicina 240 µM (**E**). Transcurrida esta incubación, las monocapas se lavaron y se fijaron con Citofix durante 10 min. Posteriormente se realizó el marcaje de los filamentos de actina mediante la phalloidina-FITC. Se muestran imágenes representativas de 2 experimentos llevados a cabo por duplicado.*

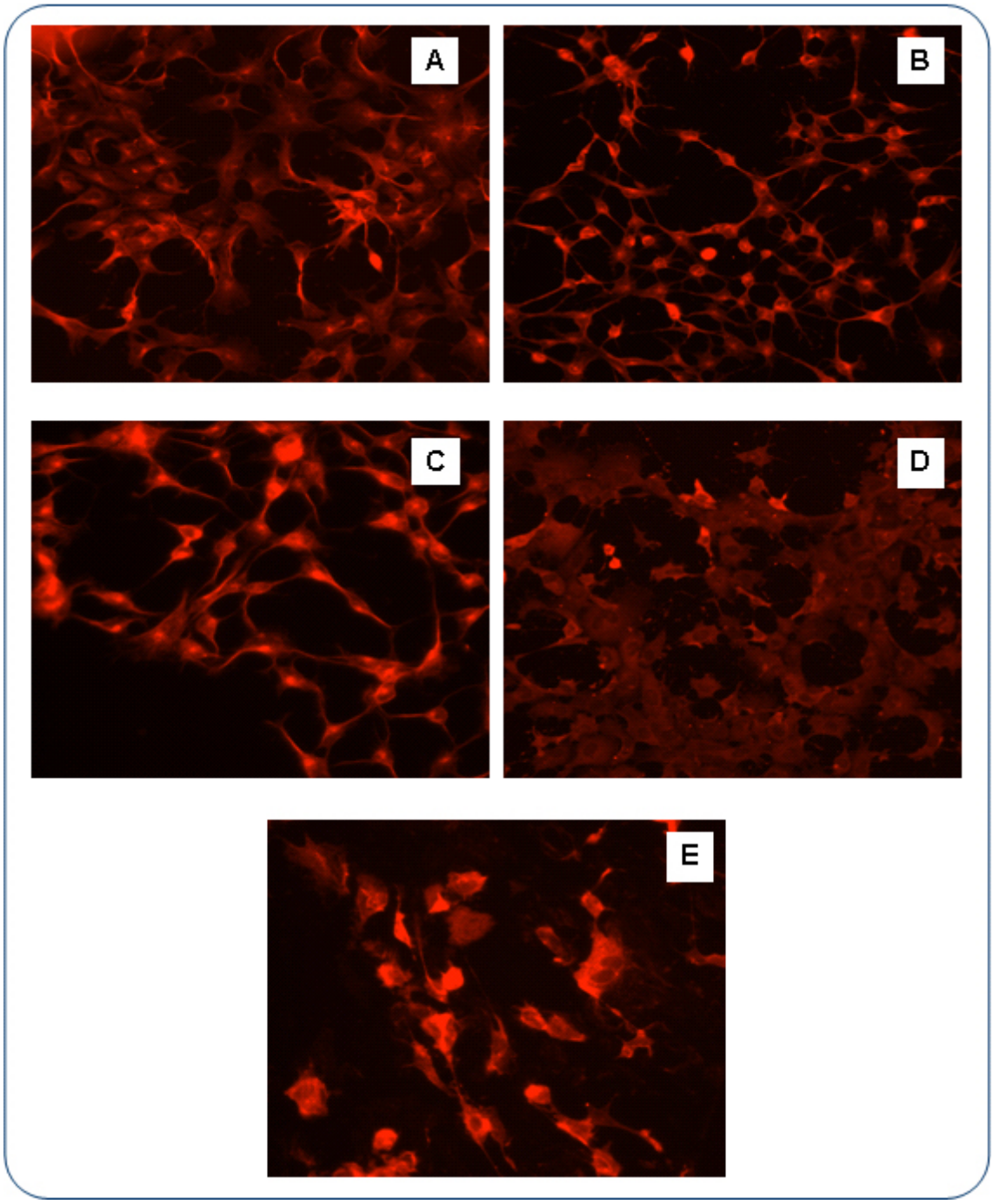


Ilustración 70. Efectos sobre los microtúbulos de las células EPC de la Citocalasina B, DMSO, Nocodazole y Colchicina. *Las monocapas de células EPC se incubaron durante 30 min a 14 ºC en ausencia (**A**) o presencia de Citocalasina B 30 µM (**B**), DMSO 2.5 % (**C**), Nocodazol 50 µM (**D**) o Colchicina 240 µM (**E**). Transcurrida esta incubación, las monocapas se lavaron y se fijaron con Citofix durante 10 min. Posteriormente se realizó el marcaje de los microtúbulos mediante un AcMo anti-tubulina-TRIC. Se muestran imágenes representativas de 2 experimentos llevados a cabo por duplicado.*

los inhibidores de actina a 20 μM Citocalasina B o a 2 % DMSO se pudo observar un redondeamiento de las células, que se caracterizó por la aparición de marcajes punteados de los filamentos actina**,** no viéndose alterado el marcaje filamentoso de los microtúbulos (**Ilustración 69B, C, y Ilustración 70B, C**, respectivamente). Contrariamente, en presencia de 50 μM Nocodazol o 240 μM Colchicina se perdió el marcaje filamentoso de los microtúbulos, manteniéndose inalterado el de los filamentos de actina (**Ilustración 69D, E, y Ilustración 70D, E** respectivamente).

La **Ilustración 71A** muestra que en presencia de Citocalasina B se redujo el número de focos con VHSV-αp5 a niveles similares a los obtenidos con VHSV, perdiéndose totalmente el efector estimulador de αp5 a todas las concentraciones ensayadas. Al aumentar la concentración a 30 μM de Citocalasina B, las infecciones con VHSV y VHSV-αp5 se redujeron de ~ 300 ffu/pocillo en ausencia de inhibidores a 37.75 ± 16.62 y 50 ± 0.71 ffu/pocillo, con VHSV y VHSV-αp5 respectivamente.

La **Ilustración 71B** muestra que en presencia de DMSO se redujo el número de focos con VHSV-αp5 a niveles ~ 2 veces mayores que los obtenidos con VHSV, perdiéndose parcialmente el efector estimulador de αp5 a todas las concentraciones ensayadas. Al aumentar el porcentaje a 2 % DMSO, las infecciones con VHSV y VHSV-αp5 se redujeron de ~ 300 ffu/pocillo en ausencia de inhibidores a ~ 46 y 80 ffu/pocillo, respectivamente.

La **Ilustración 71C** y la **Ilustración 71D** muestran que en presencia de Nocodazol y Colchicina, respectivamente, se redujo el número de focos con VHSV-αp5 a niveles ~ 2 veces mayores que los obtenidos con VHSV, perdiéndose parcialmente el efector estimulador de αp5 a todas las concentraciones ensayadas. Al aumentar el porcentaje a 50 μM Nocodazol (**Ilustración 71C**) o 20 μM Colchicina (**Ilustración 71D**), las infecciones con VHSV y VHSV-αp5 se redujeron de ~ 300 ffu/pocillo en ausencia de inhibidores a ~ 75 y 120 ffu/pocillo o ~75 y 160 ffu/pocillo, respectivamente.

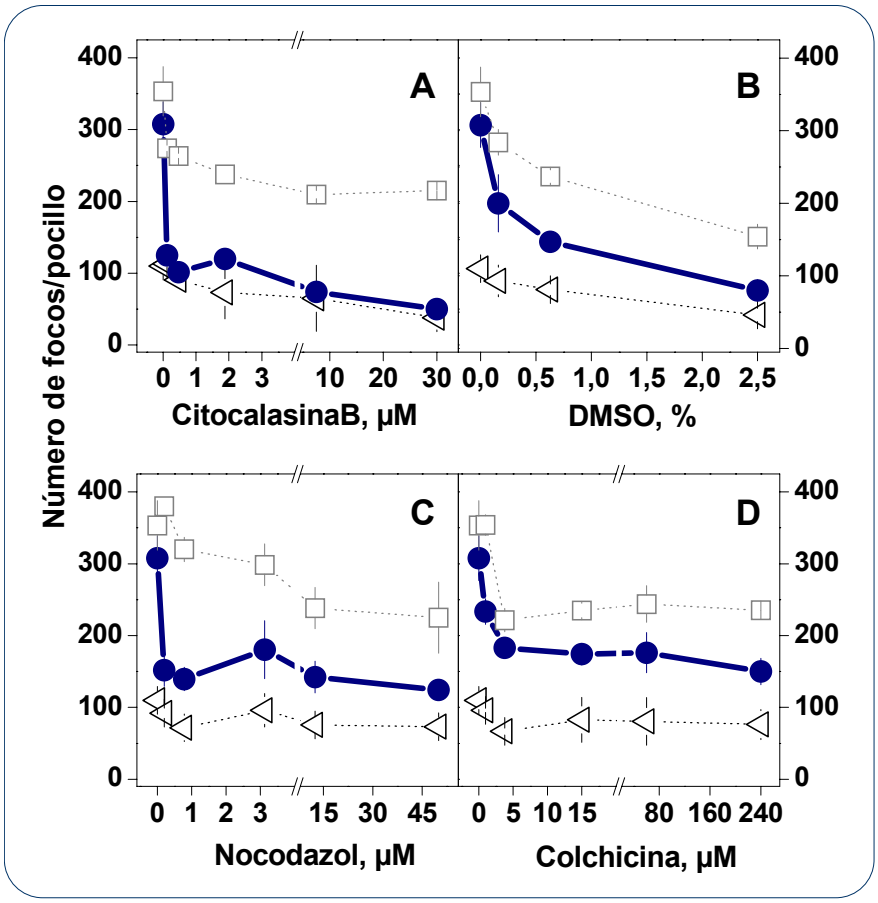


***Ilustración 71*. Influencia de inhibidores del citoesqueleto en la entrada del VSHV y VSHV-αp5**. Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron con VSHV o VSHV-αp5 en presencia o ausencia de distintos inhibidores del citoesqueleto. El VSHV se incubó con 3 µM de αp5 durante 4 h a 14 ºC antes de la infección. La infección se realizó durante 24 h a 14 ºC en ausencia o en presencia de NH4Cl, sin retirar los inóculos. Las monocapas se fijaron con metanol y se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2C9 y DAB. El tratamiento con Citocalasina B (**A**), DMSO (**B**), Nocodazol (**C**) o Colchicina (**D**) se realizó durante 30 min antes de la infección y 2 h despues de la infección. Despues del lavado de la monocapa, se adicionó 40 mM NH4Cl y se incubó durante 22 h a 14 ºC. Se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2D5 y anti-Igs de ratón-FITC. Se representan las medias y desviaciones estándar de 3 experimentos por duplicado. ·····◁·····, 0.001 ffu/célula de VHSV. ·····□·····, 0.004 ffu/célula de VHSV. —●—, 0.001 ffu/célula de VSHV-αp5.

Con el propósito de descartar cualquier posible efecto de los inhibidores sobre la acumulación de N_{VSHV}, se realizaron infecciones similares pero incubando con los inhibidores durante toda la infección. La **Ilustración 72C** muestra que las adiciones de 20 µM Citocalasina B, 2 % DMSO, 50 µM Nocodazol o 240 µM Colchicina a varias moi de VHSV no provocaron variaciones en el número de focos obtenido detectado con anti-N_{VSHV}.

En resumen, los experimentos comentados con inhibidores de citoesqueleto (Citocalasina B, DMSO, Nocodazol y Colchicina) demostraron que las fases tempranas de la infección con VHSV y en menor medida con VHSV-αp5 se inhibieron con estos compuestos a concentraciones sin efectos ni sobre la viabilidad celular ni sobre la acumulación de la N_{VSHV}.

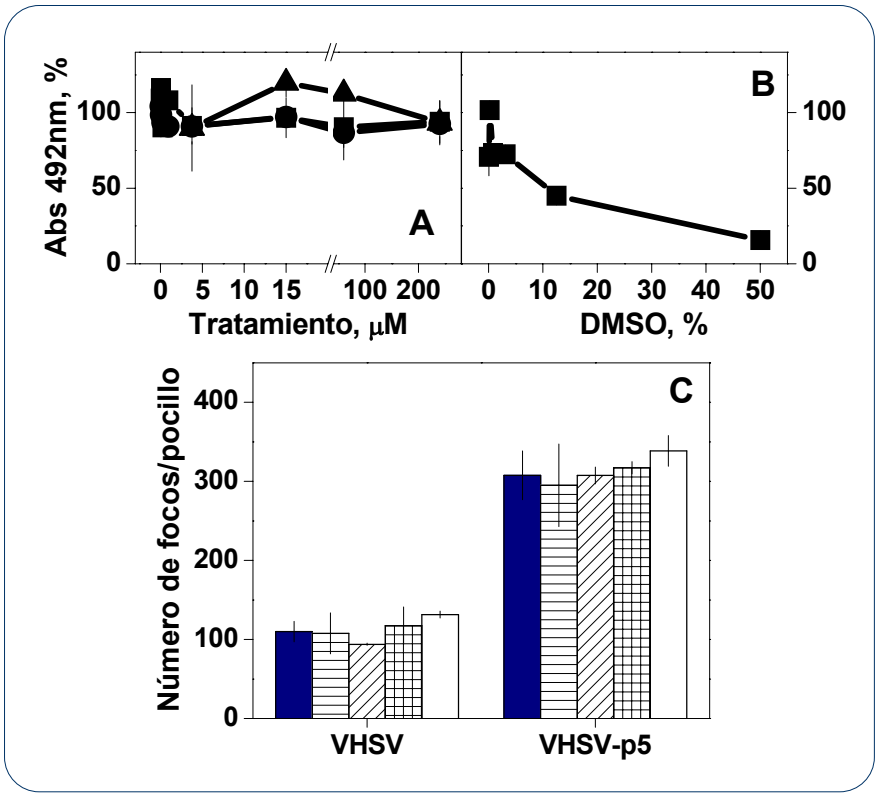


Ilustración 72. Viabilidad celular de las EPC en presencia de inhibidores del citoesqueleto (A,B) e influencia de los inhibidores del citoesqueleto en la acumulación de NVSHV.(C). A, B, *Las células EPC en placas de 96 pocillos se incubaron con las concentraciones indicadas de Citocalasina B, DMSO, Nocodazol y Colchicina durante 2 h y 30 min a 14 ºC. Transcurrida esta incubación las monocapas se lavaron y se estimó la viabilidad celular de las EPC por el ensayo MTS/PMS. Se representan los porcentajes según la fórmula: Abs492nm en presencia de los inhibidores / Abs492nm en ausencia de los inhibidores) x 100, medias y desviaciones estándar de 1 experimento por triplicado. La Abs492nm en ausencia de inhibidores fue de 1.3 ± 0.33.* ***C,*** *Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron con 0.001 ffu/célula de VSHV o VSHV-αp5 en presencia o ausencia de inhibidores del citoesqueleto. El VSHV se incubó con 3 μM de αp5 durante 4 h a 14 ºC antes de la infección. Los inóculos se incubaron durante 2 h a 14 ºC y las monocapas previo lavado se incubaron durante 2 h 30 min con las indicadas concentraciones de 30 μM Citocalasina B, 2.5 % DMSO, 50 μM Nocodazol y 240 μM Colchicina. Las monocapas se lavaron y se incubaron añadiendo 40 mM NH4Cl durante 22 h a 14 ºC. Despues se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2D5 y Ac anti-Igs de ratón-FITC. Se representan las medias y desviaciones estándar de 1 experimento por duplicado.* ***Barras azules****, ausencia de inhibidores.* ***Barras rayadas horizontalmente****, Citocalasina B.* ***Barras rayadas oblicuamente****, DMSO.* ***Barras cuadradas****, Nocodazol.* ***Barras blancas****, Colchicina.*

El hecho de que las infecciones con VHSV-αp5 fueran menos sensibles (~ 2 veces) a los inhibidores del citoesqueleto que las obtenidas con VHSV, sugirió la posibilidad de que la adición de αp5 al VHSV provocara una ralentización del progreso de su endocitosis. Para confirmar esta hipótesis se estudiaron comparativamente las cinéticas de progreso endosómico de VHSV y VHSV-αp5 estudiando el tiempo que la infección es sensible al inhibidor de acidez endosomal (resistencia al tratamiento con 40 mM de NH_4Cl). Para ello tanto el VHSV como el VHSV-αp5 se incubaron con las células durante 1 h a 4 ºC (para permitir la unión al receptor celular y la sincronización de las infecciones con VHSV y VHSV-αp5) y después, se aumentó la temperatura a 14 ºC y se adicionó NH_4Cl a distintos tiempos de 0 a 60 min. Finalmente, transcurridas 24 h a 14 ºC, se determinó el número de focos obtenidos. La **Ilustración 73** muestra una cinética más lenta cuando se usa VHSV-

αp5. Las incubaciones con 40 mM NH_4Cl a tiempo 0 (es decir inmediatamente después de la unión al receptor) redujeron el número de focos obtenido a ~ 0 tanto para VHSV como para VHSV-αp5. A medida que se aumentó el tiempo de incubación a 14 ºC en ausencia de NH_4Cl antes de añadir el NH_4Cl, se detectó un incremento en el número de focos obtenido para VHSV y VHSV-αp5. El aumento de 3-4 veces de la infectividad provocado por αp5 tan solo se detectó a partir de los 20 min antes de añadir NH_4Cl.

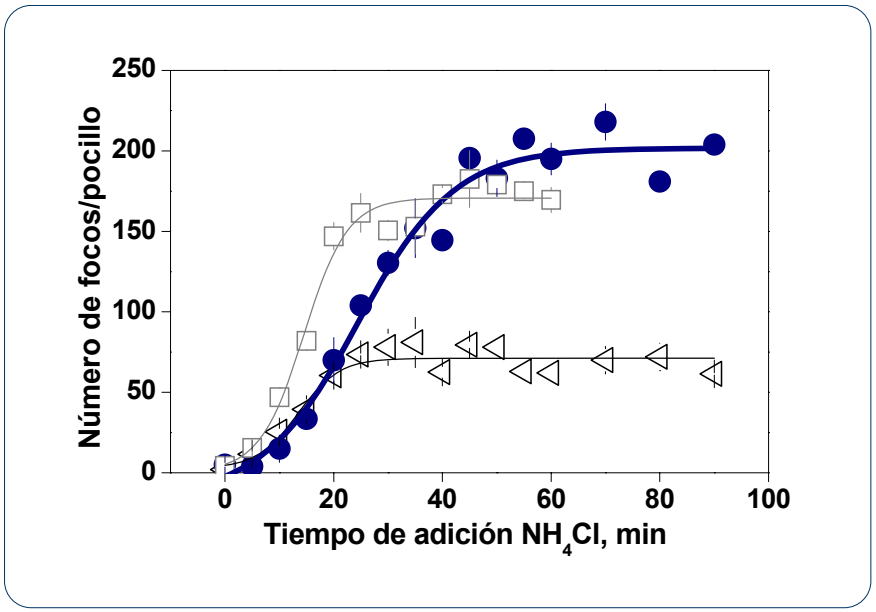


Ilustración 73. Cinética del efecto del NH_4Cl. *Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se incubaron durante 2 h a 4 ºC con VSHV o VSHV-αp5. El VSHV se incubó con 3 μM de αp5 durante 4 h a 14 ºC antes de la infección. La infección se realizó durante 24 h a 14 ºC en ausencia o en presencia de NH4Cl, sin retirar los inóculos. Las monocapas se fijaron con metanol y se tiñeron con AcMo anti-NVSHV 2C9 y DAB. Las monocapas se lavaron y se incubaron añadiéndose NH4Cl a los tiempos indicados post-infección. El NH4Cl no se retiró durante la infección, durante 24 h a 14 ºC. Se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2D5 y el Ac anti-Igs de ratón-FITC. Se representan las medias y desviaciones estándar de 3 experimentos por duplicado. ·····◁·····; 0.001 ffu/célula de VHSV. ·····□·····; 0.004 ffu/célula de VHSV. —●—; 0.001 ffu/célula de VSHV-αp5. Los ensayos en presencia de αp28 mostraron resultados similares a los obtenidos con VSHV (datos no mostrados)*

El ajuste de Boltzman de los perfiles sigmoideos obtenidos permitió calcular que el 50 % de resistencia a NH_4Cl se alcanzó a los 13.4 ± 1.8 min después de la unión al receptor para VHSV, mientras que se alcanzó a los 24.4 ± 2.1 min después de la unión al receptor para VHSV-αp5. Infecciones similares con VHSV a 0.004 ffu/pocillo mostraron una cinética similar para VHSV, alcanzándose un 50 % de resistencia al tratamiento con NH_4Cl transcurridos 14.5 ± 1.09 min después de la unión al receptor.

Finalmente, después de inhibir el paso de VHSV y VHSV-αp5 por el endosoma durante 2-8 h con 40 mM NH_4Cl (secuestro transitorio), se determinó el número de focos supervivientes. De esta manera se estimaba el nivel de resistencia al tiempo de estancia en el endosoma de VHSV y VHSV-αp5 (resistencia a la digestión endocítica). Como se muestra en la **Ilustración 74,** la infectividad del VHSV-αp5 en ausencia de NH_4Cl (122.25 ± 2.47 ffu/pocillo) sólo se redujo al ~ 50 % (66.5 ± 28.99 ffu/pocillo) después de 8 h con NH_4Cl mientras que la infectividad de VHSV en ausencia de tratamiento (41.25 ± 3.18 ffu/pocillo) se redujo a 8.25 ± 0.35 ffu/pocillo después de solo 2 h con NH_4Cl. Igualmente, la infectividad de VHSV a 0.004 ffu/pocillo en ausencia de NH_4Cl (105 ffu/pocillo) se redujo a 16 ± 2.82 ffu/pocillo después de 2 h con NH_4Cl. Las infecciones del VHSV-αp28 mostraron un perfil similar al obtenido con VHSV (datos no mostrados). Los resultados obtenidos demuestran,

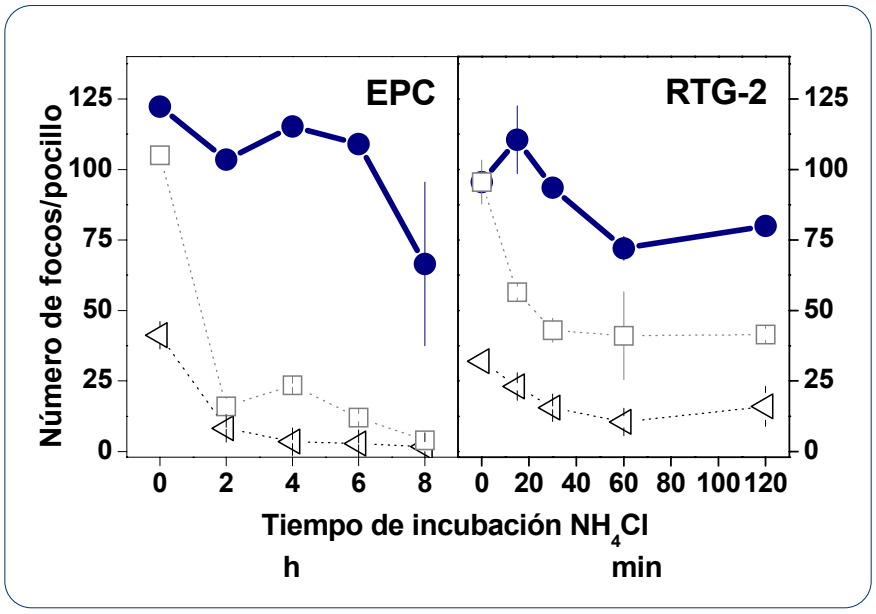


Ilustración 74. Resistencia del VSHV y VSHV-αp5 al tiempo de permanencia en el endosoma (inhibición por incubación con NH4Cl durante distintos tiempos) en EPC y RTG-2. *Las monocapas de células EPC o RTG-2 en placas de 96 pocillos se incubaron durante 2 h a 4 ºC con VSHV o VSHV-αp5. El VSHV se incubó con 3 μM de αp5 durante 4 h a 14 ºC antes de la infección. Las monocapas se lavaron y se incubaron con NH4Cl 40 mM durante los periodos de tiempo indicados. Despues se retiró el NH4Cl y las monocapas se incubaron durante 24 o 36 h, respectivamente. Despues se fijaron con metanol y se tiñeron con AcMo anti-NVSHV 2C9 y Ac anti-Igs de ratón-FITC. Se representan las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos por duplicado. ·····◁·····; 0.001 ffu/célula de VSHV. ·····□·····; 0.004 ffu/célula de VSHV. —●—; 0.001 ffu/célula de VSHV-αp5. Los ensayos con αp28 mostraron resultados similares en ambas líneas celulares a los mostrados con VSHV (datos no mostrados).*

por lo tanto, que la adición de αp5 al VHSV protege al VHSV de la estancia en el endosoma. Muy probablemente ello es debido a que el αp5 aumenta la resistencia de la G_{VHSV} a la digestión endosomal.

Para confirmar si la protección del αp5 existía en otras líneas celulares, se estudió la resistencia de la partícula vírica en presencia o

ausencia de αp5 al tratamiento transitorio con NH_4Cl en el efecto estimulador observado en infecciones con VHSV sobre la línea celular RTG-2 (**Ilustración 74**). En la **Ilustración 74B** se muestra como el número de focos obtenido con VHSV-αp5 sobre la línea celular RTG-2 (~100 ffu/pocillo) se mantuvo incluso tras 2 h de tratamiento transitorio con NH_4Cl (tiempo de incubación máximo ensayado en la RTG-2). Contrariamente, los 32 ffu/pocillo obtenidos con VHSV en ausencia de tratamiento con NH_4Cl, se redujeron a 10-15 ffu/pocillo después de incubaciones transitorias con NH_4Cl de al menos 30 min. Las infecciones en RTG-2 con VHSV a 0.004 ffu/pocillo o con VHSV-αp28 (datos no mostrados) mostraron un perfil similar al obtenido en la infecciones VHSV. Los resultados obtenidos demuestran, por lo tanto, que la adición de αp5 al VHSV protege al VHSV de la digestión endosomal tanto en EPC como en RTG-2.

- **Fusión de las membranas celular y vírica.**

Para estudiar la posible influencia del αp5 en la fusión del VHSV se llevaron a cabo ensayos de formación de sincitios desde dentro (monocapas de células EPC infectadas con VHSV) y desde fuera (adicionando gran cantidad de VHSV purificado a las monocapas de células EPC) en ausencia y en presencia de αp5. La formación de sincitios en monocapas de células EPC infectadas durante 24 h con 0.01 ffu/célula VHSV (desde dentro) se pudo observar al incubar las células a pH de 5.5 a 6.0. A estos pH el porcentaje de núcleos en sincitios (células fusionadas) fue del ~ 40 %. No se observaron núcleos en sincitios a pH superiores a 6.5. En presencia de 3 μM αp5 o αp28, las células infectadas formaron un número de núcleos en sincitios similar al obtenido con el VHSV en ausencia de αp, obteniéndose máximos del ~ 40 % a pH 5.5-6.0 y no detectándose núcleos en sincitios a pH superiores a 6.5 (**Ilustración 75A**).

La variación en el número de núcleos en sincitios formados por adición de 2.5 x 10^3 ffu/célula de VHSV a monocapas de células EPC (desde fuera) en función del pH fue similar al obtenido en los ensayos desde dentro. Adicionando VHSV a pH 5.5 o 6.0, el porcentaje de

núcleos en sincitios (células fusionadas) fue del ~ 50 %, no apreciándose sincitios a pH superiores a 6.5. Adicionando VHSV-αp5 a pH 5.5 o 6.0, el porcentaje de núcleos en sincitios (células fusionadas) fue del ~ 60 % (**Ilustración 75B**), obteniéndose ~10 % de núcleos en sincitios a pH superiores a 6.5. Los datos obtenidos en ensayos de formación de sincitios desde fuera añadiendo VHSV-αp28 fueron similares a los obtenidos añadiendo VHSV (datos no mostrados).

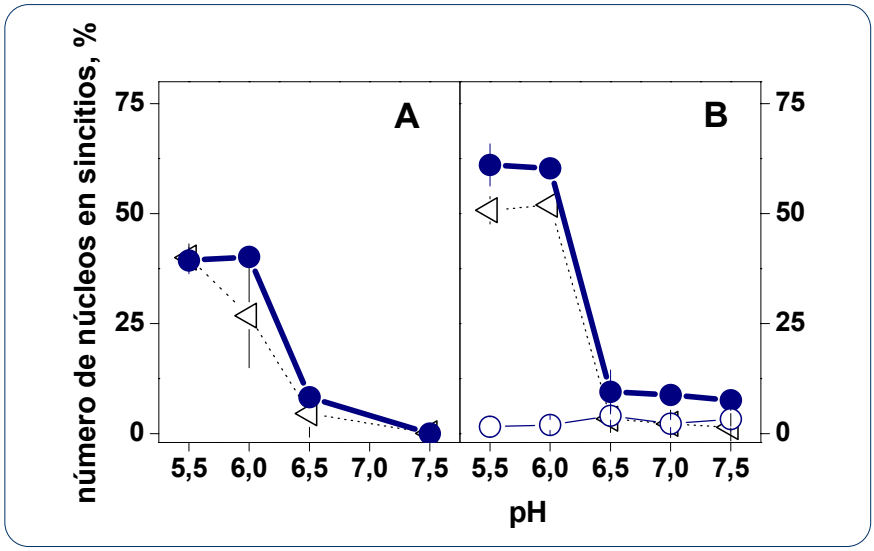


Ilustración 75 Formación de sincitios desde dentro (A) y desde fuera (B) ± αp5. A, *Las monocapas de células EPC se infectaron a 0.01 ffu/pocillo durante 24 h a 14 ºC. Las monocapas se lavaron y se incubaron con 3 µM αp5 durante 2 h a 4 ºC.* ***B,*** *Las monocapas de células EPC se incubaron con 2.5 x 103 ffu/célula de VSHV o VSHV-αp5 (4 h a 14 ºC con 3 µM de αp5) durante 1 h a 4 ºC. En ambos ensayos, despues, las monocapas se lavaron y se incubaron durante 30 min a 14 ºC con medio de fusión a los pH indicados y 2 h a 20 ºC con medio de fusión a pH 7.5. Se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa. Se representan los porcentajes según la fórmula: número de núcleos en sincitios por pocillo / número de núcleos totales por pocillo x 100, medias y desviaciones estándar de 2 experimentos por triplicado. El número de núcleos totales analizados en ambos ensayos fue de ~ 1000 por pocillo. ·····◁·····; VSHV. —●—; VSHV-αp5. —○—; αp5. Los ensayos con VSHV-αp28 mostraron resultados similares a los obtenidos con VSHV (datos no mostrados)*

4.4.8. Aplicaciones al diagnóstico del αp5

Como ejemplo de posibles aplicaciones prácticas de los αp estimuladores de la infección del VHSV, se estudió la capacidad del αp5 para aumentar la sensibilidad de los tests de diagnóstico basados en infectividad del VHSV. Debido a que las unidades infecciosas presentes en las muestras clínicas de peces infectados corresponden en gran medida a virus intracelular, los ensayos de infectividad se llevaron a cabo con VHSV intracelular obtenido de extractos de células RTG-2 previamente infectadas.

En la **Ilustración 76** se muestra las ffu obtenidas tanto del extracto intracelular como del extracelular en presencia de 3 μM αp5. Tanto en extractos intracelulares como extracelulares, hay un aumento de la infectividad con respecto a cada control no tratado con αp (el tratamiento fue de 8 h con 3 μM de αp5). En extractos extracelulares la infectividad (42.33 ± 7.23 ffu/pocillo) aumentó un 551 ± 51 % después de un tratamiento con αp5 (233.67 ± 21.83 ffu/pocillo), mientras que en extractos intracelulares la infectividad l (18.67 ± 5.03 ffu/pocillo) aumentó un 212 ± 72 % después del tratamiento con αp5 (39.67±13.43 ffu/pocillo).

Para confirmar el aumento de infectividad del extracto intracelular después del tratamiento con αp5 (16 h con 3 μM de αp5), se realizaron ensayos similares pero aumentando la dilución del extracto intracelular a 1:1000 y 1:20000. Una vez finalizado el ensayo, los pocillos donde se detectó al menos 1 ffu/pocillo se contabilizaron como positivos. En la dilución 1:1000 del extracto no tratado se obtuvieron 94 % de pocillos positivos (2.1 ffu/pocillo) mientras que en la del extracto tratado con αp5 se obtuvieron 100 % de pocillos positivos (4.7 ffu/pocillo). En la dilución 1:20000 del extracto no tratado no se obtuvieron pocillos positivos, mientras que en la del extracto tratado con αp5 1 h se obtuvieron 70 % de pocillos positivos (1.3 ffu/pocillo) y con αp5 16 h, se obtuvieron 100 % de pocillos positivos (2.5 ffu/pocillo) (**Tabla 5**).

Por último para comprobar si el aumento de la sensibilidad del ensayo de focos (ffu en 1 día) es reproducible en el ensayo de formación de placas (pfu, 8 días) y en el ensayo de dilución límite ($TCID_{50,}$ 9 días), se determinó la estimulación de los extractos intracelulares tratados con 3 μM αp5 en dichos ensayos. En la **Tabla 6**, se muestran los títulos obtenidos de un mismo stock de VHSV intracelular para los tres tipos de ensayos en presencia o ausencia de αp5. De todos ellos, el más sensible fue el ensayo de focos, donde se detectaron 7.8 x 10^{-4} ffu/ml comparados con 2.2 x 10^{-4} pfu/ml y 2.7 x 10^{-4} $TCID_{50}$/ml del ensayo de placas y de dilución límite, respectivamente. Al adicionar αp5 a una concentración de 6 μM la sensibilidad de los tres ensayos fue un ~ 200 % la obtenida en ausencia del αp5.

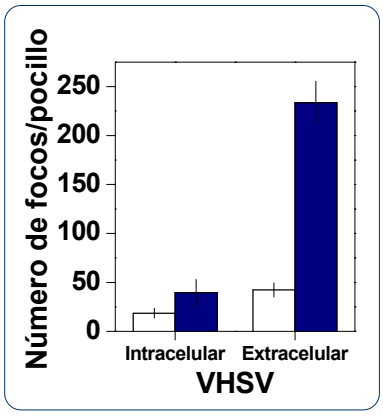


Ilustración 76. Efecto de la preincubación con αp5 en la infectividad del VSHV intracelular y extracelular. *Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron con extractos extracelulares o intracelulares de infección de RTG-2 con VSHV obtenidos según se describe en el material y métodos, en presencia (Barras blancas) o ausencia (Barras azules) de 3 μM αp5. El tratamiento de αp5 con los extractos se realizó durante 8 h a 4 ºC antes de la infección. La infección de las células EPC se realizó durante 24 h a 14 ºC. Las monocapas se fijaron con metanol y se tiñeron con AcMo anti-NVSHV 2C9 y DAB . Se representan las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos por duplicado.*

Tabla 5. Detección de VSHV en extractos intracelulares ± αp5 por ensayo de focos (ffu).

	Dilución de la muestra			
	1:1000 (n=18)		1:20000 (n=10)	
	Pocillos + , %	ffu/pocillo[a]	Pocillos + , %	ffu/pocillo[a]
VSHV control	94	2.1	0	-
VSHV+αp5 (1 h)	ND	ND	70	1.3
VSHV+αp5 (16 h)	100	4.7	100	2.5

Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron con una dilución 1:1000 o una dilución 1:20000 de extractos intracelulares de RTG-2 infectadas con VSHV en presencia o ausencia de 3 μM de αp5 (1 o 16 h a 4 ºC antes de la infección). La infección se realizó durante 24 h a 14 ºC. Las monocapas se fijaron con metanol y se tiñeron con AcMo anti-N_{VSHV} 2C9 y DAB. n, indica el número de muestras analizadas. El porcentaje de pocillos positivos (+) se obtuvo según la fórmula: número de pocillos con al menos 1 foco / n x 100. ND, no determinado. a, media de los ffu/pocillo de los pocillos +.

Tabla 6. Comparación de títulos de VSHV ± αp5 en extractos intracelulares de RTG-2 infectados con VSHV diluidos 20000 veces

El título de VSHV en un extracto intracelular de células RTG-2 infectadas con VSHV diluido 1:20000 en ausencia (-) o presencia (+)de αp5 se determinó según se describe en materiales y métodos por los ensayos de focos,

Tipo de ensayo	Título de VSHV x 10^5 -αp5	Título de VSHV x 10^5 +αp5	Estimulación por αp5, %	Tiempo, días
Focos (ffu/ml)	0.78	1.21	159	2
Placas (pfu/ml)	0.22	0.41	180	8
Dilución límite ($DICT_{50}$/ml)	0.27	0.51	189	9

4.5. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MODULADORES DE LA INFECTIVIDAD DEL VHSV EN LOS COMPUESTOS DE QUIMIOTECAS DE N,N' 2,5 PIPERAZINDIONAS (DKPs)

4.5.1. Cribado de las quimiotecas de DKP

Con la intención de identificar inhibidores de la infectividad del VHSV se analizó la capacidad inhibitoria de los 98 compuestos (R1-DKP-R2) pertenecientes a las dos quimiotecas de DKPs (DKP-I y DKP-II) cuya estructura y composición de muestra se muestra en la **Ilustración 20** (material y métodos).

Para realizar el cribado, el VHSV se incubó de manera previa a la infección con cada uno de los R1-DKP-R2 (400 µM) y a continuación con las mezclas de infección (VHSV+R1-DKP-R2,) se infectaron células EPC durante 24 h. El cribado inicial de la librerías identificó 11 compuestos en la DKP-I capaces de reducir al 0-30 % la infectividad del VHSV, que se estimo en ausencia de DKP en unos 96.3 ± 5.2 focos/pocillo (**Tabla 7**). En la quimioteca DKP-II tan sólo se identificaron 3 compuestos (6-DKPII-9, 6-DKPII-13 y 7-DKPII-9) capaces de reducir al 30-40 % el número de focos obtenido en ausencia de DKP. Como los cribados se llevaron a cabo a concentración de R1-DKP-R2 de 400 µM (una concentración relativamente alta), tan sólo las 7 R1-DKP-I-R2 que abolieron completamente la infectividad del VSHV (número de focos/pocillo = 0), se seleccionaron para continuar con el estudio. Las 7 R1-DKP-R2 seleccionadas poseían en R1: N-(2,4-diclorofenitilo) (5-DKPI-8 y 5-DKPI-14), N-(3,3 difenilpropilo) (6-DKPI-8, 6-DKPI-11, 6-DKPI-12 y 6-DKPI-14) y N-(3-(1-imidazol) propilo) (3-DKPI-12).

4.5.2. Viabilidad celular en presencia de las DKP

Para descartar que posibles efectos tóxicos de las 7 R1-DKPI-R2 sobre las células fueran en parte responsables de la inhibición de la infectividad del VHSV, células EPC fueron incubadas con distintas concentraciones de las R1-DKPI-R2 activas durantes 48 h y a continuación se analizo su viabilidad. A 400 µM, la concentración usada

Tabla 7. Cribado de las quimiotecas DKP-I y DKP-II.

	R1→	1	2	3	4	5	6	7
	R2↓							
	8	111.0 ± 4	64.7 ± 15	90.5 ± 21	86.5 ± 3	**0 ± 0**	**0 ± 0**	62.2 ± 9
	9	97.1 ± 28	83.4 ± 7	80.6 ± 2	56.6 ± 0	44.6 ± 6	58.4 ± 8	66.7 ± 27
	10	83.1 ± 4	87.0 ± 2	90.8 ± 15	81.6 ± 9	68.5 ± 10	52.4 ± 5	72.9 ± 15
DKP-I	**11**	80.3± 15	69.4 ± 14	64.6 ± 29	96.6 ± 19	23.0 ± 1	**0 ± 0**	68.7 ± 2
	12	77.5± 9	103.0 ± 1	**0 ± 0**	96.7 ± 1	21.6 ± 0	**0 ± 0**	58.5 ± 10
	13	69.4± 27	53.4 ± 11	62.4 ± 1	67.3 ± 6	26.3 ± 7	27.0 ± 0	94.1 ± 13
	14	56.7 ± 7	64.1 ± 5	55.8 ± 1	63.3± 0	**0 ± 0**	**0 ± 0**	50.2 ± 11
	8	79.6 ± 17	105.8 ± 8	103.3 ± 26	104.4 ± 14	89.6 ± 3	105.8 ± 19	110.7 ± 29
	9	84.6 ± 10	84.6 ± 31	94.6 ± 0	94.6 ± 7	77.1 ± 42	34.8 ± 7	43.5 ± 12
	10	52.8 ± 7	51.0 ± 29	67.2 ± 3	92.1 ± 24	108.2 ± 8	105.8 ± 8	97.1 ± 10
DKP-II	**11**	95.8 ± 22	100.7 ± 15	87.1 ± 0	120.7 ± 5	151.8 ± 16	123.3 ± 3	112.9 ± 17
	12	137.4 ± 5	100.1 ± 36	127.8 ± 3	121.0 ± 1	50.3 ± 21	107.4 ± 9	137.4 ± 17
	13	103.4 ± 7	111.0 ± 9	129.6 ± 7	127.8 ± 7	69.3 ± 13	41.3 ± 1	99.3 ± 21
	14	125.1 ± 11	89.8 ± 19	111.5 ± 34	122.4 ± 15	120.6 ± 19	77.5 ± 21	81.6 ± 7

Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron (100µl/pocillo) con VSHV en presencia o ausencia de 400µM de DKP. El tratamiento del VSHV con las DKP se realizó antes de la infección durante 4 h a 14 ºC y en 100 µl/pocillo. La infección se realizó durante 24 h a 14 ºC. Las monocapas se fijaron con metanol y se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2C9 y DAB. se muestra el porcentaje según la fórmula: número de focos por pocillo en presencia de DKP / número de focos por pocillo en ausencia de DKP x 100, en un experimento por duplicado. **Negritas**, inhibición total de la infectividad del VSHV. El número de focos/pocillo en ausencia de

en el cribado de las quimiotecas, todas las R1-DKPI-R2, con excepción de solo 5-DKPI-8 y 6-DKPI-14, redujeron la viabilidad de las EPC (**Ilustración 77)**.

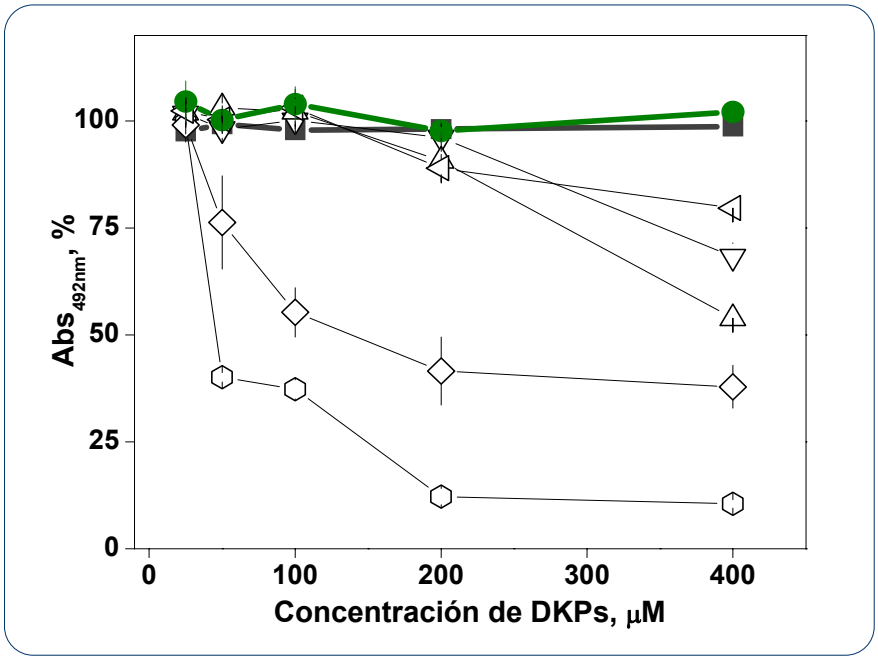


Ilustración 77. Viabilidad de las células EPC en presencia de las DKP. *Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se incubaron en presencia o ausencia de las DKP que presentaron una mayor inhibición. Esta incubación se realizó durante 48 h a 28 ºC. La viabilidad celular de las EPC se ensayó por MTS/PMS. Los resultados se expresan según la fórmula: Abs492nm en presencia de DKP / Abs492nm en ausencia de DKP x 100. Se representan las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos por hexaplicados en ausencia de DKP y triplicados en presencia de DKP. El valor de Abs492nm registrado en ausencia de DKP fue de 1.5 ± 0.23. --◇--, 3-DKP-12. —■—, **5-DKP-8**. --◁--, 5-DKP-14. --▽--, 6-DKP-8. --△--, 6-DKP-11. --○--, 6-DKP-12. —●— **6-DKP-14**.*

Consecuentemente, los estudios posteriores solo se realizaron con 5-DKPI-8 y 6-DKPI-14 (**Ilustración 78A)**. Además, tras la incubación de las células con las mezclas de infección (VHSV+R1-DKP-R2) no se observaron cambios en el pH del medio durante el periodo de infección por lo que se puede descartar que el efecto anti-VSHV observado fuera a variaciones de pH (datos no mostrados).

.

4.5.3. Estudio de la inhibición de la infectividad de VHSV causada por 5-DKP-8 y 6-DKP-14

Para determinar la mínima concentración de 5-DKPI-8 y 6-DKPI-14 requerida para detectar inhibición de la infectividad del VSHV, se realizó una curva dosis-respuesta con concentraciones de 25 a 200μM de las 5-DKP-8 y 6-DKP-14. Para ambos compuestos, se observó una dependencia directa entre la concentración y grado de inhibición de la infectividad de VSHV (**Ilustración 78B**). Los valores CI_{50} (concentración

de compuesto necesaria para inhibir la infectividad al 50%) obtenidos fueron 86.2 y 51.1 μM, para 5-DKP-8 y 6-DKP-14, respectivamente, sugiriendo por tanto una mayor capacidad antiviral de la 6-DKP-14. Mientras que a 100 μM 6-DKP-14 no se detectaron focos de infección (efecto inhibitorio del 100 %), a la misma concentración de 5-DKP-8 la infectividad del VHSV fue ~ 45 % del control (virus no tratado).

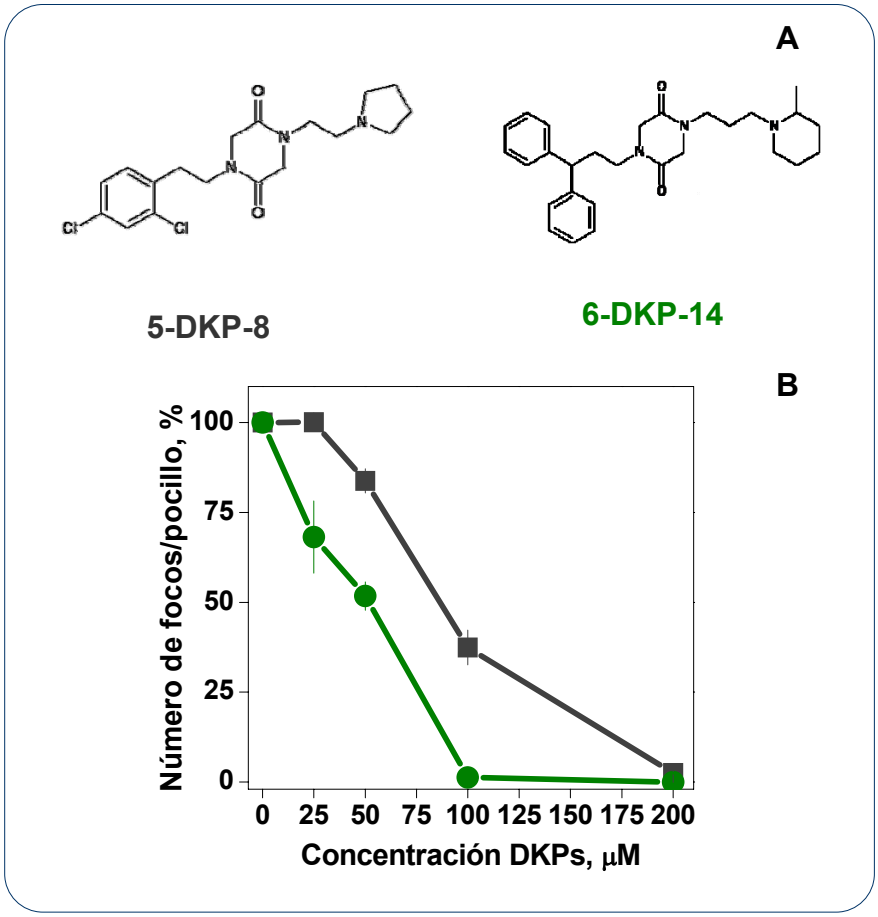


Ilustración 78. Curva dosis-respuesta de 5-DKP-8 y 6-DKP-14. A, *Estructura química de 5-DKP-8 y 6-DKP-14, las DKP con mayor actividad anti-VSHV sin efectos citotóxicos.* ***B,*** *Curva dosis respuesta de la inhibición de la infectividad del VSHV por la 5-DKP-8 y 6-DKP-14. Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron (100μl/pocillo) con VSHV en presencia de 5-DKP-8 o 6-DKP-14. El tratamiento del VSHV con 5-DKP-8 o 6-DKP-14 se realizó antes de la infección durante 4 h a 14 ºC, en 100μl/pocillo. La infección se realizó durante 24 h a 14 ºC. Las monocapas se fijaron con metanol y se tiñeron con el AcMo anti-NVSHV 2C9, y DAB. Los resultados se expresan según la fórmula: número de focos por pocillo en presencia de DKP / número de focos por pocillo en ausencia de DKP x 100. Se muestran los valores obtenidos de 2 experimentos por triplicados. El número de focos/pocillo en ausencia de DKP fue de 90.3 ± 10.2 ffu/pocillo.—■—, VSHV con* ***5-DKP-8****. —●—, VSHV con* ***6-DKP-14****.*

4.5.4. Reducción del tamaño de los focos de infección en cultivos celulares infectados en presencia 5-DKP-8 o 6-DKP-14.

Confirmando observaciones preliminares realizadas al hacer el recuento de los focos de infección en los ensayos de dosis-respuesta, cuando las infecciones de las células EPC se realizaban con VHSV

tratado con 5-DKP-8 o de 6-DKP-14 además de una reducción del número de focos (**Tabla 7, Ilustración 78B**) hay una reducción del número de células infectadas /foco (tamaño de foco) (**Ilustración 79A**). .Veinticuatro h p.i., en las infecciones realizadas con VSHV no tratado mas del 41 % de los focos de infección estaba formado por 16-20 células infectadas/foco (**Ilustración 79A, B**). Por el contrario, en las infecciones realizadas con VHSV tratado con 5-DKP-8 o de 6-DKP-14 el 80-90 % de los focos eran unicelulares o de un tamaño máximo de 2-5 células/foco (**Ilustración 79A, C**). Estos resultados sugieren que en presencia de 5-DKP-8 o 6-DKP-14, como ocurría cuando el pH del medio era 6.5, la propagación de la infección de las células EPC inicialmente infectadas a las vecinas está inhibida.

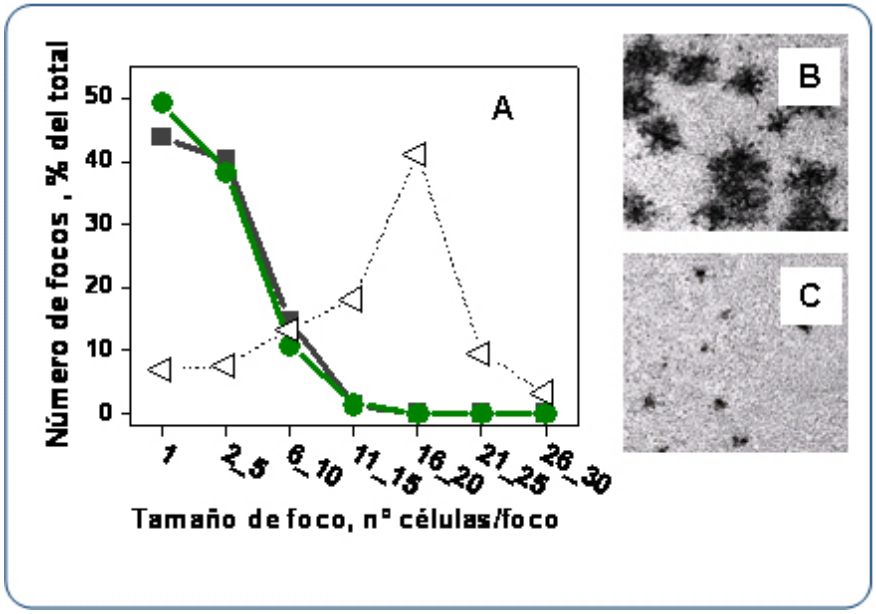


Ilustración 79. Tamaño de focos en presencia de 5-DKP-8 y 6-DKP-14. A, *Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron (100µl/pocillo) con VSHV en presencia o ausencia de las DKP. Los tratamientos del VSHV con 100 µM de DKP se realizaron durante 4 h, a 14 ºC antes de la infección, en 100µl/pocillo. La infección se realizó durante 24 h a 14 ºC. Las monocapas se fijaron con metanol y se tiñeron con AcMo anti-NVSHV 2C9 y DAB . El número de focos analizados fue de 150 en ausencia de DKP, 70 para el VSHV con 5-DKP-8 y 60 para el VSHV con 6-DKP-14.* ***--△--****, ausencia de DKP.* ***—■—****,* ***5-DKP-8****.* ***—●—****,* ***6-DKP-14****.* ***B,*** *Microfotografía de los focos obtenidos en ausencia de DKP.* ***C,*** *Microfotografía de los focos obtenidos en presencia de 6-DKP-14.*

4.5.5. Influencia en la actividad antiviral del momento de adición de las 5-DKP-8 y 6-DKP-14.

En todos los ensayos realizados hasta ahora, el VSHV se incubó con las R1-DKP-R2 antes de la infección de las células EPC (4 h a 14 ºC) y con estos inóculos formados por VHSV-R1-DKP-R2 se infectaron las células. Como además lo inóculos no se retiraron, las R1-DKP-R2 estuvieron presentes durante toda la infección. Sin embargo, cuando se

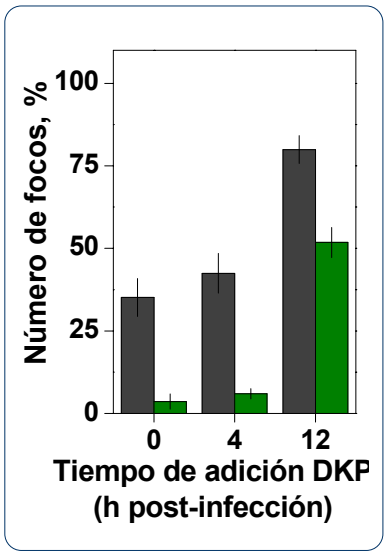


Ilustración 80. Influencia del tiempo de adición de 5-DKP-8 y 6-DKP-14 en su inhibición. *Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron (100µl/pocillo) con VSHV en presencia o ausencia de 100 µM de DKP. Las infecciones se realizaron durante 24 h a 14 ºC. Las monocapas se fijaron con metanol y se tiñeron con AcMo anti-NVSHV 2C9 y DAB. Los resultados se calcularon según la fórmula: número de focos por pocillo en presencia de DKP / número de focos por pocillo en ausencia de DKP x 100. Se muestra las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos por triplicados. El número de focos/pocillo en ausencia de DKP fue de 98.3 ± 9.5 ffu/pocillo. Barras grises, infecciones en presencia de* ***5-DKP-8****. Barras verdes, infecciones en presencia de* ***6-DKP-14****.*

retiraron las mezclas VHSV-R1-DKP-R2 tras el periodo de (2 h 14 ºC) y a las células infectadas se les añadió medio fresco sin R1-DKP-R2, tanto en presencia de 5-DKP-8 como de 6-DKP-14, la infectividad del VSHV con respecto al control de virus no tratado, se mantuvo en ~ 90 %, es decir no se detectó inhibición de la infectividad (datos no mostrados). De acuerdo con estos resultados, no parece preciso el periodo previo de incubación VHSV-R1-DKP-R2 para que los compuestos ejerzan su actividad antiviral y si parece necesario que estén presentes durante las etapas de la infección posteriores a la adsorción.

Para determinar el tiempo p.i al que era necesario adicionar las R1-DKPII-R2 para observar inhibición de la infectividad del VSHV, se realizaron infecciones en las que 5-DKP-8 o de 6-DKP-14 se adicionando a las células previamente infectadas con VHSV sin tratar a 0, 4 y 12 h p.i.. Los resultados obtenidos confirman que el periodo de preincubación del VHSV con los compuestos no es necesario porque se obtuvieron niveles de inhibición similares cuando 5-DKP-8 o de 6-DKP-14 se preincubaron con el virus antes de la infección (**Ilustración 78B**) o se adicionaron justo en el momento de la infección (t=0) (**Ilustración 80**). Además, la actividad inhibitoria de 5-DKP-8 y de 6-DKP-14 fue similar cuando se adicionaban a los cultivos a 0 o 4 h p.i., sugiriendo que las etapas tempranas de infección no se ven afectadas por estos compuestos. En el caso concreto de 6-DKP-14, la infectividad de VHSV se redujo el ~ 95 % cuando el compuesto se adiciono 0 o 4 h p.i. y el ~50% cuando se adiciono 12 h p.i. 5-DKP-8 mostró un patrón de inhibición temporal similar al de 6-DKP-14 aunque su capacidad de inhibición fue menor que la de 6-DKP-14 a cualquier tiempo de adición, confirmando la mayor actividad de 6-DKP-14 con respecto a la 5-DKP-8 tal y como previamente se había determinado en los ensayos de dosis-respuesta (**Ilustración 78B**).

4.5.6. Producción de VHSV en presencia de 5-DKP-8 y 6-DKP-14

Cuando se título el VHSV presente en el sobrenadante de infecciones realizadas en presencia o ausencia de 5-DKP-8 y 6-DKP-14

(**Tabla 8**) se comprobó que 24 h p.i. el titulo de virus en relación con el de los cultivos infectados con virus no tratado, se redujo un 76.1 y 98.6 % en presencia de 5-DKP-8 y 6-DKP-14 respectivamente. A 48 p.i. las reducción fue del 96.4 y 99.4 % (**Tabla 8**). Estos resultados confirman otra vez la mayor capacidad de inhibición de 6-DKP-14 en relación con 5-DKP-8 e indican que la reducción de la .propagación de la infección in vitro de VHSV en presencia de estos compuestos se debe en parte a una reducción de la presencia de virus infectivo en los sobrenadantes de cultivo.

Tabla 9. Títulos de los sobrenadantes de infecciones de células EPC con VSHV en presencia de 5-DKP-8 o 6-DKP-14.

	sobrenadante de infección, % de inhibición	
Tiempo infección, h	**VSHV - 5-DKP-8**	**VSHV - 6-DKP-14**
24	76.1 ± 12.7	98.6 ± 21.2
48	96.4 ± 14.1	99.4 ± 5.6

*Las monocapas de células EPC crecidas sobre pocillos de placas de 96 pocillos se infectaron (100µl/pocillo) con VSHV en presencia o ausencia de 100 µM de **5-DKP-8** y **6-DKP-14**. La adición de las DKP se llevó a cabo al inicio de la infección, no retirándose durante la infección. La infección se realizó a 14 ºC, a 3 x 10^{-4} ffu/célula (30 ffu/pocillo). Despues se recogieron los sobrenadantes de las monocapas de células y se titularon por ensayo de focos. Los porcentajes de inhibición se calcularon según la fórmula: 1 - (número de focos por pocillo en presencia de DKP / número de focos por pocillo en ausencia de DKP) x 100. Se representan las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos por duplicado.*

En principio, la ausencia/reducción de la infectividad en los sobrenadantes de cultivo de infecciones realizadas en presencia de 5-DKP-8 o 6-DKP-14 puede deberse i) a que los viriones allí presentes no son infectivos o ii) a una reducción de partículas víricas (infectivas o no). Para comprobar cual de las dos posibilidades tenia lugar, células EPC se infectaron con VHSV en presencia de 6-DKP-14 y 24 h p.i se analizó la presencia de virus en los sobrenadantes de infección

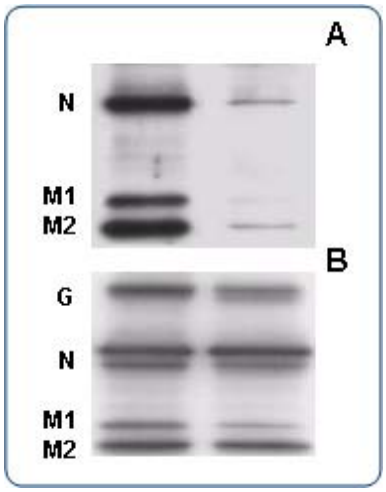


Ilustración 81. Influencia de 6-DKP-14 en la acumulación de proteínas del VSHV en sobrenadantes de infección (A) y células EPC infectadas (B). *Las monocapas de células EPC en placas de 96 pocillos se infectaron durante 24 h, 14 ºC en presencia o ausencia de 100 µM de 6-DKP-14. La adición de la 6-DKP-14 se llevó a cabo al inicio de la infección, no retirándose durante la infección, que se realizó durante 24 h a 14 ºC a 3 x 10-4 ffu/célula (30 ffu/pocillo). Transcurrido el tiempo de infección, tanto los sobrenadantes (**A**) como los extractos de células infectadas (**B**) se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida, se transfirieron a membranas de nylon y se tiñeron con AcPo anti-VSHV. Se muestran blots representativos de 3 experimentos*

valorando las presencia relativa de las bandas de las proteínas del virus por Western blot. Estos ensayos se realizaron solo con 6-DKP-14 por ser el compuesto mas activo de los dos. En todos los ensayos realizados pudo observarse una reducción general de ~85% en los niveles de proteínas de VHSV en los sobrenadantes procedentes de células infectadas en presencia de 6-DKP-14 en comparación con los procedentes de cultivos control (infecciones en ausencia de compuesto) (**Ilustración 81A**). Por el contrario, la acumulación de proteínas víricas en las células infectadas apenas reflejó una leve reducción en la producción de la proteína G y M1 (**Ilustración 81B**), manteniéndose constantes el resto de las proteínas de VSHV. La densitometría correspondiente a las bandas G y M1 mostró una reducción del 31.2 % y 42.9 %, respectivamente con respecto al VSHV no tratado con DKP. Así, aunque en el interior de las células infectadas no parece haber alteraciones en la presencia y proporción del proteínas de VHSV, son muy pocos los viriones que salen de esas células.

DISCUSIÓN

5

5.1.INHIBICIÓN DEL VHSV POR EL pH 6.5

5.2.SECUENCIAS DE LA G_{VHSV} ESTIMULADORES DEL VHSV

5.3.α-PÉPTIDOS ESTIMULADORAS DEL VHSV

5.4.DKP INHIBITORIAS DEL VHSV

5.5 MODULADORES IDENTIFICADOS

5.1. INHIBICIÓN DEL VHSV POR EL pH 6.5

La inhibición de la replicación y/o fusión vírica por el pH ácido se ha descrito en infecciones de VHSV (DeKinkelin, 1972; Vestergaard-Jorgensen, 1972; Wolf and Quimby, 1973), VSV (La Ferla and Peluso, 1989), RV (Gaudier, Gaudin, and Knossow, 2001; Gaudin, 2000b; Gaudin et al., 1993; Maillard et al., 2003), influenza virus (Bui, Whittaker, and Helenius, 1996), poliovirus (Fiszman et al., 1974) y retrovirus (Portis, McAtee, and Evans, 1985).

Fue una observación que el VHSV solo causaba efectos citopáticos *in vitro* a pH 7 o mayores de 7 desde 1970 (Vestergaard-Jorgensen, 1972; Wolf and Quimby, 1973; Wolf et al., 1973) (DeKinkelin and Scherrer, 1970).

Debido a que la incubación de los posibles moduladores durante la infección podría variar el pH del medio, causando la aparición de falsos negativos/positivos en el cribado, se estudió la sensibilidad/viabilidad del ensayo de focos en función del pH. Confirmando las observaciones ya publicadas, las variaciones del pH fisiológico tanto a pH básicos como ácidos, provocaron la reducción de la infectividad del VHSV sobre la línea celular EPC, si bien, la inhibición de la infectividad fue mayor hacia valores de pH ácidos (**Ilustración 25**). Una vez confirmado que en el ensayo de focos, el óptimo de infección se obtuvo a pH 7.2-7.5, los cribados se llevaron a cabo a dicho pH.

Debido a la importancia de la inhibición por pH ácido, ya fuera para el cribado, para la inactivación de VHSV presentes en fluidos biológicos (Kasermann, Wyss, and Kempf, 2001) o para el correcto diagnóstico de las enfermedades que provoca (Coll, 1992), se estudió la influencia del pH ácido en la infectividad del VHSV, ya que aún no se ha sugerido una explicación de su mecanismo de inhibición de la infectividad del VHSV.

Este estudio ha permitido descartar tanto la unión del VHSV al receptor celular (**Ilustración 26**) como el bloqueo en el transporte de la GVHSV (**Ilustración 31**) a la membrana de la célula infectada como causas posibles de la inhibición por pH ácido, comprobándose que en esta inhibición se produce una reducción del progreso de infección de las

células inicialmente infectadas a las vecinas caracterizada además por la inhibición preferencial de la acumulación de G_{VHSV}, $M1_{VSHV}$ y $M2_{VSHV}$, así como de la reducción de la capacidad fusogénica de la nueva GVHSV sintetizada.

Efectivamente, los ensayos de unión al receptor celular a pH 6.5 (pH representativo de pH ácido con efecto inhibitorio) y a pH 7.5 (pH fisiológico), lejos de indicar influencias negativas del pH ácido en la unión del virus al receptor celular, mostraron incluso una mayor unión a pH ácido, confirmando estudios anteriores con liposomas (Coll, 1995c) por lo que el efecto inhibitorio del pH debería afectar a procesos posteriores de la infección del VHSV (**Ilustración 26**). La unión del virus al receptor celular también fue más eficiente a pH ácido que a pH neutro para el caso de RV (Wunner, Reagan, and Koprowski, 1984), así como para el VSV (La Ferla and Peluso, 1989) o el retrovirus murino (Portis, McAtee, and Evans, 1985).

Para confirmar la inhibición del pH ácido se efectuaba en etapas posteriores a la unión del VHSV al receptor celular, se estudió el progreso de la infección a pH 7.5 y 6.5. Para ello, se estimaron los títulos y tamaños de foco obtenidos de infecciones de 7 días. A pH 6.5 se pudo comprobar una pérdida de 4-5 logaritmos en el título de VHSV obtenido a pH 7.5 independientemente del pH utilizado en la etapa de adsorción (**Tabla 3**). Además, mientras que el tamaño de foco observado a pH 7.5 fue creciendo a 60-100 células/foco transcurridas 60 h de infección, a pH 6.5 tan sólo se pudieron apreciar focos unicelulares a cualquier tiempo de infección (**Ilustración 27**, **Ilustración 28**).

Para caracterizar la inhibición del progreso de la infección unas células a otras, se estudió la posible interferencia del pH en la acumulación de proteínas del VHSV. Los resultados obtenidos a pH 6.5 mostraron una reducción en la acumulación de las proteínas GVHSV, $M1_{VSHV}$ y $M2_{VSHV}$ mientras que la N_{VSHV} se mantenía constante (**Ilustración 29**, **Ilustración 30**), confirmadas por una reducción del ARNm de la G_{VHSV} (datos no mostrados). Este efecto fue específico para las proteínas de VHSV, puesto que el nivel de expresión de la GFP en células EPC transfectadas a pH 6.5 no mostró cambios significativos con respecto al obtenido a pH 7.5. Por

tanto, la descompensación entre las cantidades acumuladas de las distintas proteínas víricas a pH 6.5 con respecto a las que se acumulan a pH 7.5, podría explicar esta inhibición del progreso de la infección, al evitar un correcto ensamblaje y por lo tanto la salida de las nuevas partículas de VHSV. Esta hipótesis esta de acuerdo con el hecho de que en infecciones a pH 6.5 tan sólo la mitad del VHSV producido se encuentra en el sobrenadante de infección, a diferencia de lo observado en infecciones a pH 7.5 donde casi el total del VHSV producido se encuentra en el sobrenadante de infección (**Tabla 3**).

Puesto que la acumulación de cada proteína de los rabdovirus decrece en el orden M1>M2>G (es decir conforme aumenta la distancia de los genes al extremo 3' del genoma de VHSV: 3' N-M1-M2-G-L-5') (Wagner, 1987), es posible que la atenuación descrita para la transcripción de los rabdovirus se vea acentuada en VHSV a pH 6.5. Esta atenuación de la transcripción que se da en la intersecciones entre genes en rabdovirus consiste en un descenso del número de mensajeros sintetizados conforme se aleja del extremo 3' (donde se encuentra el único promotor de la polimerasa) (Wagner, 1987).

Para estudiar la infectividad de los nuevos viriones se estudió el transporte a la membrana, la conformación y la actividad fusogénica de la GVHSV a pH 6.5. Las inmunofluorescencias y ELISAS con AcMo dependientes o no de conformación mostraron, que a pH 6.5, la GVHSV se transportaba a la membrana de la célula infectada (**Ilustración 31**), pero no en conformación activa para la fusión (**Ilustración 33**). Esta observación confirma trabajos previos con la G_{RV}, en la que se ha podido comprobar que adopta la conformación activa en fusión cuando se transporta a la membrana plasmática y se expone a un pH fisiológico (Gaudin, Ruigrok, and Brunner, 1995; Gaudin et al., 1993; Gaudin et al., 1995a; Maillard and Gaudin, 2002). Por ensayos de formación de sincitios, se pudo comprobar que la actividad fusogénica de la GVHSV expresada en la membrana de células previamente infectadas o transfectadas a pH 6.5 estaba inhibida reversiblemente (**Ilustración 33**)

Con todos estos resultados se puede concluir que la inhibición de la infectividad del VHSV a pH 6.5 se debe tanto a la disminución en la

producción de VHSV (posiblemente provocada por la reducción en la acumulación de GVHSV, $M1_{VSHV}$ y $M2_{VSHV}$), como a la inhibición de la adquisición de la conformación de la GVHSV activa para la fusión. Ambos procesos contribuyen a inactivar el VHSV producido.

5.2. SECUENCIAS DE LA G_{VHSV} ESTIMULADORES DEL VHSV

5.2.1. Análisis de la actividad estimuladora de los péptidos 15-mer y frg11

A diferencia de lo descrito para otros virus con envuelta, ninguno de los péptidos derivados de la G_{VHSV} mostraron actividad inhibitoria de la infectividad del VHSV. Por el contrario, se aislaron secuencias capaces de aumentar la infectividad del VHSV tales como los péptidos correspondientes al pepscan 15-mer: p24 aa 99-113, p25 aa 199-213 y p26 aa 359-373 (**Ilustración 35**) y la región correspondiente al frg11 (aa 56-110) (**Ilustración 37**) que contiene gran parte del p24 (**Tabla 9**).

El mecanismo de acción de estas secuencias de la GVHSV parece estar relacionado con la fusión del VHSV, ya que tanto el p24 (aa 99-113) como el frg11 (aa 56-110) definen una región que ya ha sido relacionada con la fusión del VHSV en trabajos anteriores (Estepa and Coll, 1996b; Nunez et al., 1998). Además, los péptidos estimuladores aa 99-113 y 199-213 son las que mostraron la mayor capacidad para unir PS, de todos los péptidos de 15-mer de la GVHSV (Estepa and Coll, 1996a). Asimismo, el hecho de que el aumento de la infectividad provocado por estos péptidos esté favorecido por la preincubación previa con el VHSV a pH 5.6 (pH óptimo de fusión para el VHSV) sugiere que para que se dé la estimulación, es necesaria la interacción de estos péptidos con la GVHSV a la conformación a pH 5.6, conformación relacionada con la fusión en el VHSV y en otros rabdovirus (Durrer et al., 1995; Gaudin et al., 1993; Gaudin et al., 1991; Konieczko, Whitaker-Dowling, and Widnell, 1994). Después de la reciente caracterización por rayos X de la estructura de la conformación a pH ácido de la G_{VSV} (Roche et al., 2006), la localización del frg11 y en particular su péptido aa 99-113 en la estructura tridimensional de la GVHSV (**Ilustración 36**), sugieren que podrían actuar como muelles que al encogerse o extenderse

favorecieran la conformación activa o inactiva, respectivamente, para la fusión. Confirmando esta hipótesis, se han demostrado cambios estructurales del frg11 recombinante que aumentan la agregación a pH 7.5 y la estructura en hojas-β extendida a pH 6.5 (Estepa et al., 2001). Además se ha demostrado que las interacciones del frg11 con liposomas a pH 6.5 aumentan del 35.3 al 84.4 % la conformación del frg11 en hojas-β extendidas (**Ilustración 43**).

Ya que la estimulación provocada por los péptidos del pepscan y el frg11, tan sólo se caracteriza por un aumento del número de focos y no del tamaño de los mismos y no se obtiene tras adicionar los péptidos una vez iniciada la infección, ni tampoco tras adicionarlos a las células previamente a la infección (**Ilustración 37**), es probable que solo afecte a las etapas tempranas de la entrada del VHSV en la célula y no a las etapas posteriores. Ahora bien, para poder descartar definitivamente esta hipótesis es necesario comprobar en futuros ensayos la influencia de estos péptidos en procesos del ciclo replicativo del VHSV tales como la replicación del genoma vírico, síntesis de proteínas víricas, ensamblaje y salida de los nuevos viriones, así como la infectividad de los nuevos viriones. Una posible explicación de la estimulación observada sería que la interacción de los péptidos estimuladores y del frg11 con la membrana celular desestabilizarían dicha membrana favoreciendo la fusión posterior con el VHSV.

5.2.2. Participación del frg11 en la fusión de membranas.

De todos los segmentos seleccionados para el estudio de la fusión: p9, p2, p3, p4 y frg11 (p9+p2), el frg11 fue el único capaz de inducir fusión al adicionarlo a monocapas de células EPC (Rocha et al., 2004b). A estos datos, se añade su actividad específica más alta en su interacción con fosfolípidos aniónicos (**Ilustración 40**) y su capacidad de translocar PS en la membrana desde la cara interna a la externa (**Ilustración 42**). La inhibición con anti-frg11 de la fusión célula-célula de monocapas celulares transfectadas con GVHSV a bajo pH confirmaba la posible implicación del frg11 en la fusión del VHSV (Rocha et al., 2004a). Su localización tridimensional en la G_{VSV} (**Ilustración 36**) sugiere que la conformación del

frg11 puede controlar la localización del doble bucle implicado en fusión. Puesto que se ha demostrado por IR y DC (**Ilustración 43, Ilustración 44**), que el frg11 adopta una conformación globular a pH fisiológico disminuyendo su solubilidad al aumentar el pH (datos no mostrados) y una conformación hoja-ß extendida al disminuir el pH (**Ilustración 43**), siendo estos cambios reversibles, podría ser el frg11 el responsable de que el doble bucle se encontrará retraído en el interior de la GVHSV a pH fisiológico mientras que a pH bajo su extensión diera lugar a la estructura tridimensional observada en la G_{VSV} a bajo pH (Roche et al., 2006).

Aunque el ligamiento de PIPP (Rocha et al., 2004a) confirmó la especificidad del p2 en el ligamiento de fosfolípidos aniónicos (Nunez et al., 1998), el frg11 era más activo en la agregación de fosfolípidos aniónicos que el p2 (**Ilustración 40**). Estas interacciones no tenían lugar con fosfolípidos neutrales indicando la especificidad de la agregación y la importancia de sus componentes electrostáticos. La importancia de las secuencias p2 del frg11 en la interacción con fosfolípidos se confirmó por espectroscopia IR y DC (**Ilustración 43, Ilustración 44**), pasando su conformación ß de un 5.8 % a pH 7.5 a un 25.4 % a pH 6.5 y a un 84.4 % en presencia de PS (**Ilustración 43**). A pesar de la continuación de las heptadas hidrofóbicas repetidas del p2 en el p9, el DC del frg11 demostró que el p9 no interaccionaba con PS, sugiriendo además que las heptadas hidrofóbicas repetidas no participan en la interacción con los fosfolípidos sino en otras interacciones estructurales de la GVHSV como podrían ser las implicadas en la agregación

Todos estos resultados sugieren que mientras que el p9 en la parte amino-terminal del frg11, añade las interacciones péptido-péptido causantes de la agregación del frg11 a pH 7.5, las interacciones con PS están restringidas al p2 en la parte carboxi-terminal del frg11. Los resultados obtenidos en este trabajo junto a los descritos anteriormente también sugieren que la correspondiente estructura del frg11 en la GVHSV podría estar enterrada en la cabeza o implicada en la formación de los trímeros de GVHSV a pH 7.5. Cuando el pH disminuye, los cambios conformacionales en la GVHSV no solo afectan al frg11 adoptando una estructura en hoja-ß extendida, sino que además deben de afectar a

regiones más amplias de la GVHSV debido a que el frg11 está flanqueado por C64 y C110 formando puentes disulfuro con otras regiones distantes (Einer-Jensen et al., 1998). En G_{VSV} se han demostrado cambios más amplios de conformación durante la fusión que los del bucle de fusión (Zhang and Ghosh, 1994). Dichos cambios se han confirmado para los dominios carboxi terminales de la G_{VSV} (Jeetendra et al., 2002; Odell et al., 1997; Shokralla et al., 1998).

Los cambios conformacionales inducidos por la disminución de pH exponen el p2 a la superficie de la GVHSV, tal y como demuestran la dependencia de pH ~ 5 de su reconocimiento por AcPo anti-p2 (Estepa and Coll, 1996b) y de la inhibición de la formación de sincitios en células transfectadas con AcMo anti-G, AcPo anti-VHSV, Ac de trucha anti-VHSV y los AcPo anti-p2 y anti-frg11 (Rocha et al., 2004b). A bajo pH, el dominio del frg11 en la GVHSV puede convertirse en una estructura totalmente extendida, toda ß, al interaccionar con los fosfolípidos de la membrana tal y como se demuestra que ocurre en el frg11 recombinante con la PS (Estepa and Coll, 1996b; Nunez et al., 1998). La transición del frg11 hacia la conformación de bajo pH podría explicarse por el atrapamiento de protones por las histidinas presentes en posiciones 66, 84, 99 y 102 (Carneiro et al., 2003). También se ha descrito la exposición de una estructura hidrofóbica no identificada enterrada en la estructura nativa de la G_{RV} con la disminución del pH (Gaudin et al., 1999) y en VSV (Lenard, 1993) y parece ser una característica común en las conformaciones activas de la $G_{rabdovirus}$ durante la fusión (Clague et al., 1990; Gaudin et al., 1993).

Hay que resaltar el hecho de que la adición de frg11 a monocapas de EPC a bajo pH sea capaz de causar fusión celular en ausencia del resto de la molécula de G_{VHSV} (**Ilustración 41**). Aunque la adición de p2 a bajo pH a una monocapa de EPC expandía las células (probablemente debido a su inserción en la membrana) (**Ilustración 41 AB**), la adición del frg11 inducía tanto su expansión como la fusión célula-célula (**Ilustración 41 CD**), sugiriendo que la diferencia observada entre el comportamiento de p2 y frg11 es debida a la presencia del p9. Por otra parte, es difícil imaginar como el frg11 sin la ayuda del p9, podría translocar PS de uno a otro lado de la membrana (**Ilustración 42**). Ahora bien, el frg11 era ~ 200 veces

menos eficiente que la GVHSV en inducir fusión (aunque esta actividad específica fue probablemente 3-6 veces mayor debido a la insolubilidad del frg11). Es decir, los resultados comparativos de eficiencia de fusión entre el frg11 y la GVHSV, también sugieren que la fusión del VHSV requiere no solo el frg11 sino también otros dominios de la GVHSV, confirmando lo comentado con anterioridad para la G_{VSV} (Odell et al., 1997; Shokralla et al., 1998; Zhang and Ghosh, 1994).

Puesto que una molécula de p2 interacciona con 15-17 moléculas de fosfolípidos aniónicos y ~ 1/20 es la relación molar para formar agregados entre el frg11 y los fosfolípidos aniónicos (**Ilustración 43**), podemos especular sobre el número de moléculas que podrían participar en el proceso de fusión a través de los trímeros de GVHSV. Si en VHSV ocurre lo mismo que en RV en que el complejo mínimo de fusión se ha estimado en 6 trímeros (Gaudin, de Kinkelin, and Benmansour, 1999; Roche and Gaudin, 2002), la penetración de p2 en las membranas provocaría una concentración local de 6 x 3 p2 y por lo tanto de 270 a 360 fosfolípidos aniónicos por cada complejo de fusión. La translocación de todas esas moléculas de fosfolípidos aniónicos de la cara interna de la membrana a la externa causaría una poderosa desestabilización local en la membrana que ayudaría al proceso de fusión (Budker et al., 1996).

5.3. αPÉPTIDOS ESTIMULADORES DEL VHSV

5.3.1. Análisis de la actividad estimuladora de αp5 y αp6

Como alternativa a los péptidos derivados de la GVHSV, la búsqueda de moduladores de la infectividad del VHSV se trasladó a la química combinatoria o quimiotecas. Esta búsqueda se centró en una quimioteca de 137180 α-péptidos (αp) de 17 aa en formato de rastreo posicional (**Ilustración 19**). El análisis de la infectividad del VHSV (cribado) en presencia de las 80 mezclas de péptidos que componen la quimioteca, tan sólo permitió la identificación de mezclas capaces de aumentar la infectividad del VHSV (**Ilustración 45** y **Ilustración 46**). Tras la deconvolución de la quimioteca, se sintetizaron 4 secuencias con la mayor capacidad activadora teórica posible: SAAEASAKATAEAEAKG

(αp3), SAAEASAKNTAEAEAKG (αp4), SAAEASAKATAEATAKG (αp5) y SAAEASAKNTAEATAKG (αp6)(**Ilustración 47**).

El análisis posterior de estas secuencias por ensayo de focos, demostró que solo αp5 y αp6, fueron capaces de estimular la infectividad del VHSV. La sustitución del aa T por el aa E en la posición 14, tanto para αp5→αp3 como para αp6→αp4, o el cambio de secuencia al azar del αp5→ αp28 (ASKASEAATAAETKGAA), provocó la pérdida de estimulación (**Ilustración 48**). Estas observaciones indicaron por tanto, que la interacción VHSV-αp (αp5 y αp6) es dependiente de la secuencia de aa del αp.

El hecho de que no se detectara la actividad estimulatoria predicha teóricamente para αp3 y αp4 puede tener que ver con el formato de la quimioteca. Al presentar la quimioteca un formato de rastreo posicional, su cribado permite predecir el aa más eficaz para obtener un αp activo en las posiciones variables (6, 9, 10, 14)(**Ilustración 19**). Pero, debido a que esta determinación se lleva a cabo de manera independiente para cada una de las 4 posiciones variables, no implica necesariamente una predicción de la secuencia final completa, es decir que pueden aparecer falsos positivos. Además, la actividad observada en la mezcla de αp que contienen el aa T en la posición 14 y que sugirió la síntesis de αp3 y αp4, puede que resida en el efecto sumatorio de varias secuencias de las 6859 presentes en la mezcla y por tanto una secuencia individual (por ejemplo, las de αp3 y αp4) podría carecer de actividad, tal y como de hecho ha sucedido.

La identificación de péptidos con capacidad para estimular la infectividad de virus se ha limitado al aislamiento de péptidos de 2-3 aa para el caso del virus de leucemia bovina {Voneche, 1993 #2017} y de un péptido de 4 aa para el caso del retrovirus murino xenotrópico {Suk, 1983 #2015}. Por lo tanto, los resultados aquí expuestos constituyen la primera identificación de péptidos capaces de aumentar la infectividad de rabdovirus.

La razón por la que no se ha podido identificar péptidos inhibidores para el VHSV puede residir en la naturaleza de los péptidos y αp analizados. A lo largo de los años, se han podido aislar péptidos

capaces de inhibir el HIV ya sea de secuencias víricas o de quimiotecas de péptidos, siendo el rango de concentración activo dependiente del tamaño de la secuencia. Por ejemplo, péptidos inhibidores de 6 aa han presentado actividad en el rango de mM, péptidos inhibidores de 11 aa la han presentado en el rango de μM y péptidos de 22 aa la han presentado en el rango de nM (Eckert and Kim, 2001; Epand, 2000; Lenard, 1993). En este trabajo, no hemos analizado todas las posibles secuencias de la GVHSV, ni todas las de otros péptidos de igual, menor o mayor tamaño. Además solo se han ensayado en un rango de concentraciones de 3-10 μM. Por todo ello es posible, al igual que ha sido descrito para otros virus, que la variación del tamaño de las secuencias y/o del rango de concentraciones permita en un futuro el aislamiento de inhibidores del VHSV.

Con el propósito de identificar péptidos inhibidores de la infectividad del VHSV, recientemente la búsqueda se ha trasladado en nuestro laboratorio hacia péptidos de un tamaño inferior. Para ello se ha iniciado el cribado de una quimioteca de péptidos de 6 aa. Todavía no se disponen de resultados definitivos, ya que el diseño de esta quimioteca provoca que su deconvolución se lleve a cabo de manera secuencial (el cribado de cada posición requiere la síntesis de una nueva quimioteca). Sin embargo, los resultados obtenidos hasta la fecha, permiten ser optimistas, ya que una vez cribadas las 4 primeras posiciones, la mezcla de péptidos RWYQXX, compuesta por 400 péptidos resultado de combinar las 2 posiciones variables X con los 20 aa, presenta una actividad inhibitoria significativa frente a la infectividad del VHSV en un rango de concentración de tan sólo 25 μg/ml (~ 40μM).

Otro posible motivo que pudiera explicar la ausencia de péptidos inhibidores de la infectividad del VHSV y más concretamente aquellos relacionados con la fusión de membranas, podría residir en los mecanismos de la fusión de los rabdovirus, diferentes a los de otras familias de virus (Lenard, 1993). Para los rabdovirus, incluido el VHSV, no se da una proteolisis de la proteína de fusión, el péptido de fusión permanece interno durante la fusión y los cambios conformacionales que se dan como consecuencia del pH bajo son reversibles. Estas

propiedades fusogénicas tan originales, ha provocado que se clasifique a la $G_{rabdovirus}$ dentro de un nuevo tipo de proteínas de fusión, el tipo III. El resto de proteínas de fusión se han incluido en el tipo I (proteínas de fusión de retrovirus, ortomyxovirus, paramyxovirus y filovirus) o en el tipo II (proteínas de fusión de alfavirus y flavivirus) (Bentz, 1993; Da Poian, Carneiro, and Stauffer, 2005; Eckert and Kim, 2001).

Debido a que el cribado de la quimioteca de αp se llevó a cabo por preincubaciones a pH 7.4 entre el VHSV y las mezclas de αp, el óptimo de actividad de αp5 y αp6 se obtuvo tras este tipo de preincubación. A diferencia de lo observado para el caso de los péptidos estimuladores del pepscan 15-mer y frg11, la preincubación a pH 5.6 entre αp5/αp6 y VHSV provocó una reducción en la actividad de los αp. Este dato ya indica que el mecanismo de estimulación entre ambos tipos de estimuladores no es el mismo. Por otro lado, el análisis de la actividad de los αp demostró que: **i)** no se detectó estimulación por αp5 y αp6 al incubarlos con las células antes o después de la infección (**Ilustración 50**), **ii)** el nivel de estimulación de αp5 y αp6 fue dependiente de la moi, de la concentración de αp (**Ilustración 51**), de la temperatura (**Ilustración 53**) y del tiempo de preincubación (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.), **iii)** la estimulación por αp5 y αp6 se obtiene tanto en EPC como en RTG-2 (**Ilustración 54**), **iv)** αp5 estimula la infección no solo de VHSV sino también de otros rabdovirus tanto de peces como el IHNV (**Ilustración 55**) o de mamíferos como el VSV (**Ilustración 56, Ilustración 57**) y **v)** αp5 no estimula la infectividad de virus pertenecientes a otras familias ya sean virus de peces como el IPNV (birnavirus) (**Ilustración 55**) o de mamíferos como el SFV (alphavirus).

Todos estos resultados, sugirieron que la estimulación se debe a la unión de los αp al VHSV (a la membrana o a la GVHSV).

5.3.2. Dianas moleculares de la interacción VHSV-αp5

A diferencia de los observado para el frg11, los resultados obtenidos de los ensayos biofísicos (agregación, calorimetría, IR, DC), no detectaron interacciones entre αp5 o αp6 con membranas de

liposomas, ya fueran de lípidos aniónicos, catiónicos o neutros (datos no mostrados) .

Por el contrario, la detección de interacciones por ensayos de unión entre αp5 o αp6 en fase sólida y VHSV en fase soluble (**Ilustración 58**), permiten concluir que la estimulación se debe a la unión de los αp a la GVHSV. Las interacciones GVHSV-αp provocaron cambios conformacionales en la GVHSV, detectados por la disminución de reactividad con los AcMo C10 y AcMo 3F1A12 (**Ilustración 62**). Ya que el reconocimiento de la GVHSV tanto por el AcMo C10 como por el AcMo 3F1A12 fue dependiente de pH (**Ilustración 32**), los correspondientes epítopos están accesibles en la conformación nativa a pH fisiológico en la GVHSV y se pierden o enmascaran cuando se disminuye el pH. Esta pérdida o enmascaramiento se inicia a pH 6.5, donde probablemente al igual que se ha descrito para las G_{RV} y G_{VSV}, la GVHSV adopte la conformación activa en fusión, conformación de carácter hidrofóbico que interacciona con membranas, y que supone el primer paso en el proceso de fusión (Gaudin, Ruigrok, and Brunner, 1995; Gaudin et al., 1993; Roche et al., 2006).

Resumiendo los resultados comentados anteriormente, parece que como consecuencia de la interacción GVHSV-αp, la GVHSV pierde su conformación activa en fusión adoptando una conformación que podría ser o no similar a la producida por la bajada del pH (conformación inactiva en fusión).

En los ensayos de reconocimiento con AcMo comentados, el VHSV y los AcMo C10 y 3F1A12 se incubaron con αp5 durante más de 12 h mientras que a tiempos inferiores, el αp no interfirió con el reconocimiento de los AcMo aún cuando si se detectó estimulación de la infectividad del VHSV. Este último dato sugiere que para que se dé la estimulación no es necesario que la totalidad de las GVHSV presentes en la envuelta del VHSV interaccionen con el αp5.

Por otro lado, debido a que tanto el AcMo C10 como el AcMo 3F1A12 son AcMo dependientes de la conformación de la GVHSV, no se puede afirmar con certeza que la zona de interacción del αp5 con la GVHSV se encuentre localizada en el epítopo de estos AcMo, ya que

cualquier interacción de los αp con otra región de la GVHSV podría provocar cambios conformacionales que indujeran igualmente la pérdida o enmascaramiento de dichos epítopos.

Para intentar dar respuesta a esta cuestión y definir la región de interacción entre la GVHSV y el αp5, se realizaron ensayos de reconocimiento por AcMo frente a la GVHSV, pero en esta ocasión con AcMo de epítopos lineales, como los I16, I10 y IP1H3 (**Ilustración 62**). Por otro lado, también se determinó la interacción del αp5 biotinilado marcado (αp5-biot) con los péptidos correspondientes con dos pepscans que cubren la totalidad de la secuencia de la GVHSV.(**Ilustración 60**). Los resultados obtenidos sugieren que la interacción entre la GVHSV y αp5 no se da exclusivamente en una localización de la GVHSV sino en distintas regiones. Se identificaron 3 regiones principales de interacción: **i)** aa 129-143, región discontinua que corresponde con la localización de uno de los epítopos definidos para el AcMo C10 (aa 140 y 433), **ii)** aa 350-370, región que incluye la zona de unión propuesta para la fibronectina, que ha sido descrita como el componente mayoritario del receptor de VHSV en las células RTG-2 (Bearzotti et al., 1999) y **iii)** aa 270-290, región discontinua localizada en la cara externa de los puentes disulfuro C49-C359 y C64-C315, adyacentes teóricamente en la estructura tridimensional de la GVHSV (Roche et al., 2006; Walker and Kongsuwan, 1999).

Aunque no se puede afirmar que αp5 interaccione con las 3 regiones identificadas, el hecho de que se observe una interacción con la región que incluye al epítopo del AcMo C10 indica que la pérdida de reconocimiento del VHSV por el AcMo C10 podría deberse a la interacción con αp5. Por el contrario debido a que no se ha detectado ninguna región de interacción del αp5 con la región correspondiente al epítopo del 3F1A12, la interacción de αp5 con alguna de las 3 regiones identificadas podría cambiar la conformación de la GVHSV de tal manera que el epítopo del 3F1A12 se pierda o deje de estar accesible.

Debido a que al adicionar αp5 después de la unión del VHSV a su receptor celular, la estimulación del número de focos no alcanzó el nivel de estimulación obtenido al adicionar αp5 antes (4-5 veces)

(**Ilustración 64**), el αp5 debería de actuar en alguna de las fases tempranas de la infección del VHSV. Para estudiar en que fase temprana de la infección del VHSV actuaba el αp5, se estudiaron comparativamente infecciones con VHSV ± αp5 en: **i)** experimentos de unión al receptor celular utilizando αp5-biotinilado (αp5-biot) (**Ilustración 63**)**, ii)** ensayos de focos en los que el αp5 se adicionó a los pocillos después de incubar el VHSV con las células (**Ilustración 64**), **iii)** infecciones en presencia de inhibidores: de acidificación de endosomas (NH_4Cl) (**Ilustración 65**), de la formación de vesículas de clatrina (Chlorpromazina y sacarosa) (**Ilustración 66**, **Ilustración 67**), del citoesqueleto de actina y tubulina (Citocalasina B, DMSO, Nocodazol y la Colchicina) (**Ilustración 71**), **iv)** ensayos de resistencia del VHSV a la digestión endocítica (**Ilustración 74**) y **v)** ensayos de formación de sincitios desde dentro (monocapas de células EPC infectadas con VHSV) y desde fuera (adicionando el VHSV a las monocapas de células EPC) (**Ilustración 75**).

Primero se comprobó que la infección de VHSV requería una endocitosis ácida y vesículas de clatrina, pero en ninguna de esta fases había diferencias significativas entre infecciones con VHSV y VHSV-αp5. Por ejemplo, la preincubación con αp5-biot no aumentó significativamente la intensidad media de fluorescencia ni el número de células EPC fluorescentes (**Ilustración 63**) y aunque si se comprobó el requerimiento de una endocitosis acida (sensibilidad de la infección al NH_4Cl), no se encontraron diferencias significativas entre VHSV y VHSV-αp5 (**Ilustración 65**). Todos los resultados obtenidos con los inhibidores Chlorpromazina y sacarosa demostraron que el VHSV requiere vesículas de clatrina para su entrada en las células EPC tanto en ausencia como en presencia de αp5 (**Ilustración 66**, **Ilustración 67)**,

Una vez comprobada la necesidad de endocitosis de carácter ácido mediada por vesículas de clatrina para la infección de VHSV (Boshra et al., 2005), se continuó con el estudio de la progresión de la endocitosis en infecciones con VHSV y VHSV-αp5. Para ello, se realizaron ensayos de entrada en presencia de inhibidores del citoesqueleto, soporte del tráfico endosómico.

Los experimentos con inhibidores de citoesqueleto (Citocalasina B, DMSO, Nocodazol y Colchicina) demostraron que las fases tempranas de la infección con VHSV y en menor medida con VHSV-αp5 (~ 2 veces) se inhibieron con estos compuestos a concentraciones sin efectos ni sobre la viabilidad celular ni sobre la acumulación de la N_{VSHV}. El hecho de que las infecciones con VHSV-αp5 fueran menos sensibles a los inhibidores del citoesqueleto que las obtenidas con VHSV, sugirió la posibilidad de que la adición de αp5 al VHSV provocara una ralentización del progreso de su endocitosis. Para confirmar esta hipótesis se estudiaron comparativamente las cinéticas de progreso endosómico de VHSV y VHSV-αp5 estudiando el tiempo que la infección es sensible a un inhibidor de acidez endosomal (resistencia al tratamiento con NH_4Cl) (**Ilustración 73**), comprobándose una ralentización del progreso de VHSV-αp5 respecto al de VHSV. Finalmente se comprobó, después de inhibir el paso de VHSV y VHSV-αp5 por el endosoma durante 2-8 h con NH_4Cl (secuestro transitorio), que la adición de αp5 al VHSV protege al VHSV de la digestión endosomal (**Ilustración 74).** La protección a la digestión endosomal con αp5 fue similar cuando se utilizó para los experimentos la línea celular RTG-2 (**Ilustración 74**). Finalmente no se pudieron detectar diferencias significativas en ensayos de formación de sincitios desde dentro (monocapas de células EPC infectadas con VHSV) y desde fuera (adicionando el VHSV a las monocapas de células EPC) en ausencia y en presencia de αp5, por lo que parece que uno de los efectos del αp5 es la protección de la digestión endosomal de la GVHSV.

5.3.3. Aplicaciones del αp5.

Como una primera posible aplicación de los αp estimuladores identificados en este trabajo se estudió su capacidad para aumentar la sensibilidad de varios test de diagnóstico de infectividad del VHSV.

En los tres test de diagnóstico estudiados (ensayo de focos, formación de placas de lisis y dilución límite), independientemente del tiempo de infección del ensayo, (2 ,8 y 9 días respectivamente), la preincubación de los extractos de células RTG-2 previamente infectadas

con VHSV con αp5 aumentó la sensibilidad de los ensayos (**Ilustración 76, Tabla 6**).

Aunque en estos ensayos, la estimulación (~ 2 veces) no alcanzó el nivel obtenido con sobrenadantes de infección (~ 4-5 veces), esta diferencia puede ser debida a la interacción de αp5 con componentes celulares de los extractos. Por otro lado, el αp5 también podría estar interaccionando no solo con partículas VHSV infectivas sino también con partículas VHSV deficientes. Es por todo ello que en un futuro sería conveniente el desarrollo de estimuladores más específicos que mostraran niveles de estimulación similares a los obtenidos en sobrenadantes de infección.

A pesar de no alcanzar niveles de estimulación idénticos a los obtenidos con VHSV extracelular, al utilizar diluciones de extractos intracelulares por debajo del nivel de detección del ensayo de focos, la preincubación con αp5 fue capaz de detectar VHSV con un 100 % de detección de las muestras ensayadas (**Tabla 5**). Esto permite albergar esperanzas de que αp como el αp5 permitan en un futuro detectar cantidades muy pequeñas de VHSV tal y como las que están presentes en portadores asintomáticos de rabdovirosis. Ello permitiría combatir con mayor eficacia estas enfermedades tan perjudiciales para los peces.

5.4 DKP INHIBITORIAS DEL VHSV.

Dado que no se encontraron ni péptidos de la G_{VHSV} ni αp de quimioteca capaces de inhibir la infectividad del VHSV, se trasladó la búsqueda a quimiotecas combinatoriales de 2,5-piperazindionas N,N' disustituidas, DKP-I y DKP-II (**Ilustración 20**). Estos compuestos, tienen la ventaja frente al empleo de péptidos, de una mayor resistencia a la proteolisis. Estrategias similares se han llevado a cabo con éxito para la identificación de inhibidores frente a la infectividad del virus HIV (Ferrer et al., 1999; Frecer, Burello, and Miertus, 2005; Park and Raines, 2000; Rinnova et al., 2000; Srivastava et al., 2004), picornavirus (Tsang et al., 2001), influenza virus (Hochgurtel et al., 2002) y adenovirus (Horne et al., 2005).

El cribado de la quimioteca DKP-I permitió identificar 7 compuestos capaces de inhibir completamente la infectividad del VHSV, bajo las condiciones ensayadas (moi ~100 ffu/pocillo, DKP 400 μM). Sin embargo, al realizar el cribado de la DKP-II no se aisló ningún compuesto capaz de alcanzar este nivel de inhibición (**Tabla 7**). Debido a que la única diferencia entre las 2 quimiotecas está en la adición de un N-oxido en el sustituyente R2 de la DKP-II, se puede afirmar que esta adición, que introduce una carga negativa en el compuesto, reduce drásticamente la capacidad inhibitoria de los compuestos similares de la DKP-I.

De las 7 DKP seleccionadas, 2 de ellas presentaron en el sustituyente R1, el radical N-(2,4-dichlorophenthyl) (5-DKP-8 y 5-DKP-14) y 4 de ellas el radical N-(3,3-diphenylpropyl) (6-DKP-8, 6-DKP-11, 6-DKP-12, y 6-DKP-14) (**Ilustración 20, Tabla 7**), sugiriendo que la actividad inhibitoria de las DKP esta relacionada con la presencia de anillos aromáticos en el sustituyente R1.

A diferencia de lo observado con los péptidos, al adicionar las DKP se observaron alteraciones morfológicas de las monocapas de células EPC, por lo que para excluir una posible alteración celular como causa de la disminución de la infectividad de VHSV observada, se estimó la viabilidad celular en presencia de las DKP seleccionadas. Exceptuando la 5-DKP-8 y 6-DKP-14 y a diferencia de lo observado en la línea celular HeLa (Carbonell et al., 2000), el resto de DKP exhibieron citotoxicidad (**Ilustración 77**). Es por ello, que estas 2 DKP se seleccionaron para posteriores ensayos de focos de VHSV.

La inhibición de la infectividad del VHSV (moi 1 x 10^{-3} ffu/célula) con 5-DKP-8 y 6-DKP-14 se obtuvo incluso reduciendo la concentración de estas DKP a 100 μM (4 veces inferior a la utilizada en el cribado) (**Ilustración 78)** similar a las dosis de 2,6-piperazindiona N sustituida (flutimide) para obtener una inhibición completa de la infectividad del virus de la gripe (Tomassini et al., 1996).

Por otro lado, el efecto inhibitorio fue independiente de una preincubación previa VHSV-DKP y de las primeras h después de la infección (**Ilustración 80**), sugiriendo que la estimulación de las DKP no

reside en una alteración de las etapas tempranas de la replicación del VHSV tales como la unión al receptor, endocitosis o descapsidación y por el contrario sí podría estar relacionada con interferencias en alguna etapa posterior del ciclo replicativo del VHSV. En este sentido se ha podido demostrar una reducción del progreso de infección de las células inicialmente infectadas a las vecinas (**Ilustración 79**), así como una reducción de la liberación al sobrenadante de infección de los nuevos viriones sintetizados (**Tabla 8**).

El mecanismo de acción propuesto para la flutimide fue la inhibición de la transcripción primaria del virus de la gripe y más concretamente la actividad endonucleasa cap-dependiente de la transcriptasa (Tomassini et al., 1996). Si la actividad transcriptasa de la polimerasa L del VHSV se hubiese visto afectada se tendría que haber observado una reducción similar de la acumulación de todas sus proteínas, sin embargo, la reducción sólo se observó para la G_{VHSV} y la $M1_{VHSV}$ (**Ilustración 81**), por lo que es probable que la inhibición por las DKP en VHSV implique un mecanismo diferente.

Por otro lado, ya que la disminución de la acumulación de proteínas del VHSV en presencia de DKP no permite explicar el nivel de inhibición apreciado, esta podría deberse a alteraciones en los procesos de ensamblaje o salida del VHSV de la célula. El hecho de que se vea reducida la síntesis de la GVHSV y $M1_{VSHV}$, ambas esenciales en los procesos del ensamblaje final del virus (Das and Pattnaik, 2005; Green et al., 2000; La Ferla and Peluso, 1989; Maillard et al., 2003), sugiere que no se dan las condiciones estequiométricas necesarias para el correcto ensamblaje y salida del VHSV. No sería un mecanismo nuevo, puesto que alteraciones en el proceso de ensamblaje del VSV se han propuesto como explicación de la inhibición inducida por la presencia de INF-β (Trottier, Palian, and Shoshkes Reiss, 2005).

5.5. MODULADORES IDENTIFICADOS

La selección de los moduladores de la infectividad del VHSV identificados en este trabajo ha dependido del tipo de ensayo utilizado para su detección: el ensayo de focos de VHSV.

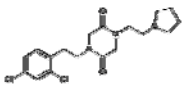
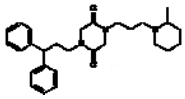
Para aislar moduladores de manera eficiente rápida y sencilla en gran número de muestras, se adaptó el ensayo de focos desarrollado con anterioridad para seroneutralización (Lorenzo, Estepa, and Coll, 1996). Este ensayo se fundamenta en la detección por inmuno-histoquímica de la N_{VSHV} en células EPC infectadas. A diferencia de otros ensayos de infectividad más tradicionales, tales como el ensayo de formación placas (pfu) o el ensayo por dilución límite ($TCID_{50}$) que requieren tiempos de infección de al menos 1 semana, el microensayo seleccionado solo requiere 1-2 días y se realiza en placas de 96 pocillos (100 µl). Sin embargo, en el ensayo de focos para seroneutralización, el tiempo de infección óptimo fue de ~ 16 h, tiempo suficiente para permitir la entrada del virus en la célula y la síntesis de N_{VSHV} en la célula infectada y en un número reducido de células adyacentes. Por tanto, con la utilización de este tiempo de infección, tan sólo se hubieran identificado moduladores de etapas tempranas de la infectividad del VHSV y no de etapas posteriores, ya que sería necesario un mayor número de rondas de replicación del VHSV para detectar sus efectos. Es por ello que con el propósito de ajustar el ensayo para la identificación de moduladores de cualquier etapa del ciclo replicativo del VHSV, se estudió detalladamente la evolución de la infección con el tiempo que llevo a escoger 24 h como el tiempo idóneo para llevar a cabo los cribados. Para otros virus tales como el IHNV y el IPNV el tiempo de infección se aumentó a 36 h.

Una vez optimizado el tiempo de infección, también se ajustó la moi de infección de VHSV para que permitiera tanto la identificación de moduladores inhibitorios como estimuladores. Los ensayos con distintas moi mostraron que entre 50-100 ffu/pocillo el número de focos es lo suficientemente alto como para permitir estadísticas significativas de la actividad de los distintos compuestos ensayados y se encuentra lejos de la saturación del número de focos que impide su recuento.

En resumen utilizando las condiciones óptimas de cribado, se han identificado los moduladores que se esquematizan en la **Tabla 9.** Es decir que el ensayo de focos ha demostrado su utilidad ya que ha permitido identificar no solo inhibidores sino también estimuladores de la

infección de VHSV, no solo péptidos derivados de la secuencia de la GVHSV sino también de quimiotecas de αp, no solo péptidos sino también otros compuestos como las DKP o el H^+ y por último ha permitido identificar moduladores que actúan en casi todas las etapas de la infección de VHSV. Por ejemplo, que actúan en: la unión al receptor como los αp, en la fusión como los péptidos derivados de la secuencia de la GVHSV y el pH, en la digestión endosomal como los αp, en la síntesis de proteínas como el pH o en etapas tardías todavía no identificadas como las DKP. La identificación de estos moduladores no solo ha permitido estudiar y permitirá profundizar en los mecanismos de las distintas etapas de la infección de VHSV sino que también estos moduladores podrán utilizarse en aplicaciones tales como la que se ha demostrado en la mejora de la sensibilidad de los métodos de diagnóstico con αp.

Tabla 9.Moduladores identificados durante este trabajo

	Compuesto	Tipo de compuesto	Mecanismo
Estimula-dores	**p24** ^{99}HYLHRVTYRVTCSTS^{113}	Péptido 15-mer G_{VSHV}	Fusión
	p25 ^{199}THWQGVYWVGATPKA^{213}	Péptido 15-mer G_{VSHV}	Fusión
	p26 ^{359}CDYEAVVSINYNRAQ^{373}	Péptido 15-mer G_{VSHV}	Fusión
	frg11 ^{56}PIRPAQLRCPHEFEDINKG L..... HYLHRVTYRVTC^{110}	Péptido 50-mer G_{VSHV} = 45aa + ~p24	Fusión
	αp5 SAAEASAKATAEATAKG	Péptido 17-mer hélice-α	Unión receptor digestión endosomal
	αp6 SAAEASAKNTAEATAKG	Péptido 17-mer hélice-α	Unión receptor digestión endosomal
Inhibi-dores	**pH ácido**	Iones hidrógeno	Síntesis de proteinas descompensada. Conformación inactiva en fusión
	6-DKP-14 	Diketopiperazindiona	Etapas tardías de la infección
	5-DKP-12 	Diketopiperazindiona	Etapas tardías de la infección

CONCLUSIONES

6

Las conclusiones de este trabajo se resumen en:

1. Se ha adaptado un ensayo de detección de virus basado en infectividad a la identificación rápida y eficaz de compuestos con capacidad de modular la infectividad. Con el han identificado tanto estimuladores como inhibidores de la infectividad del VHSV.
2. Se ha investigado por primera vez la inhibición reversible de la infectividad in vitro del VHSV por el pH ácido. Los resultados obtenidos parecen indicar que a pH ácido, hay en el interior de las células infectadas una disminución de las cantidades relativas de algunas de las proteínas de VHSV que limita o casi impide la producción y salida de nuevos viriones de esas células. Además, la capacidad fusogénica de la G_{VHSV} de nueva síntesis esta inhibida.
3. Se han identificado péptidos estimuladores de la infectividad de VHSV dentro de la secuencia de la G_{VHSV} y el estudio de su mecanismo de activación sugiere que existe una estrecha relación entre la activación de la infectividad y el proceso de fusión.
4. Se han identificado 2 péptidos, αp5 y αp6 estimuladores de la infectividad de VSHV tras el cribado de una quimioteca de 137180 péptidos 17-mer con tendencia a formar hélices-α (αp). La actividad estimuladora de estos péptidos parece relacionada con un aumento de la eficacia en la unión del VHSV a sus células huésped y con una mayor resistencia del virus tratado con estos péptidos a la digestión de las enzimas lisosomales.
5. αp5 es capaz de aumentar la infectividad no solo de otro rabdovirus de peces relacionado, el IHNV, si no también del rabdovirus de mamíferos VSV.
6. Utilizando αp5 se ha conseguido aumentar el nivel de detección de los test de diagnóstico de VHSV ye IHNV basados en infectividad.
7. Se han identificado dentro de una quimioteca de compuestos discretos basados en el esqueleto de una piperazindiona dos 2 inhibidores de la infectividad de VSHV que actúan en etapas tardías de la infección.

8. La identificación de moduladores de la infectividad del VHSV y el estudio de su mecanismo de acción ha puesto de manifiesto la utilidad de este tipo de reactivos para abordar el estudio en profundidad de las distintas etapas del ciclo de multiplicación de VSHV.

BIBLIOGRAFIA

7

Banerjee, A. K. (1987). Transcription and replication of rhabdoviruses. *Microbiol Rev* **51**(1)**,** 66-87.

Banerjee, A. K., and Barik, S. (1992). Gene expression of vesicular stomatitis virus genome RNA. *Virology* **188**(2)**,** 417-28.

Barge, A., Gaudin, Y., Coulon, P., and Ruigrok, R. W. (1993). Vesicular stomatitis virus M protein may be inside the ribonucleocapsid coil. *J Virol* **67**(12)**,** 7246-53.

Basurco, B. (1990). Estudio, identificación y caracterización del virus de la septicemia hemorrágica vírica en España. *pHD Thesis. Universidad Complutense de Madrid.* **1,** 178.

Basurco, B., and Benmansour, A. (1995). Distant strains of the fish rhabdovirus VHSV mantain a sixth functional cistron which codes for a nonstructural protein of unknown function. *Virology* **212,** 741-745.

Basurco, B., and Coll, J. M. (1989). Spanish isolates and reference strains of viral haemorrhagic septicaemia virus shown similar protein size patterns. *Bulletin European Association Fish Pathology* **9,** 92-95.

Basurco, B., and Coll, J. M. (1992). In vitro studies and in vivo immunisation with the first viral haemorrhagic septicaemia viruses isolated in Spain compared to international reference serotypes. *Res Vet Sci* **53**(1)**,** 93-7.

Basurco, B., Sanz, F., Marcotegui, M. A., and Coll, J. M. (1991). The free nucleocapsids of the viral haemorrhagic septicaemia virus contain two antigenically related nucleoproteins. *Archives Virology* **119,** 153-163.

Basurco, B., Yun, S., and Hedrick, R. P. (1993). Comparison of selected strains of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) using neutralizing trout antisera. *Diseases Aquatic Organisms* **15,** 229-233.

Bearzotti, M., Delmas, B., Lamoureux, A., Loustau, A. M., Chilmonczyk, S., and Bremont, M. (1999). Fish rhabdovirus cell entry is mediated by fibronectin. *J Virol* **73**(9)**,** 7703-9.

Bearzotti, M., Lamoureux, A., Chilmonczyk, S., and Bremont, M. (1995a). Identification of a cellular

receptor for fish rhabdoviruses. *Vet Res* **26**(5-6)**,** 544-5.

Bearzotti, M., Monnier, A. F., Vende, P., Grosclaude, J., DeKinkelin, P., and Benmansour, A. (1995b). The glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV): antigenicity and role in virulence. *Veterinary Research* **26,** 413-422.

Benmansour, A., Basurco, B., Monnier, A. F., Vende, P., Winton, J. R., and de Kinkelin, P. (1997). Sequence variation of the glycoprotein gene identifies three distinct lineages within field isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. *J Gen Virol* **78 (Pt 11),** 2837-46.

Benmansour, A., Leblois, H., Coulon, P., Tuffereau, C., Gaudin, Y., Flamand, A., and Lafay, F. (1991). Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J Virol* **65**(8)**,** 4198-203.

Bentz, J. (1993). Viral fusion mechanisms. *CRC Press Inc.Florida, USA.***,** 529.

Bernard, J., LeBerre, M. B., and DeKinkelin, P. (1983). Viral haemorrhagic septicemia of rainbow trout: relation between the G polypeptide and antibody production of fish after infection with the F25 attenuated variant. *Infection Immunity* **39,** 7-14.

Biacchesi, S., Bearzotti, M., Bouguyon, E., and Bremont, M. (2002). Heterologous exchanges of the glycoprotein and the matrix protein in a Novirhabdovirus. *J Virol* **76**(6)**,** 2881-9.

Biacchesi, S., Thoulouze, M.-I., Bearzotti, M., Yu, Y.-X., and Bremont, M. (2000). Recovery of NV Knockout Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Expressing Foreign Genes. *J. Virol.* **74**(23)**,** 11247-11253.

Boon, J. M., and Smith, B. D. (2002). Chemical control of phospholipid distribution across bilayer membranes. *Med Res Rev* **22**(3)**,** 251-81.

Boshra, H., Wang, T., Hove-Madsen, L., Hansen, J., Li, J., Matlapudi, A., Secombes, C. J., Tort, L., and Sunyer, J. O. (2005). Characterization of a C3a receptor in rainbow trout and Xenopus: the first identification of C3a receptors in nonmammalian species. *J Immunol* **175**(4)**,** 2427-37.

Boudinot, P., Blanco, M., de Kinkelin, P., and Benmansour, A. (1998). Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. *Virology* **249**(2)**,** 297-306.

Boudinot, P., Salhi, S., Blanco, M., and Benmansour, A. (2001). Viral haemorrhagic septicaemia virus induces vig-2, a new interferon-responsive gene in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol* **11**(5)**,** 383-97.

Bracci, L., Antoni, G., Cusi, M. G., Lozzi, L., Niccolai, N., Petreni, S., Rustici, M., Santucci, A., Soldani, P., Valensin, P. E., and et al. (1988). Antipeptide monoclonal antibodies inhibit the binding of rabies virus glycoprotein and alpha-bungarotoxin to the nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Immunol* **25**(9)**,** 881-8.

Bricker, B., Snyder, R. M., Fox, J. W., Volk, W. A., and Wagner, R. R. (1987). Monoclonal antibodies to the glycoprotein of vesicular stomatitis virus (Jersey serotype): a method for preliminary mapping of the epitopes. *Virology* **161,** 533-540.

Broughan, J. H., and Wunner, W. H. (1995). Characterization of protein involvement in rabies virus binding to BHK-21 cells. *Arch Virol* **140**(1)**,** 75-93.

Brown, J. C., Newcomb, W. W., and Lawrence-Smith, S. (1988). pH dependent accumulation of the vesicular stomatitis virus glycoprotein at the ends of intact virions. *Virology* **167,** 625-632.

Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J., and van Deurs, B. (2000). Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* **11**(2)**,** 467-80.

Budker, V., Gurevich, V., Hagstrom, J. E., Bortzov, F., and Wolff, J. A. (1996). pH-sensitive, cationic liposomes: A new synthetic virus-like vector. *Nature Biotechnology* **14,** 760-764.

Bui, M., Whittaker, G., and Helenius, A. (1996). Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of

influenza virus ribonucleoproteins. *J Virol* **70**(12)**,** 8391-401.

Campbell, J. B., and Wolf, K. (1969). Plaque assay and some characteristics of Egtved virus (virus of viral haemorrhagic septicaemia of Rainbow tout). *Canada Journal Microbiology* **15,** 635-637.

Carbonell, T., Masip, I., Sanchez-Baeza, F., Delgado, M., Araya, E., Llorens, O., Corcho, F., Perez, J. J., Perez-Paya, E., and Messeguer, A. (2000). Identification of selective inhibitors of acetylcholinesterase from a combinatorial library of 2,5-piperazinediones. *Mol Divers* **5**(3)**,** 131-43.

Carneiro, F. A., Bianconi, M. L., Weissmuller, G., Stauffer, F., and Da Poian, A. T. (2002). Membrane recognition by vesicular stomatitis virus involves enthalpy-driven protein-lipid interactions. *J Virol* **76**(8)**,** 3756-64.

Carneiro, F. A., Ferradosa, A. S., and Da Poian, A. T. (2001). Low pH-induced conformational changes in vesicular stomatitis virus glycoprotein involve dramatic structure reorganization. *J Biol Chem* **276**(1)**,** 62-7.

Carneiro, F. A., Lapido-Loureiro, P. A., Cordo, S. M., Stauffer, F., Weissmuller, G., Bianconi, M. L., Juliano, M. A., Juliano, L., Bisch, P. M., and Poian, A. T. (2006). Probing the interaction between vesicular stomatitis virus and phosphatidylserine. *Eur Biophys J* **35**(2)**,** 145-54.

Carneiro, F. A., Stauffer, F., Lima, C. S., Juliano, M. A., Juliano, L., and Da Poian, A. T. (2003). Membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus depends on histidine protonation. *J Biol Chem* **278**(16)**,** 13789-94.

Castric, J., and DeKinkelin, P. (1984). Experimental study of the susceptibility of two marine fish species, Sea Bass (Dicentrarchus labrax and Turbot) (Scophthalmus maximus), to Viral Haemorrhagic Septicaemia. *Aquaculture* **41,** 203-212.

Castric, J., Jeffroy, J., Bearzotti, M., and DeKinkelin, P. (1992). Isolation of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) from wild elvers anguilla anguilla.

Bulletin European Association Fish Pathology **12,** 21-23.

Clague, M. J., Schoch, C., Zech, L., and Blumenthal, R. (1990). Gating kinetics of pH-activated membrane fusion of vesicular stomatitis virus with cells: stopped-flow measurements by dequenching of octadecylrhodamine fluorescence. *Biochemistry* **29,** 1303-1308.

Coil, D. A., and Miller, A. D. (2004). Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *J Virol* **78**(20)**,** 10920-6.

Coll, J. M. (1989). Low-background substrate buffer for peroxidase-o-phenylenediamine enzymeimmunoassays. *Revista Española Fisiología* **45,** 41-46.

Coll, J. M. (1992). Kits of enzyme immunoassays in microtitre wells to detect virus ans viral antibodies. *Investigaciones Agrarias* **7,** 47-60.

Coll, J. M. (1995a). The glycoprotein G of rhabdoviruses. *Archives Virology* **140,** 827-851.

Coll, J. M. (1995b). Heptad-repeat sequences in the glycoprotein of rhabdoviruses. *Virus Genes* **10,** 107-114.

Coll, J. M. (1995c). Synthetic peptides reveal a phospholipid binding domain in the glycoprotein of VHSV, a salmonid rhabdovirus. *Vet Res* **26**(5-6)**,** 399-407.

Coll, J. M. (1997). Synthetic peptides from the heptad repeats of the glycoproteins of rabies, vesicular stomatitis and fish rhabdoviruses bind phosphatidylserine. *Archives Virology* **submitted**.

Coll, J. M. (1999). Induced fusion of VHSV persistently infected fish cells. *Journal of Fish Diseases* **22,** 401-406.

Cupit, P. M., Lorenzen, N., Strachan, G., Kemp, G. J., Secombes, C. J., and Cunningham, C. (2001). Neutralisation and binding of VHS virus by monovalent antibody fragments. *Virus Res* **81**(1-2)**,** 47-56.

Cwirla, S. E., Peters, E. A., Barret, R. W., and Dower, W. J. (1990). Peptides on phage: A vast library of

peptides for identifying ligands. *Proceedings National Academy Sciences USA* **87,** 6378-6382.

Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., and Kim, P. S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89,** 263-273.

Chen, C. H., Matthews, T. J., McDanal, C. B., Bolognesi, D. P., and Greenberg, M. L. (1995). A molecular clasp in the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 TM protein determines the anti-HIV activity of gp41 derivatives: implication for viral fusion. *J Virol* **69**(6)**,** 3771-7.

Chen, J. L., Das, T., and Banerjee, A. K. (1997). Phosphorylated states of vesicular stomatitis virus P protein in vitro and in vivo. *Virology* **228**(2)**,** 200-12.

Da Poian, A. T., Carneiro, F. A., and Stauffer, F. (2005). Viral membrane fusion: is glycoprotein G of rhabdoviruses a representative of a new class of viral fusion proteins? *Braz J Med Biol Res* **38**(6)**,** 813-23.

Das, S. C., and Pattnaik, A. K. (2005). Role of the hypervariable hinge region of phosphoprotein P of vesicular stomatitis virus in viral RNA synthesis and assembly of infectious virus particles. *J Virol* **79**(13)**,** 8101-12.

DeKinkelin, P. (1972). Le virus D'Egtved.II-Purification. *Annals Recherche Vétérinary* **3,** 199-208.

DeKinkelin, P., Bearzotti, M., Castric, J., Nougayrede, P., Lecocq-Xhonneux, F., and Thiry, M. (1995). Eighteen years of vaccination against viral haemorrhagic septicemia in France. *Veterinary Research* **26,** 379-387.

DeKinkelin, P., and LeBerre, M. (1979). Mass virus production in fish cell system. *Developments Biological Standards* **42,** 99-104.

DeKinkelin, P., and Scherrer, R. (1970). Le virus Egtved.I-Stabilité,Dévelopment et Structure du virus de la souche dainose FÇ1. *Annals Recherche Vétérinary* **1,** 17-30.

Dietzschold, B., Tollis, M., Rupprecht, C. E., Celis, E., and Koprowski, H. (1987). Antigenic variation in rabies and rabies-related viruse cross-protection

independent of glycoprotein mediated virus-neutralizing antibody. *Journal Infectious Diseases* **156,** 815-822.

Dietzschold, B., Wiktor, T. J., MacFarlan, R., and Varrichio, A. (1982). Antigenic structure of rabies virus glycoprotein: Ordering and immunological characterization of the large CNBr cleavage fragments. *Journal Virology* **44,** 595-602.

Ding, H., Green, T. J., Lu, S., and Luo, M. (2006). Crystal structure of the oligomerization domain of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus. *J Virol* **80**(6)**,** 2808-14.

Dominguez, J., Hedrick, R. P., and Sanchez-Vizcaino, J. M. (1990). Use of monoclonal antibodies for detection of infectious pancreatic necrosis virus by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Diseases Aquatic Organisms* **8,** 157-163.

Doms, R. W., Keller, D. S., Helenius, A., and Balch, W. E. (1987). Role for adenosine triphosphate in regulating the assembly and transport of vesicular stomatitis virus G protein trimers. *Journal Cell Virology* **105,** 1957-1969.

Doms, R. W., Lamb, R. A., Rose, J. K., and Helenius, A. (1993). Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* **193,** 545-562.

Doms, R. W., Ruusala, A., Nachaner, C., Helenius, J., and Rose, J. K. (1988). Differential effects of mutations in three domains on folding, quaternary structure, and intracellular transport of vesicular stomatitis virus G protein. *Journal Cell Virology* **107,** 89-99.

Durrer, P., Gaudin, Y., Ruigrok, R. W., Graf, R., and Brunner, J. (1995). Photolabeling identifies a putative fusion domain in the envelope glycoprotein of rabies and vesicular stomatitis viruses. *J Biol Chem* **270**(29)**,** 17575-81.

Eaton, W. D., Hulett, J., Brunson, R., and True, K. (1991). The first isolation in North America of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in coho salmon from the same watershed. *Juournal Aquatic Animal Helath* **3,** 114-117.

Eckert, D. M., and Kim, P. S. (2001). Design of potent inhibitors of HIV-1 entry from the gp41 N-peptide region. *PNAS* **98**(20)**,** 11187-11192.

Einer-Jensen, K., Krogh, T. N., Roepstorff, P., and Lorenzen, N. (1998). Characterization of intramolecular disulfide bonds and secondary modifications of the glycoprotein from viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *J Virol* **72**(12)**,** 10189-96.

Encinar, J. A., Fernandez, A., Ferragut, J. A., Gonzalez-Ros, J. M., DasGupta, B. R., Montal, M., and Ferrer-Montiel, A. (1998a). Structural stabilization of botulinum neurotoxins by tyrosine phosphorylation. *FEBS Lett* **429**(1)**,** 78-82.

Encinar, J. A., Fernandez, A. M., Gil-Martin, E., Gavilanes, F., Albar, J. P., Ferragut, J. A., and Gonzalez-Ros, J. M. (1998b). Inactivating peptide of the Shaker B potassium channel: conformational preferences inferred from studies on simple model systems. *Biochem J* **331 (Pt 2),** 497-504.

Engelking, H., and Leong, J. C. (1989). The glycoprotein of Infectious Hematopoitic Necrosis Virus eluciting antibody and protective responses. *Virus Research* **13,** 213-230.

Enzmann, P. J., Maier, B., and Bigott, K. (1981). Biochemical data on the RNA of VHS-V and RVC indicating a possible serological relationship. *Bulletin European Association Fish Pathology* **1,** 37-39.

Epand, R. M. (2000). Membrane fusion. *Biosci Rep* **20**(6)**,** 435-41.

Estepa, A., and Coll, J. M. (1996a). Pepscan mapping and fusion-related properties of the major phosphatidylserine-binding domain of the glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus, a salmonid rhabdovirus. *Virology* **216**(1)**,** 60-70.

Estepa, A., and Coll, J. M. (1996b). Phosphatidylserine binding to solid-phase rhabdoviral peptides: a new method to study phospholipid/viral protein interactions. *J Virol Methods* **61**(1-2)**,** 37-45.

Estepa, A., and Coll, J. M. (1997). Temperature and pH requirements for viral haemorrhagic septicemia

virus induced cell fusion. *Diseases of Aquatic Organisms* **28,** 185-189.

Estepa, A., Fernandez-Alonso, M., and Coll, J. M. (1999). Structure, binding and neutralization of VHSV with synthetic peptides. *Virus Res* **63**(1-2)**,** 27-34.

Estepa, A., Frias, D., and Coll, J. M. (1992). Susceptibility of trout kidney macrophages to viral hemorrhagic septicemia virus. *Viral Immunol* **5**(4)**,** 283-92.

Estepa, A., Frías, D., and Coll, J. M. (1992). Neutralising epitope(s) of the glycoprotein of viral haemorrhagic septicemia virus are expressed in the membrane of infected trout macrophages. *Bulletin Eurpean Associated Fish Pathology* **12,** 150-153.

Estepa, A. M., Rocha, A. I., Mas, V., Perez, L., Encinar, J. A., Nunez, E., Fernandez, A., Gonzalez Ros, J. M., Gavilanes, F., and Coll, J. M. (2001). A Protein G Fragment from the Salmonid Viral Hemorrhagic Septicemia Rhabdovirus Induces Cell-to-Cell Fusion and Membrane Phosphatidylserine Translocation at Low pH. *J. Biol. Chem.* **276**(49)**,** 46268-46275.

Fernandez-Alonso, M., Lorenzo, G., Perez, L., Bullido, R., Estepa, A., Lorenzen, N., and Coll, J. M. (1998). Mapping of linear antibody epitopes of the glycoprotein of VHSV, a salmonid rhabdovirus. *Dis Aquat Organ* **34**(3)**,** 167-76.

Fernandez-Alonso, M., Rocha, A., and Coll, J. M. (2001). DNA vaccination by immersion and ultrasound to trout viral haemorrhagic septicaemia virus. *Vaccine* **19**(23-24)**,** 3067-75.

Ferrer, M., Kapoor, T. M., Strassmaier, T., Weissenhorn, W., Skehel, J. J., Oprian, D., Schreiber, S. L., Wiley, D. C., and Harrison, S. C. (1999). Selection of gp41-mediated HIV-1 cell entry inhibitors from biased combinatorial libraries of non-natural binding elements. *Nat Struct Biol* **6**(10)**,** 953-60.

Fields, G. B., and Noble, R. L. (1990). Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res* **35**(3)**,** 161-214.

Fields, N. B., Knipe, M. D., and Howley, M. P. (1996). "Fields Virology Third Edition." 2 vols.

Fijan, N., Sulimanovic, D., Bearzotti, M., Mizinic, D., Zwillenberg, L. O., Chilmonczyk, S., Vautherot, J. F., and Kinkelin, P. (1983). Some properties of the Epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp Cyprinus carpio. 134:207-220. *Ann Virol.* **134:207-220,** 207-220.

Fiszman, M., Leaute, J. B., Chany, C., and Girard, M. (1974). Mode of action of acid pH values on the development of vesicular stomatitis virus. *J Virol* **13**(4)**,** 801-8.

Flamand, A., Raux, H., Gaudin, Y., and Ruigrok, R. W. (1993). Mechanisms of rabies virus neutralization. *Virology* **194**(1)**,** 302-13.

Frecer, V., Burello, E., and Miertus, S. (2005). Combinatorial design of nonsymmetrical cyclic urea inhibitors of aspartic protease of HIV-1. *Bioorg Med Chem* **13**(18)**,** 5492-501.

Fredericksen, B. L., and Whitt, M. A. (1995). Vesicular stomatitis virus glycoprotein mutations that affect membrane fusion activity and abolish virus infectivity. *J Virol* **69**(3)**,** 1435-43.

Fredericksen, B. L., and Whitt, M. A. (1996). Mutations at two conserved acidic amino acids in the glycoprotein of vesicular stomatitis virus affect pH-dependent conformational changes and reduce the pH threshold for membrane fusion. *Virology* **217**(1)**,** 49-57.

Frerichs, G. N. (1989). Rhabdoviruses of fishes. *Viruses of lower vertebrates.Ahne,W.& Kurstak,E.eds.Springer, Berlin* **1,** 27-32.

Gao, Y., Greenfield, N. J., Cleverley, D. Z., and Lenard, J. (1996). The transcriptional form of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus is a trimer: structure and stability. *Biochemistry* **35**(46)**,** 14569-73.

Gao, Y., and Lenard, J. (1995a). Cooperative binding of multimeric phosphoprotein (P) of vesicular stomatitis virus to polymerase (L) and template: pathways of assembly. *J Virol* **69**(12)**,** 7718-23.

Gao, Y., and Lenard, J. (1995b). Multimerization and transcriptional activation of the phosphoprotein (P)

of vesicular stomatitis virus by casein kinase-II. *Embo J* **14**(6)**,** 1240-7.

Garoff, H., Hewson, R., and Opstelten, D. J. (1998). Virus maturation by budding. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(4)**,** 1171-90.

Gaudier, M., Gaudin, Y., and Knossow, M. (2001). Cleavage of vesicular stomatitis virus matrix protein prevents self-association and leads to crystallization. *Virology* **288**(2)**,** 308-14.

Gaudier, M., Gaudin, Y., and Knossow, M. (2002). Crystal structure of vesicular stomatitis virus matrix protein. *Embo J* **21**(12)**,** 2886-92.

Gaudin, Y. (1997). Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones. *J Virol* **71**(5)**,** 3742-50.

Gaudin, Y. (2000a). Rabies virus-induced membrane fusion pathway. *J Cell Biol* **150**(3)**,** 601-12.

Gaudin, Y. (2000b). Reversibility in fusion protein conformational changes. The intriguing case of rhabdovirus-induced membrane fusion. *Subcell Biochem* **34,** 379-408.

Gaudin, Y., de Kinkelin, P., and Benmansour, A. (1999). Mutations in the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus that affect virulence for fish and the pH threshold for membrane fusion. *J Gen Virol* **80 (Pt 5),** 1221-9.

Gaudin, Y., Raux, H., Flamand, A., and Ruigrok, R. W. (1996). Identification of amino acids controlling the low-pH-induced conformational change of rabies virus glycoprotein. *J Virol* **70**(11)**,** 7371-8.

Gaudin, Y., Ruigrok, R. W., and Brunner, J. (1995). Low-pH induced conformational changes in viral fusion proteins: implications for the fusion mechanism. *J Gen Virol* **76 (Pt 7),** 1541-56.

Gaudin, Y., Ruigrok, R. W., Knossow, M., and Flamand, A. (1993). Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *J Virol* **67**(3)**,** 1365-72.

Gaudin, Y., Ruigrok, R. W., Tuffereau, C., Knossow, M., and Flamand, A. (1992). Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology* **187**(2)**,** 627-32.

Gaudin, Y., Tuffereau, C., Durrer, P., Brunner, J., Flamand, A., and Ruigrok, R. (1999). Rabies virus-induced membrane fusion. *Mol Membr Biol* **16**(1)**,** 21-31.

Gaudin, Y., Tuffereau, C., Durrer, P., Flamand, A., and Ruigrok, R. W. (1995a). Biological function of the low-pH, fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein (G): G is transported in a fusion-inactive state-like conformation. *J Virol* **69**(9)**,** 5528-34.

Gaudin, Y., Tuffereau, C., Durrer, P., Flamand, A., and Ruigrok, R. W. H. (1995b). Biological function of the low-pH, fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein (G): G is transported in a fusion-inactive state-like conformation. *Journal Virology* **69,** 5528-5534.

Gaudin, Y., Tuffereau, C., Segretain, D., Knossow, M., and Flamand, A. (1991). Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein. *J Virol* **65**(9)**,** 4853-9.

Gibson, R., Schlesinger, S., and Kornfeld, S. (1979). The nonglycosylated glycoprotein of vesicular stomatitis virus is temperature-sensitive and undergoes intracellular aggregation at elevated temperatures *J. Biol. Chem.* **254,** 3600-3607.

Glomb-Reinmund, S., and Kielian, M. (1998). The role of low pH and disulfide shuffling in the entry and fusion of Semliki Forest virus and Sindbis virus. *Virology* **248**(2)**,** 372-81.

Gordon, C. J., Muesing, M. A., Proudfoot, A. E., Power, C. A., Moore, J. P., and Trkola, A. (1999). Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection by the CC-chemokine RANTES is independent of the mechanism of virus-cell fusion. *J Virol* **73**(1)**,** 684-94.

Gottlieb, T. A., Ivanov, I. E., Adesnik, M., and Sabatini, D. D. (1993). Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells. *J Cell Biol* **120**(3)**,** 695-710.

Green, T. J., Macpherson, S., Qiu, S., Lebowitz, J., Wertz, G. W., and Luo, M. (2000). Study of the assembly

of vesicular stomatitis virus N protein: role of the P protein. *J Virol* **74**(20)**,** 9515-24.

Green, T. J., Zhang, X., Wertz, G. W., and Luo, M. (2006). Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* **313**(5785)**,** 357-60.

Hall, M. P., Burson, K. K., and Huestis, W. H. (1998). Interactions of a vesicular stomatitis virus G protein fragment with phosphatidylserine: NMR and fluorescence studies. *Biochim Biophys Acta* **1415**(1)**,** 101-13.

Heike, S., Egbert, M., y Mettenleiter, T. C. (1999). Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus Genes* **19,** 59-65.

Hernandez, L. D., Hoffman, L. R., Wolfsberg, T. G., and White, J. M. (1996). Virus-cell and cell-cell fusion. *Annual Review Cell Developmental Biology* **12,** 627-661.

Hierholzer, J. C., and Killington, R. A. (1996). Virus isolation and quantitation. *Virology Methods Manual. Academic Press, London,***,** 205□/255.

Hill, B. J. (1975). Physico-chemical and serological characterization of five rhabdoviruses infecting fish. *J Gen Virol* **27**(3)**,** 369-78.

Hochgurtel, M., Kroth, H., Piecha, D., Hofmann, M. W., Nicolau, C., Krause, S., Schaaf, O., Sonnenmoser, G., and Eliseev, A. V. (2002). Target-induced formation of neuraminidase inhibitors from in vitro virtual combinatorial libraries. *PNAS* **99**(6)**,** 3382-3387.

Hopper, K. (1989). The isolation of VHSV from salmon at Glenwood Springs, Orcas Island, Washington. *American Fish Society Fish Health Newsletter* **17,** 1.

Horne, W. S., Wiethoff, C. M., Cui, C., Wilcoxen, K. M., Amorin, M., Ghadiri, M. R., and Nemerow, G. R. (2005). Antiviral cyclic d,l-alpha-peptides: Targeting a general biochemical pathway in virus infections. *Bioorg Med Chem* **13**(17)**,** 5145-53.

Houghten, R. A. (1985). General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides:

specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(15)**,** 5131-5.

Hsu, Y. L., Engelking, H. M., and Leong, J. C. (1985). Analysis of the quantity and synthesis of the virion proteins of infectious hematopietic necrosis virus. *Journal Fish Pathology* **20,** 331-338.

Hwang, L. N., Englund, N., Das, T., Banerjee, A. K., and Pattnaik, A. K. (1999). Optimal replication activity of vesicular stomatitis virus RNA polymerase requires phosphorylation of a residue(s) at carboxy-terminal domain II of its accessory subunit, phosphoprotein P. *J Virol* **73**(7)**,** 5613-20.

Isshik, T., Nishizawa, T., Kobayashi, T., Nagano, T., and Miyazaki, T. (2001). An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder Paralichthys olivaceus in Japan. *Dis Aquat Organ* **47**(2)**,** 87-99.

Jayakar, H. R., Jeetendra, E., and Whitt, M. A. (2004). Rhabdovirus assembly and budding. *Virus Res* **106**(2)**,** 117-32.

Jeetendra, E., Robison, C. S., Albritton, L. M., and Whitt, M. A. (2002). The membrane-proximal domain of vesicular stomatitis virus G protein functions as a membrane fusion potentiator and can induce hemifusion. *J Virol* **76**(23)**,** 12300-11.

Jensen, M. H. (1963). Preparation of fish tissue cultures for virus research. *Bulletin Office International Epizooties* **59,** 131-134.

Jiang, S., Lin, K., Strick, N., and Neurath, A. (1993). Inhibition of HIV-1 infection by a fusion domain binding peptide from the HIV-1 envelope glycoprotein gp41. *Biochemical Biophysical Research Communications* **195,** 533-538.

Jorgensen, P. E. V., Olesen, N. J., Lorenzen, N., Winton, J. R., and Ristow, S. (1991). Infectious hematopoietic necrosis (IHN) and viral haemorragic septicaemia (VHS): detection of trout antibodies to the causative viruses by means of plaque neutralization, immunofluorescence, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal Aquatic Animal Health* **3,** 100-108.

Judice, J. K., Tom, J. Y., Huang, W., Wrin, T., Vennari, J., Petropoulos, C. J., and McDowell, R. S. (1997). Inhibition of HIV type 1 infectivity by constrained alpha-helical peptides: implications for the viral fusion mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25)**,** 13426-30.

Kasermann, F., Wyss, K., and Kempf, C. (2001). Virus inactivation and protein modifications by ethyleneimines. *Antiviral Research* **52**(1)**,** 33-41.

Kazmierski, W. M., Hazen, R. J., Aulabaugh, A., and StClair, H. (1996). Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 derived from gp41 transmembrane protein: structure-activity studies. *Journal Medical Chemistry* **39,** 2681-2689.

Kelley, J. M., Emersom, S. U., and Wagner, R. R. (1972). The glycoprotein of Vesicular Stomatitis Virus is the antigen that gives rise to and react with neutralizing antibodies. *Journal Virology* **10,** 1231-1236.

Khor, R., McElroy, L. J., and Whittaker, G. R. (2003). The ubiquitin-vacuolar protein sorting system is selectively required during entry of influenza virus into host cells. *Traffic* **4**(12)**,** 857-68.

Kizhatil, K., and Albritton, L. M. (1997). Requirements for different components of the host cell cytoskeleton distinguish ecotropic murine leukemia virus entry via endocytosis from entry via surface fusion. *J Virol* **71**(10)**,** 7145-56.

Konieczko, E. M., Whitaker-Dowling, P. A., and Widnell, C. C. (1994). Membrane fusion as a determinant of the infectibility of cells by vesicular stomatitis virus. *Virology* **199,** 200-211.

Kurath, G., Higman, K. H., and Bjorklund, H. V. (1995). The NV genes of fish rhabdoviruses: development of RNase protection assays for rapid assesment of genetic variation. *Veterinary Research* **26,** 477-485.

La Ferla, F. M., and Peluso, R. W. (1989). The 1:1 N-NS protein complex of vesicular stomatitis virus is essential for efficient genome replication. *J Virol* **63**(9)**,** 3852-7.

Lafay, F., Benmansour, A., Chebli, K., and Flamand, A. (1996). Immunodominant epitopes defined by a yeast-expressed library of random fragments of the

rabies virus glycoprotein map outside major antigenic sites. *Journal General Virology* **77,** 339-346.

Lambert, D. M., Barney, S., Lambert, A. L., Guthrie, K., Medinas, R., Davis, D. E., Bucy, T., Erickson, J., Merutka, G., and Petteway, S. R., Jr. (1996). Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(5)**,** 2186-91.

LaPatra, S. E., Corbeil, S., Jones, G. R., Shewmaker, W. D., Lorenzen, N., Anderson, E. D., and Kurath, G. (2001). Protection of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus four days after specific or semi-specific DNA vaccination. *Vaccine* **19**(28-29)**,** 4011-4019.

Le Blanc, I., Luyet, P. P., Pons, V., Ferguson, C., Emans, N., Petiot, A., Mayran, N., Demaurex, N., Faure, J., Sadoul, R., Parton, R. G., and Gruenberg, J. (2005). Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat Cell Biol* **7**(7)**,** 653-64.

LeBerre, M., De Kinkelin, P., and Metzger, A. (1977). Identification sérologique des rhabdovirus des salmonidés. *Bulletin Office International Epizooties* **87,** 391-393.

Lecocq-Xhonneux, F., Thiry, M., Dheur, I., Rossius, M., Vanderheijden, N., Martial, J., and DeKinkelin, P. (1994). A recombinant viral haemorrhagic septicaemia virus glycoprotein expressed in insect cells induces protective immunity in rainbow trout. *Journal General Virology* **75,** 1579-1587.

Lenard, J. (1993). Vesicular stomatitis virus fusion. *Viral fusion mechanisms.Ed.Bentz,J.CRC Press***,** 425-435.

Lenard, J., and Vanderoef, R. (1990). Localization of the membrane-associated region of vesicular stomatitis virus M protein at the N terminus, using the hydrophobic, photoreactive probe 125I-TID. *J Virol* **64**(7)**,** 3486-91.

Lenstra, J. A., Erkens, J. H. F., Langeveld, J. G. A., Posthumus, W. P. A., Meloen, R. H., Gebauer, F., Correa, I., Enjuanes, L., and Stanley, K. K. (1992). Isolation of sequences from a random-sequence

expression library that mimic viral epitopes. *Journal Immunological Methods* **152,** 149-157.

Lentz, T. L., Benson, R. J., Klimowicz, D., Wilson, P. T., and Hawrot, E. (1986). Binding of rabies virus to purified Torpedo acetylcholine receptor. *Brain Res* **387**(3)**,** 211-9.

Lentz, T. L., Burrage, T. G., Smith, A. L., Crick, J., and Tignor, G. H. (1982). Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science* **215**(4529)**,** 182-4.

Leong, J. C., Bootland, L., Anderson, E., Chiou, P. W., Drolet, B., Kim, C., Lorz, H., Mourich, D., Ormonde, P., Perez, L., and Trobridge, G. (1995). Viral vaccines for aquaculture. *Journal Marine Biotechnology* **3,** 16-23.

Li, Y., Drone, C., Sat, E., and Ghosh, H. P. (1993). Mutational analysis of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G for membrane fusion domains. *J Virol* **67**(7)**,** 4070-7.

Liu, X., and Collodi, P. (2002). Novel form of fibronectin from zebrafish mediates infectious hematopoietic necrosis virus infection. *J Virol* **76**(2)**,** 492-8.

Lorenzen, N., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., and LaPatra, S. E. (2002a). DNA vaccines as a tool for analysing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol* **12**(5)**,** 439-53.

Lorenzen, N., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., and LaPatra, S. E. (2002b). Immunity induced shortly after DNA vaccination of rainbow trout against rhabdoviruses protects against heterologous virus but not against bacterial pathogens. *Developmental & Comparative Immunology* **26**(2)**,** 173-179.

Lorenzen, N., Olesen, N. J., and Jorgensen, P. E. (1990). Neutralization of Egtved virus pathogenicity to cell cultures and fish by monoclonal antibodies to the viral G protein. *J Gen Virol* **71 (Pt 3),** 561-7.

Lorenzen, N., Olesen, N. J., and Vestergaard-Jorgensen, P. E. (1990). Neutralization of Egtved virus pathogenicity to cell cultures and fish by monoclonal antibodies to the viral G protein. *Journal General Virology* **71,** 561-567.

Lorenzo, G., Estepa, A., and Coll, J. M. (1996). Fast neutralization/immunoperoxidase assay for viral haemorrhagic septicaemia with anti-nucleoprotein monoclonal antibody. *J Virol Methods* **58**(1-2)**,** 1-6.

Lutzke, R., Eppens, N., Weber, P., Houghten, R., and Plasterk, R. (1995). Identification of a Hexapeptide Inhibitor of the Human Immunodeficiency Virus Integrase Protein by Using a Combinatorial Chemical Library. *PNAS* **92**(25)**,** 11456-11460.

Luzzago, A., Felici, F., Tramontano, A., Pessi, A., and Cortese, R. (1993). Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides,I.Epitope mapping of human H ferritin using phage library of constrained peptides. *Gene* **128,** 51-57.

Maillard, A., Domanski, M., Brunet, P., Chaffotte, A., Guittet, E., and Gaudin, Y. (2003). Spectroscopic characterization of two peptides derived from the stem of rabies virus glycoprotein. *Virus Res* **93**(2)**,** 151-8.

Maillard, A. P., and Gaudin, Y. (2002). Rabies virus glycoprotein can fold in two alternative, antigenically distinct conformations depending on membrane-anchor type. *J Gen Virol* **83**(Pt 6)**,** 1465-76.

Martinez, J., and Coll, J. M. (1987). Preliminary clinical studies of C-reactive protein quantified by enzyme-immunoassay. *Clinical Chemistry* **33,** 2185-2190.

Martinez, J. A., and Coll, J. M. (1988). Selection and performance of monoclonal anti-C-reactive protein in ELISA quantitative assay. *Clinical Chemistry Acta* **176,** 123-132.

Mebatsion, T., Weiland, F., and Conzelmann, K.-K. (1999). Matrix Protein of Rabies Virus Is Responsible for the Assembly and Budding of Bullet-Shaped Particles and Interacts with the Transmembrane Spike Glycoprotein G. *J. Virol.* **73**(1)**,** 242-250.

Melki, R., Gaudin, Y., and Blondel, D. (1994). Interaction between tubulin and the viral matrix protein of vesicular stomatitis virus: possible implications in the viral cytopathic effect. *Virology* **202**(1)**,** 339-47.

Meyers, T. R., Sullivan, J., Emmeneger, E., Follet, J., Short, S., Batts, W. N., and Winton, J. R. (1992). *Identification of viral haemorrhagic septicemia virus isolated from pacific cod, Gadus Macocephalus in prince William Sound, Alaska,USA*. *Diseases Aquatic Organisms* **12,** 167-175.

Morzunov, S. P., Winton, J. R., and Nichol, S. T. (1995). The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. *Virus Research* **38,** 175-192.

Nehete, P. N., Arlinghaus, R. B., and Sastry, K. J. (1993). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection and syncytium formation in human cells by V3 loop synthetic peptides from gp120. *Journal Virology* **67,** 6841-6846.

Newcomb, W. W., and Brown, J. C. (1981). Role of the vesicular stomatitis virus matrix protein in maintaining the viral nucleocapsid in the condensed form found in native virions. *J Virol* **39**(1)**,** 295-9.

Nichol, S. T., Rowe, J. E., and Winton, J. R. (1995). Molecular epizootiology and evolution of the glycoprotein and non-virion protein genes of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. *Virus Research* **38,** 159-173.

Nishizawa, T., Iida, H., Takano, R., Isshiki, T., Nakajima, K., y Muroga, K. (2002). Genetic relatedness among Japanese, American y European isolates of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) based on partial G y P genes. *Diseases Aquatic Organisms* **48,** 143-148.

Nunez, E., Fernandez, A. M., Estepa, A., Gonzalez-Ros, J. M., Gavilanes, F., and Coll, J. M. (1998). Phospholipid interactions of a peptide from the fusion-related domain of the glycoprotein of VHSV, a fish rhabdovirus. *Virology* **243**(2)**,** 322-30.

O'Neil, K. T., and DeGrado, W. F. (1990). A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids. *Science* **250**(4981)**,** 646-51.

Odell, D., Wanas, E., Yan, J., and Ghosh, H. P. (1997). Influence of membrane anchoring and cytoplasmic domains on the fusogenic activity of vesicular

stomatitis virus glycoprotein G. *J Virol* **71**(10)**,** 7996-8000.

Okamoto, N., Shirakura, T., and T., S. (1985). Precision of a plaque assay: eel virus european and infectious hematopoietic necrosis virus-RTG-2 cell systems. *Fish Pathology* **19,** 225-230.

Olesen, N. J., and H. Korsholm. (1997). Control measures for viral diseases in Aquaculture: eradication of VHS and IHN. *Bulletin European Association Fish Pathologists* **17,** 229-233.

Owens, R. J., Tanner, C. C., Mulligan, M. J., Srinivas, R. V., and Compas, R. W. (1990). Oligopeptide inhibitors of HIV-induced syncytium formation. *AIDS Research Human Retroviruses* **6,** 1289-1296.

Park, S. H., and Raines, R. T. (2000). Genetic selection for dissociative inhibitors of designated protein-protein interactions. *Nat Biotechnol* **18**(8)**,** 847-51.

Pastor, M. T., Lopez de la Paz, M., Lacroix, E., Serrano, L., and Perez-Paya, E. (2002). Combinatorial approaches: A new tool to search for highly structured beta -hairpin peptides. *PNAS* **99**(2)**,** 614-619.

Pattnaik, A. K., Hwang, L., Li, T., Englund, N., Mathur, M., Das, T., and Banerjee, A. K. (1997). Phosphorylation within the amino-terminal acidic domain I of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus is required for transcription but not for replication. *J Virol* **71**(11)**,** 8167-75.

Paul, P. R., Chattopadhyay, D., and Banerjee, A. K. (1988). The functional domains of the phosphoprotein (NS) of vesicular stomatitis virus (Indiana serotype). *Virology* **166**(2)**,** 350-7.

Perez-Paya, E., Houghten, R. A., and Blondelle, S. E. (1996). Functionalized protein-like structures from conformationally defined synthetic combinatorial libraries. *J Biol Chem* **271**(8)**,** 4120-6.

Perez, L., Estepa, A., and Coll, J. M. (1998). Purification of the glycoprotein G from viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus, by lectin affinity chromatography. *J Virol.Methods* **76,** 1-8.

Piper, R. C., and Luzio, J. P. (2001). Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies. *Traffic* **2**(9)**,** 612-21.

Portis, J. L., McAtee, F. J., and Evans, L. H. (1985). Infectious entry of murine retroviruses into mouse cells: evidence of a postadsorption step inhibited by acidic pH. *J Virol* **55**(3)**,** 806-12.

Raiborg, C., Rusten, T. E., and Stenmark, H. (2003). Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol* **15**(4)**,** 446-55.

Rapaport, D., Ovadia, M., and Shai, Y. (1995). A synthetic peptide corresponding to a conserved heptad repeat domain ia a potent inhibitor of Sendai virus-cell fusion: an emerging similarity with functional domains of other viruses. *EMBO Journal* **14,** 5524-5531.

Reitter, J. N., Sergel, T., and Morrison, T. G. (1995). Mutational analysis of the leucine zipper motif in the Newcastle disease virus fusion protein. *Journal Virology* **69,** 5995-6004.

Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (1988). Amino acid preferences for specific locations at the ends of alpha helices. *Science* **240**(4859)**,** 1648-52.

Rigaut, K. D., Birk, D. E., and Lenard, J. (1991). Intracellular distribution of input vesicular stomatitis virus proteins after uncoating. *Journal Virology* **65,** 2622-2628.

Rinnova, M., Hradilek, M., Barinka, C., Weber, J., Soucek, M., Vondrasek, J., Klimkait, T., and Konvalinka, J. (2000). A Picomolar Inhibitor of Resistant Strains of Human Immunodeficiency Virus Protease Identified by a Combinatorial Approach. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **382**(1)**,** 22-30.

Ristow, S. S., and Arnzen, J. M. (1991). Monoclonal antibodies to the glycoprotein and nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) reveal differences among isolates of the virus by fluorescence, neutralization and electrophoresis. *Diseases Aquatic Organisms* **11,** 105-115.

Rocha, A., Fernandez-Alonso, M., Mas, V., Perez, L., Estepa, A., and Coll, J. M. (2002). Antibody response to a fragment of the protein G of VHS

rhabdovirus in immunised trout. *Vet Immunol Immunopathol* **86**(1-2)**,** 89-99.

Rocha, A., Ruiz, S., Tafalla, C., and Coll, J. M. (2004a). Conformation- and fusion-defective mutations in the hypothetical phospholipid-binding and fusion peptides of viral hemorrhagic septicemia salmonid rhabdovirus protein G. *J Virol* **78**(17)**,** 9115-22.

Rocha, A., Ruiz, S., Tafalla, C., and Coll, J. M. (2004b). Characterisation of the syncytia formed by VHS salmonid rhabdovirus G gene transfected cells. *Vet Immunol Immunopathol* **99**(3-4)**,** 143-52.

Roche, S., Bressanelli, S., Rey, F. A., and Gaudin, Y. (2006). Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* **313**(5784)**,** 187-91.

Roche, S., and Gaudin, Y. (2002). Characterization of the equilibrium between the native and fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein indicates that the fusion complex is made of several trimers. *Virology* **297**(1)**,** 128-35.

Rupprecht, C. E., Cathleen, A. H., and Hemachudha, T. (2002). Rabies re-examined. *Lancet Infect Dis* **2,** 327-343.

Sanz, F., Basurco, B., Babin, M., Dominguez, J., and Coll, J. M. (1993). Monoclonal antibodies against the structural proteins of viral haemorrhagic septicaemia virus isolates. *Journal Fish Diseases* **16,** 53-63.

Sanz, F., and Coll, J. M. (1992). Neutralizing-enhancing monoclonal antibody recognizes the denatured glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Arch Virol* **127**(1-4)**,** 223-32.

Schlegel, R., Sue, T. T., Willingham, M. C., and Pastan, I. (1983). Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: Is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell* **32,** 639-646.

Schlegel, R., and Wade, M. (1983). Neutralized vesicular stomatitis virus binds to host cells by a different receptor. *Biochemical Biophysical Research Communication* **114,** 774-779.

Schlegel, R., Willigan, M. C., and H.Pastan, I. H. (1982). Saturable binding sites for vesicular stomatitis virus

on the surface of Vero cells. *Journal Virology* **43,** 871-875.

Schlegel, R., Willingham, M. C., and Pastan, I. H. (1982). Saturable binding sites for vesicular stomatitis virus on the surface of Vero cells. *J Virol* **43**(3)**,** 871-5.

Schlotfeldt, H. J., Ahne, W., Vestergard-Jorgensen, P. E., and Glende, W. (1991). Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (Scophthalmus maximus)-A natural outbreak. *Bulletin European Association Fish Pathology* **11,** 105-107.

Schnell, M. J., Buonocore, L., Boritz, E., Ghosh, H. P., Chernish, R., and Rose, J. K. (1998). Requirement for a non-specific glycoprotein cytoplasmic domain sequence to drive efficient budding of vesicular stomatitis virus. *Embo J* **17**(5)**,** 1289-96.

Sergel-Germano, T., McQuain, C., and Morrison, T. (1994). Mutations in the fusion peptide and heptad repeat regions of the Newcastle disease virus fusion protein block fusion. *Journal Virology* **68,** 7654-7658.

Shai, Y. (2000). Functional domains within fusion proteins: prospectives for development of peptide inhibitors of viral cell fusion. *Biosci Rep* **20**(6)**,** 535-55.

Shokralla, S., Chernish, R., and Ghosh, H. P. (1999). Effects of double-site mutations of vesicular stomatitis virus glycoprotein G on membrane fusion activity. *Virology* **256**(1)**,** 119-29.

Shokralla, S., He, Y., Wanas, E., and Ghosh, H. P. (1998). Mutations in a carboxy-terminal region of vesicular stomatitis virus glycoprotein G that affect membrane fusion activity. *Virology* **242**(1)**,** 39-50.

Sieczkarski, S. B., and Whittaker, G. R. (2002). Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol* **83**(Pt 7)**,** 1535-45.

Slepushkin, V. A., Kornilaeva, G. V., Andreev, S. M., Sidorova, M. V., Petrukhina, A. O., Matsevich, G. R., Raduk, S. V., Grigoriev, V. B., Makarova, T. V., Lukashov, V. V., and Karamov, E. V. (1993). Inhibition of human immunodeficinecy virus type 1 (HIV-1) penetration into target cellsby synthetic petides mimicking the N-terminus of the HIV-1

transmembrane glycoprotein. *Virology* **194,** 294-301.
Somsel Rodman, J., and Wandinger-Ness, A. (2000). Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci* **113 Pt 2,** 183-92.
Srivastava, P., Schito, M., Fattah, R. J., Hara, T., Hartman, T., Buckheit, R. W., Jr., Turpin, J. A., Inman, J. K., and Appella, E. (2004). Optimization of unique, uncharged thioesters as inhibitors of HIV replication. *Bioorg Med Chem* **12**(24)**,** 6437-50.
Sun, X., Yau, V. K., Briggs, B. J., and Whittaker, G. R. (2005). Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* **338**(1)**,** 53-60.
Superti, F., Derer, M., and Tsiang, H. (1984). Mechanism of rabies virus entry into CER cells. *J Gen Virol* **65 (Pt 4),** 781-9.
Superti, F., Seganti, L., Tsiang, H., and Orsi, N. (1984). Role of phospholipids in rhabdovirus attachment to CER cells. Brief report. *Arch Virol* **81**(3-4)**,** 321-8.
Svensson, L., Hjalmarsson, A., and Everitt, E. (1999). TCID50 determination by an immuno dot blot assay as exemplified in a study of storage conditions of infectious pancreatic necrosis virus. *J Virol Methods* **80**(1)**,** 17-24.
Thiry, M., Lecoq-Xhonneux, F., Dheur, I., Renard, A., and Kinkelin, D. (1991). Sequence of a cDNA carrying the glycoprotein gene and part of the matrix protein M2 gene of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. *Biochimica Biophysica Acta* **1090,** 345-347.
Thoulouze, M. I., Bouguyon, E., Carpentier, C., and Bremont, M. (2004). Essential role of the NV protein of Novirhabdovirus for pathogenicity in rainbow trout. *J Virol* **78**(8)**,** 4098-107.
Tomassini, J., Davies, M., Hastings, J., Lingham, R., Mojena, M., Raghoobar, S., Singh, S., Tkacz, J., and Goetz, M. (1996). A novel antiviral agent which inhibits the endonuclease of influenza viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**(5)**,** 1189-1193.
Trottier, M. D., Jr., Palian, B. M., and Shoshkes Reiss, C. (2005). VSV replication in neurons is inhibited by

type I IFN at multiple stages of infection. *Virology* **333**(2)**,** 215-25.

Tsang, S. K., Cheh, J., Isaacs, L., Joseph-McCarthy, D., Choi, S.-K., Pevear, D. C., Whitesides, G. M., and Hogle, J. M. (2001). A structurally biased combinatorial approach for discovering new anti-picornaviral compounds. *Chemistry & Biology* **8**(1)**,** 33-45.

Tuffereau, C., Benejean, J., Alfonso, A. M., Flamand, A., and Fishman, M. C. (1998a). Neuronal cell surface molecules mediate specific binding to rabies virus glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus on the surfaces of lepidopteran cells. *J Virol* **72**(2)**,** 1085-91.

Tuffereau, C., Benejean, J., Blondel, D., Kieffer, B., and Flamand, A. (1998b). Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *Embo J* **17**(24)**,** 7250-9.

Uchil, P., and Mothes, W. (2005). Viral entry: a detour through multivesicular bodies. *Nat Cell Biol* **7**(7)**,** 641-2.

Vandepol, S. B., LeFrancois, L., and Holland, J. J. (1986). Sequences of the major antibody binding epitopes of the Indiana serotype of vesicular stomatitis virus. *Virology* **148,** 312-325.

Vestergaard-Jorgensen, P. E. (1972). Egtved virus: antigenic variation in 76 virus isolates examined in neutralization test and by means of the fluorescent antibody technique. *Symposiums Zoological Society* **30,** 333-339.

Wagner, R. R. (1975). Reproduction of Rhabdoviruses. *In* "Plenum Press." pp. 1-93. Comprensive.Virology, New york.

Wagner, R. R. (1987). The rhabdoviruses. *Plenum Press N.Y.***,** 543.

Wagner, R. R., Prevec, L., Brawn, F., Summers, D. F., Sokol, F., and McLeod (1972). Classification of rhabdovirus proteins: a proposal. *Journal Virology* **10,** 1228-1230.

Walker, P. J., and Kongsuwan, K. (1999). Deduced structural model for animal rhabdovirus glycoproteins. *J Gen Virol* **80 (Pt 5),** 1211-20.

Wang, B., Ke, L. H., Jiang, H., Li, C. Z., and Tien, P. (2000). Selection of a specific peptide from a nona-peptide library for in vitro inhibition of grass carp hemorrhage virus replication. *Virus Res* **67**(2)**,** 119-25.

White, J. M. (1990). Viral and cellular embrane fusion proteins. *Annual Review Physiology* **52,** 675-697.

White, J. M. (1992). Membrane fusion. *Science* **258,** 917-924.

Whitt, M. A., Buonocore, L., Prehaud, C., and Rose, J. K. (1991). Membrane fusion activity, oligomerization, and assembly of the rabies virus glycoprotein. *Virology* **185**(2)**,** 681-8.

Whitt, M. A., Zagouras, P., Crise, B., and Rose, J. K. (1990). A fusion-defective mutant of the vesicular stomatitis virus glycoprotein. *J Virol* **64**(10)**,** 4907-13.

Wiktor, T. J., Gyorgy, E., Schlumberger, H. D., Sokol, F., and Koprowski, H. (1973). Antigenic properties of rabies virus components. *Journal Immunology* **110,** 269-276.

Wild, C., Greenwell, T., and Matthews, T. (1993). A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *Aids Research and Human Reroviruses* **9,** 1051-1053.

Wild, C., Greenwell, T., Shugars, D., Rimsky-Clarke, L., and Matthews, T. (1995). The inhibitory activity of an HIV type 1 peptide correlates with its ability to interact with a leucine zipper structure. *Aids Research and Human Retroviruses* **11,** 323-325.

Wild, C., McDanal, C., Bolognesi, D., and Mathews, T. (1992). A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficincy virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proceedings National Academy Sciences USA* **77,** 3273-3277.

Wild, T. F., and Buckland, R. (1997). Inhibition of measles virus infection and fusion with peptides corresponding to the leucine zipper region of the fusion protein. *J Gen Virol* **78 (Pt 1),** 107-11.

Williamson, P., and Schlegel, R. A. (1994). Back and forth: the regulation and function of transbilayer

phospholipid movement in eukaryotic cells. *Mol Membr Biol* **11**(4)**,** 199-216.

Wolf, K., and Quimby, M. C. (1973). Fish viruses: buffers and methods for plaquing eight agents under normal atmosphere. *Appl Microbiol* **25**(4)**,** 659-64.

Wolf, K., Quimby, M. C., Pettijohn, L. L., and Landolt, M. L. (1973). Fish viruses: isolation and identification of infectious hematopoietic necrosis virus in Eastern North America. *Journal Fish Research* **30,** 1625-1627.

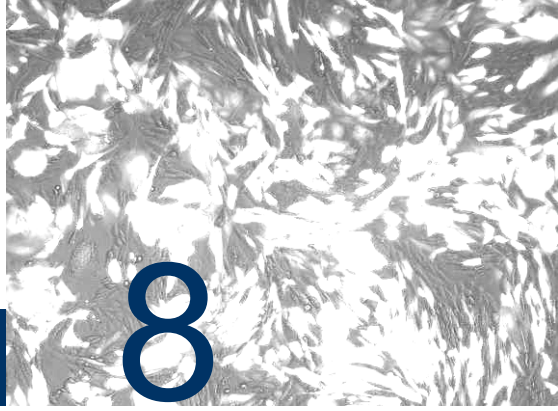
Wunner, W. H., Reagan, K. J., and Koprowski, H. (1984). Characterization of saturable binding sites for rabies virus. *Journal Virology* **50,** 691-697.

Yao, Q., and Compans, R. W. (1996). Peptides corresponding to the heptad repeat sequence of human parainfluenza virus fusion protein are potent inhibitors of virus infection. *Virology* **223**(1)**,** 103-12.

Zhang, L., and Ghosh, H. P. (1994). Characterization of the putative fusogenic domain in vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *J Virol* **68**(4)**,** 2186-93.

Zwaal, R. F., and Schroit, A. J. (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* **89**(4)**,** 1121-32.

PUBLICACIONES



8

- Falco A, **Mas V**, Brocal I, Perez L, Coll JM, Estepa A. "Inhibition of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV), a salmonid rhabdovirus, by human alpha-defensin 1 (HNP-1)" (en revisión)

- Brocal I, Falco A, **Mas V**, Rocha A, Perez L, Coll JM, Estepa A. "Stable expression of bioactive recombinant pleurocidin in a fish cell line" **Appl Microbiol Biotechnol** 72(6). Pages 1217-1228. Year 2006.

- **Mas V**, Falco A, Brocal I, Perez L, Coll JM, Estepa A. "Identification of selective inhibitors of VHSV from biased combinatorial libraries of N,N'-disubstituted 2,5-piperazinediones" **Antiviral Research** 72. Pages 107-115 Year 2006.

- Micol V, Caturla N, Pérez-Fons L, **Mas V**, Perez L, and Estepa A. "The olive leaf extract and oleuropein exhibit antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). **Antiviral Research** 66(2-3). Pages 129-136. Year 2005.
- **Mas V**, Rocha A, Perez L, Coll J.M and Estepa A "Reversible inhibition of spreading of in vitro infection and imbalance of viral protein accumulation at low pH in VHSV, a salmonid rhabdovirus". **Journal of Virology** 78(4). Pages 1936-1944. Year 2004.

- **Mas V**, Perez L, Encinar J. A, Pastor M. T, Rocha A, Perez-Paya E, Ferrer-Montiel A, Gonzalez Ros J. M, Estepa A, and Coll J. M "Salmonid viral haemorrhagic septicaemia virus: fusion-related enhancement of virus infectivity by peptides derived from viral glycoproteinG or a combinatorial library". **Journal of General Virology** 83. Pages 2671-2681. Year 2002.

- Perez L, **Mas V**, Coll J.M, Estepa A." Enhanced detection of viral hemorrhagic septicemia virus (a salmonid rhabdovirus) by pre-treatment of the virus with a combinatorial library-selected peptide". **Journal of Virological Methods** 106. Pages 17-23. Year 2002.

- Rocha A, Fernandez-Alonso M, **Mas V,** Perez L, Estepa A, Coll J. M. "Antibody response to a fragment of the protein G of VHS rhabdovirus in immunised trout". **Vet Immunol Immunopathol** 86 (1-2). Pages 89-99. Year 2002.

- Estepa A, **Mas V**, Perez L, Encinar J.A, Fernández A ,Fernández-Alonso M, Rocha A, Gonzalez Ros J.M, Gavilanes F, and Coll J.M. "A Protein G Fragment From The Salmonid VHS Rhabdovirus Induces Cell-To-Cell And Membrane Phosphatidylserine Translocation". J**ournal Of Biological Chemistry** 276. Pages 46268-46275. Year 2001.

Lista de Figuras (No borrar nunca, permite la automatización de los números de las Figuras)

- ✓ **Ilustración 1. Micrografía del virus de la rabia y esquema del visión.**
- ✓ **Tabla 1. Proteínas, peso molecular y número de moléculas para los rabdovirus**
- ✓ **Ilustración 2. Estructura del complejo ARN y N**
- ✓ **Ilustración 3. Estructura del dominio central de la P**
- ✓ **Ilustración 4. Estructura de la M**
- ✓ **Ilustración 5. Ciclo replicativo de los rabdovirus**
- ✓ **Ilustración 6.Esquema endocitosis con Back-fusión**
- ✓ **Ilustración 7. Esquema parada aranque**
- ✓ **Ilustración 8. Micrografía Budding**
- ✓ **Ilustración 9. Esquema Budding**
- ✓ **Ilustración 10. Estructura global G VSV**
- ✓ **Ilustración 11. Dominio II oligomerización G VSV**
- ✓ **Ilustración 12. Dominio PH G VSV**
- ✓ **Ilustración 13. Dominio de Fusión G VSV**
- ✓ **Ilustración 14. Esquema G de los rabdovirus**
- ✓ **Tabla 2. Virus de peces teleosteos**
- ✓ **Ilustración 15. Esquema cisteínas GVSV y GVHSV**
- ✓ **Ilustración 16. Estructura G VSV cisteínas.**
- ✓ **Ilustración 17. Mapa del VHSV**
- ✓ **Ilustración 18. Imágenes de truchas infectadas con VHSV**
- ✓ **Ilustración 19. Esquema Librería de 17 aminoácidos**
- ✓ **Ilustración 20. Esquema DKPs**
- ✓ **Ilustración 21. Tamaño de foco vs tiempo de infección**
- ✓ **Ilustración 22. Fotos focos vs tiempo de infección**
- ✓ **Ilustración 23. Número de focos vs moi**
- ✓ **Ilustración 24. Tamaño de focos vs moi**
- ✓ **Ilustración 25. pH vs focos (número/tamaño) 228**

- ✓ **Ilustración 26. Binding pH (citometría y reinfección)**
- ✓ **Ilustración 27. Progreso infección pH 6.5/7.5**
- ✓ **Ilustración 28. Fotos progreso de la infección pH 6.5/7.5**
- ✓ **Tabla 3. Producción de virus**
- ✓ **Ilustración 29. Imagen Western Blots a distintos pHs**
- ✓ **Ilustración 30. Densitometría Blot PoB**
- ✓ **Ilustración 31. Imágenes fluorescencias a pHs**
- ✓ **Ilustración 32. Señal anticuerpos a pHs**
- ✓ **Ilustración 33. Fusión a pHs**
- ✓ **Ilustración 34. Fotos Reversibilidad del pH**
- ✓ **Ilustración 35. Cribado secuencias internas**
- ✓ **Ilustración 36. Localización en estructura de secuencias internas estimuladoras**
- ✓ **Ilustración 37. Focos en presencia del Fr11**
- ✓ **Ilustración 38. Localización del fr11 en G VSV**
- ✓ **Ilustración 39. SDS-page Fr11**
- ✓ **Ilustración 40. Agregación Fr11**
- ✓ **Ilustración 41. Fotos sincitios fr11**
- ✓ **Ilustración 42. Anexina en presencia del fr11**
- ✓ **Ilustración 43. CD Fr11**
- ✓ **Ilustración 44. FTIR Fr11**
- ✓ **Ilustración 45. Cribado mezclas I**
- ✓ **Ilustración 46. Cribado mezclas II**
- ✓ **Ilustración 47. Péptidos sintetizados**
- ✓ **Ilustración 48. Cribado péptidos**
- ✓ **Ilustración 49. FTIR péptidos**
- ✓ **Ilustración 50. Tipo de incubación actividad péptidos**
- ✓ **Ilustración 51. Concentración preincubación vs actividad de péptidos.**
- ✓ **Ilustración 52. Cinética actividad de péptidos**
- ✓ **Ilustración 53. Temperatura vs actividad de péptidos**
- ✓ **Ilustración 54.Actividad péptidos RTG-2**
- ✓ **Ilustración 55. Actividad péptidos IHNV, IPNV**
- ✓ **Ilustración 56. Actividad péptidos VSV**

- ✓ **Ilustración 57. Fotos placas de VSV**
- ✓ **Ilustración 58. Elisas Péptidos (1) VHSV (2)**
- ✓ **Ilustración 59. Elisas Péptidos (1) G (2)**
- ✓ **Ilustración 60. Unión P5 pepscans péptidos**
- ✓ **Ilustración 61. Localización VSV G sitios de unión de p5**
- ✓ **Tabla 4. Acs utilizados**
- ✓ **Ilustración 62. Influencia de P5 en el reconocimiento de Acs anti G**
- ✓ **Ilustración 63. Citometría Binding**
- ✓ **Ilustración 64. Actividad péptidos post-binding**
- ✓ **Ilustración 65. Infectividad NH4Cl y control**
- ✓ **Ilustración 66. Infectividad inhibidores clatrina**
- ✓ **Ilustración 67. Fotos inhibidores clatrina**
- ✓ **Ilustración 68. Controles ensayos inhibidores clatrina**
- ✓ **Ilustración 69. Controles internos inhibidores actina**
- ✓ **Ilustración 70. Controles internos inhibidores microtúbulos**
- ✓ **Ilustración 71. Infectividad inhibidores citoesqueleto**
- ✓ **Ilustración 72. Controles ensayos inhibidores citoesqueleto**
- ✓ **Ilustración 73. Cinética NH4Cl**
- ✓ **Ilustración 74. Digestión NH4Cl**
- ✓ **Ilustración 75. Fusión péptidos**
- ✓ **Ilustración 76. P5 versus virus intra-extra**
- ✓ **Tabla 5. Detección focos en presencia de p5**
- ✓ **Tabla 6. Comparativa tres ensayos de infectividad**
- ✓ **Tabla 7. Infectividad en presencia de DKPs**
- ✓ **Ilustración 77. Viabilidad celular en presencia de DKPS**
- ✓ **Ilustración 78. Estructura y actividad DKPs seleccionadas**
- ✓ **Ilustración 79. Tamaño de foco en presencia de DKPs**
- ✓ **Ilustración 80. Influencia del tiempo de adición DKPs**
- ✓ **Ilustración 81. Blots DKPs**
- ✓ **Tabla 8. Producciones de VHSV en presencia de DKPs**
- ✓ **Tabla 9. Sumario de moduladores**