



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Salamanca

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LOS
RECEPTORES Y LOS
MECANISMOS DE
ENTRADA DEL VIRUS
DE LA ENFERMEDAD
DE NEWCASTLE**

LORENA SÁNCHEZ FELIPE

Marzo 2012

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Lorena', with a large, stylized flourish.

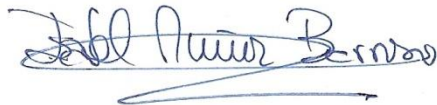
DON ENRIQUE VILLAR LEDESMA, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD, Y
DOÑA M^a ISABEL MUÑOZ BARROSO, PROFESORA TITULAR DE
UNIVERSIDAD, DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICAN:

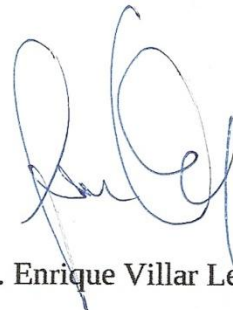
Que la presente Tesis Doctoral titulada “**Estudio de los receptores y los mecanismos de entrada del virus de la enfermedad de Newcastle**”, que para optar al grado de Doctora en Biología presenta Doña Lorena Sánchez Felipe, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Considerando que dicho Trabajo se halla concluido, autoriza su presentación para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Y, para que así conste, firman el presente certificado en Salamanca a 14 de Febrero de 2012.



Dra. M^a Isabel Muñoz Barroso



Dr. Enrique Villar Ledesma

1. INTRODUCCIÓN

2. OBJETIVOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I

ESTUDIO DEL RECEPTOR CELULAR DEL NDV

II

**ESTUDIO DE LA
ENTRADA DEL NDV
POR ENDOCITOSIS Y
EFECTO DEL pH ÁCIDO**

5. CONCLUSIONES

6. BIBLIOGRAFÍA

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 LOS PARAMIXOVIRUS.....	1
1.2 EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE.....	3
1.2.1 Cepas o estirpes del NDV.....	4
1.2.2 La enfermedad de Newcastle.....	5
1.2.3 Morfología y estructura.....	5
1.2.3.1 La nucleocápsida.....	6
1.2.3.2 La membrana externa.....	8
1.3 CICLO BIOLÓGICO DEL NDV.....	9
1.4 LAS GLICOPROTEÍNAS DEL NDV.....	13
1.4.1 La proteína HN.....	13
1.4.2 La proteína F.....	17
1.5 FUSIÓN DE MEMBRANAS.....	21
1.6 RECEPTORES VÍRICOS.....	27
1.6.1 Receptores de los paramixovirus.....	28
1.6.2 Análogos del ácido siálico y agentes antivirales.....	33
1.7 RUTAS DE ENTRADA DE VIRUS ENVUELTOS.....	35
1.7.1 Rutas de entrada de paramixovirus.....	37
2. OBJETIVOS.....	39
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
3.1 MATERIAL Y APARATOS.....	41

3.2 REACTIVOS.....	42
3.3 MATERIAL INFORMÁTICO.....	45
3.4 MATERIAL BIOLÓGICO.....	45
3.4.1 Virus.....	45
3.4.2 Líneas celulares.....	46
3.5 MÉTODOS.....	47
3.5.1 Crecimiento y obtención del virus.....	47
3.5.1.1 Crecimiento del NDV.....	47
3.5.1.2 Purificación del NDV.....	47
3.5.2 Titulación del NDV.....	48
3.5.3 Infección de las células de cultivo.....	48
3.5.4 Marcaje fluorescente del NDV: incorporación del cloruro de octadecilrodamina B (R18) en la membrana vírica.....	49
3.5.5 Medida de la actividad fusogénica del NDV en cultivos celulares mediante microscopía de fluorescencia	50
3.5.6 Valoración de proteínas totales.....	50
3.5.7 Ensayos de formación de sincitios.....	51
3.5.8 Análisis de los niveles relativos de ácidos siálicos unidos con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$ y $\alpha 2 \rightarrow 6$ en diferentes líneas celulares mediante citometría de flujo (FACS).....	52
3.5.9 Análisis del grado de unión virus-célula mediante citometría de flujo.....	53
3.5.10 Análisis del grado de infectividad mediante FACS.....	54
3.5.11 Análisis de la infectividad mediante microscopía de fluorescencia.....	55
3.5.12 Tratamiento de las células diana con sialidasas.....	55
3.5.13 Tratamiento de las células diana con lectinas.....	56

3.5.14 Tratamiento de las células diana con sialiltransferasas (SIATs).....	57
3.5.15 Incorporación de gangliósidos.....	58
3.5.16 Tinción de las células diana con las lectinas de <i>Arachis hypogaea</i> , <i>Maackia amurensis</i> y <i>Sambucus nigra</i> conjugadas con FITC.....	59
3.5.17 Extracción de gangliósidos de las células MEB4 y GM95.....	60
3.5.18 Cromatografía capa fina (HPTLC).....	61
3.5.19 Tratamiento de las células diana a pH ácido.....	62
3.5.20 Inactivación del NDV por pH ácido	63
3.5.21 Transfección de células HeLa con las proteínas HN y F del NDV.....	63
3.5.22 Doble marcaje de eritrocitos humanos con R ₁₈ y calceína.....	64
3.5.23 Ensayos de fusión de eritrocitos con células transfectadas con las proteínas del NDV.....	65
3.5.24 Tratamiento de las células diana con inhibidores de la endocitosis.....	66
3.5.24.1 Tratamiento de las células diana con BIM.....	67
3.5.24.2 Tratamiento de las células diana con <i>dynasore</i>	67
3.5.24.3 Tratamiento de las células diana con Concanamicina A, monensina o cloroquina.....	68
3.5.25 Ensayos de viabilidad celular: Método de exclusión del azul de tripán.....	69

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 70

I- ESTUDIO DEL RECEPTOR CELULAR DEL NDV

4.1 NIVELES RELATIVOS DE ÁCIDOS SIÁLICOS UNIDOS CON ENLACES $\alpha 2 \rightarrow 3$ Y $\alpha 2 \rightarrow 6$ EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES.....	70
---	----

4.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON DIFERENTES SIALIDASAS SOBRE LA FUSIÓN, INFECTIVIDAD Y UNIÓN DEL NDV CON CÉLULAS DE CULTIVO.....	73
4.2.1 Efecto del tratamiento de las células diana con distintas sialidasas sobre la fusión del NDV con células de cultivo.....	73
4.2.2 Efecto del tratamiento de las células diana con diferentes sialidasas sobre la infectividad del NDV.....	78
4.2.3 Efecto del tratamiento de las células diana con diferentes sialidades sobre la unión del NDV con células de cultivo.....	82
4.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON DIFERENTES LECTINAS SOBRE LA FUSIÓN, INFECTIVIDAD Y UNIÓN DEL NDV CON CÉLULAS DE CULTIVO.....	84
4.3.1 Efecto del tratamiento de las células diana con diferentes lectinas sobre la fusión del NDV con células de cultivo.....	85
4.3.2 Efecto del tratamiento de las células diana con distintas lectinas sobre la infectividad del NDV	87
4.3.3 Efecto del tratamiento de las células diana con diferentes lectinas sobre la unión del NDV con células de cultivo.....	91
4.4 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON DIFERENTES SIALILTRANSFERASAS SOBRE LA FUSIÓN E INFECTIVIDAD DEL NDV CON CÉLULAS DE CULTIVO.....	93
4.4.1 Efecto del tratamiento de las células diana con SIATs sobre la fusión del NDV con células de cultivo.....	93
4.4.2 Efecto del tratamiento de células ELL-0 con SIATs sobre la infectividad del NDV.....	95
4.5 INCORPORACIÓN DE GANGLIÓSIDOS EN CÉLULAS Lec1 Y EFECTO SOBRE LA FUSIÓN DEL NDV.....	98
4.6 EXTRACCIÓN DE GANGLIÓSIDOS DE CÉLULAS MEB4 Y GM95.....	102

4.7 RELEVANCIA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	103
---	-----

II- ESTUDIO DE LA ENTRADA DEL NDV POR ENDOCITOSIS Y EFECTO DEL pH ÁCIDO

4.8 EFECTO DEL pH ÁCIDO SOBRE LA ENTRADA DEL NDV.....	107
4.8.1 Efecto del pH ácido sobre la fusión del NDV con células de cultivo.....	107
4.8.2 Inactivación del NDV por pH ácido.....	109
4.8.3 Efecto del pH ácido sobre la formación de sincitios.....	110
4.8.4 Efecto del pH ácido sobre la infectividad del NDV.....	112
4.8.5 Efecto del pH ácido sobre la formación de sincitios en células HeLa transfectadas con las proteínas HN y F del NDV.....	114
4.8.6 Efecto del pH ácido y la temperatura sobre la fusión de eritrocitos con células transfectadas con las proteínas del virus.....	116
4.9 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON INHIBIDORES DE LA ENDOCITOSIS SOBRE LA FUSIÓN, INFECTIVIDAD Y UNIÓN DEL NDV.....	119
4.9.1 Efecto del tratamiento de las células diana con bisindolilmelimida I sobre la infectividad del NDV.....	120
4.9.2 Efecto del tratamiento de las células diana con <i>dynasore</i> sobre la fusión, infectividad y unión del NDV.....	123
4.9.2.1 Efecto del tratamiento de las células diana con <i>dynasore</i> sobre la fusión del NDV con células de cultivo.....	123
4.9.2.2 Efecto del tratamiento de las células diana con <i>dynasore</i> sobre la infectividad del NDV.....	125
4.9.2.2.1 Análisis de la infectividad mediante microscopía de fluorescencia	125
4.9.2.2.2 Análisis de la infectividad mediante FACS.....	127

4.9.2.3 Efecto del tratamiento de las células diana con <i>dynasore</i> sobre la unión virus-célula	128
4.9.2.4 Efecto del <i>dynasore</i> postinfección.....	129
4.9.3 Efecto del tratamiento de las células diana con concanamicina A, monensina o cloroquina sobre la fusión, infectividad y unión del NDV.....	130
4.9.3.1 Efecto del tratamiento de las células diana con ConA, monensina o CQ sobre la fusión del NDV con células de cultivo....	131
4.9.3.2 Efecto del tratamiendo de las células diana con ConA, monensina o cloroquina sobre la infectividad del NDV.....	133
4.9.3.2.1 Análisis de la infectividad mediante microscopía de fluorescencia.....	133
4.9.3.2.2 Análisis de la infectividad mediante FACS.....	137
4.9.3.3 Efecto del tratamiento de las células diana con ConA, monensina o cloroquina sobre la unión virus-célula.....	139
4.10 RELEVANCIA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	141
5. CONCLUSIONES.....	144
6. BIBLIOGRAFÍA.....	145



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Salamanca

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LOS
RECEPTORES Y LOS
MECANISMOS DE
ENTRADA DEL VIRUS
DE LA ENFERMEDAD
DE NEWCASTLE**

LORENA SÁNCHEZ FELIPE

Marzo 2012

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Lorena', with a large, stylized flourish.

DON ENRIQUE VILLAR LEDESMA, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD, Y
DOÑA M^a ISABEL MUÑOZ BARROSO, PROFESORA TITULAR DE
UNIVERSIDAD, DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICAN:

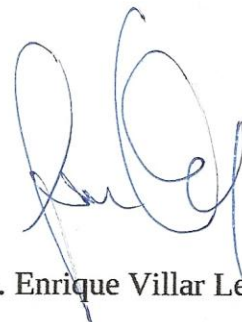
Que la presente Tesis Doctoral titulada “**Estudio de los receptores y los mecanismos de entrada del virus de la enfermedad de Newcastle**”, que para optar al grado de Doctora en Biología presenta Doña Lorena Sánchez Felipe, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Considerando que dicho Trabajo se halla concluido, autoriza su presentación para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Y, para que así conste, firman el presente certificado en Salamanca a 14 de Febrero de 2012.



Dra. M^a Isabel Muñoz Barroso



Dr. Enrique Villar Ledesma

Nota Preliminar¹

Este trabajo ha sido realizado durante el disfrute de una beca predoctoral del programa de **Formación de Personal Investigador (FPI)**, de la Junta de Castilla y León (periodo 2007-2011)

La financiación de la presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a las subvenciones asignadas por los siguientes proyectos:

Bases moleculares de los estadios tempranos de la interacción virus-célula. Procesos implicados en el reconocimiento celular y en la entrada en el citoplasma celular. Junta de Castilla y León. SA009A08

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca.
2008-2010

Responsable: M^a Isabel Muñoz Barroso

El virus de la enfermedad de Newcastle, herramienta molecular para el estudio de la interacción virus-célula y de la aplicación de virus recombinantes que expresan proteínas implicadas en cáncer y otras patologías. FIS PI081813

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca.
2009-2011

Responsable: Enrique Villar Ledesma.

*“A mis padres,
simplemente, por todo”*

Agradecimientos:

Quisiera agradecer a Enrique Villar Ledesma el haberme dado la oportunidad de realizar este Trabajo de Tesis en su laboratorio, así como su asesoramiento y ayuda a lo largo de todo este tiempo.

A Isabel Muñoz Barroso, por todo lo que me ha enseñado a lo largo de estos años además de las técnicas necesarias para la realización de este Trabajo y por el tiempo que ha sacado para ayudarme y asesorarme, sin su ayuda y apoyo no habría sido posible realizar esta Tesis.

A J. A. Rodríguez Hernández y Enrique Díaz de Espada de Laboratorios Intervet, Salamanca, por la donación de la cepa Clone-30 del virus de la enfermedad de Newcastle.

A todos los donantes de sangre del centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León que quisieron colaborar a través de la sede del hospital Virgen de la Vega en Salamanca donándonos un poquito de su sangre para poder realizar una serie de experimentos.

A todos los compañeros de laboratorio que he tenido a lo largo de este tiempo por la ayuda que me han prestado cuando los problemas y las dudas aparecían. También agradecer los buenos momentos que hemos pasado juntos, dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeros de departamento porque siempre han estado dispuestos a echar una mano cuando ha sido necesario.

A mis amigas, en especial las “reinas” y sus “respectivos” por animarme siempre que me desesperaba y por todos los buenos momentos que hemos vivido hasta ahora y los que nos quedan aunque cada vez nos sea más difícil quedar. A Isa Sousa e Isa Torres por su “apoyo moral” y por escucharme siempre. A Ruth simplemente por todo. A Isra y Ana por todos los buenos ratos que pasamos los fines de semana en Cáceres.

A Israel Benáin por estar siempre ahí, por todo su apoyo y ayuda incondicional, por todo lo bueno que hemos vivido hasta ahora y que en el futuro espero que todavía sea mucho mejor.

A mi familia, a mis padres por todo su apoyo, paciencia y comprensión y sobre todo por animarme siempre a seguir hacia adelante; a mi tía Joaqui por estar siempre ahí para todo y en especial por ser una gran amiga; a mi tío Andrés, mi tía Mari Jose y mis primos Sheila, Alberto y Sergio por ayudarme siempre y por todos esos buenos ratos que hemos pasado y pasaremos. A mis tíos “putativos” con quienes he compartido muy buenos momentos los fines de semana y las vacaciones. En último lugar, aunque ya no estén aquí, a mis abuelos por todo lo que me enseñaron y porque gran parte de lo que soy se lo debo a ellos.

Nota preliminar²

En el presente trabajo figuran numerosos términos en lengua inglesa, que aparecen en cursiva. Sin lugar a dudas, la riqueza del vocabulario castellano permitiría que todos estos términos y expresiones fueran traducidos o, en el peor de los casos, sustituidos por vocablos y frases equivalentes en significado en nuestra lengua. Sin embargo, el inglés es el idioma internacional utilizado por la comunidad científica en nuestros días, y en inglés se acuñan y se publican la practica total de los nuevos avances y descubrimientos que se realizaron en las ciencias biomédicas. Por ello, a la hora de redactar el presente trabajo hemos considerado más adecuado usar directamente en inglés términos para los que no existe una traducción directa en castellano, así como aquellos que requerirían de expresiones más o menos largas para expresar su exacto significado en nuestra lengua. Ello se ha hecho con el único fin de facilitar la lectura del texto, y siempre con términos cuyo uso en inglés está totalmente asumido por la comunidad científica. Del mismo modo y por los mismos motivos se ha decidido respetar las abreviaturas de terminología científica en su forma inglesa original.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

α Neu5thioAc2SMe	Ácido 2-S-metil-5-N-thioacetilneuramínico
<i>A.ureafaciens</i>	<i>Arthrobacter ureafaciens</i>
AAV	Virus adeno asociado
ASLV	Virus aviar del sarcoma y de la leucosis
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAAV	Virus adeno asociado bovino
BIM	Bisindolilmaleimida I
bPIV	Virus parainfluenza bovino
BKV	Poliomavirus que causa de nefritis
BPV1	Virus del papiloma bovino tipo 1
bRSV	Virus respiratorio sincitial bovino
BRC	<i>Riken Bioresource Center</i>
BSA	Seroalbúmina bovina
C:M	Cloroformo:metanol
<i>C.perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
CCP	Vesículas revestidas de clatrina
CDV	Virus del moquillo canino
CME	Endocitosis mediada por clatrina
CMP-NANA	Citidina 5'-monofosfo-N-acetil ácido neuramínico
ConA	Concanamicina A
CQ	Cloroquina
DANA (Neu5Ac2en)	2,3-dehidro-2-deoxi-N-acetilneuramínico
DIPE	Diisopropil éter
DMEM	Medio Eagle modificado por Dubelcco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EBV	Virus de Epstein-Barr
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERAV	Virus de rinitis equina A
<i>et al</i>	“y otros”
EV70	Enterovirus 70
FANA	2-deoxi-2,3-dehidro-N-Trifluoroacetilneuraminico
FACS	Citometría de flujo

FCV	Calicivirus felino
FITC	Isocianato de fluoresceína
g	Aceleración de la gravedad
<i>G mean</i>	Media geométrica de la intensidad de fluorescencia (<i>Geometric mean</i>)
Gal	Galactosa
GFP	Proteína fluorescente verde
GlcNAc-T1	N-acetilglucosaminiltransferasa 1
4-GU-DANA	4-guanidino-Neu5Ac2en (Zanamivir)
HA	Proteína hemaglutinina del virus de la gripe
HeV	Virus Hendra
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HMPV	Virus metapneumovirus humano
HN	Hemaglutinina-neuraminidasa
hPIV	Virus parainfluenza humano
HPTLC	Cromatografía en capa fina de alta resolución
HPV16	Virus del papiloma humano 16
HR	Región heptada repetida (<i>Heptad Repeat</i>)
JCV	Virus John Cunningham
JSRV	Retrovirus ovino Jaagsiekte
kDa	kiloDalton
LCH	Lectina de lenteja
LCMV	Virus de la coriomeningitis linfocítica
LF	Lipofectamina
MALI	Lectina de <i>Maackia amurensis</i>
m.o.i.	Multiplicidad de infección
mPy	Poliomavirus murino
MuV	Virus de las paperas
MV	Virus del sarampión
NA	Proteína neuraminidasa del virus de la gripe
NDV	Virus de la enfermedad de Newcastle
Neu5Ac	Ácido <i>N</i> -acetilneuramínico
Neu5Gc	Ácido <i>N</i> -glicolilneuramínico
OM	OptiMEM

ORF	Fragmento de lectura abierto
p.f.u.	Unidades formadoras de placa
p/v	Peso/volumen
PBS	Solución amortiguadora de fosfato
PFA	Paraformaldehído
PIV	Virus parainfluenza
PKC	Proteína kinasa C
PVM	Virus de la neumonía de ratón
R ₁₈	Cloruro de octadecilrodamina
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RFP	Proteína fluorescente roja
RSV	Virus respiratorio sincitial
SARS-CoV	Coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo y grave
SBF	Suero bovino fetal
SD	Desviación estándar
SeV	Virus Sendai
SFV	Virus del bosque de Semliki
Sia	Ácido siálico
SIAT	Sialiltransferasa
SNA	<i>Sambucus nigra</i>
SV5	Virus de los simios 5
SV40	Virus de los simios 40
SV41	Virus de los simios 41
TBE	Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas
TLC	Cromatografía en capa fina
TM	Dominio transmembranal
v/v	Volumen/volumen
<i>V.cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
<i>wt</i>	Tipo silvestre (<i>wild type</i>)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 LOS PARAMIXOVIRUS.....	1
1.2 EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE.....	3
1.2.1 Cepas o estirpes del NDV.....	4
1.2.2 La enfermedad de Newcastle.....	5
1.2.3 Morfología y estructura.....	5
1.2.3.1 La nucleocápsida.....	6
1.2.3.2 La membrana externa.....	8
1.3 CICLO BIOLÓGICO DEL NDV.....	9
1.4 LAS GLICOPROTEÍNAS DEL NDV.....	13
1.4.1 La proteína HN.....	13
1.4.2 La proteína F.....	17
1.5 FUSIÓN DE MEMBRANAS.....	21
1.6 RECEPTORES VÍRICOS.....	27
1.6.1 Receptores de los paramixovirus.....	28
1.6.2 Análogos del ácido siálico y agentes antivirales.....	33
1.7 RUTAS DE ENTRADA DE VIRUS ENVUELTOS.....	35
1.7.1 Rutas de entrada de paramixovirus.....	37
2. OBJETIVOS.....	39
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
3.1 MATERIAL Y APARATOS.....	41
3.2 REACTIVOS.....	42
3.3 MATERIAL INFORMÁTICO.....	45
3.4 MATERIAL BIOLÓGICO.....	45
3.4.1 Virus.....	45

3.4.2 Líneas celulares.....	46
3.5 MÉTODOS.....	47
3.5.1 Crecimiento y obtención del virus.....	47
3.5.1.1 Crecimiento del NDV.....	47
3.5.1.2 Purificación del NDV.....	47
3.5.2 Titulación del NDV.....	48
3.5.3 Infección de las células de cultivo.....	48
3.5.4 Marcaje fluorescente del NDV: incorporación del cloruro de octadecilrodamina B (R18) en la membrana vírica.....	49
3.5.5 Medida de la actividad fusogénica del NDV en cultivos celulares mediante microscopía de fluorescencia	50
3.5.6 Valoración de proteínas totales.....	50
3.5.7 Ensayos de formación de sincitios.....	51
3.5.8 Análisis de los niveles relativos de ácidos siálicos unidos con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$ y $\alpha 2 \rightarrow 6$ en diferentes líneas celulares mediante citometría de flujo (FACS).....	52
3.5.9 Análisis del grado de unión virus-célula mediante citometría de flujo.....	53
3.5.10 Análisis del grado de infectividad mediante FACS.....	54
3.5.11 Análisis de la infectividad mediante microscopía de fluorescencia.....	55
3.5.12 Tratamiento de las células diana con sialidasas.....	55
3.5.13 Tratamiento de las células diana con lectinas.....	56
3.5.14 Tratamiento de las células diana con sialiltransferasas (SIATs).....	57
3.5.15 Incorporación de gangliósidos.....	58
3.5.16 Tinción de las células diana con las lectinas de <i>Arachis hypogaea</i> , <i>Maackia amurensis</i> y <i>Sambucus nigra</i> conjugadas con FITC.....	59
3.5.17 Extracción de gangliósidos de las células MEB4 y GM95.....	60

3.5.18 Cromatografía capa fina (HPTLC).....	61
3.5.19 Tratamiento de las células diana a pH ácido.....	62
3.5.20 Inactivación del NDV por pH ácido	63
3.5.21 Transfección de células HeLa con las proteínas HN y F del NDV.....	63
3.5.22 Doble marcaje de eritrocitos humanos con R ₁₈ y calceína.....	64
3.5.23 Ensayos de fusión de eritrocitos con células transfectadas con las proteínas del NDV.....	65
3.5.24 Tratamiento de las células diana con inhibidores de la endocitosis.....	66
3.5.24.1 Tratamiento de las células diana con BIM.....	67
3.5.24.2 Tratamiento de las células diana con dynasore.....	67
3.5.24.3 Tratamiento de las células diana con Concanamicina A, monensina o cloroquina.....	68
3.5.25 Ensayos de viabilidad celular: Método de exclusión del azul de tripán.....	69

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....70

I- ESTUDIO DEL RECEPTOR CELULAR DEL NDV

4.1 NIVELES RELATIVOS DE ÁCIDOS SIÁLICOS UNIDOS CON ENLACES $\alpha 2 \rightarrow 3$ Y $\alpha 2 \rightarrow 6$ EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES.....	70
4.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON DIFERENTES SIALIDASAS SOBRE LA FUSIÓN, INFECTIVIDAD Y UNIÓN DEL NDV CON CÉLULAS DE CULTIVO.....	73
4.2.1 Efecto del tratamiento de las células diana con distintas sialidasas sobre la fusión del NDV con células de cultivo.....	73
4.2.2 Efecto del tratamiento de las células diana con diferentes sialidasas sobre la	

infectividad del NDV.....	78
4.2.3 Efecto del tratamiento de las células diana con diferentes sialidades sobre la Unión del NDV con células de cultivo.....	82
4.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON DIFERENTES LECTINAS SOBRE LA FUSIÓN, INFECTIVIDAD Y UNIÓN DEL NDV CON CÉLULAS DE CULTIVO.....	84
4.3.1 Efecto del tratamiento de las células diana con diferentes lectinas sobre la fusión del NDV con células de cultivo.....	85
4.3.2 Efecto del tratamiento de las células diana con distintas lectinas sobre la infectividad del NDV	87
4.3.3 Efecto del tratamiento de las células diana con diferentes lectinas sobre la unión del NDV con células de cultivo.....	91
4.4 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON DIFERENTES SIALILTRANSFERASAS SOBRE LA FUSIÓN E INFECTIVIDAD DEL NDV CON CÉLULAS DE CULTIVO.....	93
4.4.1 Efecto del tratamiento de las células diana con SIATs sobre la fusión del NDV con células de cultivo.....	93
4.4.2 Efecto del tratamiento de células ELL-0 con SIATs sobre la infectividad del NDV.....	95
4.5 INCORPORACIÓN DE GANGLIÓSIDOS EN CÉLULAS Lec1 Y EFECTO SOBRE LA FUSIÓN DEL NDV.....	98
4.6 EXTRACCIÓN DE GANGLIÓSIDOS DE CÉLULAS MEB4 Y GM95.....	102
4.7 RELEVANCIA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	103
<u>II- ESTUDIO DE LA ENTRADA DEL NDV POR ENDOCITOSIS Y EFECTO DEL pH ÁCIDO</u>	

4.8 EFECTO DEL pH ÁCIDO SOBRE LA ENTRADA DEL NDV.....	107
4.8.1 Efecto del pH ácido sobre la fusión del NDV con células de cultivo.....	107
4.8.2 Inactivación del NDV por pH ácido.....	109
4.8.3 Efecto del pH ácido sobre la formación de sincitios.....	110
4.8.4 Efecto del pH ácido sobre la infectividad del NDV.....	112
4.8.5 Efecto del pH ácido sobre la formación de sincitios en células HeLa transfectadas con las proteínas HN y F del NDV.....	114
4.8.6 Efecto del pH ácido y la temperatura sobre la fusión de eritrocitos con células transfectadas con las proteínas del virus.....	116
4.9 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON INHIBIDORES DE LA ENDOCITOSIS SOBRE LA FUSIÓN, INFECTIVIDAD Y UNIÓN DEL NDV.....	119
4.9.1 Efecto del tratamiento de las células diana con bisindolilmelimida I sobre la infectividad del NDV.....	120
4.9.2 Efecto del tratamiento de las células diana con dynasore sobre la fusión, infectividad y unión del NDV.....	123
4.9.2.1 Efecto del tratamiento de las células diana con dynasore sobre la fusión del NDV con células de cultivo.....	123
4.9.2.2 Efecto del tratamiento de las células diana con dynasore sobre la infectividad del NDV.....	125
4.9.2.2.1 Análisis de la infectividad mediante microscopía de fluorescencia	125
4.9.2.2.2 Análisis de la infectividad mediante FACS.....	127
4.9.2.3 Efecto del tratamiento de las células diana con dynasore sobre la unión virus-célula	128

4.9.2.4 Efecto del dynasore postinfección.....	129
4.9.3 Efecto del tratamiento de las células diana con concanamicina A, monensina o cloroquina sobre la fusión, infectividad y unión del NDV.....	130
4.9.3.1 Efecto del tratamiento de las células diana con ConA, monensina o CQ sobre la fusión del NDV con células de cultivo.....	131
4.9.3.2 Efecto del tratamiendo de las células diana con ConA, monensina o cloroquina sobre la infectividad del NDV.....	133
4.9.3.2.1 Análisis de la infectividad mediante microscopía de fluorescencia.....	133
4.9.3.2.2 Análisis de la infectividad mediante FACS.....	137
4.9.3.3 Efecto del tratamiento de las células diana con ConA, monensina o cloroquina sobre la unión virus-célula.....	139
4.10 RELEVANCIA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	141
5. CONCLUSIONES.....	144
6. BIBLIOGRAFÍA.....	145

1.1 LOS PARAMIXOVIRUS

Los paramixovirus son un grupo de virus que causan una gran variedad de enfermedades en humanos y otros animales. Entre los paramixovirus que causan enfermedades en humanos se encuentran los virus del sarampión, parainfluenza, paperas, el virus respiratorio sincitial y los virus Hendra y Nipah. Otros paramixovirus infectan animales importantes para la nutrición humana y producen graves pérdidas económicas causando enfermedades como la de Newcastle o la peste bovina. Estos virus son excelentes modelos para el estudio de la biología de los virus en general y de los virus de RNA de polaridad negativa en particular.

Constituyen la familia *Paramyxoviridae*, que se encuentra dentro del orden *Mononegavirales* (Lamb y Kolakofsky, 1996). La familia *Paramyxoviridae* está formada por virus recubiertos por una membrana y con RNA monocatenario de polaridad negativa. Este RNA se encuentra exclusivamente en una nucleocápsida helicoidal, donde está asociado a otras proteínas como la polimerasa dependiente de RNA o RNA sintetasa. El RNA genómico sirve de molde para la síntesis del RNA mensajero y del antígenoma de polaridad positiva que a su vez será el molde para nuevas moléculas de RNA genómico. La envoltura que rodea la nucleocápsida es una membrana lipoproteica, formada por una bicapa lipídica que deriva de la membrana plasmática de la célula hospedadora. La membrana lipídica contiene al menos dos glicoproteínas transmembranales con forma de espícula (con un dominio hacia el exterior), la proteína F o proteína de fusión, que hace posible la fusión de membranas, y las proteínas de unión al receptor HN, G o H según el virus (Rott, 1979). La proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN) de algunos paramixovirus tiene tres actividades, la primera es el reconocimiento y unión a receptores específicos de la célula hospedadora (actividad hemaglutinante), la segunda es la actividad enzimática neuraminidásica o sialidásica y la tercera es la actividad promotora de la fusión. En la hemicapa interna de la envoltura del virus, interaccionando tanto con la nucleocápsida como con la membrana, se encuentra la proteína M (de matriz), que constituye el armazón que establece contacto entre la envoltura y la nucleocápsida (Shimizu y Ishida, 1975; García-Sastre *et al.*, 1989; Galinski y Wechsler, 1991). En el año 2000, el Comité Internacional de Taxonomía de virus dividió la familia *Paramyxoviridae* en dos subfamilias, *Paramixovirinae* y *Pneumovirinae*. La clasificación se basaba en criterios

morfológicos, en la organización del genoma, en la actividad biológica y la relación de la secuencia de las proteínas víricas (Esquema 1).

Familia *Paramyxoviridae*

Subfamilia *Paramyxovirinae*

Género *Respirovirus*

Virus Sendai (SeV)
Virus parainfluenza humano (hPIV) tipos 1 y 3
Virus parainfluenza bovino (bPIV) tipo 3

Género *Rubulavirus*

Virus de simios 5 o Virus parainfluenza 5 (PIV5)
Virus de las paperas (MuV)
Virus parainfluenza humano (hPIV) tipos 2, 4a y 4b

Género *Morbillivirus*

Virus del sarampión (MV)
Virus del moquillo canino (CDV)
Virus de la peste bovina

Género *Avulavirus*

Virus de la enfermedad de Newcastle (NDV)

Género *Henipavirus*

Virus Hendra (HeV)
Virus Nipah

Subfamilia *Pneumovirinae*

Género *Pneumovirus*

Virus respiratorio sincitial humano (hRSV)
Virus respiratorio sincitial bovino (bRSV)
Virus de la neumonía del ratón (PVM)

Género *Metapneumovirus*

Metaneumovirus humano (HMPV)
Metaneumovirus de aves tipos A, B y C

<p>Esquema 1- Clasificación de la familia <i>Paramyxoviridae</i> y algunos ejemplos representativos.</p>

En 1994 se identificó un nuevo miembro de la familia *Paramyxoviridae*, el morbilivirus equino o virus Hendra (HeV), que causó la muerte a una persona y a varios caballos en Australia (Murray *et al.*, 1995; O'Sullivan *et al.*, 1997). En 1998 apareció en Malasia una epidemia de encefalitis febril severa que provocó muertes humanas causadas por un nuevo virus que se denominó virus Nipah. Tanto el HeV como el Nipah comparten la capacidad de infectar y causar enfermedades potencialmente mortales en una gran variedad de especies animales. Chua *et al.* (2000), tras el análisis filogenético de las secuencias de los genes de estos virus, sugirieron que ambos deberían formar un nuevo género, *Henipavirus* (Esquema 1).

La subfamilia *Pneumovirinae*, separada en la última reclasificación, se distingue porque en su membrana posee la proteína G, que es la proteína de unión al receptor pero que no posee actividades sialidásica ni hemaglutinante (Richman *et al.*, 1971; Kingsbury *et al.*, 1978). Morfológicamente se diferencian de los *Paramixovirinae* por contener nucleocápsidas más estrechas. También difieren en aspectos del RNA vírico y en estructuras de proteínas (Collins *et al.*, 1991).

1.2 EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

El virus de la enfermedad de Newcastle es uno de los agentes infecciosos causante de un gran número de enfermedades respiratorias aviares lo cual conlleva grandes pérdidas económicas en explotaciones avícolas.

El NDV es un miembro del género *Avulavirus* de la subfamilia *Paramixovirinae*, orden Mononegavirales (Seal *et al.*, 2002). En 1999, de Leeuw y Peeters, basándose en comparaciones de secuencias genómicas entre el NDV y otros Paramixovirus, sugirieron que el NDV debería constituir un nuevo género. Al año siguiente, Locke *et al.* (2000) y Seal *et al.* (2000), estudiando los genes de las proteínas P y M apoyaron esta idea. Pero no fue hasta 2002 cuando se incluyó al NDV en el nuevo género *Avulavirus*, gracias al análisis de la secuencia nucleotídica de la proteína NP de múltiples aislados de NDV, lo que permitió establecer relaciones filogenéticas (Seal *et al.*, 2002).

1.2.1 CEPAS O ESTIRPES DEL NDV

Los términos “cepa” o “estirpe”, aplicados al NDV, se utilizan para designar una línea de virus caracterizada y estable. Se han descrito varias cepas de NDV con marcadas diferencias en cuanto a su capacidad para producir enfermedad y muerte en pollos. Hanson y Brandly (1955) las agruparon, arbitrariamente, en tres grupos según su patogenicidad en embriones de pollo:

- Cepas velogénicas: producen la muerte del embrión entre 40 y 60 horas tras la inyección de la dosis letal mínima (tiempo medio de muerte en huevos).

- Cepas mesogénicas: tiempo medio de muerte entre 60 y 90 horas.

- Cepas lentogénicas: tardan más de 90 horas en provocar efectos letales.

Pese a su arbitrariedad esta clasificación sigue en uso actualmente, por resultar muy útil para distinguir las cepas. Hanson (1972), tomando en consideración los síntomas que produce la enfermedad, clasificó las cepas del NDV en otros cuatro grupos:

- Formas “Doyle” o velogénicas-viscerotrópicas: engloban las cepas extremadamente letales que provocan lesiones hemorrágicas en el intestino.

- Formas “Beach” o velogénicas-neumotrópicas: engloban las cepas extremadamente letales que provocan trastornos nerviosos y respiratorios, pero sin lesiones intestinales.

- Formas “Beaudette”: equivalentes a las mesogénicas. Provocan síntomas respiratorios y ocasionalmente nerviosos. Los pollos jóvenes pueden morir, pero en general la mortalidad es muy baja.

- Formas “Hitchner”: engloban todas las cepas lentogénicas. Provocan infecciones suaves o inaparentes.

La cepa “Clone 30”, utilizada en este trabajo, pertenece a este último grupo. Se trata de una línea genética estable obtenida a partir de la cepa “La Sota”. Fue obtenida y es utilizada por Intervet Laboratories (Boxmeer, Holanda) y Laboratorios Intervet (Salamanca, España). Se utiliza comercialmente para la inmunización activa de pollos contra la enfermedad de Newcastle.

1.2.2 LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

La enfermedad de Newcastle es un proceso infeccioso causado por el NDV, que afecta a pollos, pavos y otras aves de corral, causándoles alteraciones en el sistema respiratorio y/o nervioso. En el caso de las cepas más virulentas, puede causar tasas de mortalidad del 90 % entre los animales infectados (Chang, 1975). La enfermedad provoca graves pérdidas económicas al causar la muerte de las aves, o cuando menos, una reducción de la puesta. Las infecciones en el hombre son el resultado de accidentes de laboratorio, vacunación o manipulación de pollos y sus síntomas son ligeros y muchas veces reducidos a una leve conjuntivitis, que inmuniza de por vida al individuo (Rott y Klenk, 1988). Los medios de propagación descritos son varios: aves enfermas procedentes de regiones donde dicha enfermedad es endémica, transporte de pollos enfermos a otras regiones, diseminación por el aire o por mamíferos que sufren infecciones asintomáticas, incluido el hombre (Lancaster y Alexander, 1975).

1.2.3 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA

El NDV es un paramixovirus típico que consta de una nucleocápsida helicoidal rodeada por una envoltura membranosa (Figura 1). Las partículas víricas son generalmente esféricas, con un diámetro de 100 a 200 nm, aunque pueden observarse formas de hasta 600 nm de diámetro. Roberts y Compans (1998) demostraron, para el también pleomórfico virus de la gripe, que la morfología final del virión se encuentra determinada por el tipo celular hospedador y especialmente por la integridad de los filamentos del citoesqueleto. Dado que las proteínas de los paramixovirus también interaccionan con el citoesqueleto (Sanderson *et al.*, 1995), es posible que lo anteriormente descrito para la gripe sea también cierto para este grupo.

El virus purificado muestra la siguiente composición química: 67 % de proteínas, 1 % de RNA, 24 % de lípidos y 7 % de glúcidos (Lancaster y Alexander, 1975).

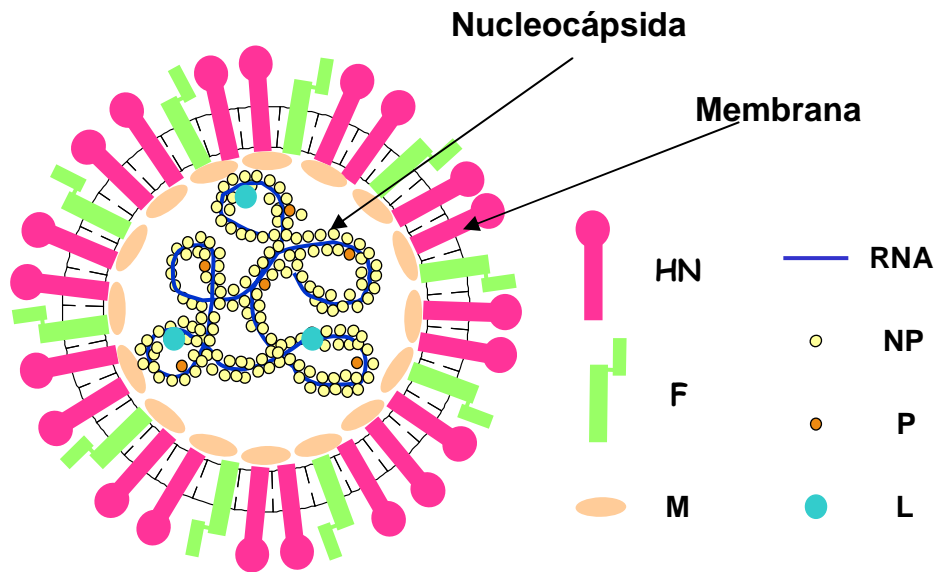


Figura 1- Representación esquemática del Virus de la Enfermedad de Newcastle.

1.2.3.1 LA NUCLEOCÁPSIDA

La nucleocápsida es una estructura helicoidal de giro levógiro, con un diámetro de 17-18 nm y un hueco interior de 4-5 nm, aunque pueden existir diferentes estados morfológicos (Egelman *et al.*, 1989), posiblemente en función de las diferentes etapas del ciclo vírico. Está formada por una única molécula de RNA monocatenario de polaridad negativa que contiene 15186 nucleótidos (Krishnamurthy y Samal, 1998; de Leeuw y Peeters, 1999). Esta molécula constituye el genoma vírico que en ninguna fase del ciclo replicativo está aislado, sino que se encuentra en todo momento acompañado con proteínas. El RNA constituye algo más del 9 % de la nucleocápsida (Rott *et al.*, 1963) y su tamaño varía entre 49 S y 57 S (Lancaster y Alexander, 1975). En los extremos posee dos secuencias extracistrónicas, no codificantes, de unos 50 nucleótidos, conocidas como *leader* (en el 3') y *trailer* (en el 5'). Estas dos secuencias de control son esenciales para la replicación (Blumberg *et al.*, 1991; Harty y Palese, 1995; Marcos *et al.*, 2005). Flanquean los seis genes que codifican las proteínas estructurales del NDV, separadas por regiones intergénicas no codificantes, donde se encuentran las señales de inicio y terminación de cada gen.

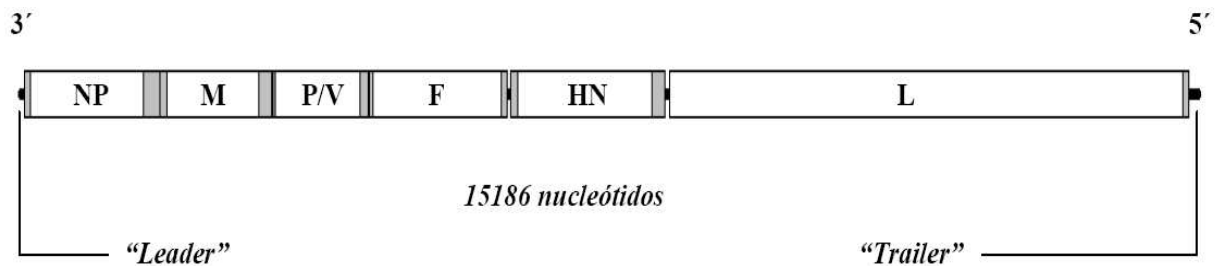


Figura 2. Organización del genoma del NDV. Se muestran a escala los distintos genes del NDV. Las zonas blancas son los fragmentos de lectura abiertos (ORFs) y las grises las partes de los transcritos que no se traducirán. También se muestran las secuencias conservadas de final e inicio de la transcripción y la posición de las señales de regulación no transcritas en 5' y 3'.

Las proteínas que forman parte de la nucleocápsida son las siguientes:

- Proteína NP (proteína de la nucleocápsida): Es la proteína estructural mayoritaria, con aproximadamente 2600 copias por cada molécula de RNA, al cual permanece unido en todo momento de forma que cada seis nucleótidos del genoma hay interacción con una copia de la NP (Egelman *et al.*, 1989; Kolakofsky *et al.*, 1998). Su función principal es mantener la integridad estructural de la nucleocápsida, además de participar en el proceso de encapsidación interaccionando con la proteína M y en los procesos de transcripción y replicación colaborando con las proteínas L y P.

- Proteína L: Es la RNA polimerasa vírica RNA dependiente (Peeples y Bratt, 1982). Sólo se encuentran entre 30 y 50 copias por nucleocápsida, ya que sólo se requiere en pequeñas cantidades para la replicación del RNA vírico.

- Proteína P o fosfoproteína: Es la segunda proteína más abundante de la nucleocápsida, con unas 250-300 copias por virión. Se encuentra altamente fosforilada, y participa, junto con la proteína L, en la replicación y transcripción del genoma, y colabora en el proceso de encapsidación junto con la proteína NP.

- Proteína V: Se origina por el desplazamiento de la fase de lectura de la traducción de la proteína P al añadirse un nucleótido, no presente en el molde. En principio se suponía que estaba solo implicada en la regulación de la replicación vírica (Steward *et al.*, 1993). Actualmente se han descrito funciones como la de antagonista del sistema de interferón de la célula hospedadora y la de determinante del espectro de

posibles hospedadores (Park *et al.*, 2003a y 2003b), lo que la convierte en esencial para explicar la capacidad replicativa de las distintas cepas y su virulencia (Mebatsion *et al.*, 2001). También se ha descrito la existencia de otra posible proteína, la W, como consecuencia de la adición de más de un nucleótido a la fase de lectura de la proteína P (Steward *et al.*, 1993; Locke *et al.*, 2000).

1.2.3.2 LA MEMBRANA EXTERNA

La envoltura del virus está formada por una membrana lipoproteica con una en bicapa derivada de la membrana plasmática de la célula hospedadora y modificada por la incorporación de las proteínas víricas (Stenback y Durand, 1963). Las proteínas asociadas a la membrana son tres: dos de ellas, HN y F, (trataremos más extensamente sobre estas proteínas en el apartado 1.4) son glicoproteínas que atraviesan la bicapa y constituyen las “espículas víricas”; la tercera, proteína M o proteína de matriz, se dispone por debajo de la hemicapa interna de la membrana y no se encuentra glicosilada (Figura 1). Esta proteína es la más abundante del virus y forma un armazón o matriz periférica que recubre internamente la envoltura, manteniendo la estructura del virión al interactuar tanto con el resto de las proteínas de la membrana como con las de la de la nucleocápsida. Como en otros muchos paramixovirus, la proteína M del NDV tiene un papel clave en la formación de la progenie vírica (Takimoto y Portner, 2004) y en el proceso de gemación que marca el inicio de la salida de nuevos viriones de la célula (Shnyrova *et al.*, 2007). La proteína M es absolutamente necesaria y suficiente para la salida de la progenie vírica por gemación en la célula hospedadora (Pantua *et al.*, 2006). Las recientes investigaciones sobre la dependencia de la formación del NDV de los *rafts* lipídicos (Laliberte *et al.*, 2006), junto con experimentos que demuestran la interacción directa entre la proteína M y membranas lipídicas purificadas (Faaberg y Peeples, 1988; Neitchev y Dumanova, 1992), indican la acción sinérgica de la proteína M y los lípidos en la formación de los nuevos viriones de NDV. Otros estudios demuestran que la interacción de la proteína M purificada con las bicapas lipídicas es suficiente para inducir la organización de las proteínas en dominios funcionales de gemación. Según estos estudios (Shnyrova *et al.*, 2007) resulta suficiente para provocar curvatura negativa en las bicapas lipídicas y controlar la forma de estas vesículas proteolipídicas originadas.

Los lípidos de la membrana, aunque derivan de la membrana plasmática de la célula hospedadora, sufren un proceso de selección por parte de las proteínas víricas. Éstas controlan la proporción de los lípidos y actúan como un factor para modular el funcionamiento, y con ello la capacidad infectiva del virus (Aloia *et al.*, 1993). La composición lipídica de la membrana de la cepa “clone 30” del NDV ha sido estudiada previamente en nuestro laboratorio (Muñoz-Barroso *et al.*, 1997). La razón molar colesterol/fosfolípidos es 1.02 y el porcentaje de los diferentes fosfolípidos en la bicapa es: 26.8 % fosfatidiletanolamina, 23 % esfingomielina, 22.7 % fosfatidilcolina, 15.5 % fosfatidilserina y fosfatidilinositol, 4.2 % lisofosfatidiletanolamina, 3.2 % lisofosfatidilcolina, 2.8 % ácido fosfatídico y 2.1 % fosfatidilglicerol. La razón molar lípido/proteína es de 0.2 (Muñoz-Barroso *et al.*, 1997).

1.3 CICLO BIOLÓGICO DEL NDV

En la Figura 3 puede verse un esquema de las etapas del ciclo de vida de los paramixovirus: unión, fusión de membranas, síntesis de nuevos viriones y gemación. Una vez que el virus ha penetrado en el interior de la célula, todos los procesos tienen lugar dentro del citoplasma. En cultivos celulares, un ciclo de crecimiento tiene una duración de entre 14 y 30 horas, pudiendo ser de 10 horas en las cepas más virulentas del NDV (Lamb y Kolakofsky, 2001).

Adsorción y entrada del virus en la célula

El paso inicial en la infección de una célula hospedadora consiste en la adsorción del virus a la membrana externa de la misma. La unión del NDV a la célula tiene lugar gracias al reconocimiento de receptores específicos en la superficie de la membrana celular. Estos receptores se caracterizan por poseer restos de ácidos siálicos expuestos al exterior, con los que interacciona la molécula HN mediante su actividad hemaglutinante. Los ácidos siálicos se encuentran tanto en glicoproteínas como en glicolípidos (sialoglicolípidos y gangliósidos). Suzuki *et al.* (1985) identificaron ciertos gangliósidos como receptores en las membranas diana para el NDV y el virus Sendai (SeV) mientras que Wu *et al.* (1980) y Oku *et al.* (1981, 1982a y 1982b) evidenciaron

que también las sialoglicoproteínas son receptores naturales para el SeV. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que para el NDV tanto gangliósidos y como *N*-glicoproteínas, pero no *O*-glicoproteínas, son importantes en el proceso de interacción virus-célula (Ferreira *et al.*, 2004b).

El segundo paso en la infección es la fusión de la envoltura vírica con la membrana de la célula diana. Este proceso está mediado por la proteína F (Choppin y Compans, 1975) y según el cuerpo de doctrina actual, tiene lugar a nivel de la membrana plasmática de la célula hospedadora a pH neutro. No obstante, nuestro grupo de investigación demostró que la fusión de NDV con la célula diana se incrementaba a pH ácido (San Román *et al.*, 1999). Además, nuestro grupo también ha comprobado, usando técnicas de microscopía de fluorescencia, que la fusión de la envoltura vírica también se producía con la membrana endosómica y que el NDV puede seguir una segunda ruta de entrada por endocitosis (Cantín *et al.*, 2007), como se explicará más adelante. Asimismo, en un trabajo reciente nuestro grupo ha determinado la importancia del colesterol de la membrana de la célula huésped en la entrada del NDV (Martín *et al.*, 2012, nuestro grupo de investigación), demostrando la interacción de la proteína HN del NDV con los rafts lipídicos de la membrana plasmática.

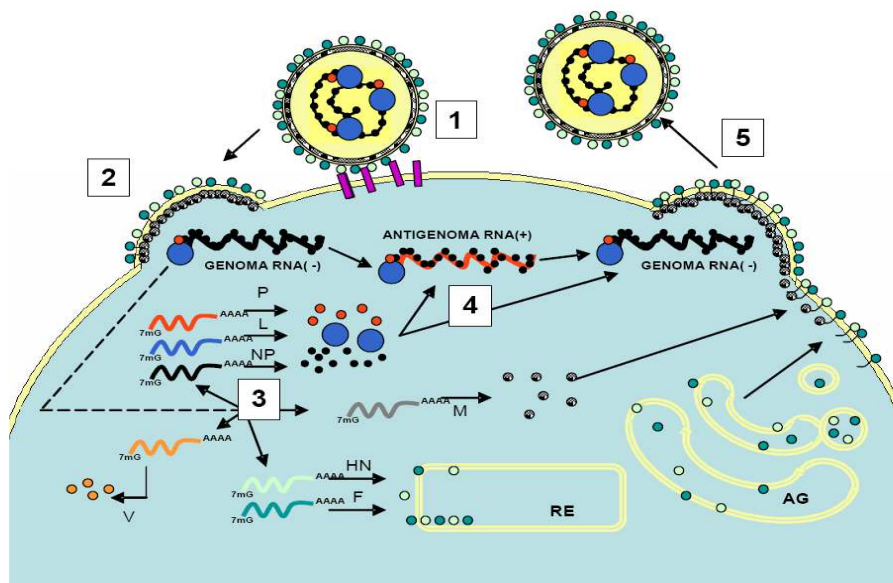


Figura 3- Ciclo biológico de los Paramixovirus. 1) Adsorción; 2) Entrada en la célula; 3) Transcripción primaria; 4) Replicación del genoma; 5) Ensamblaje y liberación de los viriones.

Síntesis de RNA vírico

Como consecuencia de la fusión de membranas, la nucleocápsida vírica penetra en el citoplasma celular y el genoma vírico puede empezar a transcribirse, sin que en ningún momento la proteína NP deje de interactuar con el RNA formando la nucleocápsida. De esta manera, los únicos RNA víricos que permanecen “libres” son los mRNA que codifican las proteínas del virus.

Transcripción primaria

La estrategia de replicación de los virus RNA de polaridad negativa fue descubierta precisamente en el NDV (Kingsbury, 1966; Bratt y Robinson, 1971). A diferencia del ciclo replicativo de los ortomixovirus como el virus de la gripe, el RNA de los paramixovirus se transcribe y se replica en el citoplasma de la célula hospedadora y no requiere un iniciador exógeno. Se cree que la proteína vírica L, ayudada por la proteína P, es la RNA-polimerasa vírica dependiente de RNA (Hamaguchi *et al.*, 1983). La polimerasa detiene la transcripción y reinicia ésta al final de cada gen vírico, debido a las secuencias señal de inicio y de finalización flanqueando cada gen y que están presentes en las regiones intergénicas, produciendo mRNA monocistrónicos aunque, a veces, se pueden formar bicistrónicos. Éstos sufren los procesos de *capping* en el extremo 5' y poliadenilación en el 3'. La abundancia relativa de cada mRNA desciende del extremo 3' al 5' del genoma RNA, de manera que el primer gen, NP, se transcribe a niveles más altos, y el último cistrón del genoma, el gen L, se transcribe a niveles más bajos (Figura 2) (Glazier *et al.*, 1977).

Replicación del genoma

La acumulación de proteínas víricas provoca de alguna manera la síntesis del antigenoma. No está claro cuál es la señal que desencadena que la polimerasa ignore las regiones intergénicas y sintetice una cadena complementaria de RNA completa. Se ha propuesto que a medida que los mRNA han generado suficientes proteínas víricas, las proteínas NP libres empiezan a ensamblarse con la cadena de RNA naciente, que determinan que la polimerasa ignore las secuencias de paro intergénicas. Esto permite

generar un antígenoma completo sin interrupciones, que también permanece interaccionando con las proteínas NP y a partir del cual se copiará el genoma de los nuevos viriones. Este sistema sugiere un mecanismo de autorregulación de la traducción y replicación determinado por los niveles intracelulares de proteína NP sin ensamblar.

Un insuficiente nivel de NP promovería la síntesis de mRNA para proveer más proteína vírica, mientras que un exceso de NP causaría replicación del genoma para disminuir el nivel de esta proteína sin ensamblar (Kolakofsky *et al.*, 1991).

Ensamblaje y liberación de los viriones

Mientras se produce la replicación del genoma y se van formando las nucleocápsidas, las glicoproteínas víricas de la envoltura se sintetizan siguiendo la vía retículo endoplásmico-Golgi hasta incorporarse a la membrana plasmática, donde quedan insertadas. Durante este proceso de transporte, tanto la proteína F como la HN sufren modificaciones postraduccionales como glicosilación, acilación, activación proteolítica y formación de puentes disulfuro (Morrison *et al.*, 1987; Yoshida *et al.*, 1989; Collins y Mottet, 1991a, 1991b). En cuanto la proteína M, una vez sintetizada se une a la nucleocápsida, rodeándola. Ese armazón de proteína M se rodea a su vez de una porción de membrana celular, provocando la salida de la progenie vírica de la célula (Schmitt y Lamb, 2005). La fracción de membrana adquirida por los viriones lleva las glicoproteínas que formarán las espículas del virus. El lugar de interacción entre M y HN que desencadena todo este proceso es la membrana plasmática (García-Sastre *et al.*, 1989), en concreto, en unos microdominios de membrana, denominados *lipid rafts*, balsas lipídicas o *rafts* lipídicos, cuya integridad y organización es crucial para el ensamblaje y liberación de partículas infecciosas de NDV (Laliberte *et al.*, 2006). Nuestro grupo de investigación (Shnyrova *et al.*, 2007) ha demostrado que la interacción de la proteína M con bicapas lipídicas es suficiente para inducir la organización de las proteínas en dominios funcionales de gemación; además, la proteína M controla la forma de estas vesículas proteolipídicas.

1.4 LAS GLICOPROTEÍNAS DEL NDV

La membrana del NDV tiene dos glicoproteínas transmembranales, la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F) (Figura 4). El virus utiliza las rutas existentes en la célula para la síntesis, transporte y posteriores modificaciones de sus glicoproteínas.

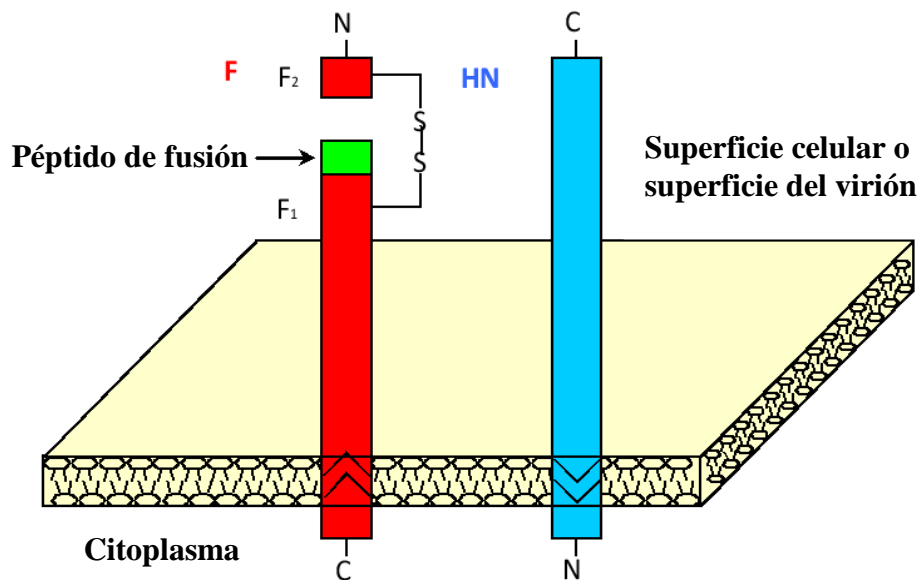


Figura 4- Orientación de las proteínas integrales de membrana del NDV.

1.4.1 LA PROTEÍNA HN

Es una proteína de 74 kDa que posee una estructura con tres dominios: un dominio globular hidrofílico externo glicosilado (el de mayor tamaño), un dominio hidrofóbico de anclaje en la membrana y un tercer dominio hidrofílico que sobresale por debajo de la semicapa interna de la envoltura (Morrison y Portner, 1991). El ectodominio está formado por un dominio globular terminal o “cabeza” soportado por un “tallo” de gran longitud que sobresale de la membrana (Crennell *et al.*, 2000). Es una glicoproteína de tipo II, con el extremo C-terminal orientado extracelularmente (Schuy *et al.*, 1984). La proteína HN sufre N-glicosilación postraducciona (Nakamura *et al.*, 1982). La formación de puentes disulfuro intercatenarios es responsable de la aparición de formas homodiméricas que se originan gracias al establecimiento de puentes disulfuro en el dominio globular externo de la proteína. Los homodímeros de HN se asocian covalentemente para formar un tetrámero.

Algunas proteínas víricas son sintetizadas como precursores que se activan tras sufrir un procesamiento proteolítico (proteína F de los paramixovirus, proteína hemaglutinina (HA) del virus de la gripe, etc.). Sin embargo, la mayoría de las proteínas HN de los paramixovirus no están sujetas a este cambio, sólo algunas cepas lentogénicas del NDV (Ulster, Queensland y D26) sintetizan la proteína HN en forma de un precursor (HN₀).

Actividades biológicas de la proteína HN

La proteína HN de paramixovirus tiene tres actividades importantes en el ciclo de infección vírico (unión al receptor, actividad sialidásica y activación de la proteína F) y es el balance de estas tres funciones lo que determina el resultado de la infección (Porotto *et al.*, 2005). La actividad hemaglutinante posibilita la adsorción del virus a la célula huésped, al reconocer receptores específicos que contienen restos de ácidos siálicos. La actividad sialidásica es necesaria para una propagación eficiente del virus al evitar la agregación de nuevos viriones, eliminando los restos de ácidos siálicos de las glicoproteínas HN y F, situadas hacia el exterior del virión. Además, el virus no permanece unido a los receptores de su membrana plasmática al salir de la célula infectada, ni tampoco a glicoproteínas solubles o a secreciones mucosas con las que pueda encontrarse antes de llegar a la célula hospedadora (Klenk y Choppin, 1970; Klenck *et al.*, 1970).

A día de hoy sigue existiendo controversia sobre la localización de los sitios de las dos actividades sialidásica y hemaglutinante. Si bien ambas se localizan en la cabeza globular, algunos autores están a favor de una separación en dos sitios mientras que otros aportan pruebas que apoyan que tanto la actividad hemaglutinante como la sialidásica residen en el mismo sitio de la proteína (revisado por Lamb y Parks, 2007). Estudios de cristalización del ectodominio globular de la proteína HN del NDV han revelado la existencia de dos sitios de unión al receptor en la cabeza globular. La cristalización junto con el inhibidor de sialidasa 2-deoxi-2,3-dehidro-N-acetilneuramínico (Neuc5Ac2en) ha determinado que el sitio I con función de unión al receptor y actividad sialidásica se encuentra en una hélice β (Crennell *et al.*, 2000). El segundo sitio de unión al receptor (sitio II) se encuentra en el hueco que hay en el lugar de contacto entre los dos dímeros del tetrámero y fue descubierto por la cocrystalización

del HN con un sustrato tiosialósido no hidrolizable Neu5Ac-2-5- α (2,6)Gal1OMe (Zaitsev *et al.*, 2004) (Figura 5A, interfase de dímeros). Este sitio se expone después de que el sitio I se una al receptor. El sitio I muestra actividad sialidásica y hemaglutinante con alta afinidad, mientras que el sitio II tiene actividad hemaglutinante y podría contribuir a la activación de la proteína F a través de la unión al receptor (Li *et al.*, 2004; Palermo *et al.*, 2009 y referencias incluidas en éste) como se resumirá más adelante (apartado 1.5 de la Introducción). Por su parte, Palermo *et al.* (2007) han demostrado para el virus parainfluenza humano tipo 3 (hPIV3) que mutaciones en el sitio I y en el sitio II de la proteína HN provocan que la afinidad por receptor de HN sea dependiente de pH.

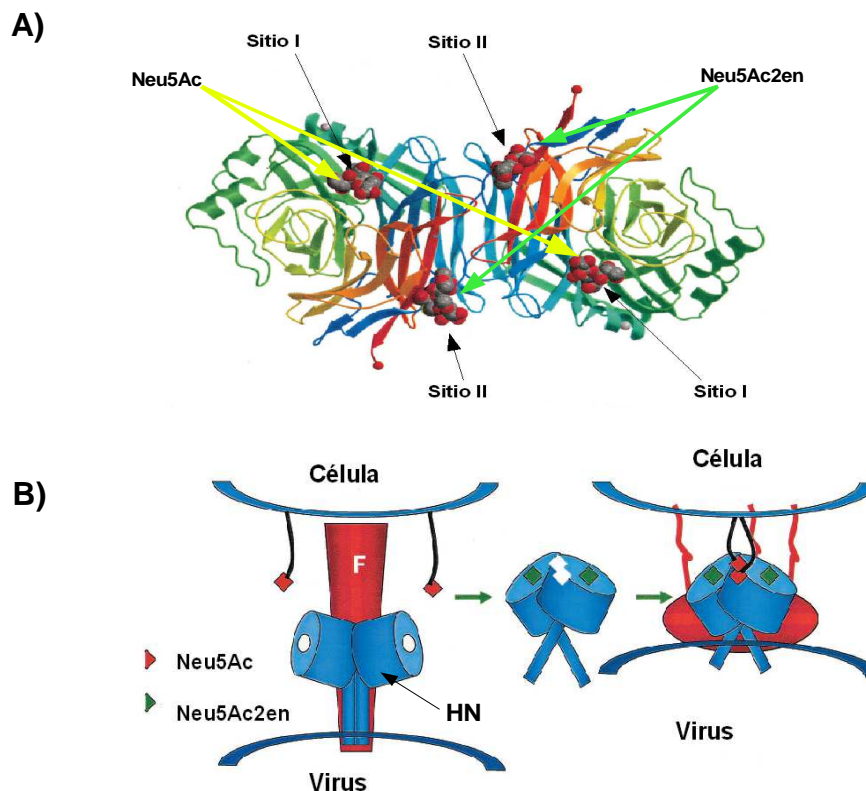


Figura 5- A) Diagrama de cintas del dímero de la proteína HN mostrando la localización de los sitios activos con el sustrato Neu5Ac2en unido (Sitio II) y los sitios de unión del ácido siálico Neu5Ac (Sitio I). B) Actividad promotora de fusión. (Izquierda) Las proteínas HN y F en estado prefusión. (Centro) Neu5Ac2en se une a la proteína HN cambiando la conformación del dímero de forma que se crean dos sitios de unión para ácido siálico. (Derecha) El cambio conformacional de HN al unirse al ácido siálico hace que la proteína F cambie a su estado fusogénico (Tomado de Zaitsev *et al.*, 2004).

Como hemos mencionado más arriba, la proteína HN es una proteína multifuncional con tres actividades que están diferenciadas topológicamente (Lamb, 1993; Sergel *et al.*, 1993a y 1993b), ya que además de las actividades hemaglutinante y sialidásica, la proteína HN tiene una tercera actividad, llamada actividad de promoción de la fusión por su relación con la actividad de la proteína F (Figura 5B). El mecanismo implicado en esta actividad promotora de fusión se desconoce con exactitud, como se comentará en el apartado 1.5. Aún no se ha establecido con claridad en qué parte de la proteína reside, ni en qué consiste exactamente dicha actividad. Se ha propuesto que estaría relacionada con su función de unión a la membrana de la célula diana. Utilizando envolturas reconstituidas con la proteína F del virus Sendai (SeV), se ha demostrado que la presencia de un elemento que realice la función de unión a la membrana (por ejemplo, una lectina) puede ser suficiente para que ocurra la fusión, aunque la presencia de la proteína HN del mismo virus incrementa fuertemente la actividad fusogénica (Bagai *et al.*, 1993). Sin embargo, en la mayoría de los paramixovirus es necesaria la co-expresión de HN y F homotípicas. Datos obtenidos con virus parainfluenza humana tipos 2 (hPIV2) y 3 (hPIV3) y con el NDV sugieren que el papel de la HN es bastante más complejo que el de servir simplemente de unión al receptor, pues ni lectinas, ni la proteína HA del virus de la gripe, ni proteínas HN heterotípicas pueden suplir la necesidad de la HN homotípica (Porotto *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 1997).

Existen numerosos trabajos que intentan dilucidar cuál es la región de la proteína HN en donde se localiza la actividad promotora de fusión. Así, se han descrito mutantes en el NDV con deleciones en la proteína HN que poseen actividad hemaglutinante, pero que carecen de actividad promotora de la fusión (Sergel *et al.*, 1993a). Nuestro grupo de investigación (Ferreira *et al.*, 2004a) ha publicado que la cabeza globular podría estar implicada, de alguna manera, en la actividad promotora de fusión de la proteína HN del NDV. Recientemente, se ha determinado la estructura atómica de la cabeza y una porción del tallo de la proteína HN del NDV por cristalografía de rayos X (Yuan *et al.*, 2011). Se ha encontrado que el tallo tiene una estructura formada por un haz de 4 hélices (4HB) desde el residuo 83 hasta el 114 y el estudio de esta región posibilita el conocimiento de los residuos que están implicados en la interacción con la proteína F y su activación (Bose *et al.*, 2011). La estructura cristalográfica del ectodominio de la proteína del HN muestra la existencia de un contacto entre el dominio con actividad sialidásica de la cabeza y la región del tallo estudiada, sugiriendo que hay una interfase funcional entre la cabeza y la parte más alta del tallo que posiblemente sea importante

tanto para la actividad sialidásica como para la activación de F tras producirse la unión al receptor. Por otro lado, el sitio II localizado en la interfase de dímeros de HN sería el responsable de regular la función promotora de fusión de la proteína HN (Porotto *et al.*, 2011 y 2012), es decir, de modular las interacciones HN-F. Se ha propuesto que el sitio II podría regular la homooligomerización de F (Porotto *et al.*, 2012) y las interacciones HN-F, según se verá más adelante (apartado 1.5, Figura 11). En resumen, aunque existe desacuerdo sobre el papel de la zona transmembranal y la cabeza globular en la especificidad de HN por la proteína F, está claro que ambas son cruciales para la promoción de la fusión.

1.4.2 LA PROTEÍNA F

Las proteínas de fusión (F) de los paramixovirus son esenciales para la penetración del virus en la célula ya que debe producirse la fusión de la envoltura de los viriones y la membrana plásmica de la célula hospedadora. La consecuencia de esta fusión es que la nucleocápsida accede al citoplasma. Más adelante, en la infección, las proteínas F expresadas en la membrana plasmática de las células infectadas pueden mediar la fusión con células vecinas y formarse sincitios, efecto citopático que conduce a la necrosis celular *in vivo* y que podría ser también un mecanismo de propagación del virus (Lamb y Parks, 2007).

La proteína F es un homotrímero que es sintetizado como un precursor inactivo F₀ de aproximadamente 65-70 kDa. Para ser biológicamente activa, debe sufrir un procesamiento proteolítico por una proteasa de la célula hospedadora. Como resultado de este corte proteolítico se libera un nuevo extremo *N*-terminal y de este modo se forma la proteína activa, que consiste en dos cadenas, F₁ y F₂, unidas por un puente disulfuro (Figura 6). Los genes de la proteína F de paramixovirus codifican entre 540 y 580 residuos. La proteína F es una proteína integral de membrana que atraviesa la membrana una vez y que contiene en su extremo *N*-terminal una secuencia con la señal para proteólisis que dirige la síntesis de la cadena polipeptídica naciente a la membrana del retículo endoplasmático. En su extremo *C*-terminal, un dominio transmembranal (TM) ancla la proteína a la membrana y deja una pequeña cola (entre 20 y 40 residuos) orientada hacia el citoplasma. Las secuencias adyacentes al péptido de fusión y al dominio TM típicamente, poseen un patrón de repeticiones hidrofóbicas y se denominan regiones heptadas repetidas A y B, HRA y HRB (Figura 6) (revisado por Lamb y Parks,

2007). Estas dos regiones están separadas por aproximadamente 250 residuos y juegan un papel importante en el mecanismo de fusión en el NDV y virus relacionados como se mencionará más adelante. La región HRA es conocida como *leuzine zipper* o cremallera de leucinas, porque los aminoácidos leucina o isoleucina se repiten cada siete aminoácidos.

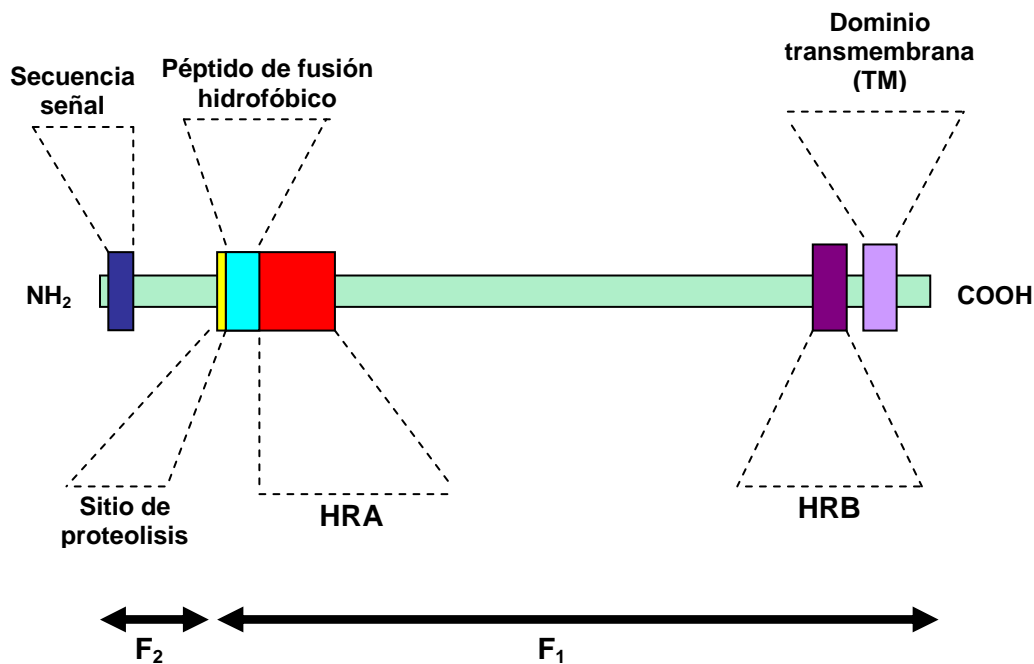


Figura 6- Representación esquemática de la proteína F del NDV.

Además del procesamiento proteolítico, la proteína F de los paramixovirus sufre otras modificaciones como la *N*-glicosilación (Yoshima *et al.*, 1981; Morrison y Portner, 1991), aunque los sitios de glicosilación no están conservados entre las diferentes especies. Las subunidades F_2 y F_1 de respirovirus y rubulavirus están glicosiladas, y hay un total de entre tres y seis sitios potenciales para la unión de glúcidos con enlaces *N*. Por ejemplo, en la proteína F de PIV5 se sabe que son utilizados los cuatro sitios potenciales para unirse glúcidos con enlaces *N*. La proteína F del virus del sarampión tiene tres sitios para unir glúcidos con enlace *N* en la subunidad F_2 y los tres son usados (revisado por Lamb y Parks, 2007). La glicosilación de la proteína F ocurre de modo cotraduccional (Doms *et al.*, 1993), y es necesaria para el plegamiento correcto de la proteína, así como para su funcionalidad (Hu *et al.*, 1995; Bagai y Lamb, 1995; McGinnes *et al.*, 2001). Otra modificación importante es la

formación de puentes disulfuro. La gran conservación de los residuos de cisteína entre las diferentes proteínas F de los paramixovirus (Morrison y Portner, 1991) sugiere que la formación de puentes disulfuro es crucial para el plegamiento y funcionalidad de la molécula. El grupo de Trudy Morrison (Jain *et al.*, 2007) ha demostrado que la reducción de puentes disulfuro de la proteína F expresada en la membrana celular por protein disulfuro isomerasa (PDI) es clave para la funcionalidad de la proteína. Por último, hay una modificación que no se da por igual en todos los paramixovirus, que es la acilación o adición de un ácido graso unido covalentemente a la proteína.

La proteína F del NDV fue cristalizada por Chen *et al.* (2001). Los datos cristalográficos muestran que esta proteína se organiza en forma de homotrímero, con tres regiones del ectodominio denominadas “cabeza”, “cuello” y “tallo” (Figura 7B). Además, en el NDV existen evidencias de una segunda forma de la proteína F que supone entre un 10 % y 50 % del total de esta proteína. En esta segunda versión de la proteína, las secuencias F₂ y HRA de la cadena F₁ están translocadas a través de la membrana, y el dominio TM está invertido de forma que la cola citoplasmática queda expuesta en la superficie celular. Se ha propuesto que la mayoría de los residuos de F₁ estarían en el citoplasma. Hay anticuerpos que reconocen la cola citoplasmática de la proteína F del NDV en la superficie celular, en el caso de esta segunda versión de la proteína F, y bloquean la fusión mediada por F, lo cual sugiere que ambas formas de la proteína F del NDV son necesarias para la actividad fusogénica. Esta segunda forma de la proteína no se ha encontrado en otros paramixovirus y no está claro por qué sería diferente en el caso del NDV (revisado por Lamb y Parks, 2007).

Estructura de las proteínas de fusión víricas de la clase I

Estructuralmente, las proteínas de fusión de virus con membrana se clasifican en dos tipos, clase I, cuyo prototipo es la proteína HA del virus de la gripe, y clase II, cuyo prototipo es la glicoproteína E del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBE) (Kielian y Rey, 2006). La proteína F de paramixovirus pertenece a la clase I.

El mecanismo general de fusión de estas proteínas de la clase I consiste en pasar una proteína desde un estado metaestable hasta llegar a un estado postfusogénico más estable (estado post-fusión) a través de grandes cambios conformacionales, como se explicará en el siguiente apartado.

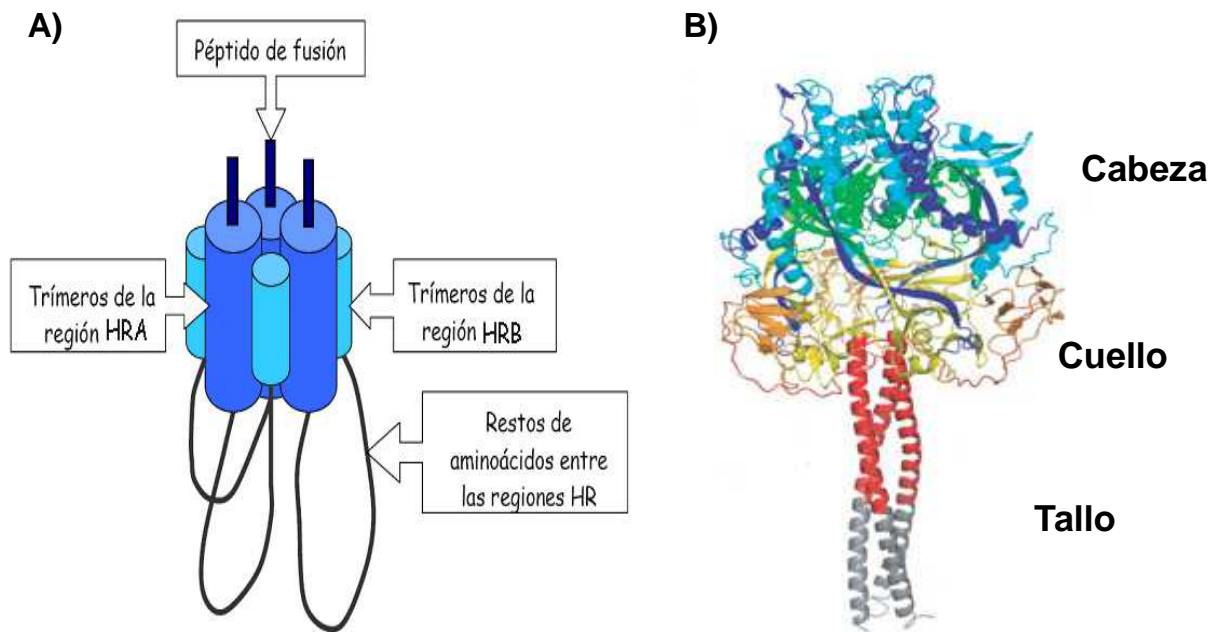


Figura 7- A) Modelo propuesto para la disposición de las regiones HR en la proteína F durante el proceso de fusión en la conformación postfusogénica. B) Diagrama de cintas del trímero de la proteína F de PIV5. Las cadenas están coloreadas desde azul (*N*-terminal) a rojo (*C*-terminal) (Tomado de Yin *et al.*, 2006).

Los datos biofísicos indican que las secuencias HRA y HRB (Figura 6) forman un complejo en el estado postfusogénico; concretamente los estudios cristalográficos revelan que HRA y HRB forman una horquilla helicoidal o estructura de seis hélices llamada *six-helix bundle* (6HB) que está formada por seis hélices superenrolladas, tres hélices interiores que corresponden a la HRA rodeadas por tres hélices exteriores correspondientes a la HRB (Figura 7A). Es decir, la estructura postfusogénica de estas proteínas de fusión consiste en una estructura de hélice superenrollada trimérica cerca del extremo *C*-terminal del péptido de fusión hidrofóbico correspondiente a 3 HRA; el segmento *C*-terminal que está al lado del dominio TM se empaqueta de forma antiparalela alrededor del extremo *N*-terminal superenrollado, situando los péptidos de fusión y los anclajes TM en el mismo extremo de estructura en horquilla (Figura 7A). Antes de adquirir esta estructura postfusogénica (horquilla), los intermediarios prehorquilla (Figura 9b) que se forman a lo largo del proceso de fusión pueden ser atrapados por la adición de péptidos derivados de las regiones heptadas repetidas (HRA o HRB) en el caso de muchas proteínas de fusión de la clase I, indicando que la proteína

intacta sufre cambios conformacionales que exponen ambas regiones HR, antes de empaquetarse en la forma final 6HB. Se cree que los intermediarios prehorquilla representan formas parcialmente plegadas de la proteína de fusión, con un péptido de fusión hidrofóbico anclado en la membrana de la célula diana y los dominios TM anclados a la membrana vírica con los trímeros de la región HRA ya formados en este intermediario prehorquilla. Finalmente, la formación del 6HB está estrechamente relacionada con la mezcla de las dos bicapas de las membranas y probablemente estaría asociado con la energía libre liberada en el empaquetamiento de la proteína durante el proceso de fusión de membranas (Lamb y Parks, 2007).

1.5 FUSIÓN DE MEMBRANAS

Los virus con envoltura tienen una bicapa lipídica que deriva de la membrana de la célula hospedadora. Esta membrana protege el material genético hasta que es liberado en el citoplasma. Para ello se tiene que producir la fusión entre la membrana vírica y la de la célula hospedadora o la de algún compartimento endocítico, ya sea a nivel de la membrana plasmática o a nivel intracelular en el caso de virus que hayan sido adsorbidos por endocitosis (Earp *et al.*, 2005; Smith y Helenius, 2004). La fusión de membranas es un paso crucial en la infección vírica y está mediado por proteínas transmembranales de la superficie del virus. Se ha demostrado que en este proceso las proteínas de fusión víricas cambian de una conformación preactiva original a otra postactiva final a través de otras conformaciones intermedias, probablemente más inestables. Según se ha resumido en el apartado anterior, este cambio es esencial para que se produzca la fusión de membranas (Lamb, 1993; Hernández *et al.*, 1996; Chan y Kim, 1998; Skehel y Wiley, 1998; Weissenhorn *et al.*, 1999).

El proceso de fusión de los virus que fusionan directamente con la membrana plasmática es activado presumiblemente por la interacción del virus con su receptor a pH neutro. Por su parte, la fusión de los virus que utilizan rutas endocíticas es activada por la exposición de las proteínas a pH ligeramente ácido. Las vesículas de endocitosis fusionan con lisosomas donde encuentran estas condiciones adecuadas para la inducción

del cambio conformacional que necesitan las proteínas de fusión. Ejemplos de virus que fusionan a pH ácido son el virus de la gripe (Skehel y Wiley, 2000), el virus de la estomatitis vesicular (VSV) o el virus del bosque de Semliki (SFV) (Hernández *et al.*, 1996). Como se ha comentado anteriormente, en los paramixovirus se ha admitido que la fusión ocurre en la superficie celular y es independiente del pH. Sin embargo, por primera vez para un paramixovirus, como se ha indicado también previamente en esta Memoria, nuestro grupo demostró que el NDV utiliza la vía endocítica como mecanismo alternativo de entrada en la célula, así como que el pH es activador de la fusión vírica (San Román *et al.*, 1999; Cantín *et al.*, 2007).

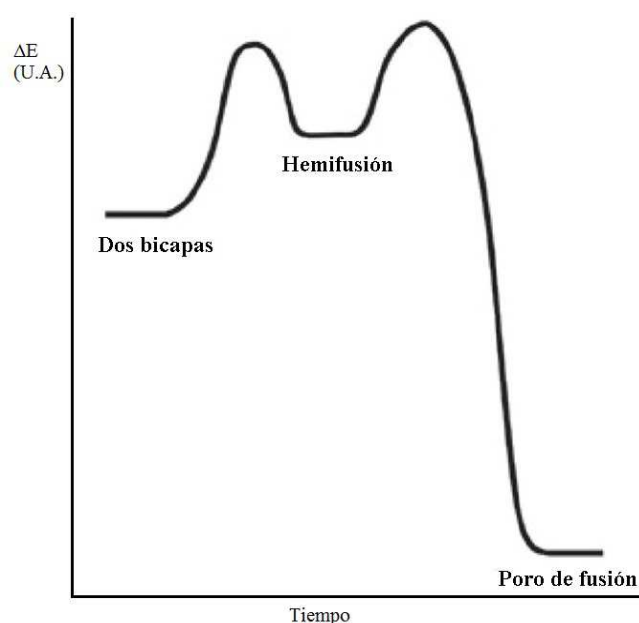


Figura 8- Diagrama representativo de los cambios de energía que se producen durante la fusión (las proporciones entre las diferentes barreras son arbitrarias) (Harrison, 2008).

La fusión de las dos membranas es termodinámicamente favorable aunque existe una gran barrera cinética (Figura 8) (Chernomordik y Kozlov, 2003; Chernomordik *et al.*, 2006). Las proteínas de fusión víricas utilizan la energía libre liberada durante el cambio conformacional de la proteína F resumido más arriba (es decir, cambio desde la conformación metaestable a la postfusogénica final) para acercar las dos membranas. Se produce un estado intermedio llamado hemifusión en el cual se mezclan los lípidos de

las capas externas de la envuelta del virus y de la membrana de la célula hospedadora (Harrison, 2008).

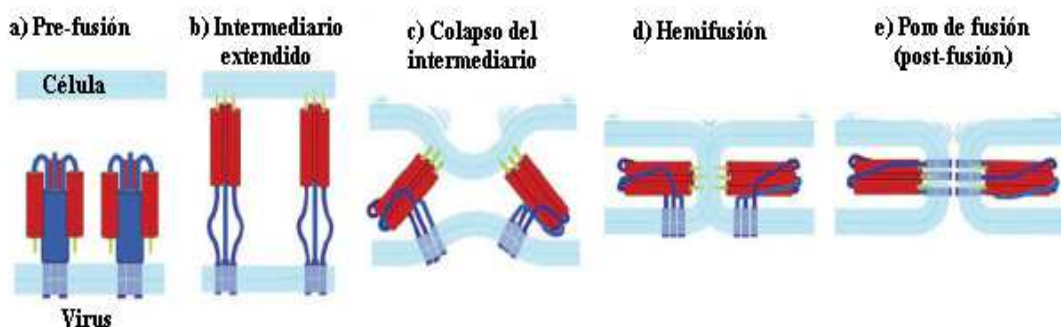


Figura 9- Secuencia de eventos del proceso de fusión de membranas promovido por la proteína de fusión vírica (Harrison, 2008).

Las evidencias acumuladas sugieren que las proteínas de fusión víricas bajan la barrera energética y catalizan el proceso de fusión de la siguiente manera:

1) La proteína forma un puente entre las dos bicapas que recibe el nombre de “intermediario *pre-hairpin* o pre-horquilla” (Figura 9b). Este intermediario puede tener relativamente una vida media larga, como ocurre con la proteína gp41 de HIV-1 que es de varios minutos, o durar tan solo unos segundos (Harrison, 2008).

2) El puente se pliega (Figura 9c) de manera que se sitúan juntos el péptido de fusión en la membrana diana y el dominio C-terminal en la membrana vírica. Este plegamiento distorsiona las dos bicapas, formándose una especie de protuberancia en ambas, de manera que hay un área donde se aproximan más (Kuzmin *et al.*, 2001; Harrison, 2008).

3) La distorsión individual de las dos membranas disminuye la barrera energética entre las bicapas separadas y hemifusionadas de modo que se forma una región de hemifusión (Figura 9d).

4) La región de hemifusión se abre para formar un poro de fusión transitorio. Un último cambio conformacional en la proteína F hace que el estado abierto sea irreversible y el poro se expanda (Figura 9e). En muchos de los casos, los pasos 3 y 4 probablemente requieran de la acción conjunta de más de un trímero de proteínas de fusión.

Para que la proteína F sufra estos cambios conformacionales precisa de la activación de la proteína HN, en un mecanismo aún por esclarecer. Recientemente, Porotto *et al.* (2011 y 2012) han propuesto un nuevo modelo de interacción HN-F durante la fusión de paramixovirus según el cual, una vez que se produce la unión al receptor, HN activa la proteína F para que avance a través de una serie de intermediarios transitorios que preceden (pero no dependen) de la inserción del péptido de fusión en la célula diana. Se requiere la unión continua de HN al receptor para que se produzca la evolución de F por estos intermediarios transitorios; en particular, la unión al receptor es necesaria todavía después de la inserción del péptido de fusión en la membrana de célula diana para que la proteína F pueda sufrir el cambio conformacional que da lugar a la conformación más estable (de menor energía) que conduce a la mezcla de membranas. Proponen que el papel de la interacción de HN con el receptor en el proceso de fusión no solo está limitado a la iniciación de la cadena de reajustes estructurales que sufre la proteína F, sino que continúa jugando un papel importante en el progreso de F a través de sus estados transitorios desde intermediario prehorquilla hasta cuando el péptido de fusión se inserta en la célula diana. Este modelo se describe en la siguiente figura (Figura 10).

Las proteínas HN y F estarían asociadas antes de la unión al receptor (Porotto *et al.*, 2011 y 2012). El primer paso es la unión de HN al receptor sialilado presente en la membrana diana (Figura 10A y 10B) iniciándose así los cambios conformacionales de la proteína F nativa (Figura 10C). La interacción de HN con el receptor determina la formación de agrupaciones HN-F (*clusters*) en el sitio de fusión. El cambio conformacional inicial de F forma un intermediario previo a la inserción del péptido de fusión en la membrana de la célula diana. Con la unión continua de HN al receptor, F procede a insertar el péptido de fusión en la membrana de la célula hospedadora, alcanzando el estado de prehorquilla (Figura 10D). Si la unión de HN al receptor es interrumpida con zanamivir, una sustancia que bloquea la interacción HN-receptor (análogo de receptor, ver Figura 13 pág. 34), la fusión se para en el estado de preinserción (Figura 10F). Mientras HN continúa unida al receptor, F desencadena el proceso de fusión de membranas (Figura 10E), proceso que puede quedar parado de nuevo si la unión HN-receptor se interrumpe con el inhibidor zanamivir (Figura 10G).

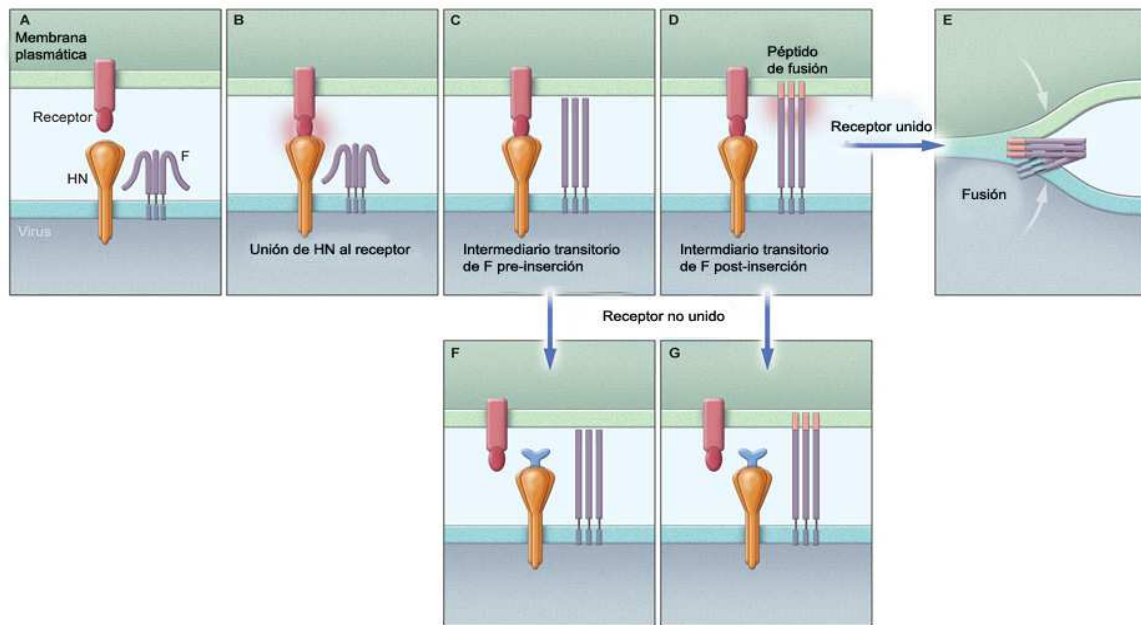


Figura 10- Modelo de interacción HN-F durante la fusión de paramixovirus (Porotto *et al.*, 2011).

Por tanto, este modelo indica una participación mayor de la proteína HN en el proceso de fusión de la descrita hasta ahora, un proceso en el cual se requiere la continua unión al receptor para la activación de F.

Como ya se ha mencionado, el sitio II de la cabeza globular de la proteína HN podría ser clave en la regulación de las interacciones HN-F necesarias para la fusión. El grupo de Anne Moscona (Porotto *et al.*, 2011) ha realizado estudios con una proteína quimérica compuesta por el tallo de la proteína G del virus Nipah (proteína de unión al receptor sin actividad sialidásica) y la cabeza globular de la proteína HN del NDV (G-HN). El modelo que ilustra la hipótesis sobre el papel del sitio II en la activación de F puede verse en la Figura 11. La proteína quimérica G-HN se une al receptor de la membrana de la célula diana (Figura 11A y 11B) pero es rápidamente separado por la actividad sialidásica del sitio I de la proteína HN (Figura 11C), y el resultado de esta unión transitoria al receptor es que fallaría la activación de la proteína F (del virus Nipah). Sin embargo, si se activa la unión del sitio II de HN al receptor mediante la interacción del inhibidor zanamivir con el sitio I (Figura 11E) (recordar que el sitio II se desenmascara después de la interacción del sitio I con el receptor, y que carece de actividad sialidásica), la unión al receptor dura más tiempo. De este modo, si la proteína

quimérica permanece continuamente unida al receptor, la proteína F lleva a cabo la fusión de membranas de manera eficiente (Figura 11F).

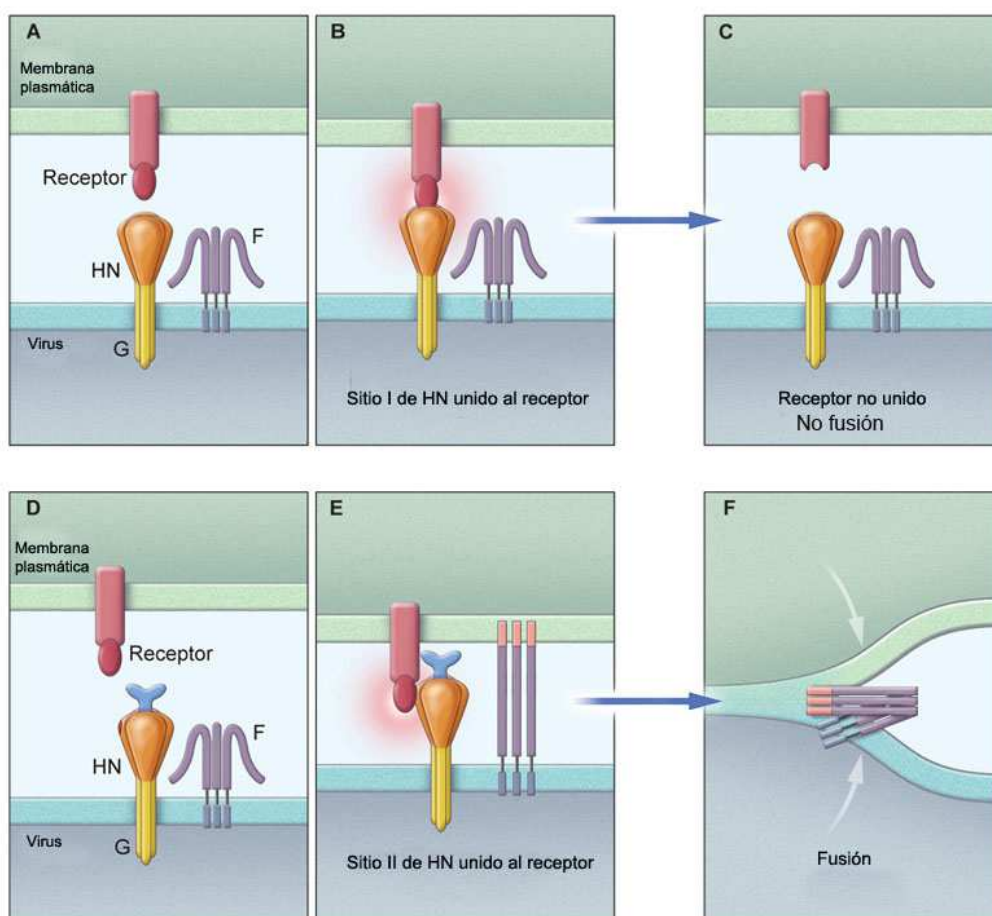


Figura 11- Representación esquemática del papel del sitio II de la proteína quimérica G-HN en la activación de la proteína F (Porotto *et al.*, 2011).

Estas observaciones podrían tener relevancia clínica ya que muchas estrategias antivíricas se han centrado en la proteína de fusión (por ejemplo péptidos inhibitorios derivados de regiones HR, como el medicamento antisida Fuzeon o Enfuvirtide). Teniendo en cuenta lo expuesto en párrafos anteriores, debería considerarse también la proteína HN en estas estrategias ya que puede activar eficientemente F, lo que podría determinar que se desarrollara resistencia a inhibidores frente a la proteína de fusión.

1.6 RECEPTORES VÍRICOS

Los receptores víricos se definen como moléculas de la célula diana que permiten a los virus adsorberse a la célula e iniciar la infección. Se han identificado varias moléculas como receptores de virus, por ejemplo, el CD4 para HIV e ICAM-1 para rinovirus. En el virus de la gripe se identificó hace unos 50 años que los restos de ácido siálico eran las moléculas responsables de la unión del virus a la célula hospedadora (Gottschalk, 1959) y desde entonces se ha establecido que los virus de la gripe A y B pueden unirse a residuos de ácido siálico que están presentes tanto en glicoproteínas como en glicolípidos. Además, la conformación específica del enlace del ácido siálico $\alpha 2 \rightarrow 3$ vs $\alpha 2 \rightarrow 6$ se conoce bien ya que establece el tropismo de este virus (Chu y Whittaker, 2004).

Los ácidos siálicos son una familia de moléculas de glúcidos cargados negativamente que se encuentran en la superficie de todo tipo de células en el extremo de glicoconjugados. Estos glúcidos ácidos, con un esqueleto de nueve carbonos (Figura 13), decoran todas las superficies celulares y forman parte de la mayoría de las proteínas secretadas por vertebrados, mediando o modulando una gran variedad de procesos normales y patológicos. En primer lugar, debido a su carga negativa y su hidrofiliidad, los ácidos siálicos tienen muchas funciones estructurales y modulatorias. En segundo lugar, forman parte de los sitios de unión para varios patógenos y toxinas, como los que se señalan en la Tabla 1 (Varki, 2008 y las referencias dentro de la revisión).

En las células de mamíferos, los restos de ácidos siálicos se encuentran localizados en el extremo de los glicanos unidos a glicoproteínas, glicoesfingolípidos y a proteoglicanos como queratán sulfato. Miembros de al menos siete familias de virus (*Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Coronaviridae*, *Reoviridae*, *Picornaviridae*, *Papomaviridae* y *Adenoviridae*) incluyendo virus con envoltura y sin ella, y virus RNA y DNA, utilizan sialoglicoconjugados como receptores de la célula diana. Los ácidos siálicos de los glicanos normalmente se unen con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$ o $\alpha 2 \rightarrow 6$ a una galactosa terminal o con $\alpha 2 \rightarrow 8$ a otro resto de ácido siálico interno. Las diferentes combinaciones de los enlaces glicosídicos y las numerosas sustituciones que pueden ocurrir en el anillo piranósico y las cadenas laterales de ácidos siálicos generan una diversidad considerable de estructuras glucídicas sialiladas. Algunos virus tienen preferencia por ácidos siálicos unidos con un determinado enlace glicosídico, y esta

especificidad puede contribuir al rango de hospedadores del virus, al tropismo tisular, y a la patogénesis (Nokbeh *et al.*, 2005 y las referencias incluidas en el artículo).

Patógeno	Proteína de unión	Secuencia sialilada reconocida en la célula diana
Virus de la gripe humana A	Hemaglutinina	*Sia α 2 \rightarrow 6Gal(NAc)
Virus de la gripe aviar A	Hemaglutinina	Sia α 2 \rightarrow 3Gal β 1-
Virus de la gripe humana C	Hemaglutinina-esterasa	9-O-Ac-Sia α 2-
<i>Vibrio cholerae</i>	Toxina	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1-4(Sia α 2 \rightarrow 3)Lac-Cer
<i>Plasmodium falciparum</i>	EBA-175	Sia α 2 \rightarrow 3Gal β 1-3(Sia α 2 \rightarrow 6)GalNAc-O
<i>Clostridium botulinum</i>	Toxina	Polisialogangliósidos
<i>Helicobacter pylori</i>	SabA	Sia α 2 \rightarrow 3Gal de gangliósidos

Tabla 1- Ejemplos de proteínas de unión de distintos patógenos y secuencias sialiladas que reconocen en la célula diana (*Sia = ácido siálico).

1.6.1 RECEPTORES DE LOS PARAMIXOVIRUS

Como se ha señalado anteriormente, se define el receptor vírico como la molécula o moléculas presentes en la superficie de la célula hospedadora que son reconocidas específicamente por el virus; después de la unión virus-receptor comienza la infección. Aunque está bien establecido que la mayoría de los paramixovirus se unen a receptores celulares que poseen restos de ácidos siálicos, la naturaleza exacta de los receptores, (aparte de que son compuestos sialilados), y el mecanismo vírico de unión a los mismos no se conocen con exactitud. Se cree que tanto las sialoglicoproteínas como los gangliósidos pueden servir como receptores víricos, aunque los paramixovirus no se unen de forma indiscriminada a todas las moléculas que contienen restos de ácidos siálicos presentes en la superficie de la célula (Villar y Muñoz Barroso, 2006 y las referencias incluidas en éste). En los paramixovirus, la proteína HN reconoce los restos de ácidos siálicos en la superficie de la célula diana y tiene la capacidad de separarlos debido a su actividad sialidásica (Lamb y Kolakofsky, 2001). La estructura de la cabeza globular de la proteína HN (Crennell *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 2005) revela que hay un

motivo conservado que es una hélice β , como se identificó originalmente en la proteína NA del virus de la gripe (Varghese *et al.*, 1983), pero con un sitio de unión a ácido siálico en cada monómero del homotetrámero, que puede participar tanto en la unión al receptor como en la actividad sialidásica (sitio I) (Figura 5).

Como se ha mencionado anteriormente en esta Memoria, en la proteína HN del NDV se ha identificado un segundo sitio de unión al receptor (sitio II) en la interfase de los dímeros (Zaitsev *et al.*, 2004) (Figura 5) el cual ha sido postulado también en la proteína HN de hPIV3 (Porotto *et al.*, 2007). A diferencia de HN, la hemaglutinina (H) del virus del sarampión (MV) no presenta actividad sialidásica y reconoce proteínas específicas como SLAM y CD46 (revisado en Iorio y Mahon, 2008)

Las proteínas HN de diferentes paramixovirus son capaces de reconocer restos de ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2 \rightarrow 3$ a galactosa (Markwell y Paulson, 1980, revisado en Herrler *et al.*, 1995), pero no reconocen sustratos que contienen restos de ácidos siálicos unidos en $\alpha 2 \rightarrow 6$; sin embargo sí reconocen el grupo disialo Neu5Ac- $\alpha 2 \rightarrow 8$ Neu5Ac unido con enlace $\alpha 2 \rightarrow 3$ a galactosa (Markwell *et al.*, 1981).

Los factores de los que depende el reconocimiento de restos de ácidos siálicos presentes en los receptores víricos por la proteína de unión al receptor son los siguientes:

- 1- El tipo de ácido siálico, principalmente ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) y ácido *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc).
- 2- El tipo de enlace que conecta el residuo de ácido siálico con el oligosacárido.
- 3- La secuencia de la cadena oligosacáridica.
- 4- El número de residuos de ácido siálico de la molécula sialilada.
- 5- La disposición espacial de los residuos de ácido siálico.

Un gran número de estudios han demostrado que los gangliósidos de las series gangliotetraosa, que contienen Neu5Ac en la galactosa terminal como son GD1a, GT1b y GQ1b (Figura 12), y gangliósidos de las series neolacto, son los principales receptores del virus Sendai (referencias en Villar y Muñoz Barroso, 2006). Sin embargo, este virus no reconoce gangliósidos sin restos de ácidos siálicos unidos a la galactosa terminal (GM1 o GD1b) (Markwell *et al.*, 1981) (Figura 12). En relación con la especificidad de

enlace, el virus Sendai reconoce gangliósidos con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$ pero no $\alpha 2 \rightarrow 6$, a diferencia de algunas cepas del virus de la gripe (Muthing y Unland, 1994).

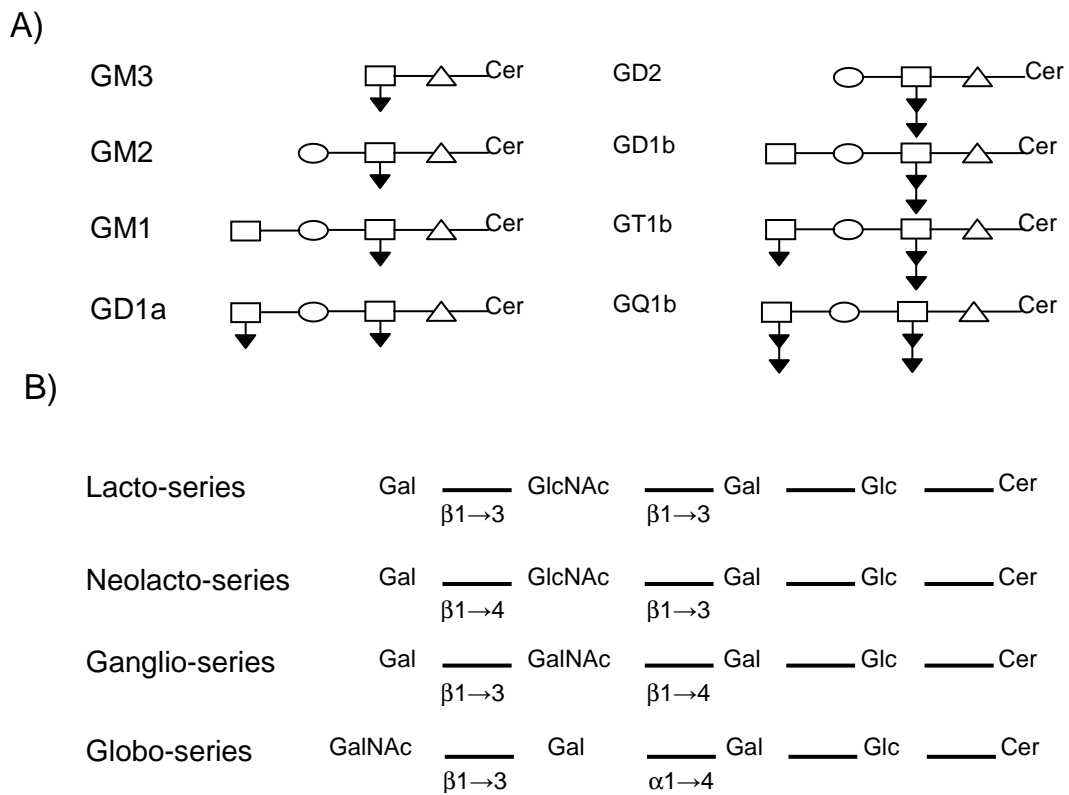


Figura 12- A) Estructura química de algunos gangliósidos. Cer, ceramida, Δ , glucosa; \square , galactosa; \circ , *N*-acetilgalactosamina; \blacktriangledown , ácido *N*-acetilneuramínico. B) Núcleo de la estructura de la cadena glucídica de diferentes series de gangliósidos (Tomado de Villar y Muñoz-Barroso, 2006).

Como se ha indicado más arriba, los sialoglicolípidos y las sialoglicoproteínas son los receptores potenciales para la mayoría de los paramixovirus. Gran parte de la información que se tiene hoy en día es sobre los virus Sendai y NDV. En la Tabla 2 se resumen los diferentes tipos de receptores de los paramixovirus.

Introducción

Virus	Proteína de unión	Receptor
Género Respirovirus Virus Sendai	HN	Gangliósidos de las series gangliotetraosa con Neu5Ac unido a la galactosa terminal con enlace $\alpha 2 \rightarrow 3$ y gangliósidos de la series neolacto; glicoforina y GP-2
hPIV1		Oligosacáridos con ramificaciones de <i>N</i> -acetillactosaminoglicanos con Neu5Ac unido a la galactosa terminal con enlace $\alpha 2 \rightarrow 3$
hPIV		Oligosacáridos con ramificaciones de <i>N</i> -acetillactosaminoglicanos con Neu5Ac unido a la galactosa terminal con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$, $\alpha 2 \rightarrow 6$ o receptores que contegan Neu5Gc unido a galactosa con enlace $\alpha 2 \rightarrow 3$
Género Avulavirus NDV	HN	Oligosacáridos lineales de las series lacto y GM3, llevando ambos los ácidos siálicos Neu5Ac o Neu5Gc; diferentes gangliósidos como GM3, GD1a y GT1b, GM2, GM1, o GD1b; <i>N</i> -glicoproteínas
Género Rubulavirus PIV5 Virus de las paperas PIV2 PIV4	HN	Moléculas sialiladas
Género Morbilivirus Virus del sarampión	H	CD46 y SLAM
Género Pneumovirus RSV	G	Glicosaminoglicanos
Género Henipavirus Hendra virus Nipah virus	G	Proteína de superficie

Tabla 2- Posibles receptores para algunos miembros de la familia *Paramyxoviridae* (tomado de Villar y Muñoz-Barroso, 2006).

En el caso del NDV, los primeros trabajos realizados en los años 50 y 70 determinaron que el virus interacciona con sialoglicoconjugados a través de Neu5Ac (revisado en Markwell, 1981). Usando eritrocitos que tenían diferentes gangliósidos en la membrana (Suzuki *et al.*, 1985), se concluyó que los determinantes de receptor para NDV eran lacto-series lineales de oligosacáridos y GM3 (Figura 12). Sin embargo, experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio (Ferreira *et al.*, 2004b) indican que el NDV interacciona con diferentes monosialogangliósidos, disialogangliósidos y trisialogangliósidos. Además, el NDV reconoce ácidos siálicos unidos a diferentes restos glucídicos terminales, tales como GM3, GD1a y GT1b, o ácidos siálicos unidos a restos glucídicos internos, como en GM2, GM1 o GD1b. Estos datos de nuestro laboratorio parecen señalar que no hay un patrón de gangliósidos que interaccione de forma específica con el NDV. Asimismo, trabajos centrados en la especificidad de unión de los virus parainfluenza humano tipos 1 y 3 muestran que la variabilidad en la especificidad de receptor podría depender de los diferentes subtipos de virus. Los virus hPIV1 y hPIV3 reconocen preferentemente oligosacáridos que contengan ramificaciones de *N*-acetilactosaminoglicanos con Neu5Ac α 2 \rightarrow 3Gal al final, y hPIV-3 también reconoce receptores que contengan Neu5Ac α 2 \rightarrow 6Gal- o Neu5Gc α 2 \rightarrow 3Gal- (Suzuki *et al.*, 2001).

Del mismo modo, los ortomixovirus como los virus de la gripe A y B reconocen sólo glicoconjugados que contengan restos de ácidos siálicos. Las distintas cepas del virus de la gripe varían en el tipo de enlace que reconocen (α 2 \rightarrow 3 o α 2 \rightarrow 6) y el tipo de residuo de ácido siálico (Neu5Ac, NeuGc, o 9-*O*-Ac-Neu5Ac) (revisado en Herrler *et al.*, 1995).

Por otro lado, hay muchos menos trabajos sobre el papel de las glicoproteínas como receptores víricos. En un trabajo realizado por Chu y Whittaker con células Lec1 (deficientes en la *N*-glicosilación terminal) se señala que los virus de la gripe requieren específicamente *N*-glicoproteínas para entrar en las células; sin embargo el ácido siálico, aunque actúa de forma eficiente como factor de unión, no es suficiente como receptor de estos virus *in vivo* (Chu y Whittaker, 2004). Algunos estudios revelan que, además de los gangliósidos, el virus Sendai utiliza glicoproteínas sialiladas como receptores, por ejemplo, la glicoforina o la GP-2. En el caso del NDV nuestro grupo ha demostrado que se requieren las *N*-sialoglicoproteínas de la superficie celular para que

la fusión y la entrada del virus sea óptima, con lo cual ambos, *N*-sialoglicoproteínas y gangliósidos podrían actuar como receptores para NDV (Ferreira *et al.*, 2004b).

La interacción del virus con la superficie de la célula hospedadora puede ser un complejo escenario de interacciones entre ambos. Se ha sugerido que la unión del virus a la célula podría ser un proceso que implica múltiples pasos. Es posible que el receptor vírico consista en un complejo de diferentes componentes celulares que incluiría glicolípidos como los gangliósidos, glicoproteínas y otras proteínas. Este podría ser el caso de los paramixovirus, en los cuales los virus usarían diferentes moléculas que tendrían distintos papeles en el proceso de unión virus-célula, por ejemplo, receptores primarios y secundarios. En este sentido, se ha propuesto que los gangliósidos podrían actuar en unos casos como receptores víricos primarios y en otros como correceptores.

1.6.2 ANÁLOGOS DEL ÁCIDO SIÁLICO Y AGENTES ANTIVIRALES

Una de las estrategias antivíricas con más futuro consiste en el diseño de análogos de ácidos siálicos específicos que inhiban las actividades sialidásica y de unión al receptor de la proteína HN del virus y de este modo prevenir la infección por paramixovirus. El estudio de los análogos de ácidos siálicos comenzó a principio de los años 70 con la proteína HA del virus de la gripe como diana. Compuestos como el ácido 2,3-dehidro-2-deoxi-*N*-acetil neuramínico (Neu5Ac2en o DANA) (Figura 13) y el ácido 2-deoxi-2,3-dehidro-*N*-trifluoroacetilneuramínico (FANA) actúan como inhibidores específicos de la sialidasa del virus de la gripe. Se ha demostrado que el análogo de estado de transición del ácido siálico 4-guanidino-Neu5Ac2en o 4-GU-DANA (también llamado Zanamivir), diseñado a partir de la estructura del cristal de la proteína HA del virus de la gripe para que encaje en el sitio catalítico, ha resultado ser un agente antivírico efectivo y se utiliza en el tratamiento clínico de infecciones del virus de la gripe (Hayden *et al.*, 1997; Monto *et al.*, 1999). Los análogos DANA, FANA y 4-GU-DANA (Zanamivir) también inhiben las actividades sialidásica y de unión al receptor del virus hPIV3 según se ha comentado en el apartado 1.5. Sin embargo, se requieren concentraciones más altas de 4-GU-DANA para inhibir la actividad enzimática en paramixovirus que en el virus de la gripe, haciendo que este compuesto no sirva para el tratamiento o profilaxis de infecciones causadas por paramixovirus. Además, en el caso

del NDV, el 4-GU-DANA inhibe la actividad sialidásica de su proteína HN pero no su actividad hemaglutinante (Porotto *et al.*, 2004). Desde que hay datos cristalográficos de las proteínas HN del NDV y el hPIV3, estas estructuras están siendo muy útiles como modelos para diseñar inhibidores específicos de paramixovirus humanos y no humanos. Este es el caso de dos potentes inhibidores de los virus de parainfluenza humanos, BCX 2798 y BCX 285, dos derivados del Neu5Ac2en, que fueron diseñados a partir de la estructura tridimensional de la proteína HN (Alymova *et al.*, 2004). Además, el análogo ácido α -2-S-metil-5-n-tioacetilneuramínico (α -Neu5thioAc2SMe) (Figura13), un análogo de ácido siálico modificado en C-2 y C-5, se ha demostrado que inhibe la fusión de hPIV3 con células y la replicación vírica en cultivos celulares. Los datos cristalográficos de la glicoproteína del NDV unida con Neu5Ac2en indican que una modificación en el C-4 de Neu5Ac2en puede ser útil para el desarrollo de agentes anti-paramixovirus (revisado en Villar y Muñoz -Barroso, 2006).

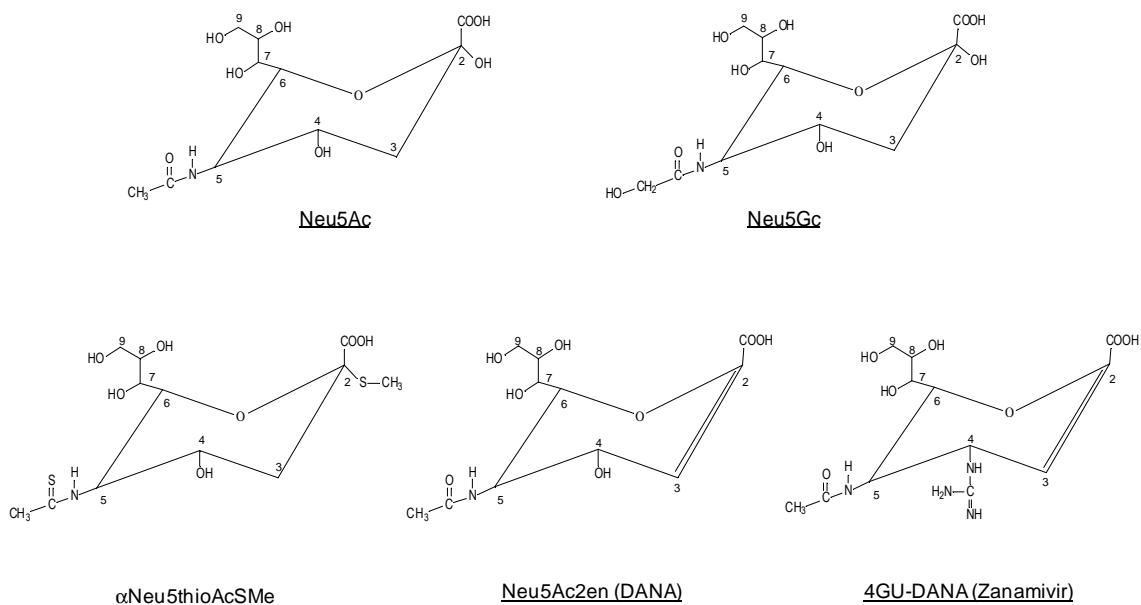


Figura 13- Estructura química de los ácidos siálicos Neu5Ac y Neu5Gc y de los análogos sintéticos de ácidos siálicos que son inhibidores hipotéticos de la entrada de Paramixovirus (Tomado de Villar y Muñoz-Barroso, 2006).

Recientemente, se han descrito un nuevo tipo de inhibidores de hPIV3 como el CSC11 (Figura 14) que uniéndose al sitio II de la cabeza globular de HN estimulan la activación prematura de la proteína F antes de interactuar con la membrana. De este

modo se inactiva la proteína de fusión incapacitando al virión antes de que pueda alcanzar su diana e interactuar de forma adecuada con los receptores celulares (Farzan *et al.*, 2011).

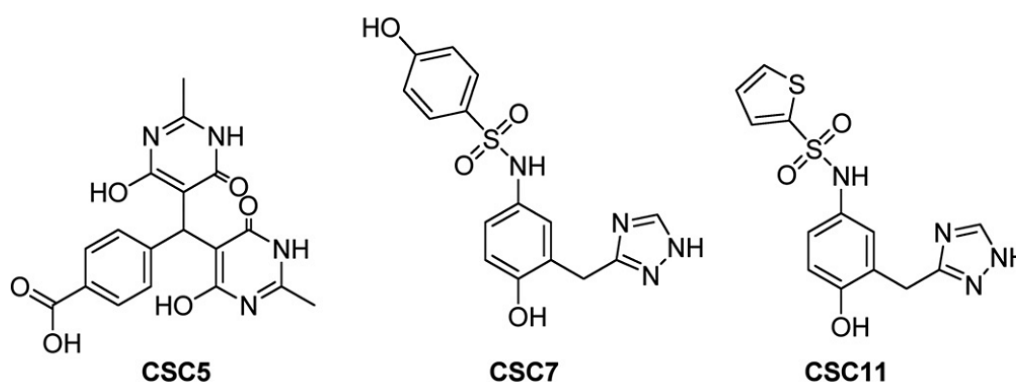


Figura 14- Estructura química de los compuestos inhibidores CSC5, CSC7 y CSC11 (Farzan *et al.*, 2011).

1.7 RUTAS DE ENTRADA DE VIRUS ENVUELTOS

Los virus envueltos pueden entrar en la célula bien por endocitosis mediada por receptor o bien por fusión directa de la envoltura vírica y la membrana plasmática. Los virus que requieren pH ácido para fusionar, como los virus de la gripe y el virus de la estomatitis vesicular (VSV), utilizan la maquinaria endocítica celular, ya que la mayoría de las rutas endocíticas convergen en endosomas acidificados. Otros virus, como el Ébola, necesitan que sus proteínas de fusión sean expuestas a proteasas dependientes de pH antes de que ocurra la fusión. En estos casos, la fusión virus-célula ocurre en algún lugar de la ruta endocítica. Los virus con proteínas de fusión independientes de pH, como paramixovirus y retrovirus, se cree que generalmente penetran en la célula fusionando directamente con la membrana plasmática, ya que la mayoría de los virus de estas familias pueden infectar las células eficientemente en presencia de agentes que suben el pH de los endosomas como el cloruro de amonio. Sin embargo, hay estudios recientes que sugieren que virus cuyas proteínas de fusión son independientes del pH pueden utilizar también mecanismos de endocitosis (Smith *et al.*, 2009 y referencias incluidas en éste).

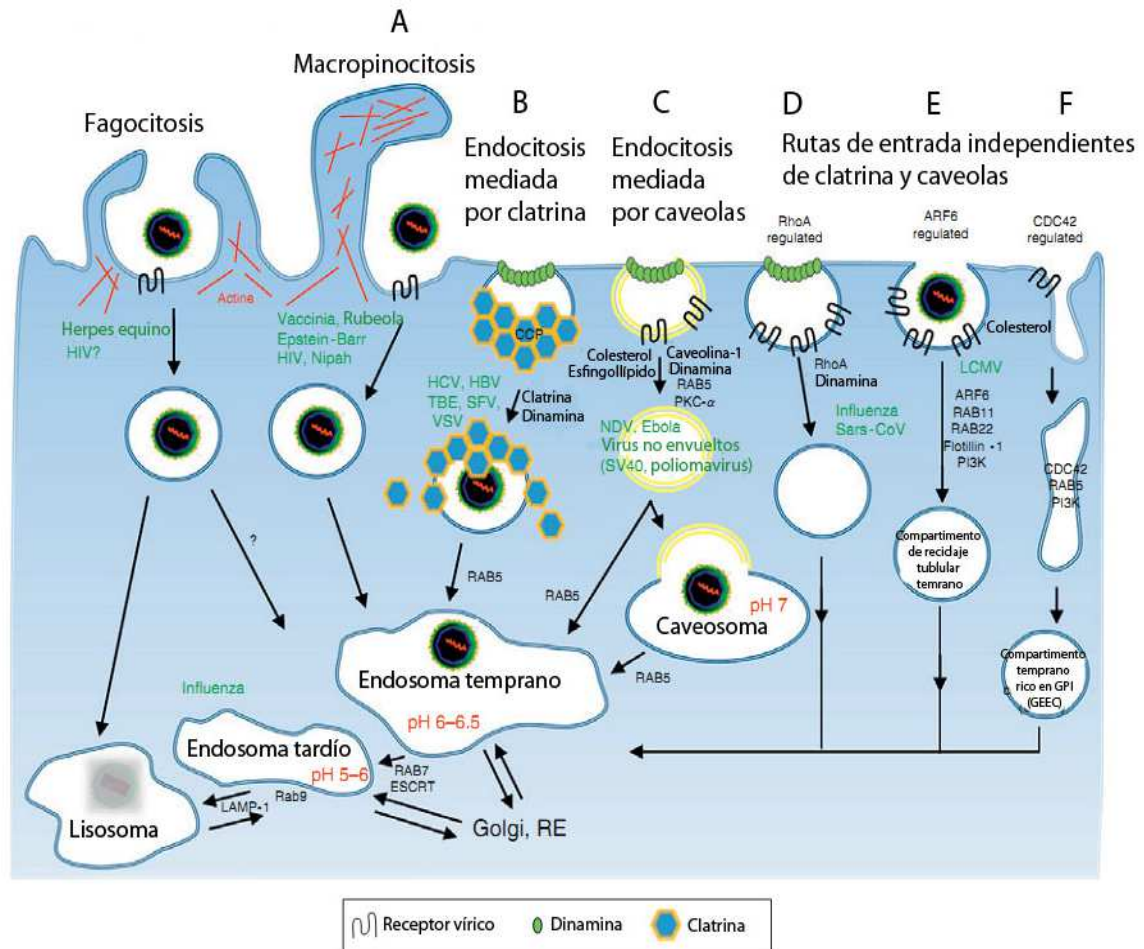


Figura 15-Diferentes mecanismos de endocitosis (Cosset y Lavillette, 2011).

Se han descrito muchas rutas de entrada de endocitosis diferentes (Marsh y Helenius, 2006; Mercer y Helenius, 2009; Mercer *et al.*, 2010) que son usadas tanto por virus dependientes de pH como independientes de pH. La Figura 15 muestra un esquema de diferentes mecanismos de endocitosis. La endocitosis mediada por clatrina (CME) es la ruta mejor caracterizada. Este proceso se inicia con la formación de las invaginaciones de la membrana características conocidas como vesículas revestidas de clatrina (CCP) e inducidas por el receptor (Figura 15B). Esta ruta es utilizada por ejemplo por los alfavirus Semliki forest y Sindbis, el rubivirus de la rubeola, el hantavirus Hantaan y también por el HIV (Miyachi *et al.*, 2009). La macropinocitosis (Figura 15A) es otra vía de endocitosis utilizada por virus pertenecientes a diferentes familias como poxvirus, adenovirus y picornavirus. Existen evidencias que sugieren que la macropinocitosis es empleada por el virus HIV-1 y el herpesvirus Epstein-Barr (Cosset y Lavillette, 2011 y referencias incluidas en éste).

Una ruta endocítica adicional, aunque peor conocida, es la llamada ruta de endocitosis independiente de clatrina y caveolas (Figura 15D, E y F). La dependencia de diferentes GTPasas y proteínas cargo (dinamina, Rho, CDC42, ARF6, etc.) define esta vía de entrada. Varios virus pueden usar esta ruta como el ortomixovirus virus de la gripe (como ruta secundaria), el coronavirus SARS-CoV, el arenavirus LCMV y algunos picornavirus.

Finalmente, otro mecanismo endocítico utilizado es la endocitosis mediada por caveolas/raft lipídicos (Figura 15C), la cual es independiente de clatrina y dependiente de dinamina. El virus no envuelto SV40 y algunos enterovirus humanos son los prototipos de virus independientes de pH que emplean esta ruta. Hasta ahora, solo se han descrito dos virus con envoltura que emplean esta vía, el NDV (Cantín *et al.*, 2007, nuestro grupo de investigación) y el virus Ébola (Empig y Goldsmith, 2002; Sánchez, 2007). La mayoría de los virus solo emplean una ruta de entrada; sin embargo, cada vez hay más ejemplos de virus que utilizan múltiples mecanismos de endocitosis para entrar en la célula diana (gripe, HIV). Por ejemplo, el virus Ébola puede penetrar en las células tanto por endocitosis mediada por clatrina como por endocitosis mediada por caveolas y asociada con rafts lipídicos (Cosset y Lavillette, 2011 y referencias incluidas en éste).

1.7.1 RUTAS DE ENTRADA DE PARAMIXOVIRUS

Como se ha mencionado anteriormente, los paramixovirus principalmente penetran en la célula hospedadora por fusión directa con la membrana plasmática a pH neutro. La activación de la mayoría de la proteínas de fusión de paramixovirus es independiente de pH, excepto en el caso de la proteína F del metaneumovirus humano (HMPV). Sin embargo, cada vez hay más evidencias de que al menos algunos miembros de la familia utilizan mecanismos más complejos para entrar en la célula. La internalización de partículas víricas antes de la fusión se ha visto en el virus Sendai (Rasmusson *et al.*, 1998) y en el virus Nipah (Diederich *et al.*, 2008). Como ya hemos señalado más arriba, nuestro grupo ha descrito (empleando agentes químicos que sequestran colesterol e inhibidores de químicos de la endocitosis) que el NDV puede utilizar la endocitosis mediada por caveolas para penetrar en la célula diana y que colocaliza con marcadores de endosomas tempranos, sugiriendo estos resultados que los paramixovirus también podrían emplear este mecanismo de entrada (Cantín *et al.*,

2007). La interacción de la proteína HN del NDV con los rafts lipídicos de la membrana de la célula a infectar durante la entrada del NDV es un apoyo más al uso de rafts/caveolas como plataforma de entrada del virus (Martín et al., 2012, nuestro grupo de investigación). Además se ha descrito que el virus respiratorio sincitial humano (hRSV) usa la endocitosis para entrar en la célula, puesto que la infección del mismo disminuye en células que expresan siRNAs contra componentes clave de la endocitosis mediada por clatrina (CME) como la cadena ligera de clatrina, el complejo adaptador de clatrina, dinamina 3 y la pequeña GTPasa Rab5A. Además, experimentos empleando inhibidores químicos así como proteínas dominantes negativos apoyan la hipótesis de que al menos parcialmente este virus puede utilizar CME para establecer una infección productiva (Kolokoltsov *et al.*, 2007). Trabajos recientes indican que el HMPV puede usar la maquinaria endocítica para entrar en la célula, ya que el tratamiento con clorpromacina (un inhibidor de CME) confiere protección contra este virus (Schowalter *et al.*, 2009). Además, el *dynasore*, una pequeña molécula inhibidora de la dinamina (proteína requerida en el paso final de la formación de vesículas tanto en la endocitosis mediada por clatrina como por caveolas), resultó muy efectivo bloqueando la infección de HMPV y reduciendo los niveles de infección hasta un 90 % (Schowalter *et al.*, 2009). Para algunas cepas, la activación de la proteína F del HMPV es fuertemente estimulada a pH ácido (Schowalter *et al.*, 2006), sugiriendo que el pH ácido de los endosomas también juega un papel importante en la entrada, y el empleo de inhibidores de la acidificación endosómica como la bafilomicina A1, concanamicina, cloruro de amonio, y monensina también ha mostrado ser eficaz en la prevención de la infección de HMPV (Schowalter *et al.*, 2009). Por tanto, a día de hoy hay claras evidencias de que al menos algunos miembros de la familia de los paramixovirus utilizan rutas endocíticas de entrada. Estos mecanismos podrían potencialmente proteger a los virus del sistema inmune del hospedador y proporcionar unos ambientes únicos, junto con la bajada de pH, que ayudarían a producir una infección productiva. Sin embargo, se necesitan llevar a cabo más trabajos para caracterizar mejor las rutas de entrada utilizadas por paramixovirus (revisado en Smith *et al.*, 2009), ya que el esclarecimiento de los diferentes mecanismos de entrada ayudaría al desarrollo de nuevas estrategias antivíricas.

La entrada de los paramixovirus en la célula hospedadora se inicia con la unión del virus a los receptores de la superficie celular, produciéndose posteriormente la fusión de las membranas vírica y celular. Esos receptores han de ser reconocidos por la glicoproteína vírica HN para que se produzca la unión virus-célula. En el caso del NDV, no se conoce la naturaleza exacta de los receptores, aunque se sabe que son compuestos sialilados. Los restos de ácidos siálicos de los sialoglicoconjugados de la membrana celular están unidos a glicoproteínas y glicolípidos. El tipo de enlace específico con el que están unidos al receptor determina el rango del hospedador así como los tejidos que puede infectar el virus.

A pesar de que se sabe que los paramixovirus infectan la célula uniéndose a receptores sialilados, no se conoce bien el tipo de enlace con el que estas moléculas deben estar unidas al receptor. En este Trabajo de Tesis Doctoral nos propusimos estudiar el tipo de compuesto sialilado que reconoce el NDV, así como la especificidad del enlace con el que se une el ácido siálico a éste.

En el caso de los paramixovirus, entre ellos el NDV, la fusión de las membranas vírica y plasmática que tiene lugar tras la unión del virus a los receptores de la superficie celular se produce a pH neutro. Sin embargo, se han descrito recientemente varios casos en los que virus que penetran en la célula mediante un mecanismo independiente del pH, utilizan también el proceso de endocitosis para llegar a una infección productiva. A este respecto, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la fusión del NDV con células de cultivo es activada a pH ácido y ha propuesto que el NDV penetra en la célula a través de endocitosis mediada por caveolas como una ruta secundaria. En el presente Trabajo nos hemos propuesto ahondar en la caracterización de esta ruta.

Según estos antecedentes, los objetivos concretos planteados en este Trabajo de Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Estudiar el papel que el tipo de enlace de los restos de ácidos siálicos del receptor celular tiene en la unión, la fusión de membranas y la infectividad del NDV.

Objetivos

2. Estudiar el efecto de la ausencia de gangliósidos o *N*-glicoproteínas en la célula diana sobre la fusión de membranas y la infectividad del NDV.
3. Estudiar el efecto de la incorporación de gangliósidos en células deficientes en *N*-glicoproteínas sobre la fusión de membranas.
4. Estudiar el efecto del pH ácido sobre la entrada del NDV en células de cultivo.
5. Estudiar el efecto de diferentes inhibidores de endocitosis sobre la unión, la fusión de membranas y la infectividad del NDV.

3.1 MATERIAL Y APARATOS

- ◆ Agitadores magnéticos Agimatic S.SELECTA.
- ◆ Agitador de plataforma para placas (BFR25-ROCKER, Grant Boeckel).
- ◆ Autoclave (SELECTA).
- ◆ Balanzas granatarias y analíticas (Sartorius).
- ◆ Baño sonicador (Fungilab Ultrasonic Cleaner).
- ◆ Baños termorregulables (Selecta).
- ◆ Balones de vidrio de fondo cónico.
- ◆ Bomba peristáltica (LKB 1200).
- ◆ Bomba de vacío (KNF Neuberger Labaport).
- ◆ Cámara de video digital Olympus DP170 adaptada a un microscopio invertido de fluorescencia.
- ◆ Cámara de recuento de células Neubauer.
- ◆ Cámara frigorífica a 4 °C.
- ◆ Campana de extracción de gases.
- ◆ Campanas de flujo laminar GELAIRE TC48 y TELSTAR Bio-II-A.
- ◆ Centrífugas Kubotta KR-1500, Heraeus Sepatech Omnifuge 2.0 RS, Beckman J2-21M, Beckman Allegra TM 21R, Heraeus Biofugue, Thermo Scientific Sorvall Legend Micro 21R.
- ◆ Citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson Biosciences).
- ◆ Congeladores de -20 °C y -80 °C (Revco).
- ◆ Depósito de Nitrógeno Líquido (ThermoForma Cryoplus 3).
- ◆ Espectrofotómetro LKB Biochrom Novaspec II.
- ◆ Espectrofotómetro Hitachi U-2000.
- ◆ Espectrofluorímetro Hitachi F-4010
- ◆ Impresora LaserJet 2300 (Hewlett Packard).
- ◆ Incubadores para cultivos celulares CO2-AUTO-ZERO (Heraeus, FORMA SCIENTIFIC HEPA CLASS 100).
- ◆ Mezclador de gradientes (LKB).
- ◆ Microscopio invertido bifocal (Nikon Europe B.V.).

- ◆ Microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX51 con cubos de excitación U-MNG2 para rodamina y U-MNB2 para fluoresceína.
- ◆ Microscopio confocal Leica SP5.
- ◆ Ordenadores PC compatibles.
- ◆ pH-metro digital Mini-pH 2001 (Crison).
- ◆ Placas para cultivos celulares de 6, 12 y 24 pocillos (Falcon).
- ◆ Placas para cultivos celulares de 35 x 10 mm, 60 x 15 mm y de 100 x 20 mm (Falcon).
- ◆ Placas de Silica gel 60 para TLC (20 x 20cm) MERCK K6aA, 64271 (Darmstadt, Alemania).
- ◆ Rascador de plástico (*rubber policeman scrapper*).
- ◆ Rotavapor (Büchi R-200).
- ◆ Rotores de centrífuga (Beckman JLA-16.250, 60Ti, SW28, S4180, A-54 IEC, RS-150 de Kubotta).
- ◆ Sistema de purificación de agua ultrapura Ultrapura (Millipore).
- ◆ Sonicador de punta (Banson B-30).
- ◆ Tubos Falcon de 15 y 50 ml.
- ◆ Ultracentrífuga (Beckman Optima XL-100K).

Otro material de uso corriente en el laboratorio

3.2 REACTIVOS

- ◆ Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ Agarosa (SeaKem LE) Lonza.(España)
- ◆ Azul tripán (Trypan blue). Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ Bisindolilmaleimida I. Calbiochem (San Diego, California, USA).
- ◆ Calceína AM. Molecular Probes INC. (Eugene, OR, USA).
- ◆ Cloroquina.(Chloroquine diphosphate salt).Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

- ◆ Cloruro de octadecilrodamina B (R₁₈). Molecular Probes INC. (Eugene, OR, USA).
- ◆ CMP-NANA. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ Colorante Giemsa. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ Concanamicina A. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ Cristal violeta. Panreac (España).
- ◆ DIPE (Diisopropileter 99 % isopropileter 99 %) Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ Dimetil Sulfoxido (DMSO). Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ *Dynasore*. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ “FACS lysing solution”. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA).
- ◆ Gangliósidos GM1, GM3, GD1a, GT1b y AsialoGM1. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ Glutamax 100x. GibcoBRL, Life Technologies (UK).
- ◆ Hepes de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ Hoechst 33258, pentahydrate. Molecular Probes INC. (Eugene, OR, USA).
- ◆ Inhibidor de acetiltripsina. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ Lectina de *Sambucus Nigra* (SNA). Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ Lectina de *Maackia amurensis* (MALI). Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
- ◆ Lectina de *Arachis hypogaea* conjugada con FITC. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ Lectina de *Maackia amurensis* conjugada con FITC. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ L-Glutamina (200mM en NaCl 0.85 %). BioWhittaker (Walkersville, MD, USA).
- ◆ Lipofectamina. Molecular Probes INC. (Eugene, OR, USA).
- ◆ Medio de Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM). BioWhittaker (Walkersville, MD, USA).
- ◆ Medio de Eagle, Alpha-MEM con EBSS, con L-glutamina, deoxirribonucleósidos y ribonucleótidos. BioWhittaker (Walkersville, MD, USA).

- ◆ Medio de Eagle, DMEM: F12, 1:1 mixture con 3.151 g/L glucosa, HEPES y L-glutamina. BioWhittaker (Walkersville, MD, USA).
- ◆ Monensina. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ *N*-Acetiltripsina. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ OptiMEM I + Glutamax. GibcoBRL, Life Technologies (UK).
- ◆ Paraformaldehído. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ Penicilina G-Streptomycin (penicilina 5000U-estreptomycin 5000 µg/ml). BioWhittaker (Walkersville, MD, USA).
- ◆ Sephadex G-50. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ Sephadex G-75. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ Seroalbúmina bovina (BSA). Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ Sialidasa de *Vibrio cholerae* 9500 mU/ml. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ Sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens* 5000 mU/ml. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ Sialidasa de *Clostridium perfringens* 2000mU/ml. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ $\alpha(2\rightarrow6)$ *N*-Sialiltransferasa 200mU/ml. Calbiochem (San Diego, California, USA)
- ◆ $\alpha(2\rightarrow3)$ *N*-Sialiltransferasa 560 mU/ml. Calbiochem (San Diego, California, USA)
- ◆ $\alpha(2\rightarrow3)$ *O*-Sialiltransferasa 1400 mU/ml. Calbiochem (San Diego, California, USA)
- ◆ Suero bovino fetal (SBF). BioWhittaker (Walkersville, MD, USA).
- ◆ Tartrato potásico. Merk (Darmstadt, MO, Alemania).
- ◆ Tripsina-EDTA (EDTA 200 mg/l, tripsina 500 mg/l). BioWhittaker (Walkersville, MD, USA).
- ◆ Tris (hidroximetil) aminoetano (Tris). Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- ◆ Triton X 100. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

El resto de los reactivos utilizados en el trabajo fueron de grado analítico y procedían de Probus o Panreac (España).

3.3 MATERIAL INFORMÁTICO

En la redacción del presente trabajo se ha utilizado el procesador de texto “Microsoft Office Word 2007”. El procesamiento matemático de los datos, así como su representación gráfica se efectuó con el programa informático “Microsoft Office Excel 2007”. El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante t de Student calculada a través del test t de la página de GraphPad QuickCalcs cuya dirección de Internet es:

<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm?Format=SD> (último acceso 14/12/2011).

Las ilustraciones y esquemas se realizaron con el programa “Microsoft Office Power Point 2007”, “Open Office Impress v.3.1.” y con el “Adobe Photoshop CS4 extended”.

La búsqueda de referencias se llevó a cabo mediante la página web Medline (National Library of Medicine, USA) en la dirección de Internet:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>

El procesado de las mismas se realizó con “Endnote X4”.

El análisis y representación gráfica de los datos obtenidos mediante citometría de flujo se efectuó con el programa informático “WinMDI 2.9”.

3.4 MATERIAL BIOLÓGICO

3.4.1 VIRUS

- Virus de la Enfermedad de Newcastle. En el presente trabajo se empleó la cepa lentogénica denominada “Clone 30”, que es una línea genéticamente estable obtenida a partir de la cepa “La Sota”, facilitada por los Laboratorios Intervet S.A. (Salamanca).
- rNDV-F3aa-mRFP: virus de la Enfermedad de Newcastle recombinante que expresa la proteína monomérica roja fluorescente (Campbell *et al.*, 2002). Clonado y rescatado por los doctores Luis Martínez Sobrido y Jerome Cros, del Departamento de Microbiología de la Mount Sinai School of Medicine (Nueva York, E.E.U.U.), a partir del pNDV-F3aa (Mibayashi *et al.*, 2007).

3.4.2 LÍNEAS CELULARES

En este trabajo se han utilizado las siguientes líneas celulares:

NOMBRE	ORIGEN	CARACTERÍSTICAS
ELL-0	ATCC*	Fibroblasto embrionario de ave, hospedadoras naturales del virus
HeLa	ATCC	Células epiteliales humanas derivadas de adenocarcinoma
MEB4	BRC Cell Bank**	Fibroblastos de piel de ratón derivados del melanoma B16, control de las células GM95
GM-95	BRC Cell Bank	Fibroblastos derivados de la línea MEB4 deficientes en glicosilceramida sintetasa y por lo que no tienen glicosfingolípidos
CHO	ATCC	Célula epitelial de ovario de hámster, control de las células Lec1
Lec1	ATCC	Célula derivada de la línea CHO con una mutación en la <i>N</i> -acetilglicosaminiltransferasa 1 (GlcNAc T1), deficientes en <i>N</i> -glicoproteínas

Tabla 3- Líneas Celulares (*ATCC, American Type Culture Collection, USA, y **BRC, Riken Bioresource Center, Japón)

Las líneas celulares ELL-0, HeLa, MEB4 y GM-95 se cultivaron en DMEM, medio Eagle, modificado por Dulbecco, al que se le agregó 1 % Glutamax 2x ó 2 % L-glutamina (580 mg/l), 1 % penicilina-estreptomina (100 U/ml-100 µg/ml) y 10 % de suero bovino fetal (SBF). La línea CHO se cultivó en DMEM:F12, al que se agregó 1 % penicilina-estreptomina (100 U/ml-100 µg/ml) y 10 % de suero bovino fetal (SBF). La línea Lec1 se cultivó en Alpha-MEM al que se agregó 1 % penicilina-estreptomina (100 U/ml-100 µg/ml) y 10 % de suero bovino fetal (SBF). Las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C en atmósfera húmeda al 5 % de CO₂. Las monocapas de células se subcultivaron desprendiéndolas con tripsina-EDTA. Para su almacenamiento, las células se resuspendieron en el medio correspondiente al crecimiento de cada línea suplementado con 5 % de dimetilsulfóxido (DMSO) y se congelaron en nitrógeno líquido.

3.5 MÉTODOS

3.5.1 CRECIMIENTO Y OBTENCIÓN DEL VIRUS

3.5.1.1 Crecimiento del NDV

El líquido alantoideo que contenía el virus fue cedido amablemente por Laboratorios Intervet S.A. (Salamanca), en donde el virus se creció y se extrajo de la cavidad alantoidea de embriones de pollo.

3.5.1.2 Purificación del NDV

El líquido alantoideo del NDV se centrifugó a 12000 x g durante 2 horas y 30 minutos en un rotor angular (A-54 IEC). El sedimento obtenido se puso en contacto, durante 12 horas a 4 °C, con un volumen diez veces menor al volumen inicial de muestra de solución amortiguadora de Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4. Transcurrido este tiempo, el sedimento se resuspendió y se disgregó empleando un sonicador (Branson B-30) a una intensidad del 50 % durante tres periodos de 30 segundos, con un intervalo de 2 minutos entre ellos, para evitar la agregación de las partículas víricas. A continuación, se depositaron cuidadosamente 2 ml de la suspensión vírica en la parte superior de una solución en gradiente de tartrato potásico del 10 al 50 % (p/v), preparada en la misma solución amortiguadora empleada para la resuspensión del virus. Los gradientes se prepararon en tubos de centrifuga del rotor oscilante SW28 (Beckman). Después de ser centrifugados a 80000 x g durante 8 horas a 4 °C, en la parte media de los gradientes se apreció una banda, que contenía los viriones puros, que se recogió con una jeringa. El paso siguiente fue la eliminación del tartrato del gradiente mediante la adición de 1/4 de volumen de una solución amortiguadora de Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4, lo cual disminuyó la densidad de la muestra y permitió la sedimentación del virus cuando posteriormente se centrifugó a 100000 x g durante 1 hora 30 minutos en el rotor angular 60 Ti (Beckman). El sedimento obtenido se resuspendió en la solución amortiguadora KNP (KCl 120 mM, NaCl 30 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7.4), cuyo volumen dependió de la concentración de proteínas deseada para los ensayos posteriores, que en nuestro caso fue de 1mg/ml.

El virus purificado se alicuotó y se guardó a -80 °C hasta su utilización.

3.5.2 TITULACIÓN DEL NDV

Al grado de infectividad de un virus o su capacidad de propagación en el medio se le conoce como el “título del virus”. El título del virus se expresa en p.f.u./ml (unidades formadoras de placa/ml) o m.o.i. (*multiplicity of infection*), calculado según la siguiente fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de placas} / \text{Volumen del inóculo en ml} = \text{p.f.u./ ml}$$

La infectividad del NDV se tituló en células ELL-0 y Vero, de acuerdo con el ensayo de Yao y Compans (1996), con ligeras modificaciones. Se sembraron células Vero en placas de 12 pocillos, 2.5×10^5 células/pocillo; o células ELL-0 en placas de 24 pocillos, 3×10^5 células ELL-0/pocillo. Tras 24 horas de incubación, se lavaron con OptiMEM, y se infectaron con diluciones seriadas de NDV (250 μ l/pocillo). Pasada 1 hora de incubación a 37 °C, se retiró el inóculo y se agregó cuidadosamente 1 ml de medio de cultivo que contenía 5 % de SBF, agarosa al 1 % y 5 μ g /ml de *N*-acetil tripsina a 37 °C. Se dejó solidificar la capa de agarosa a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad y finalmente las placas se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 48-72 horas. Transcurrido este tiempo, las células se fijaron con una solución de formaldehído al 4 % en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM, pH 7.4), durante 30 minutos, y se tiñeron con cristal violeta 0.1 % en etanol al 20 %. Una vez secas las placas de cultivo, se observaron para el recuento de “calvas” o áreas sin crecimiento de células empleando un microscopio invertido. Para el recuento se escogió la mayor dilución de virus capaz de formar calvas visibles.

3.5.3 INFECCIÓN DE LAS CÉLULAS DE CULTIVO

Las células se sembraron entre 12 y 24 horas antes de la infección consiguiéndose la confluencia adecuada para el experimento que se tratara. Se lavaron tres veces con OptiMEM, y se infectaron con NDV a la m.o.i. que requiriese el experimento. El volumen empleado fue el mínimo posible, para facilitar la penetración del virus en la célula huésped, 300 y 150 μ l para placas de 35 mm y 24 pocillos, respectivamente. El inóculo se añadió gota a gota en el centro del pocillo y se dejó

adsorber durante 1 hora a 37 °C y 5 % de CO₂, agitando periódicamente. Después se retiró el inóculo de las células y se añadió medio completo, dejándolas en incubación 24 horas o lo que requiriese el experimento.

3.5.4 MARCAJE FLUORESCENTE DEL NDV: INCORPORACIÓN DEL CLORURO DE OCTADECILRODAMINA B (R₁₈) EN LA MEMBRANA VÍRICA

Se empleó el método desarrollado por Hoekstra *et al.* (1984), con las modificaciones realizadas por Cobaleda *et al.* (1994) en nuestro laboratorio. Al NDV purificado se le añadió R₁₈ a una concentración de 10 µg/ml y se incubó durante 1 hora con agitación constante en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó la R₁₈ no incorporada en la membrana vírica por filtración en gel, empleando una columna de Sephadex G-75 (1 x 15 cm), en la cual quedó retenida la sonda no incorporada. El virus marcado con la R₁₈ (NDV-R₁₈) colectado de la columna se mantuvo a 4 °C hasta su utilización. Se determinó la concentración de proteínas totales según se describirá en el Apartado 3.5.6.

Además, en otra serie de experimentos utilizamos una variación del método de Connolly y Lamb (2006). Se incubaron 250 µl de virus a una concentración de proteínas de 0.5 mg/ml en PBS⁺⁺ (PO₄H₂Na 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 0.1 mM, pH 7.4) con 4 µg/ml de R₁₈ durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se precipitó el virus en un colchón de sacarosa al 20 %, para lo cual, se sometió a una centrifugación durante 1 hora 30 minutos a 70000 x g. El precipitado se resuspendió en 250 µl de PBS, y se conservó a 4 °C en oscuridad hasta su utilización. En los ensayos de fusión no se emplearon virus de más de 4 días de marcado.

Por último, se empleó un tercer método de marcaje que consistió en incubar 100 µl de NDV (1 mg/ml) con R₁₈ durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después se precipitó el virus centrifugando a 21000 x g durante 10 minutos y se midió el dequenching de la sonda en el fluorímetro para comprobar que la concentración de la R₁₈ en la membrana vírica era < 9 % molar, ya que a esa concentración la fluorescencia se encuentra eficientemente apagada (*quenched*). El *quenching* de la R₁₈ en la membrana del virus se determinó por medición de la fluorescencia de 20 mg de

proteínas totales de virus en 2 ml de PBS antes y después de la adición de Triton X-100 (concentración final 1 % v/v) y se calculó según la expresión:

$$\% \text{ Quenching} = 100 (1 - F_0 / F_{100})$$

donde:

F_0 = Fluorescencia en ausencia de Triton X-100

F_{100} = Fluorescencia en presencia de Triton X-100

3.5.5 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD FUSOGÉNICA DEL NDV EN CULTIVOS CELULARES MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Primeramente, se marcó la membrana vírica con octadecilrodamina (R_{18}), con uno de los métodos que se describen en el apartado anterior. Las líneas celulares fueron crecidas con una confluencia del 80 % en placas de 35 mm o 24 pocillos, e incubadas con los diferentes compuestos a distintas concentraciones entre 30 minutos o 5 h dependiendo del experimento. A continuación, las células se incubaron con 3 μg ó 2 μg de virus marcado con R_{18} durante 1 hora o 30 minutos, dependiendo del experimento, a 4 °C o en hielo, para favorecer su unión. Los virus no unidos fueron eliminados mediante 3 lavados con PBS a 4 °C. Seguidamente, se incubó 1 hora a 37 °C para permitir la fusión virus-célula y se añadió Hoechst a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para teñir los núcleos celulares. A continuación, las células se fijaron con formaldehído al 2 % (p/v) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron con agua ultrapura y se observaron al microscopio de fluorescencia. La valoración del grado de fusión célula-virus se realizó por cuantificación de células rojas con respecto al total, multiplicado por 100, en 10 campos tomados al azar con un objetivo de 40x.

3.5.6 VALORACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Para determinar la cantidad de proteínas totales que contiene una muestra, se empleó el método descrito por Markwell *et al.* (1978), que es una modificación del desarrollado anteriormente por Lowry *et al.* (1951) para la cuantificación de proteínas de membrana y lipoproteínas. Este método colorimétrico se basa en la capacidad de las proteínas para formar complejos de coordinación con el cobre, de forma que el

compuesto formado por las proteínas, el sulfato de cobre y el Folin-Ciocalteu, tiene un color azul de intensidad proporcional a la cantidad de proteína que exista en la muestra. Para el ensayo se utilizaron como patrón concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm.

3.5.7 ENSAYOS DE FORMACIÓN DE SINCITIOS

Estos experimentos solo se realizaron en células ELL-0 y HeLa ya que en el resto de líneas no se observan sincitios después de infectar con el virus. Las células se sembraron el día anterior en placas de 24 pocillos para que estuvieran con una confluencia del 100 %. A las 24 h se lavaron con OptiMEM, se infectaron con NDV a 1 m.o.i. durante 1 h a 37 °C, se lavaron con OptiMEM para retirar el exceso de virus y se dejaron en medio completo a 37 °C. A las 7 h postinfección se activó la proteína F para que se produjera la fusión célula-célula; el método de activación fue el siguiente (Young *et al.*, 1997): las células se lavaron dos veces con OptiMEM, se incubaron con acetiltripsina (5 µg/ml) durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con inhibidor de acetiltripsina (7.5 µg/ml), se lavaron una vez más con OptiMEM y se incubaron en medio completo hasta el día siguiente en que se tiñeron con Giemsa o cristal violeta para observar los sincitios.

Los ensayos de sincitios también se llevaron a cabo con células HeLa transfectadas con las proteínas del virus F y HN (apartado 3.5.20 de Métodos). En esta serie de experimentos, a las 24 h posttransfección, se activó la proteína F como se ha descrito antes, y al día siguiente se tiñeron las células con cristal violeta al 0.1 % en etanol para su observación y cuantificación.

En ambo casos, se tomaron fotografías de 6 campos al azar con el objetivo 40x y 10x y los resultados se cuantificaron utilizando el programa “Adobe Photoshop CS4 extended” con el cual se midieron las áreas ocupadas por los sincitios. Los datos se expresaron como porcentaje de área ocupada en píxeles por los sincitios respecto al área total de la fotografía.

3.5.8 ANÁLISIS DE LOS NIVELES RELATIVOS DE ÁCIDOS SIÁLICOS UNIDOS CON ENLACES $\alpha 2 \rightarrow 3$ Y $\alpha 2 \rightarrow 6$ EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO (FACS).

Los niveles relativos de restos de ácidos siálicos unidos con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$ y $\alpha 2 \rightarrow 6$ en la superficie celular de las diferentes líneas empleadas se analizaron mediante tinción con lectinas fluorescentes seguido de la cuantificación por FACS.

Las células fueron incubadas con las lectinas conjugadas con la sonda fluorescente FITC de *Maackia amurensis* (FITC-MALI) que reconoce ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2 \rightarrow 3$ (Imberty *et al.*, 2000) y de *Sambucus nigra* (FITC-SNA) que reconoce ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2 \rightarrow 6$ (Shibuya *et al.*, 1987).

En estos ensayos, se sembraron las células en placas de 6 pocillos (10^6 células); a las 24 h se lavaron con PBS, y se incubaron con 1 ml de EDTA (520 μ M) a 37 °C para levantar las células de la placa. Después se lavó la placa con 500 μ l de PBS, se centrifugaron las células a 1500 x g (centrífuga Sorvall Legend Micro 21R) durante 5 minutos a 4 °C, se fijaron con 500 μ l de paraformaldehído (PFA) 2.5 % (p/v) durante 30 minutos a 4 °C, se añadió 1 ml de PBS y se centrifugó de nuevo a 1500 x g durante 5 minutos a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 200 μ l de PBS y se incubó o no (controles) con la lectina marcada con FITC de *Maackia amurensis* o de *Sambucus nigra* a una concentración de 10 μ g/ml durante 30 minutos a 4 °C. Transcurrido ese tiempo se añadió 1 ml de PBS, se centrifugó a 1500 x g durante 5 minutos a 4 °C, se volvió a lavar con PBS y finalmente se resuspendieron las células en 400 μ l de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo (FACS) (citómetro de Becton-Dickinson). Se realizó la cuantificación de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia, “G mean” (*Geometric mean*), de cada muestra mediante el programa WinMDI 2.9.

3.5.9 ANÁLISIS DEL GRADO DE UNIÓN VIRUS-CÉLULA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO (FACS)

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (10^6 células). Al día siguiente, se lavaron con OptiMEM y se incubaron o no (controles) con los diferentes compuestos durante el tiempo que fuera necesario. Luego se lavaron nuevamente con OptiMEM y se incubaron con NDV a 1 m.o.i. durante 1 h a 4 °C (en presencia o no del inhibidor o la enzima dependiendo del experimento) y se lavaron varias veces con OptiMEM frío para retirar el exceso de virus no unido. Las células se incubaron con 1 ml de EDTA (520 μ M) a 37 °C para levantarlas de la placa, después se lavó con 500 μ l de PBS, se centrifugaron las células a 1500 x g (centrífuga Sorvall Legend Micro 21R) durante 5 minutos a 4 °C, se fijaron con 500 μ l de PFA 2.5 % (p/v) durante 30 minutos a 4 °C, se añadió 1 ml de PBS y se centrifugó de nuevo a 1500 x g durante 5 minutos a 4 °C. El precipitado se resuspendió y se incubó con los anticuerpos primarios antiHN 14f y antiHN 1b (generosamente donados por R. Iorio, *University of Massachusetts Medical School, USA*) (ambos a una dilución 1:100) en solución de bloqueo (BSA al 1% en PBS) durante 1 h a 4 °C. Transcurrido ese tiempo, se añadió 1 ml de PBS, se centrifugó a 3500 x g durante 6 minutos a 4 °C y se incubó con el anticuerpo secundario Alexafluor 488 antiratón (5 μ g/ml) en solución de bloqueo durante 1 h a 4 °C; se añadió 1 ml de PBS y se centrifugó de nuevo a 3500 x g durante 6 minutos tras lo cual se volvió a lavar con PBS y finalmente se resuspendieron las células en 400 μ l de PBS y se analizaron mediante FACS (Becton-Dickinson). La cuantificación se realizó mediante el cálculo de la “G mean” de cada muestra con el programa WinMDI 2.9. Los resultados se normalizaron asignando al control el 100 % del grado de unión virus-célula.

En los ensayos de análisis del efecto de las sialidasas sobre el grado de unión virus-célula, el virus se empleó a 5 m.o.i. y el método de preparación de las células para el citómetro fue diferente. En estos experimentos, las células se sembraron en placas de 60 mm el día anterior, se trataron con las diferentes sialidasas como se indicará más adelante, se lavaron con OptiMEM, se incubaron con NDV a 5 m.o.i. durante 1 h a 4 °C y se lavaron varias veces con OptiMEM frío para retirar el exceso de virus no unido. Las células se levantaron de forma manual con un rascador en 1 ml de PBS frío, se precipitaron a 4000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C (en la centrífuga Kubotta KR-1500)

y el precipitado se resuspendió en PBS⁺⁺. El anticuerpo primario, antiHN y antiF, se diluyó 1:100 en PBS⁺⁺ utilizado para la resuspensión y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en balancín. El anticuerpo no unido fue eliminado mediante una nueva centrifugación y por un posterior lavado con PBS⁺⁺. Se usó como anticuerpo secundario nuevamente Alexafluor 488 antiratón, diluido en PBS⁺⁺ en una proporción 1:200 y se incubó con el precipitado durante 45 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante otra centrifugación. Las células se resuspendieron en PBS⁺⁺ y se fijaron con “FACS lysing solution” (Becton-Dickinson) durante 10 minutos, y luego se sedimentaron mediante centrifugación y se lavaron con PBS⁺⁺ para eliminar los restos del fijador. Se resuspendieron en 400 µl de PBS y se analizó la fluorescencia mediante citometría de flujo (citómetro Becton-Dickinson).

3.5.10 ANÁLISIS DEL GRADO DE INFECTIVIDAD DEL NDV MEDIANTE FACS

Para este tipo de análisis se sembraron las células en placas de 6 pocillos (10⁶ células). Al día siguiente se lavaron con OptiMEM y se incubaron o no (controles) con los diferentes compuestos durante el tiempo que fuera necesario. Luego se lavaron nuevamente con OptiMEM y se incubaron con NDV a 1 m.o.i. durante 1 h a 37 °C con agitaciones periódicas (en presencia o no del inhibidor dependiendo del experimento) y se lavaron con OptiMEM para retirar el exceso de virus no unido. El método de preparación de las células para el análisis mediante FACS fue similar al primero descrito en el apartado anterior excepto que el anticuerpo primario empleado en este caso fue antiNP a una dilución 1:200 en solución de bloqueo. En este caso además, tras fijar las células con PFA y lavarlas, se bloqueó con solución de bloqueo (BSA al 1 % en PBS) que contenía Tritón X100 al 0.1 %, durante 20 minutos a 4 °C, después se añadió 1 ml de PBS y se centrifugó a 3500 x g (centrífuga Sorvall Legend Micro 21R) durante 6 minutos, para seguir con el resto del proceso (apartado 3.5.9).

3.5.11 ANÁLISIS DE LA INFECTIVIDAD DEL NDV MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Para esta serie de experimentos, se utilizó el virus recombinante rNDV-F3aa-mRFP que expresa la proteína monomérica roja fluorescente, por lo que resulta fácil seguir la infección de las células por este virus. Se infectaron con rNDV-F3aa-mRFP células que habían sido sembradas entre 12 y 24 h antes para conseguir la confluencia adecuada para el experimento que se tratara (entre 80 %-100 %). Tras recibir el tratamiento con los compuestos correspondientes, las células se lavaron con OptiMEM y se infectaron con distintas diluciones de rNDV-F3aa-mRFP. El volumen empleado para la infección fue el mínimo posible para facilitar la penetración del virus en la célula hospedadora (150 µl para placas de 24 pocillos). El inóculo se añadió gota a gota desde el centro del pocillo y se dejó adsorber durante 1 h a temperatura ambiente agitando periódicamente. Después, se retiró el inóculo y se añadió medio completo, dejando las células en incubación hasta el día siguiente a 37 °C y 5 % de CO₂. Una hora antes de su análisis mediante microscopía de fluorescencia, se añadió Hoechst a una concentración de 10 µg/ml para teñir los núcleos. La valoración del grado de infectividad se realizó mediante la cuantificación del número de células rojas respecto al total multiplicado por 100 en 6 campos tomados al azar con un objetivo 10x.

3.5.12 TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON SIALIDASAS

Para esta serie de experimentos, se sembraron las células en placas de 35mm (2,5 x 10⁵ células) o placas de 24 pocillos (10⁵ células). A las 24 h se lavaron con OptiMEM y se trataron con las sialidasas y a la concentración que se indica en la siguiente tabla (Tabla 4):

Sialidasa	Tipo de enlace que hidroliza	Solución amortiguadora	Concentración	Referencia
Sialidasa de <i>Vibrio cholerae</i>	Enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$ con 260 veces más afinidad que $\alpha 2 \rightarrow 6$ y $\alpha 2 \rightarrow 8$	OptiMEM con 4mM de CaCl_2 y a pH 5.7	25 mU/ml	(Nokhbeh <i>et al.</i> , 2005; Kaludov <i>et al.</i> , 2001)
Sialidasa de <i>Clostridium perfringens</i>	Enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$ con mayor afinidad que $\alpha 2 \rightarrow 6$ y $\alpha 2 \rightarrow 8$	OptiMEM a pH 7.4	50 mU/ml	(Nokhbeh <i>et al.</i> , 2005) (Kaludov <i>et al.</i> , 2001)
Sialidasa de <i>Arthrobacter ureafaciens</i>	Enlaces $\alpha 2 \rightarrow 6$ con mayor afinidad que $\alpha 2 \rightarrow 3$ y $\alpha 2 \rightarrow 8$	OptiMEM a pH 7.4	25 mU/ml	(Kaludov <i>et al.</i> , 2001)

Tabla 4- Sialidasas utilizadas en el presente estudio para analizar el tipo de enlace con el que está unido el resto de ácido siálico en el receptor celular del NDV.

Se incubaron las células en presencia de las diferentes sialidasas durante 1 h a 37 °C y 5 % de CO_2 , después se retiró el inóculo y se lavaron con OptiMEM y se llevaron a cabo ensayos de fusión (apartado 3.5.5), infectividad (apartado 3.5.11) y análisis del grado de unión virus-célula (apartado 3.5.9).

Los controles consistieron en la incubación de las células en OptiMEM en ausencia de enzima.

3.5.13 TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON LECTINAS

Las lectinas son proteínas de origen animal, vegetal o de microorganismos que interaccionan de manera específica con glúcidos.

El día anterior al tratamiento de las células con las diferentes lectinas se sembraron para que estuvieran a una confluencia del 80 %. Se lavaron con OptiMEM y se incubaron con concentraciones crecientes de las lectinas de *Sambucus nigra* (reconoce específicamente ácidos siálicos unidos con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 6$) o de *Maackia amurensis* (reconoce específicamente ácidos siálicos unidos con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$). Las concentraciones utilizadas fueron 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$.

Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente, se retiró el inóculo y se lavaron las células con OptiMEM. A continuación, se llevaron a cabo ensayos de fusión (apartado 3.5.5), infectividad (apartado 3.5.11) y análisis del grado de unión virus-célula (apartado 3.5.9).

Como control, se incubaron las células en OptiMEM en ausencia de lectina o con la lectina de lenteja (*Lens culinaris*) que reconoce compuestos glicosilados con manosa y glucosa (no con ácidos siálicos).

3.5.14 TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON SIALILTRANSFERASAS (SIATs)

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 10^5 células/ml. A las 24 horas, se lavaron con OptiMEM y se trataron con la sialidasa de *V.cholerae* como se describe en el apartado 3.5.12. Después, se incubaron durante 4 h a 37 °C y 5 % de CO₂ con 1 mM de CMP-NANA (el donador del ácido siálico *N*-acetilneuramínico, sustrato de las sialiltransferasas) y las siguientes sialiltransferasas a las concentraciones que se indican en la Tabla 5.

Nombre comercial de la sialiltransferasa (Concentración utilizada)	Nombre sistemático (abreviatura; nº EC)	Enlace que forma
$\alpha 2 \rightarrow 6$ <i>N</i> -sialiltransferasa (25 mU/ml ó 50 mU/ml)	Sialiltransferasa 1; β -galactósido $\alpha 2 \rightarrow 6$ -sialiltransferasa (ST6Gal I; 2.4.99.1)	¹ Sia $\alpha 2 \rightarrow 6$ Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc en oligosacáridos unidos con enlace <i>N</i>
$\alpha 2 \rightarrow 3$ <i>N</i> -sialiltransferasa (50 mU/ml)	Sialiltransferasa 6; <i>N</i> -acetil-lactosamida $\alpha 2 \rightarrow 3$ -sialiltransferasa (ST3Gal III; 2.4.99.6)	Sia $\alpha 2 \rightarrow 3$ Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ (ó 4)GlcNAc en glicoproteínas y glicolípidos
$\alpha 2 \rightarrow 3$ <i>O</i> -sialiltransferasa (50 mU/ml)	Sialiltransferasa 4B; β -galactósido $\alpha 2 \rightarrow 3$ -sialiltransferasa (ST3Gal II; 2.4.99.4)	Sia $\alpha 2 \rightarrow 3$ Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GalNAc en glicoproteínas y glicolípidos

Tabla 5- Sialiltransferasas utilizadas para añadir ácidos siálicos a las células previamente desialiladas. (¹Sia: ácido siálico)

Transcurridas las 4 horas se lavaron las células con OptiMEM y se llevaron a cabo ensayos de fusión virus-célula.

Los controles utilizados fueron los siguientes:

- Células que se incubaron solo con OptiMEM.
- Células que se incubaron con sialidasa pero no con SIATs ni CMP-NANA.
- Células que se incubaron con sialidasa y después con 1 mM de CMP-NANA.

3.5.15 INCORPORACIÓN DE GANGLIÓSIDOS

En esta serie de experimentos, se intentó modificar la composición de gangliósidos de las membranas de la célula diana incorporándolos de forma exógena en el medio de cultivo.

En la incubación de células de cultivo con gangliósidos en medio acuoso (micelas) hay que tener en cuenta que éstos se distribuyen en tres poblaciones (Saqr *et al.*, 1993):

- Micelas asociadas débilmente, eliminables por proteínas séricas (*serum labile*).
- Gangliósidos unidos a proteínas, resistentes a proteínas séricas (*serum stable*).
- Gangliósidos resistentes a tripsina (*trypsin stable*) que son los que se incorporan a la bicapa.

La incorporación depende de la concentración de gangliósidos, del tiempo de incubación y de la temperatura (no hay incorporación entre 4-10 °C).

La incorporación de gangliósidos se llevó a cabo en células Lec1 (células sin *N*-glicoproteínas) que se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 10⁵ células/ml. A las tres horas, una vez que las células estuvieron adheridas a la placa, se retiró el medio de cultivo, se lavaron con OptiMEM y se incubaron hasta el día siguiente con diferentes gangliósidos GM1, GD1a, GM3, GT1b y asialoGM1, a una concentración de 20 µg/ml en 150 µl de OptiMEM a 37 °C y 5 % de CO₂. Las soluciones de gangliósidos individuales fueron preparadas mediante vórtex y sonicación en baño.

Al día siguiente, se lavaron las células con medio completo 2 veces y cada lavado tuvo una duración de 15 minutos (para eliminar los gangliósidos *serum labile*). Después se tripsinizaron brevemente, incubando con 0.1 % de tripsina durante 30 minutos a 37

°C (para eliminar los gangliósidos *serum stable*), se lavaron de nuevo con medio completo, y se realizaron ensayos de fusión virus-célula.

Los controles utilizados fueron los siguientes:

- Células que se incubaron en OptiMEM sin gangliósidos.
- Células en las que se incorporó asialoGM1.
- Células que se incubaron en ausencia de virus.

3.5.16 TINCIÓN DE LAS CÉLULAS DIANA CON LAS LECTINAS DE *Arachis hypogaea*, *Maackia amurensis* Y *Sambucus nigra* CONJUGADAS CON FITC

Como se ha mencionado más arriba, la lectina de *Arachis hypogaea* reconoce restos β -gal(1 \rightarrow 3)galNAc, la de *Maackia amurensis* restos de ácidos siálicos unidos con enlaces α 2 \rightarrow 3 y la de *Sambucus nigra* ácidos siálicos unidos con enlaces α 2 \rightarrow 6. Para analizar el grado de presencia de estos compuestos en la superficie celular, llevamos a cabo experimentos de tinción de las células con lectinas marcadas con la sonda fluorescente FITC. Los experimentos se realizaron también tanto en células tratadas con sialidasas como en células sin tratar, para comprobar el nivel de ácidos siálicos en las mismas antes y después del tratamiento enzimático.

El protocolo que se siguió fue el siguiente: incubar las células a 4 °C durante 5 minutos, lavar con OptiMEM, e incubar durante 30 minutos a 4 °C y en oscuridad con las lectinas marcadas fluorescentemente, a una concentración de 10 μ g/ml en el caso de la lectina de *A. hypogaea* y 20 μ g/ml en el de *M. amurensis* y *S. nigra*. Después, se lavaron 2 veces con OptiMEM y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. También se realizaron ensayos con las lectinas fluorescentes que se analizaron mediante FACS (ver apartado 3.5.8).

3.5.17 EXTRACCIÓN DE GANGLIÓSIDOS DE LAS CÉLULAS MEB4 Y GM95

Para la extracción de los gangliósidos de las células MEB4 y GM95 se siguieron estos pasos:

1- Preparado de las células:

Se partió de 20 placas de 100 mm de cada una de las 2 líneas celulares crecidas en monocapa que se tripsinizaron, se lavaron una vez con medio y después con agua ultrapura obteniéndose un precipitado de células que fue pesado (peso húmedo) y a partir del cual se llevó a cabo una extracción de lípidos totales. La extracción se hizo en paralelo en las 2 líneas celulares.

2- Extracción de lípidos totales:

Se siguió el protocolo de Rueda *et al.* (1993) que consistió en:

- El primer día se añadieron 20 ml de cloroformo:metanol (C:M) (1:1) por g de células y se agitó toda la noche a 4 °C en atmósfera de N₂.

- El segundo día, se centrifugaron a 800 x g durante 10 minutos utilizando el rotor S4180 (Beckman) obteniéndose un sobrenadante, que se guardó a 4 °C en atmósfera de nitrógeno, y un precipitado al cual se volvió a añadir el mismo volumen de C:M esta vez en proporción 2:1, y se agitó durante 3 h a 4 °C en atmósfera de nitrógeno. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y se obtuvo un precipitado que se desechó y un sobrenadante que se unió con el anterior. Ambos sobrenadantes se redujeron a ¼ de volumen mediante desecación en el rotavapor. El extracto obtenido se congeló a -20 °C toda la noche y en atmósfera de nitrógeno.

- El tercer día se descongeló el extracto y se centrifugó a 1000 x g [rotor S4180 (Beckman)] durante 10 minutos y a 4 °C, se desechó el precipitado, el sobrenadante se secó completamente en el rotavapor y se dejó al vacío durante 3 h para eliminar los restos de solvente.

3- Sistema de particiones DIPE:1-butanol (Ladish y Gillard, 1985)

Los lípidos obtenidos en el paso anterior se dispersaron en 20 ml por g de células de DIPE:1-Butanol (6:4) y se añadió ½ del volumen anterior de NaCl 0,1 %; se agitó en vórtex y se sonicó en baño durante 10 minutos. Después se centrifugó a 800 x g durante 10 minutos a 4 °C, y se obtuvieron dos fases:

- Fase superior en la cual se encuentran los fosfolípidos y lípidos neutros

- Fase inferior

Se eliminó la fase superior cuidadosamente con una pipeta Pasteur, dejando la interfase y se añadió el volumen inicial de DIPE:1-butanol (6:4). Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores y de nuevo se obtuvieron dos fases; se eliminó la superior dejando la interfase y se repitió el lavado de la fase inferior. En el último lavado se retiró la interfase. La fase inferior acuosa se congeló a -80 °C toda la noche.

- El cuarto día se liofilizó la fase inferior acuosa.

- El quinto día se volvió a rehidratar la muestra en 500 µl de agua ultrapura y se sonicó en baño durante 5 minutos. Después, se pasó por una columna de Sephadex G-50 en agua y se recogieron fracciones de 500 µl cuya absorbancia se leyó a 206 nm en el espectrofotómetro Hitachi U 2000. Se cogieron las fracciones del mayor pico de absorbancia y se congelaron a -80 °C durante toda la noche.

- Al día siguiente la muestra se liofilizó, se disolvió en 500 µl de C:M (1:1), se centrifugó a 12000 r.p.m. (RS-150A, Kubotta) durante 15 minutos a 4 °C y se recogió el sobrenadante que posteriormente se desecó en atmósfera de nitrógeno, se volvió a resuspender en 150 µl de C:M (1:1) y se almacenó a -20 °C en atmósfera de nitrógeno hasta que se llevó a cabo el análisis de gangliósidos mediante cromatografía de capa fina.

3.5.18 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (HPTLC)

Este método se utilizó para analizar los extractos de gangliósidos obtenidos a partir de células MEB4 y GM95 (apartado 3.5.17). Se utilizaron placas de silica gel 60 sobre soporte de plástico de 10 x 10 cm y 0,1 mm de espesor. El líquido de desarrollo de esta cromatografía fue cloroformo:metanol:agua en las proporciones 50:45:10 (v/v/v) y con CaCl₂ al 0.02 %. Se colocó papel de filtro en la cubeta donde se desarrolló la cromatografía, se echaron 30 ml del líquido de desarrollo y se tapó para que se saturara el ambiente.

Se marcó en la placa dónde iban a ir las muestras y se añadieron las mismas además de un patrón estándar de gangliósidos (GM1, GT1b, GD1a y GM3), echándolas gota a gota con jeringuilla Hamilton, y se secaron con secador. Se pasó la

placa a la cubeta y se dejaron correr las muestras hasta que el frente ascendió a la parte superior de la placa, tras lo cual ésta se sacó y se dejó secar a temperatura ambiente.

Una vez que se secó la placa, se procedió a su revelado con resorcinol (0,05 g de resorcina, 62.5 µl CuSO₄ 0.1 M, 20 ml HCl 37 % y agua en cantidad suficiente para 25 ml); el resorcinol sólo revela gangliósidos. Tras pulverizar la placa con resorcinol, se calentó ésta a 110 °C durante 10-15 minutos, con el fin de visualizar los gangliósidos.

3.5.19 TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS A pH ÁCIDO

En esta serie de ensayos las células recibieron “pulsos de pH” que consistieron en incubar las células diana con PBS a pH 5 o PBS a pH 7.4 (control) durante 3 minutos y a 37 °C; transcurrido ese tiempo se lavaron con PBS a pH 7.4 para neutralizar.

En los experimentos en los que se analizó el efecto del pH ácido sobre la fusión del NDV con células de cultivo, tras incubar las células durante media hora con 2 µg de NDV-R₁₈ a 4 °C, se lavó 3 veces con PBS frío para eliminar el virus no unido y se incubaron durante 3 minutos a 37 °C con PBS a pH 5 o PBS a pH 7.4 (control); después se lavó con PBS a pH 7.4 para neutralizar y se incubaron 37 °C para que se produjera la fusión como se describe en el apartado 3.5.5.

En ensayos de análisis de la fusión mediante sincitios (apartado 3.5.7), las células se incubaron durante 1 h a 37 °C con NDV a 1 m.o.i., se retiró el inóculo y las células recibieron 3 pulsos de pH con PBS a pH 5 o PBS a pH 7.4 (control) de 3 minutos de duración a 37 °C con intervalos de 1 h entre cada pulso. A las 7 h postinfección, se activó la proteína F (apartado 3.5.7) y las células se incubaron en medio completo hasta el día siguiente que se tiñeron con Giemsa o cristal violeta para observar los sincitios (apartado 3.5.7).

En los experimentos realizados con células Hela transfectadas con las proteínas víricas HN y Fwt (*wild-type*) o el mutante de F, Q454A, las células recibieron los 3 pulsos de pH ácido tras la activación de la proteína F (apartado 3.5.7).

En los estudios de infectividad donde se empleó el virus recombinante rNDV-F3aa-mRFP (apartado 3.5.11), se infectaron las células durante 1 h a temperatura ambiente y transcurrido ese tiempo recibieron 3 pulsos de pH con PBS a pH 5 o PBS a pH 7.4 (control) de 3 minutos de duración a 37 °C con intervalos de 1 h entre cada pulso. Tras el último pulso, las células se incubaron en medio completo hasta el día

siguiente en que se analizó el grado de infectividad mediante microscopía de fluorescencia.

3.5.20 INACTIVACIÓN DEL NDV POR pH ÁCIDO

En esta serie de ensayos se emplearon 100 μ l de NDV marcado con la sonda R₁₈ como se describe en el apartado 3.5.4. Se incubaron 50 μ l del virus marcado en 1 ml de PBS a pH 5 y otros 50 μ l del virus en 1 ml de PBS a pH 7.4 durante 30 minutos a 37 °C y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se centrifugó a 21000 x g durante 10 minutos y a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 50 μ l de PBS a pH neutro. Después se llevaron a cabo experimentos de fusión como se explica en el apartado 3.5.5.

3.5.21 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HeLa CON LAS PROTEÍNAS F Y HN DEL NDV

En estos experimentos se emplearon células HeLa sembradas el día anterior en placas de 100 mm. La transfección se realizó con células en suspensión y se sembraron en placas de 12 pocillos tras ser incubadas con la mezcla lipofectamina-DNA. Los plásmidos empleados fueron pCAGGs (Niwa *et al.*, 1991) que contenían el gen de la proteína Fwt, de la proteína HNwt o de la proteína F mutada Q454A del NDV (Ayllón *et al.*, 2010).

Las tranfecciones se realizaron utilizando lipofectamina. El primer paso de este proceso fue preparar una mezcla de lipofectamina y OptiMEM (LF-OM) en un falcon de 15 ml, con 250 μ l de OptiMEM por cada pocillo a transfectar. Se añadieron 2 μ l de LF por cada pocillo y se agitó suavemente golpeando el tubo. La mezcla LF-OM, se incubó al menos 5 minutos a temperatura ambiente sin agitar para que se estabilizara la LF.

Mientras tanto, se prepararon las diluciones de DNA. Se tomó un tubo eppendorf por cada pocillo a transfectar y se echaron 50 μ l de OM en cada eppendorf. Se

añadieron los diferentes plásmidos para cada transfección (2 µg de cada uno por tubo eppendorf, de forma que la proporción final DNA:LF fuera 1:1).

Tras los 5 minutos de incubación de la mezcla LF-OM, se añadieron 250 µl de la misma a cada eppendorf con DNA, se agitaron suavemente los tubos y se dejaron incubando sin agitar a temperatura ambiente al menos 20 minutos para que se formaran los complejos LF-DNA. Durante esos 20 minutos, las células HeLa fueron tripsinizadas y puestas en suspensión en un Falcon con medio completo sin antibióticos.

Transcurrida la incubación LF-DNA, se añadió 1 ml de la suspensión de células (a la concentración adecuada) a cada tubo eppendorf, y se agitó suavemente, y se vertió su contenido en un pocillo de una placa de 12 pocillos. Se agitó para distribuir las células uniformemente, y se incubaron a 37 °C; a las 6 h posttransfección se sustituyó el medio de transfección por medio completo para evitar el efecto tóxico de la LF. La eficiencia y el curso de la transfección se comprobaron transfectando un pocillo con el gen *reporter* pCAGGs-GFP. Además también se empleó como control un pocillo transfectado con el plásmido pCAGGs vacío.

3.5.22 DOBLE MARCAJE DE ERITROCITOS HUMANOS CON R₁₈ Y CALCEÍNA

Los eritrocitos se obtuvieron de sangre de donantes voluntarios del centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León a través de su sede del Hospital Virgen de la Vega en Salamanca.

El primer paso de este proceso fue el lavado de los eritrocitos. Se partió de tubos que contenían 2 ml de sangre con heparina. Se añadieron 15 ml de PBS por cada 2 ml de sangre y se centrifugó a 200 x g durante 15 minutos a 4 °C; este paso se repitió una vez más, después se centrifugó a 700 x g durante 15 minutos y el precipitado obtenido se resuspendió en 2 ml de PBS obteniéndose una solución de eritrocitos al 10 % (v/v) de hematocrito final teniendo en cuenta que en la sangre humana los eritrocitos están en torno al 50 % (v/v) de hematocrito y asumiendo cierta pérdida en cada paso de lavado.

El siguiente paso del proceso consistió en marcar los eritrocitos con calceína (sonda hidrofílica verde). Para ello se disolvieron 50 µg de calceína primero en 10 µl de DMSO y luego en 40 µl de PBS. Después se añadió la calceína a 1 ml de eritrocitos (al

10 % (v/v) de hematocrito) y se incubaron durante 1 h a 37 °C en oscuridad y con agitaciones periódicas. Transcurrido ese tiempo, se precipitaron los eritrocitos (700 x g) y se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS, cambiando de tubo para eliminar el exceso de la sonda. Finalmente, se resuspendieron en 2 ml de PBS (al 5 % (v/v) hematocrito final).

Una vez marcados los eritrocitos con calceína, se incubaron los 2 ml obtenidos en el paso anterior con 25 µl de R₁₈ (stock 2 mg/ml en etanol) durante 30 min a temperatura ambiente, en oscuridad y con agitaciones periódicas. Pasado ese tiempo, se lavaron con 50 ml de PBS, se sedimentaron mediante centrifugación (700 x g) y se resuspendieron en 50 ml de DMEM completo para que la sonda no incorporada fuera absorbida por el suero; seguidamente se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente, en oscuridad y con agitaciones periódicas. Después se lavaron con 50 ml de PBS (mediante centrifugación a 700 x g); este lavado se repitió 5 veces cambiando de tubo. Tras el último lavado se resuspendieron los eritrocitos en 1 ml de PBS (10 % (v/v) hematocrito final) y se guardaron a 4 °C durante 4 días como máximo.

3.5.23 ENSAYOS DE FUSIÓN DE ERITROCITOS CON CÉLULAS TRANSFECTADAS CON LAS PROTEÍNAS DEL NDV

En estos ensayos se emplearon células HeLa cotransfectadas con las proteínas F y HN del NDV (células efectoras) como se describe más arriba (apartado 3.5.21). Se sembraron las células para que estuvieran en monocapas confluentes en placas de 24 pocillos. A las 24 h posttransfección se activó la proteína F (apartado 3.5.7) mediante la adición de acetiltripsina. Inmediatamente las células recibieron un pulso de pH de 5 minutos a 37 °C con PBS a pH 5 o PBS a pH 7.4 (controles). Después se aspiró el medio y sin lavar se añadieron los eritrocitos doblemente marcados con calceína y R₁₈ al 0.2 % de hematocrito en DMEM y además se añadió Hoechst (10 µg/ml) para cuantificar los núcleos. Se incubó durante 1 h a diferentes temperaturas 25 °C, 29 °C, 31 °C o 37 °C y se lavó para retirar los eritrocitos no unidos. Después se tomaron fotografías de 3 campos al azar con el microscopio invertido de fluorescencia (objetivo 10x) y se contó el número de células fusionadas con los eritrocitos. Los datos se expresaron como porcentaje de células fusionadas con los eritrocitos (rojas y/o verdes) respecto al total de células (número total de núcleos azules). Las células solo rojas son aquellas en las que ha habido hemifusión, es decir, solo han fusionado las membranas

ya que la sonda R₁₈ marca la membrana del eritrocito. Las células marcadas en rojo y verde son aquellas en las que se ha producido la fusión completa porque la calceína marca el interior del eritrocito.

3.5.24 TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON INHIBIDORES DE LA ENDOCITOSIS

Para los estudios de la ruta de entrada del NDV mediante endocitosis se emplearon diferentes inhibidores como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 6):

INHIBIDOR	EFECTO	[C]	TRATAMIENTO INFECTIVIDAD
Bisindolilmaleimida I (BIM)	Inhibidor de la proteína Kinasa C (PKC) (endocitosis mediada por receptor)	20 µM (en OptiMEM)	-BIM presente durante 1h de infección -BIM presente durante 1h de infección y 24h postinfección -BIM añadido después de 1h de infección y presente 24h postinfección
<i>Dynasore</i>	Inhibidor de la actividad GTPásica de dinamina 1 (endocitosis mediada por caveolas y por clatrina)	80 µM (en OptiMEM)	-Preincubación 30 min. Presente durante la infección + 2 h post infección.
Concanamicina A (ConA)	Inhibidor de la ATPasa vacuolar	5 nM (en medio completo)	-Preincubación 1 h 30 min. Presente durante la infección + 4 h postinfección
Monensina	Ionóforo	2.5 µM (en medio completo)	
Cloroquina (CQ)	Agente lisosomotrópico	10 nM (en OptiMEM)	-Solo preincubación 1 h - Preincubación 1 h. Presente durante la infección + 4 h postinfección - A las 5 h postinfección incubación 6 h con CQ

Tabla 6- Inhibidores utilizados para estudiar la ruta de entrada del virus por endocitosis.

En todos los experimentos se realizaron diferentes controles: 1) células no infectadas ni tratadas con el inhibidor, 2) células sin tratar con el compuesto pero sí infectadas con el virus, 3) células incubadas con la misma concentración de DMSO utilizada en los pocillos tratados con los inhibidores ya que tanto *dynasore*, como ConA y monensina se disuelven en DMSO.

3.5.24.1 Tratamiento de las células diana con Bisindolilmaleimida 1 (BIM)

El efecto de BIM se estudió analizando el efecto sobre la infectividad mediante microscopía de fluorescencia (apartado 3.5.11).

En estos experimentos se sembraron las células el día anterior en placas de 24 pocillos (10^5 células). Las células se lavaron con OptiMEM y se trataron con el inhibidor a una concentración 20 μ M de cuatro formas diferentes como se describe a continuación:

- BIM presente durante 1 h de infección (Virus + BIM).
- BIM presente durante 1 h de infección y 24 h postinfección (Virus + BIM/BIM).
- BIM añadido después de 1 h de infección y presente 24h postinfección (Virus/BIM).
- Control, células sin infectar en presencia de BIM (para fijar el *background*).

BIM es un compuesto que tiene autofluorescencia roja, pero es de una intensidad mucho menor que la de la proteína roja expresada por el virus con lo cual no interfiere con ésta a la hora de cuantificar los resultados de infectividad, fijándose el *background* para restar la fluorescencia del inhibidor a partir de las muestras control.

3.5.24.2 Tratamiento de las células diana con *Dynasore*

El efecto de *dynasore* sobre la entrada del NDV en células de cultivo se analizó mediante ensayos de fusión, infectividad por microscopía de fluorescencia y por FACS, análisis del grado de unión virus-célula; también se estudió el efecto de incubación con el compuesto añadido después de la infección vírica.

En todos los ensayos las células se sembraron el día anterior para que estuvieran a una confluencia entre 80 % y 100 %.

Para los estudios de fusión, las células se incubaron con el inhibidor (80 μ M) en OptiMEM durante 30 minutos a 37 °C. Después se lavaron y se incubaron a 4 °C con NDV-R₁₈ en presencia del compuesto y luego se incubaron durante 1 h a 37°C también presencia de *dynasore*.

El tratamiento utilizado en los experimentos de infectividad es el que se resume en la Tabla 6. Se lavaron las células con OptiMEM y se incubaron durante 1 h con el inhibidor a 37 °C; transcurrido ese tiempo las células se infectaron en presencia de *dynasore* y se incubaron 2 h más postinfección con el mismo.

En los estudios del análisis del grado de unión virus-célula, las células se preincubaron con el inhibidor durante 30 min a 37 °C, se lavaron y se incubaron con el virus en presencia de *dynasore* durante 1 h a 4 °C.

Para ver el efecto postinfección del *dynasore*, el protocolo que se siguió fue infectar las células y a distintos tiempos tras añadir el virus (5, 10, 20 y 60 minutos) se añadió *dynasore* y las células se incubaron en su presencia hasta completar la hora de infección, luego se lavaron con OptiMEM y se incubaron en presencia del inhibidor durante 2 h más.

3.5.24.3 Tratamiento de las células diana con Concanamicina A, Monensina o Cloroquina

En estos experimentos, se sembraron las células 24 h antes para que estuvieran a una confluencia entre el 80 % y el 100 %. El estudio del efecto de estos compuestos sobre la entrada del NDV se analizó mediante ensayos de fusión, infectividad por microscopía de fluorescencia y por FACS, y análisis del grado de unión virus-célula.

Para analizar el efecto de estos compuestos sobre la fusión se preincubaron las células con ConA o monensina durante 1 h y 30 min ó 1 h en el caso de CQ a 37 °C, después se lavaron y se infectaron con NDV (a la temperatura adecuada según el experimento) en presencia del inhibidor y luego, si el ensayo lo requería, se incubaron durante 4 h más a 37 °C con el compuesto presente en el medio.

3.5.25 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR: MÉTODO DE EXCLUSIÓN DEL AZUL DE TRIPÁN.

Este método se basa en que los daños en las membranas celulares provocan que colorantes a los que normalmente las células son impermeables (como el azul de Tripán) puedan entrar en la misma cuando existe daño o muerte celular. Así, comparando el número de células teñidas con el de células sin teñir (células sanas) se puede determinar la viabilidad celular.

Una pequeña cantidad de una suspensión de células (200 μ l) se mezcló con 300 μ l de azul de Tripán al 0.4 % (p/v) en PBS y con 300 μ l de PBS. Se dejó actuar durante 5-10 minutos, se pasaron 20 μ l a una cámara de recuento y las células se observaron en un microscopio invertido mediante un objetivo 10x. El número de células contadas, teñidas o no, fue siempre superior a 100.

4.1 NIVELES RELATIVOS DE ÁCIDOS SIÁLICOS UNIDOS CON ENLACES $\alpha 2 \rightarrow 3$ Y $\alpha 2 \rightarrow 6$ EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES

Como ya se ha señalado a lo largo de esta Memoria, no se conoce la naturaleza exacta de los receptores del NDV aunque se sabe que son compuestos sialilados. Para obtener más información sobre el receptor del NDV, hemos estudiado la interacción del NDV con cinco líneas celulares diferentes: ELL-0, MEB4, GM95, CHO y Lec1. Estas células difieren en la composición de glicoconjugados de su membrana (Tabla 3 del apartado de Métodos 3.4.2, pág. 46). Los niveles relativos de expresión de ácidos siálicos unidos con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$ y/o $\alpha 2 \rightarrow 6$ en la superficie celular se analizó mediante tinción con lectinas fluorescentes seguido de la cuantificación por FACS como se explica en el apartado 3.5.8 de Métodos. Las lectinas son glicoproteínas naturales de origen no inmune que pueden aglutinar células y son capaces de reconocer específicamente un determinado oligosacárido (con secuencia y tipo de enlace específicos) uniéndose reversiblemente al mismo, sin alterar la estructura covalente de los ligandos glicosídicos reconocidos.

Las células se incubaron con las lectinas conjugadas con la sonda fluorescente FITC de *Maackia amurensis* (FITC-MALI) que reconoce ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2 \rightarrow 3$ (Imberty *et al.*, 2000) o de *Sambucus nigra* (FITC-SNA) que reconoce ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2 \rightarrow 6$ (Shibuya *et al.*, 1987). Los resultados se muestran en las Figuras 16 y 17 (eje de ordenadas izquierdo en Figura 17).

Por otro lado, se analizó el grado de fusión del NDV marcado con la sonda fluorescente octadecilrodamina ($3\mu\text{g}$ de NDV-R₁₈) con las células de las cinco líneas empleadas en estos estudios (Figura 17, eje de ordenadas derecho), para comparar el nivel de fusión del NDV con el nivel de expresión de los ácidos siálicos con diferentes enlaces de unión.

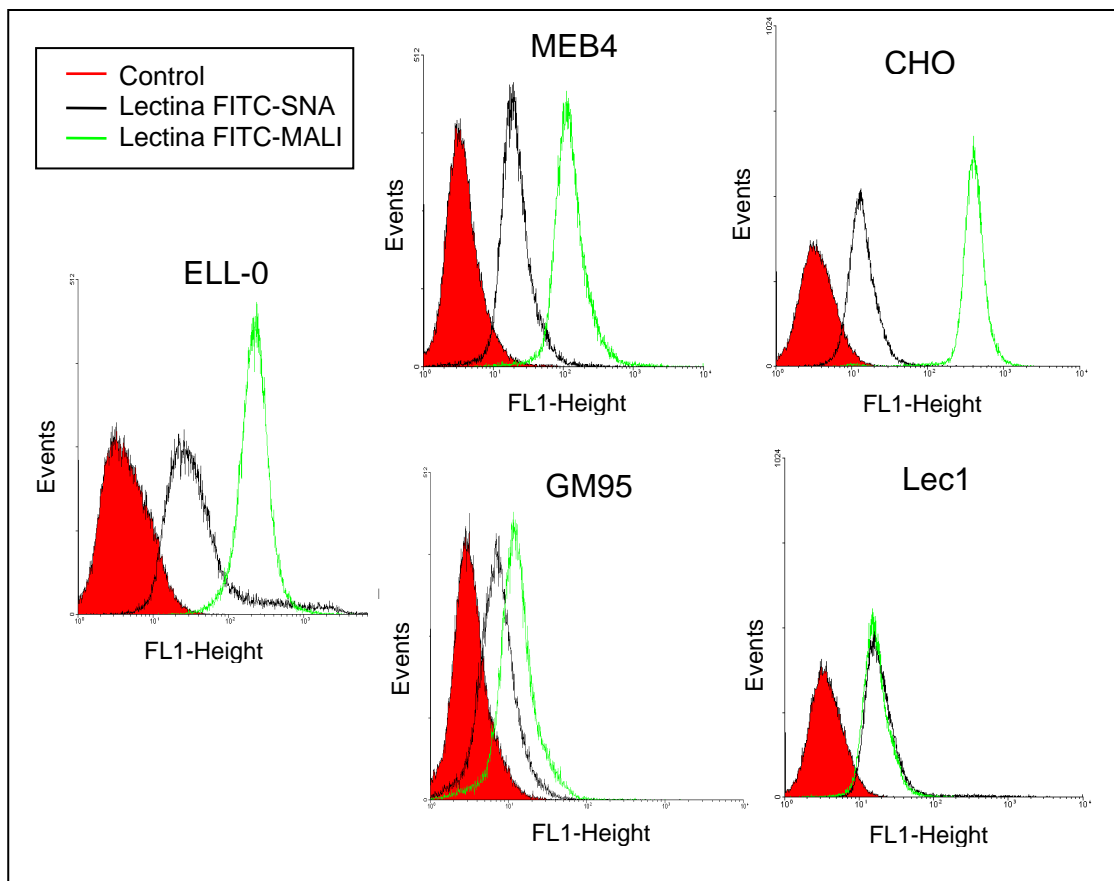


Figura 16- Análisis de los niveles relativos de ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2 \rightarrow 3$ y $\alpha 2 \rightarrow 6$ en diferentes líneas celulares. Las células se tiñeron con las lectinas FITC-MALI o FITC-SNA y se analizaron mediante FACS. Se muestra un experimento representativo.

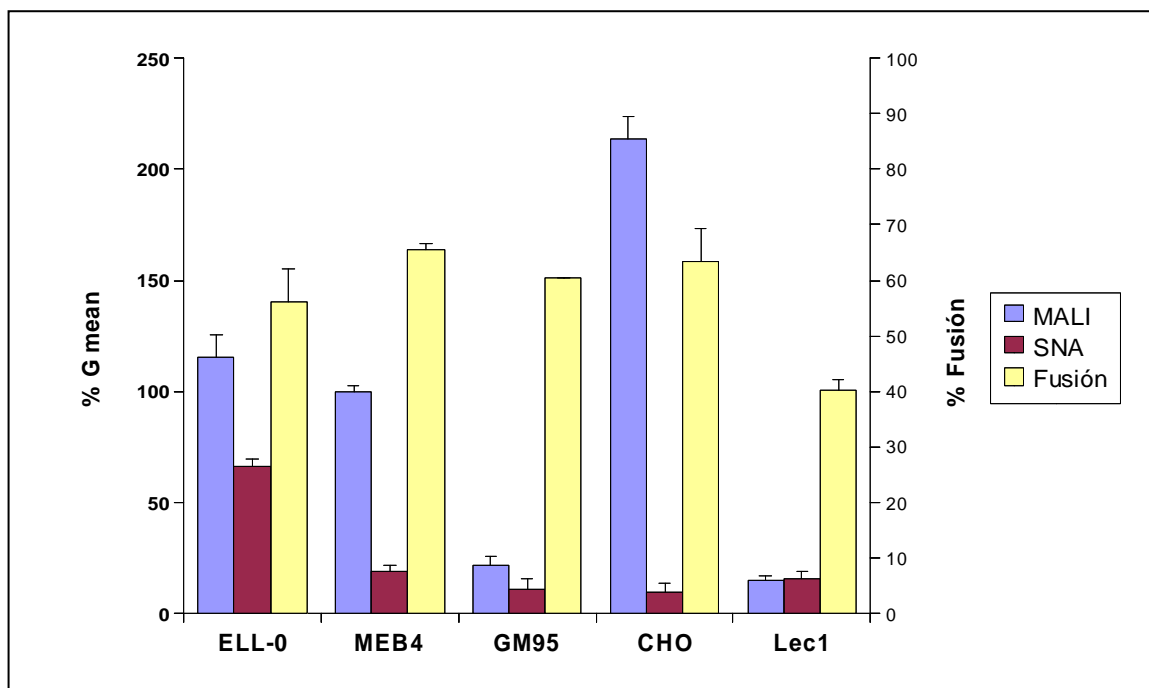


Figura 17- Comparación de los niveles de fusión del NDV con células ELL-0, MEB4, GM95, CHO y Lec1 (eje de ordenadas derecho) con sus niveles relativos de expresión de ácidos siálicos unidos con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$ (unión a lectina MALI) o $\alpha 2 \rightarrow 6$ (unión a lectina SNA) cuantificados mediante la “G mean” de histogramas como los mostrados en la Figura 16. Los datos se expresan como la media \pm SD de tres experimentos independientes.

Los datos (Figura 17, eje de ordenadas izquierdo) indicaron niveles altos de ácidos siálicos con uniones $\alpha 2 \rightarrow 3$ en las líneas celulares ELL-0, MEB4 y CHO mientras que las células GM95 y Lec1 mostraron tinción muy baja con FITC-MALI indicando baja proporción de ácidos siálicos con uniones $\alpha 2 \rightarrow 3$ en estas líneas celulares, resultado esperable al carecer de gangliósidos y proteínas *N*-glicosiladas respectivamente. Solo se detectó un nivel de ácidos siálicos con uniones $\alpha 2 \rightarrow 6$ significativo en las células ELL-0. Las células MEB4 expresan aproximadamente 4.5 veces más niveles de ácidos siálicos $\alpha 2 \rightarrow 3$ que GM95 según determinó la tinción con MALI mientras que Lec1 expresa 14.5 veces menos ácidos siálicos que CHO. Sin embargo, el NDV fusiona eficientemente con las cinco líneas celulares; GM95 mostró niveles de fusión similares a los de su parental MEB4; la fusión del NDV con células Lec1, deficientes en *N*-glicoproteínas, fue en torno al 60 % de nivel de fusión de su parental CHO (Figura 17, eje de ordenadas derecho). Estos datos indicarían que no hay

correlación entre los niveles de ácidos siálicos y los niveles de fusión sugiriendo que otras macromoléculas podrían tener un papel relevante en la fusión del virus.

4.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON DIFERENTES SIALIDASAS SOBRE LA FUSIÓN, INFECTIVIDAD Y UNIÓN DEL NDV CON CÉLULAS DE CULTIVO

El siguiente paso para analizar con más detalle el tipo de enlace con el cual está unido el ácido siálico en la molécula receptora del NDV fue llevar a cabo una serie de experimentos en los que utilizamos la acción de diferentes sialidasas que hidrolizan ácidos siálicos unidos con diferentes tipos de enlace tal y como se indica en el apartado 3.5.12 (Tabla 4).

4.2.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON DISTINTAS SIALIDASAS SOBRE LA FUSIÓN DEL NDV CON CÉLULAS DE CULTIVO

Las células de diferentes líneas celulares fueron tratadas con las sialidasas de *Vibrio cholerae*, *Arthrobacter ureafaciens* y *Clostridium perfringens* durante una hora a 37 °C a las concentraciones señaladas en el apartado de Métodos 3.5.12; después se llevó a cabo un ensayo de fusión (Métodos 3.5.5). El grado de fusión virus-célula se analizó mediante microscopía de fluorescencia tomando fotografías en 10 campos al azar con el objetivo 40x. Los datos se calcularon como el número de células rojas (fusionadas con el virus) respecto del total de células y multiplicado por 100. Los resultados obtenidos son los que se muestran en las siguientes dos figuras (Figura 18 y 19). Los datos de la Figura 19 provienen de la cuantificación de imágenes como las mostradas en la Figura 18.

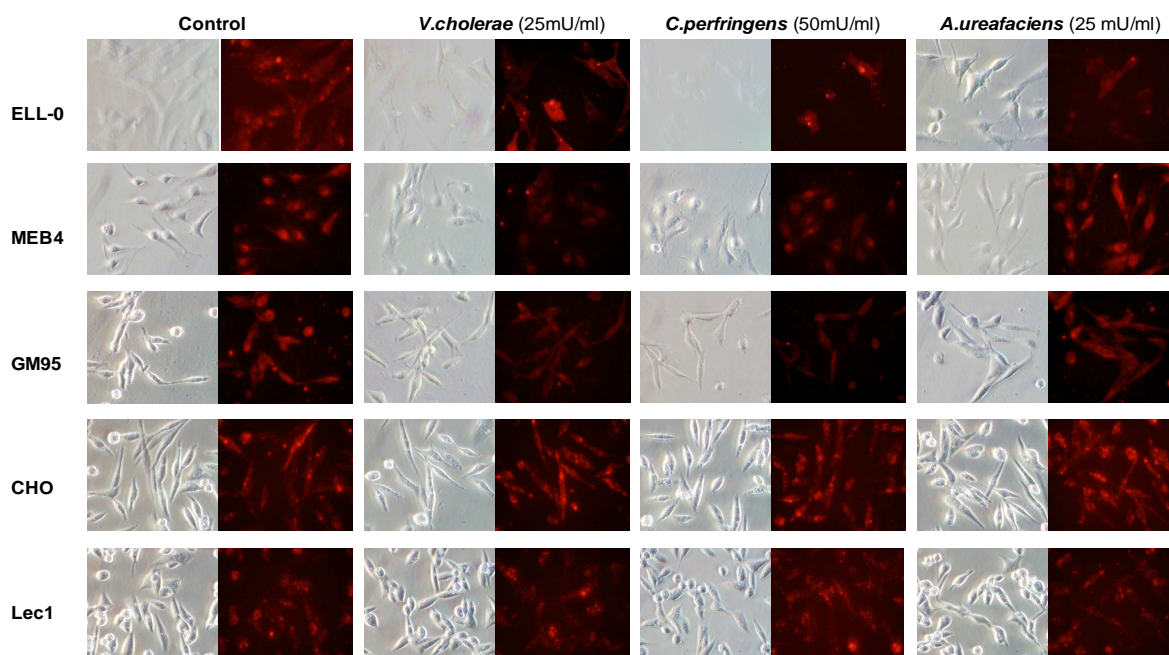


Figura 18- Efecto de la incubación de las células con diferentes sialidasas sobre la fusión del NDV con células de cultivo (fotografías tomadas con el objetivo 40x).

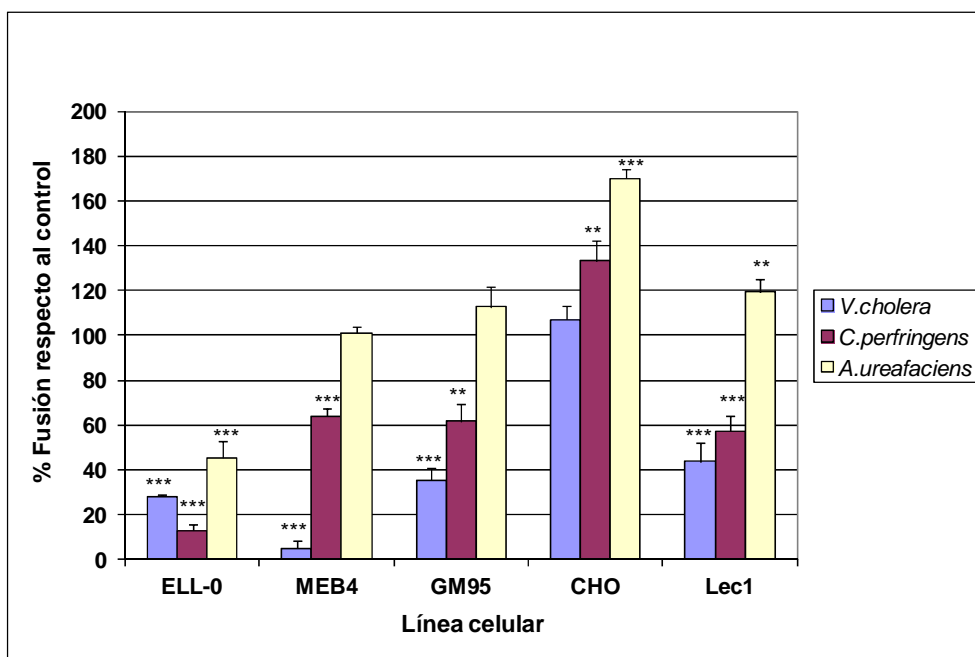


Figura 19- Efecto del tratamiento de las células con las sialidasas de *V.cholerae* (25mU/ml), de *C.perfringens* (50 mU/ml) y de *A.ureafaciens* (25 mU/ml) sobre la fusión del NDV. En esta gráfica se consideró el valor del control de las diferentes líneas celulares (valor de la fusión del NDV con células no tratadas) como el 100 %. Los datos corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes. Estadística test t de Student, *** extremadamente significativo $p < 0.001$, ** muy significativo $p < 0.01$.

Como muestra la Figura 19, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- En la línea celular ELL-0 se observó una reducción de la fusión del 78 % y del 87.2 % tras el tratamiento con las sialidasas de *V.cholerae* y *C. perfringens* respectivamente; ambas son sialidasas que hidrolizan ácidos siálicos unidos con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$. En el caso del tratamiento con la sialidasa de *A.ureafaciens*, que hidroliza preferentemente enlaces $\alpha 2 \rightarrow 6$, se produjo una reducción del 54.8 %.

- En las células MEB4 se produjo una reducción de la fusión del NDV del 94.8 % y del 34.7 % con el tratamiento con las sialidasas de *V.cholerae* y *C.perfringens* respectivamente. En el caso del tratamiento con la sialidasa de *A.ureafaciens* no se produjo efecto inhibitorio.

- En la línea celular GM95 (células carentes de gangliósidos) se detectó una reducción de los niveles de fusión virus-célula del 68.6 % y del 28.5 % tras el tratamiento con las sialidasas de *V.cholerae* y *C.perfringens*, respectivamente. En el caso del tratamiento con la sialidasa de *A.ureafaciens* tampoco hubo reducción de la fusión del NDV.

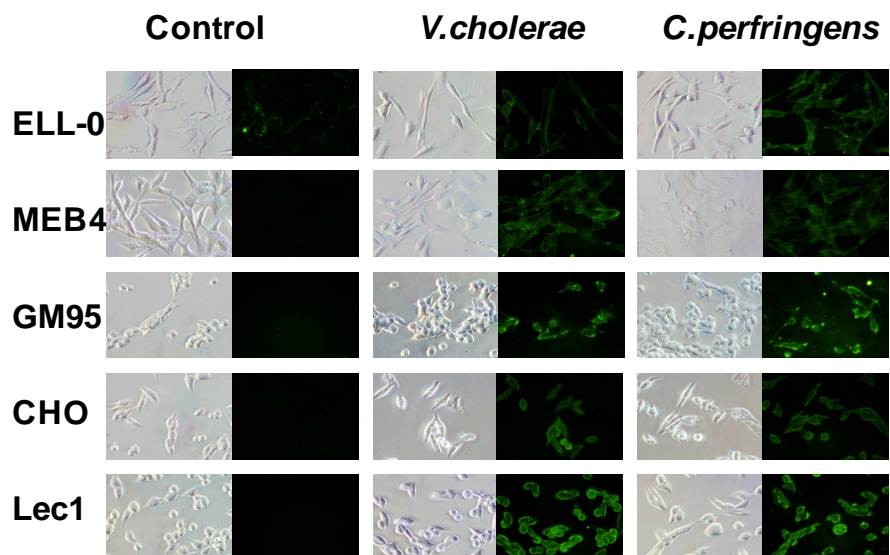
- En la línea celular CHO, sorprendentemente, observamos un aumento de la fusión después del tratamiento con la sialidasa de *C.perfringens* del 33.2 % y con la de *A. ureafaciens* del 70 %. Con la sialidasa de *V.cholerae* no se observó ninguna diferencia respecto del control.

- En la línea celular Lec1 (células que no tienen *N*-glicoproteínas) se produjo una reducción del 53.5 % de la fusión del NDV después de tratar con la sialidasa de *V.cholerae* y del 43 % con la sialidasa de *C.perfringens*. Con la sialidasa de *A.ureafaciens* no se detectó reducción.

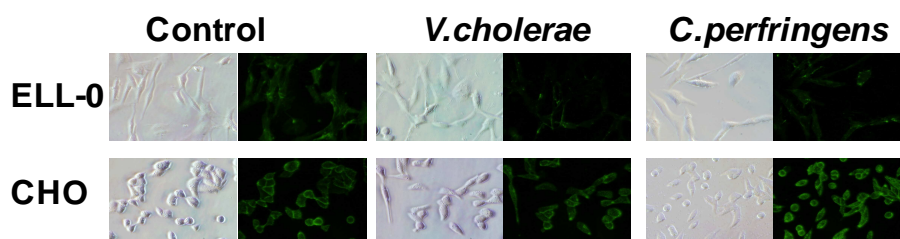
Se comprobó la efectividad de la acción de sialidasas mediante la tinción de las células con las lectinas fluorescentes de *Arachis hypogaea*, *Maackia amurensis* y *Sambucus nigra* después de tratar con las diferentes sialidasas. En esta serie de experimentos, utilizamos la lectina de *Arachis hypogaea* marcada con FITC que, como se indica en el apartado 3.5.16, reconoce restos de galactosa (a los que estaba unido un ácido siálico antes de tratar con sialidasas); la lectina de *Maackia amurensis* también marcada con FITC que reconoce ácidos siálicos con uniones $\alpha 2 \rightarrow 3$, y la lectina de *Sambucus nigra* que reconoce ácidos siálicos con uniones $\alpha 2 \rightarrow 6$. Se incubaron las diferentes líneas celulares con estas lectinas tras haber recibido o no el tratamiento con sialidasas. Los resultados se muestran en la Figura 20. Mediante la utilización de las tres lectinas, comprobamos que las sialidasas utilizadas en los diferentes experimentos

estaban funcionando de forma correcta, es decir, que después del tratamiento con las mismas se producía la disminución de los niveles de ácidos siálicos en la superficie celular.

A)



B)



C)

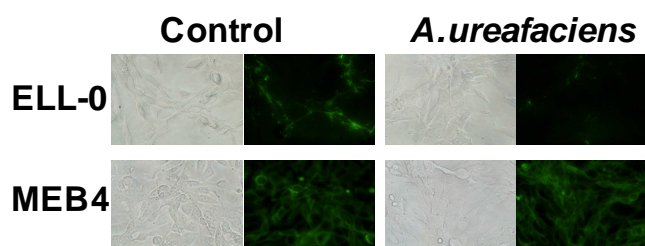


Figura 20- Tinción con las lectinas fluorescentes de células tratadas y no tratadas (control) con las sialidasas de *V.cholerae* (25 mU/ml), *C.perfringens* (50 mU/ml) y *A.ureafaciens* (25 mU/ml). A) Incubación con la lectina marcada con FITC de *A.hypogaea* (10 µg/ml) B) Incubación con la lectina marcada con FITC de MALI (20 µg/ml) y C) Incubación la lectina marcada con FITC de SNA (20 µg/ml).

Como se ve en la Figura 20, tras el tratamiento con las sialidasas de *V.cholerae* y *C.perfringens* aumentó el grado de unión de la lectina de *A.hypogaea* en las cinco líneas celulares, lo que refleja el aumento de restos de galactosa accesibles debido a la eliminación de ácidos siálicos por la acción de sialidasas. Asimismo, a pesar del bajo nivel de ácidos siálicos en la superficie celular GM95 y Lec1 (Figuras 16 y 17), las enzimas fueron capaces de hidrolizar ácidos siálicos en estas células. Además, la tinción de la superficie celular de ELL-0 con FITC-MALI disminuyó tras el tratamiento con sialidasas (Figura 20B). Sin embargo, detectamos un aumento de la tinción con FITC-MALI en las células CHO después del tratamiento con *C.perfringens* lo que sugiere que la eliminación de varios ácidos siálicos determinaría el desenmascaramiento de algunos sialoglicoconjugados reconocidos por esta lectina en la superficie de las células CHO. Este resultado explicaría el aumento observado del grado de fusión virus-célula tras el tratamiento de las células CHO con las sialidasas de *C.perfringens* y *A.ureafaciens* (Figuras 18 y 19). Además, tras el tratamiento con la sialidasa de *A.ureafaciens* se produjo una disminución del nivel de ácidos siálicos en células ELL-0 mientras que en las MEB4 no hubo variaciones (Figura 20C).

En resumen, de los datos mostrados en las Figuras 18 y 19 puede deducirse que el tratamiento de cuatro de las líneas celulares, ELL-0, MEB4, GM95 y Lec1, con las sialidasas de *V.cholerae* y *C.perfringens*, específicas de enlace $\alpha 2 \rightarrow 3$, ejerce un efecto inhibitorio en la fusión del NDV, siendo más efectiva la sialidasa de *V.cholerae*.

Como ya se ha mencionado, Lec1 es una línea celular derivada de CHO deficiente en proteínas *N*-glicosiladas debido a una mutación en el gen de la *N*-acetilglucosaminil transferasa I que determina deficiencias en la *N*-glicosilación. El tratamiento con las sialidasas de *V.cholerae* y *C. perfringens* determinó la inhibición de la fusión del NDV del 60 % y 40 % respectivamente aunque, como ya se ha mencionado, en CHO se produjo un aumento de la fusión vírica (Figuras 18 y 19). La acción de las sialidasas en Lec1 presumiblemente se ejercería sobre *O*-glicoproteínas y gangliósidos, reduciendo la fusión del NDV; sin embargo, en CHO (con gangliósidos, *N*- y *O*-glicoproteínas) el tratamiento con sialidasas favorecería la unión del virus a estas células. Las sialidasas podrían disminuir en las células CHO la unión a moléculas de la superficie celular que no conduciría a una entrada efectiva, o como se ha apuntado más arriba, hacer más accesible la unión del virus a receptores específicos “enmascarados” en células CHO no tratadas con sialidasas.

La hidrólisis de ácidos siálicos unidos con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 6$ (mediante la sialidasa de *A.ureafaciens*) causó la inhibición del grado de fusión del NDV exclusivamente con

células ELL-0, que son fibroblastos embrionarios de pollo, es decir, del hospedador natural del virus. Esta inhibición resultó ser de aproximadamente el 50 % (Figura 19). En las células CHO se produjo un aumento de la fusión tras la preincubación de las mismas con la sialidasa de *A.ureafaciens* al igual que se observó con las otras dos sialidasas específicas de enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$. Como esperábamos, el tratamiento con la sialidasa de *A.ureafaciens* no tuvo efecto inhibitorio en la fusión del NDV con células Lec1. Este tipo de enlace ($\alpha 2 \rightarrow 6$) está presente en glicoproteínas pero no en glicolípidos y como ya se ha mencionado Lec1 carece de *N*-glicoproteínas; y las *O*-glicoproteínas no son utilizadas como receptores del NDV (Ferreira *et al.*, 2004b).

En definitiva, los resultados de la acción de las mencionadas sialidasas sobre la fusión del NDV indican que el virus puede reconocer sialoglicoconjugados con diferentes enlaces del ácido siálico ($\alpha 2 \rightarrow 3$ y $\alpha 2 \rightarrow 6$) dependiendo de la composición de la membrana plasmática de la línea celular.

4.2.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON LAS DIFERENTES SIALIDASAS SOBRE LA INFECTIVIDAD DEL NDV

Los experimentos de infectividad, como ya se explicó en el apartado de Métodos 3.5.11, se llevaron a cabo con el virus rNDV-F3aa-mRFP, virus recombinante con el gen de la proteína roja fluorescente que es muy útil para seguir y cuantificar la infección vírica. Antes de la infección con este virus, se incubaron las células con la sialidasa de *V.cholerae*, ya que, según mostraron los resultados de inhibición de la fusión del NDV resultó ser la sialidasa más efectiva eliminando los restos de ácidos siálicos con unión $\alpha 2 \rightarrow 3$ (Figuras 18 y 19). Las células se incubaron con la sialidasa (25 mU/ml) durante una hora a 37 °C, después se lavaron y se infectaron con diferentes diluciones de rNDV-F3aa-mRFP (10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} que corresponden aproximadamente a 100, 10 y 1 m.o.i, respectivamente) durante una hora a temperatura ambiente, se lavaron nuevamente y se incubaron en medio completo hasta el día siguiente en que se observaron y analizaron mediante microscopía de fluorescencia. La Figura 21 muestra fotografías de un experimento representativo. Los datos (Figura 22) se cuantificaron contando el número de células rojas dividido por el total y multiplicado por 100 (% infectividad), en 6 campos aleatorios de imágenes como las que se muestran en la Figura 22.

Como puede observarse, en las células ELL-0 y Lec1 con la dilución 10^{-2} se produjo reducción en el número de células infectadas siendo del 38.5 % en ELL-0 y del

78.6 % en células Lec1 (Figuras 21A y 22A). En el resto de líneas celulares, con esta dilución no se observó reducción. Sin embargo, con la dilución 10^{-3} (Figuras 21B y 22B) en células ELL-0 se produjo una disminución de más del 80 % de la infectividad; en MEB4 y GM95 la reducción fue de casi el 50 %, mientras que en CHO fue de casi el 40 %; en Lec1 la infectividad se redujo casi totalmente. Con la menor concentración de virus utilizada (10^{-4}), los niveles de infectividad se redujeron considerablemente (más del 90 %, Figuras 21C y 22C) en todas las líneas celulares después de tratar con sialidasas.

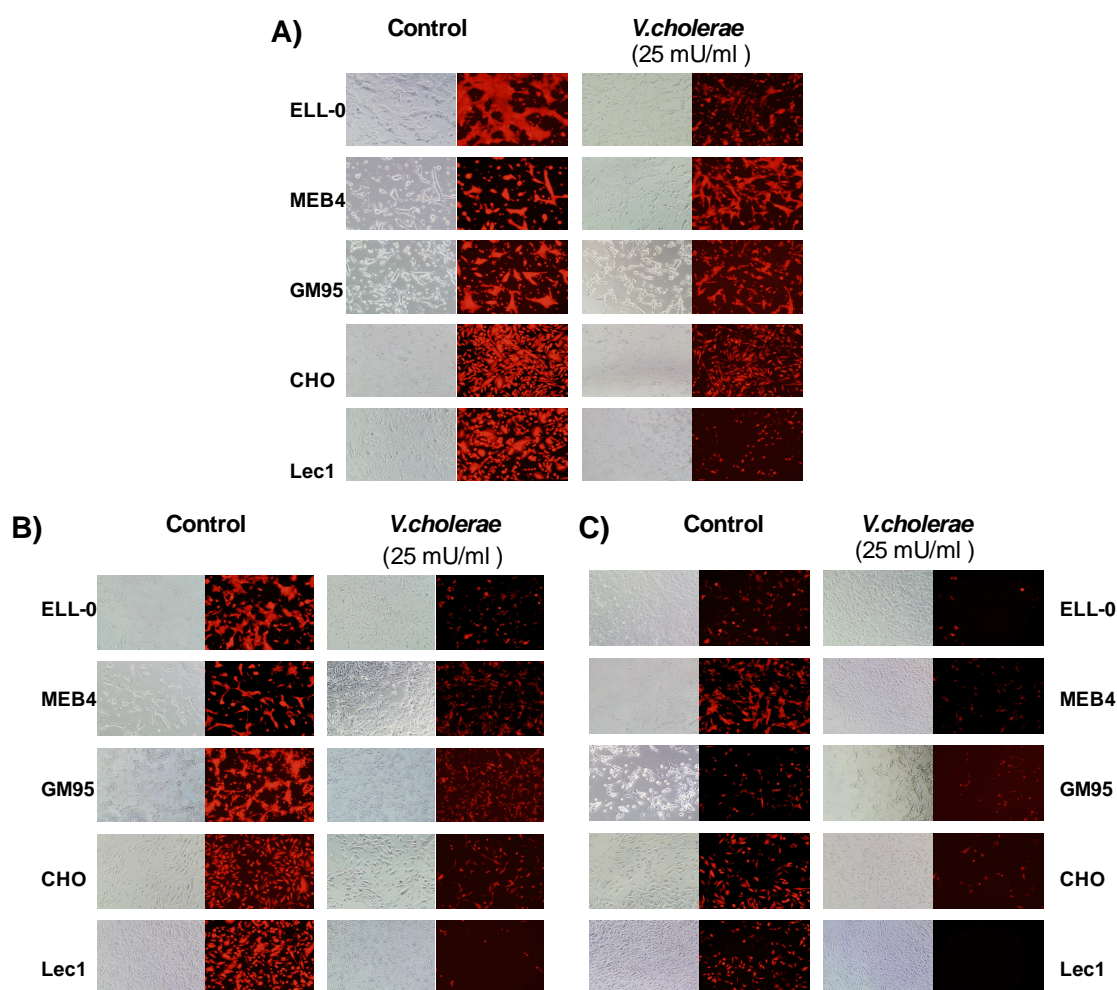


Figura 21- Efecto de la sialidasa de *V.cholerae* sobre la infectividad del rNDV-F3aa-mRFP en las diferentes líneas celulares. Las distintas diluciones de virus A) 10^{-2} ; B) 10^{-3} ; C) 10^{-4} .

Resultados y Discusión

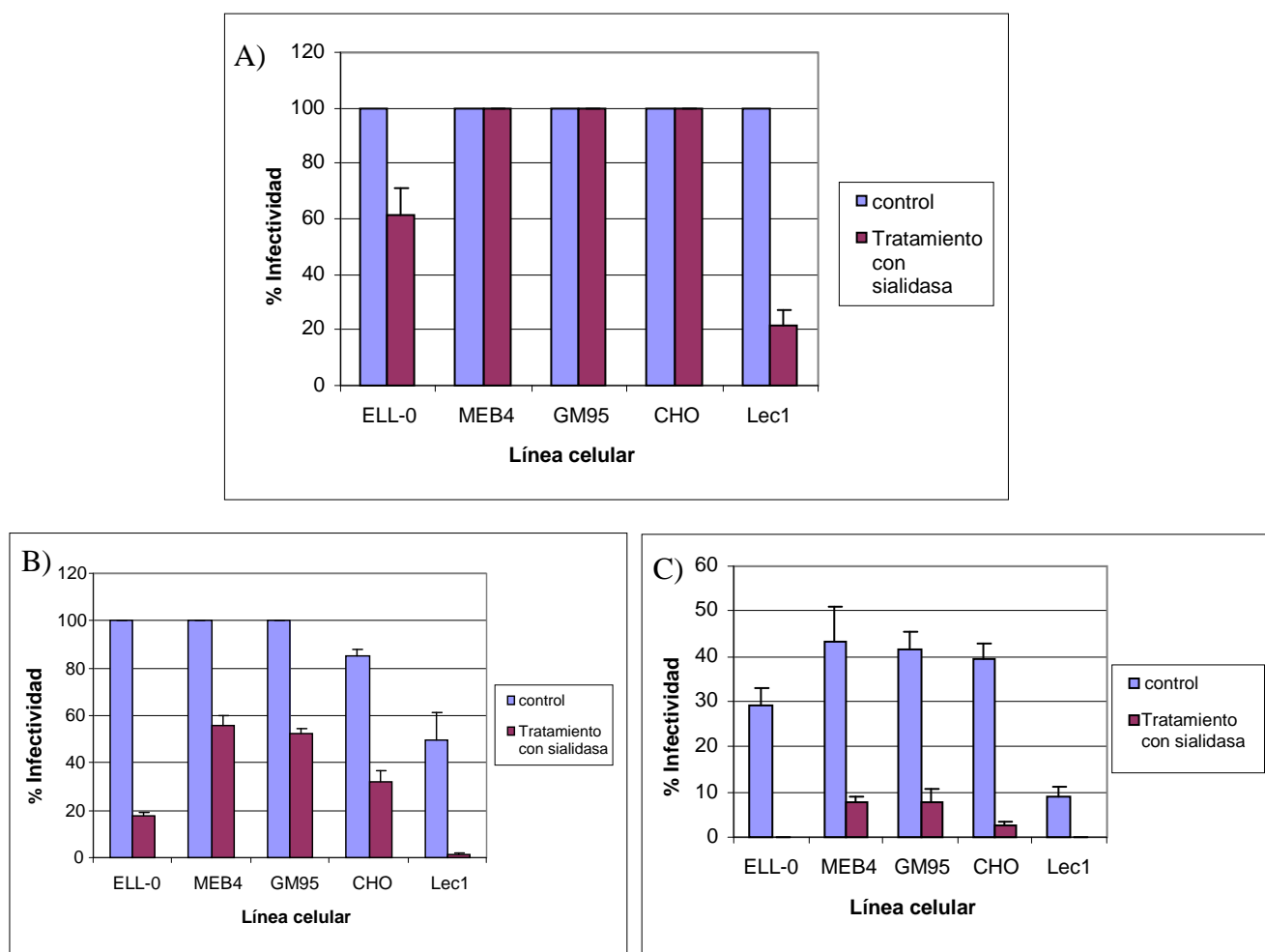


Figura 22- Efecto de la sialidasa de *V.cholerae* sobre la infectividad del NDV a diferentes diluciones de virus rNDV-F3aa-mRFP 10^{-2} (A); 10^{-3} (B); 10^{-4} (C). Los datos corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes.

En resumen, el efecto inhibitorio del tratamiento con la sialidasa de *V.cholerae* sobre la infectividad del NDV dependió de la concentración vírica utilizada. A la máxima concentración vírica (dilución 10^{-2} , que supone una m.o.i. de 100) sólo se produjo inhibición en las células ELL-0 y sobre todo en células Lec1 (aproximadamente el 40 % y 80 % respectivamente). Esto indicaría que en estas líneas celulares, especialmente en Lec1, la eliminación de receptores específicos (con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$) ejerce un gran efecto negativo en la infectividad. Este resultado es interesante, considerando que Lec1 carece de proteínas *N*-glicosiladas, que por tanto, no podrían ser usadas por el virus en ausencia de gangliósidos con ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2 \rightarrow 3$ (eliminados por la sialidasa). En los ensayos de infectividad con una dilución de 10^{-3} (Figura 22B), la m.o.i. del virus utilizada (10 m.o.i.) fue comparable a la de los

ensayos de fusión (Figura 19). El grado de inhibición de la infectividad y la fusión fue similar en células ELL-0 y GM95 mientras que en el resto de líneas celulares el tratamiento con la sialidasa inhibió más potentemente la infectividad que la fusión. Estos datos indicarían la relevancia de los receptores eliminados por la sialidasa en el ciclo del NDV: a pesar de su eliminación, el virus puede unirse a la célula diana y fusionar con la membrana, pero la infección es menos productiva. Esta observación es más llamativa en las células CHO, donde el tratamiento con la sialidasa no ejerció ningún efecto en el grado de fusión del NDV (Figura 19) pero redujo la infectividad aproximadamente el 70 % de la del control (Figura 22B). Estos resultados apoyan la teoría de la existencia de diferentes tipos de moléculas en la superficie celular a las que puede unirse el virus: moléculas con unión virus-célula efectiva (es decir, que conducen a una infectividad productiva), y moléculas cuya unión es improductiva; la acción de la sialidasa limitaría el número del primer tipo de moléculas. De hecho en algunos virus, como el virus de la gripe, se ha visto que la unión inicial a los ácidos siálicos celulares no es suficiente para la infección (Chu y Whittaker, 2004).

Se ha postulado que a menor concentración vírica, los virus utilizan rutas de entrada más específicas. El mayor efecto inhibitorio de la acción de la sialidasa de *V.cholerae* sobre la infectividad a concentraciones menores de virus indicaría que los glicoconjugados con ácidos siálicos con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$ serían más específicos para la entrada del NDV, pudiendo interaccionar con otro tipo de moléculas de manera menos específica cuando el virus está a altas concentraciones.

También hemos analizado el efecto de la sialidasa de *A. ureafaciens* sobre la infectividad del NDV en células ELL-0 puesto que ésta fue la única línea celular que mostró una disminución de la fusión tras recibir el tratamiento con esta enzima (Figura 23). Los resultados obtenidos indican que tanto a la dilución 10^{-3} (10 m.o.i) como con la 10^{-4} (1 m.o.i) se produce una inhibición de la infectividad del NDV en las células ELL-0 tratadas con la sialidasa de en torno al 50 % (Figura 23). Estos datos corroboran los obtenidos sobre la inhibición de la fusión, señalando que en la línea celular ELL-0 el NDV se une a receptores de la superficie celular que contiene ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2 \rightarrow 6$ además de unirse a sialoglicoconjugados con ácidos siálicos $\alpha 2 \rightarrow 3$.

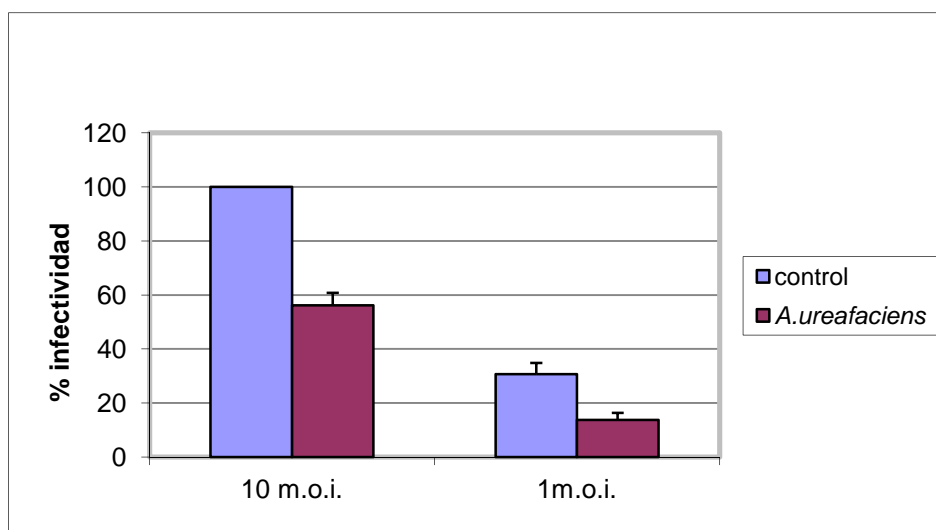


Figura 23- Efecto de la sialidasa de *A.ureafaciens* sobre la infectividad del NDV a diferentes diluciones de virus 10^{-3} (10 m.o.i) y 10^{-4} (1 m.o.i). Los datos corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes.

4.2.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON DISTINTAS SIALIDASAS SOBRE LA UNIÓN DEL NDV CON CÉLULAS DE CULTIVO

Además de estudiar el efecto de las sialidasas sobre la fusión y la infectividad del NDV con diferentes células diana, también analizamos el grado de unión del NDV a células tratadas con las sialidasas según el método del apartado 3.5.12 con objeto de comprobar si el efecto inhibitorio mostrado en los apartados anteriores se debe a un descenso en la unión virus-célula. Las células se incubaron durante 1 h a 37 °C con las sialidasas y después se incubaron durante 1 h a 4 °C con NDV “Clone 30” para permitir la unión del virus a las células. Transcurrido este tiempo las células se lavaron varias veces para retirar el virus no unido y se prepararon para su análisis mediante FACS (apartado de Métodos 3.5.9). Los resultados se cuantificaron a partir de la “G mean” de tres experimentos llevados a cabo de forma independiente y se normalizaron asignando al control el 100 % del grado de unión virus-célula. Los datos obtenidos se muestran en la siguiente Figura 24:

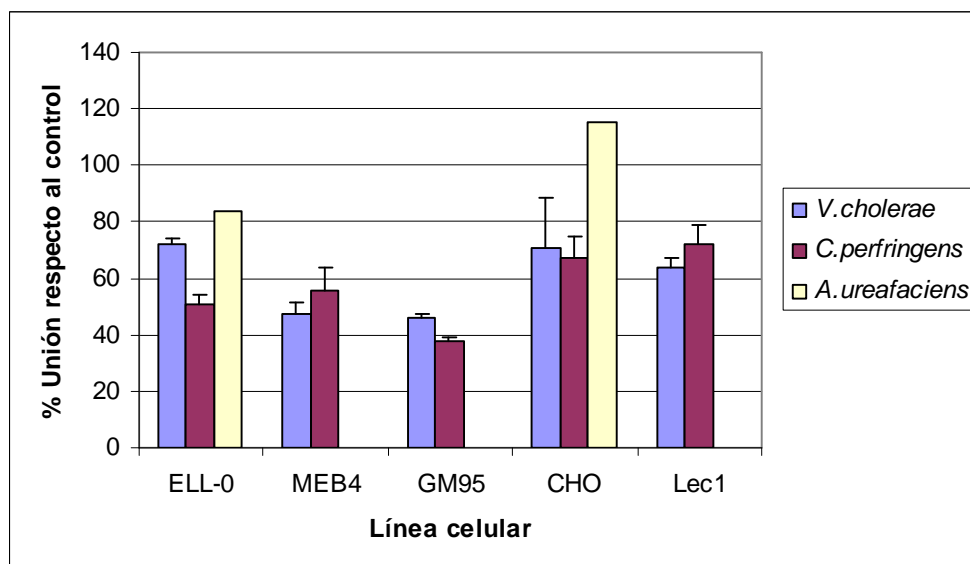


Figura 24- Efecto de las sialidasas de *V.cholerae* (25 mU/ml), *C.perfringens* (50 mU/ml) y *A.ureafaciens* (25 mU/ml) sobre la unión del NDV con células de cultivo. Los datos corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes excepto los de la sialidasa *A.ureafaciens* que muestran el resultado de un experimento.

El tratamiento de las células con las sialidasas de *V.cholerae* y *C. perfringens* (específicas de enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$) redujo el nivel de unión del NDV entre el 30 % y el 50 % dependiendo de la línea celular, incluidas GM95 y Lec1. En células CHO, donde se podría esperar un aumento de la unión del NDV tras observar un incremento de la tinción con FITC-MALI (Figura 20B) así como un aumento de la fusión del NDV (Figura 19), se produjo una disminución de la unión del virus en torno al 30 % tras la hidrólisis de ácidos siálicos $\alpha 2 \rightarrow 3$. Interpretamos este resultado argumentando que se han eliminado sitios de unión no productivos tras el tratamiento de células CHO con las sialidasas mientras que se desenmascaran nuevos sitios de unión productivos que permiten una fusión vírica más efectiva. Es decir, hay una disminución global del grado de unión virus-célula pero un aumento de la unión a receptores productivos. Debido a que las mayores diferencias en la fusión tras el tratamiento con la sialidasa específica de enlaces $\alpha 2 \rightarrow 6$ se observaron en células ELL-0 y CHO, el efecto sobre la unión virus-célula tras el tratamiento con la sialidasa de *A. ureafaciens* se estudió solo en estas dos líneas celulares. La unión se redujo aproximadamente un 20 % respecto al control en ELL-0 mientras que hubo un ligero incremento en las células CHO en consonancia con los datos de aumento de la fusión (Figura 19).

En la siguiente tabla (Tabla 7) se muestra un resumen de los resultados obtenidos tras el tratamiento de las células con las diferentes sialidasas:

SIALIDASA	EFECTO	LÍNEA CELULAR				
		ELL-0	MEB4	GM95	CHO	Lec1
Sialidasa de <i>V.cholerae</i> (enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$)	Fusión	23.8±0.6	5.1±3.1	35.5±5.3	107±6.4	43.8±8.5
	Infectividad (10 m.o.i.)	17.7±1.7	56.1±3.8	52.5±2.1	37.6±7.8	3±2.5
	Unión	72.4±1.4	47.1±4.7	45.8±1.6	70.5±18	63.8±3.3
Sialidasa de <i>C.pfeifferingens</i> (enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$)	Fusión	12.8±3.2	64.1±3.5	61.6±7.6	133.2±9.2	57.5±6.9
	Infectividad	ND	ND	ND	ND	ND
	Unión	50.8±3.5	55.4±8.1	37.6±1.3	67.3±7.8	72.2±6.5
Sialidasa de <i>A.ureafaciens</i> (enlaces $\alpha 2 \rightarrow 6$)	Fusión	45.6±7	101.1±2.7	112.8±8.8	170.2±3.8	119.3±6.1
	Infectividad (10 m.o.i.)	56.2±4.6	ND	ND	ND	ND
	Unión	83.5	ND	ND	115	ND

Tabla 7- Efecto de las sialidasas sobre las diferentes actividades del NDV. Los datos se expresan como % de fusión respecto al control.

En general, el efecto inhibitorio del tratamiento con sialidasas sobre el grado de unión del virus a la célula fue menor que el detectado sobre la fusión e infectividad víricas (Tabla 7).

4.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON DISTINTAS LECTINAS SOBRE LA FUSIÓN, INFECTIVIDAD Y UNIÓN DEL NDV CON CÉLULAS DE CULTIVO

En estos ensayos, analizamos la interacción del NDV con células preincubadas con lectinas con diferente especificidad de unión a restos glucídicos, con objeto de seguir estudiando el tipo de enlace con el que está unido el ácido siálico en los receptores de la superficie celular.

Las lectinas utilizadas y su concentración fueron las indicadas en el apartado 3.5.13 de Métodos (pág. 56 y 57).

4.3.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON DIFERENTES LECTINAS SOBRE LA FUSIÓN DEL NDV CON CÉLULAS DE CULTIVO

Las células de las cinco líneas celulares diferentes se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con diferentes concentraciones de las lectinas de *Sambucus nigra* (SNA) y *Maackia amurensis* (MALI); como control se utilizó la lectina de lenteja (LCH) que no reconoce ácidos siálicos sino restos de manosa. Después se llevaron a cabo experimentos de fusión virus-célula (apartado de Métodos 3.5.5); los resultados obtenidos se muestran en la Figura 25:

- En la línea celular ELL-0, tras el tratamiento con la lectina MALI, (específica de glicoconjugados con ácidos siálicos con unión $\alpha 2 \rightarrow 3$), se observó la inhibición de la fusión del 100 % con la mayor concentración ensayada (100 $\mu\text{g/ml}$). Después de incubarse con la lectina SNA, que reconoce preferentemente ácidos siálicos con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 6$, también se produjo inhibición pero con un máximo del 38 % con la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 25A). Este dato indicaría que en esta línea celular el virus reconoce receptores con uniones $\alpha 2 \rightarrow 3$ y $\alpha 2 \rightarrow 6$, resultados que estarían en consonancia con los de la acción de sialidasas comentados en apartados anteriores (Figuras 18 y 19).

- En la línea celular MEB4 solo se observó inhibición después de incubarse con la lectina de MALI aunque la inhibición no fue tan alta como la observada en el caso de las células ELL-0, siendo el máximo valor de inhibición del 47 %. La lectina SNA no produjo ningún efecto sobre la fusión (Figura 25B).

- En las células GM95 solo se produjo inhibición tras incubarse con la lectina de MALI, siendo el valor máximo de inhibición del 50.7 % (Figura 25C).

- De manera similar, en el caso de las células CHO, sólo detectamos inhibición significativa tras incubarse con la lectina MALI con un nivel máximo de inhibición del 71 % para la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 25C).

- En las células Lec1 no se detectó inhibición con ninguna de las lectinas ensayadas, confirmando el bajo nivel de unión de las lectinas a estas células, tal y como se observa en las Figuras 16 y 17.

- Como control, la preincubación de células con la lectina de lenteja (LCH), que reconoce glicoconjugados ricos en manosa, no ejerció ningún efecto inhibitorio en la fusión del NDV en ninguna de las líneas celulares estudiadas.

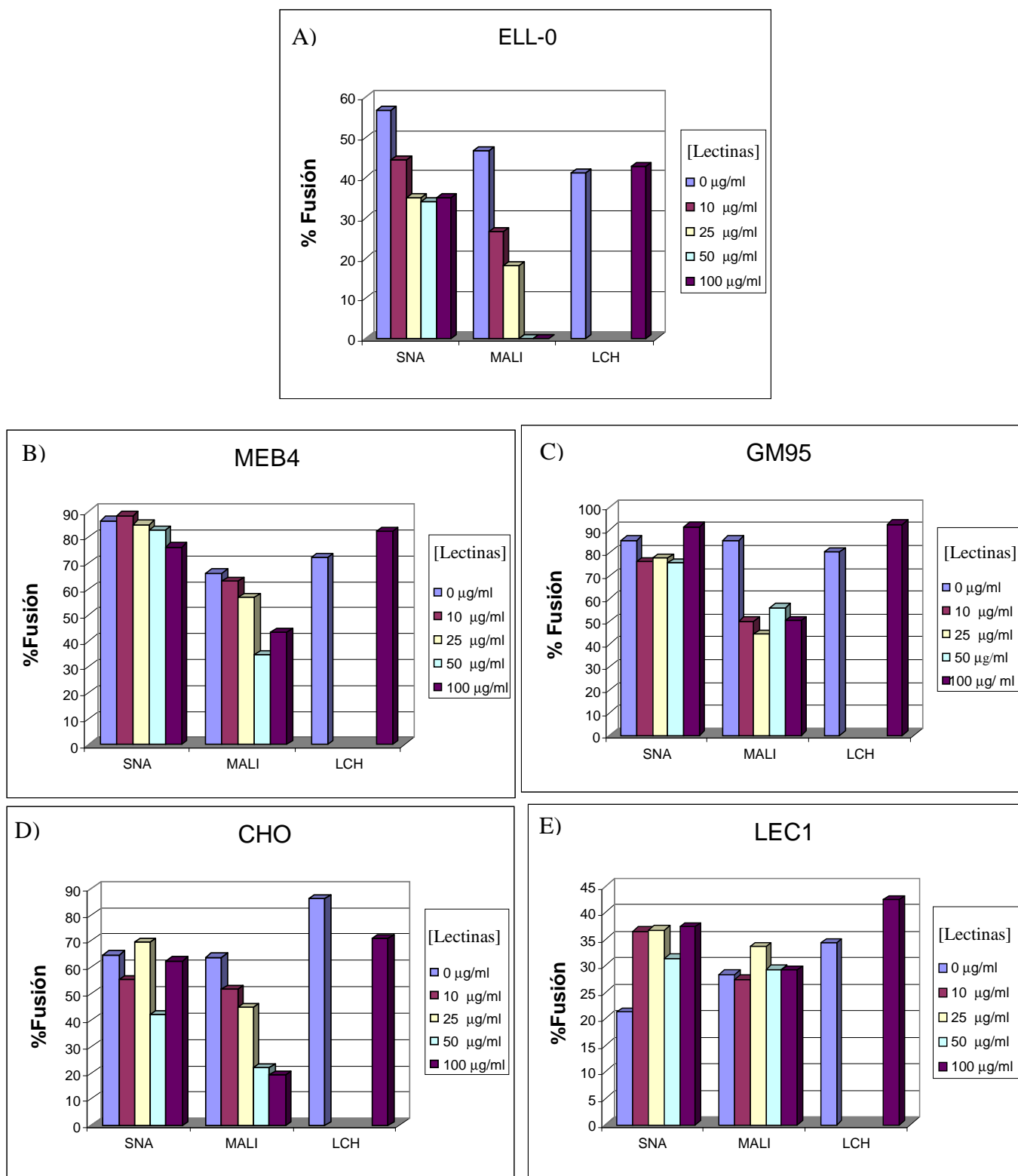


Figura 25- Efecto de la incubación con lectinas sobre la fusión del NDV con las líneas celulares que se indican. Las concentraciones de SNA y MALI utilizadas fueron de 10, 25, 50 y 100 µg/ml. La concentración del control con LCH fue de 100 µg/ml. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes. La SD entre ± 0.93 y ± 18.10 ; no se representa para facilitar la observación de las gráficas.

Por tanto, los resultados de inhibición de la fusión del NDV con células preincubadas con lectinas están en consonancia con los datos obtenidos de la acción de las sialidasas: la incubación con la lectina específica de compuestos con restos de ácidos siálicos con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$ (lectina MALI) inhibió la fusión en todas las líneas celulares excepto en Lec1; mientras que la preincubación con la lectina específica de enlaces $\alpha 2 \rightarrow 6$ (lectina SNA) solo ejerció efecto negativo en células ELL-0, al igual que el tratamiento con la sialidasa de *A.ureafaciens*, también específica de este tipo de enlaces.

La inhibición de la fusión en células CHO (Figura 25D) después de incubar con la lectina MALI confirma que los compuestos sialilados con enlace $\alpha 2 \rightarrow 3$ son importantes en la interacción del NDV con estas células, a pesar de que las sialidasas no ejercieron efecto inhibitorio sino al contrario (Figura 19). Una posibilidad que explicaría esta discrepancia sería que la lectina de MALI y las sialidasas específicas de enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$ tendrían diferentes sustratos.

4.3.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON DIFERENTES LECTINAS SOBRE LA INFECTIVIDAD DEL NDV

En este bloque de experimentos de nuevo se utilizó el virus rNDV-F3aa-mRFP para analizar el efecto de las lectinas sobre la infectividad del NDV. Antes de la infección, las células fueron incubadas en presencia de las lectinas SNA y MALI a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 h a temperatura ambiente, después se lavaron y se infectaron con diluciones 10^{-3} (10 m.o.i.) y 10^{-4} (10 m.o.i.) del virus también durante 1 h a temperatura ambiente, se volvieron a lavar y se incubaron hasta el día siguiente a 37 °C. En la Figura 26 se muestran fotografías representativas del efecto de la preincubación con lectinas sobre la infectividad del NDV tomadas con un objetivo 10x. Los datos mostrados en la Figura 27 se calcularon contando el número de células rojas (células infectadas) dividido por el total de células y multiplicado por 100, a partir de fotografías como las mostradas en la Figura 26.

Como se puede ver, con la dilución 10^{-3} del virus (Figura 26A y 27A) después de la incubación con la lectina MALI se produjo una inhibición de la infectividad del NDV respecto del control del 75.4 % en células ELL-0, del 67.5 % en células MEB4 y del 32.7 % en células CHO. A esta dilución, no detectamos ningún efecto en células GM95.

En lo que respecta a la lectina de SNA, se observó una inhibición del 34.5 % en las células ELL-0, pero en el resto de líneas celulares no se redujo la infectividad vírica. De manera similar al efecto de la sialidasa de *V.cholerae* en la infectividad (Figuras 21 y 22), la preincubación con la lectina de MALI ejerció mayores niveles de inhibición a menores concentraciones de virus (Figuras 26B y 27B), reflejando como se ha mencionado en el apartado anterior la mayor especificidad de los receptores bloqueados por esta lectina en la interacción del virus. La acción de la lectina MALI resultó más inhibitoria en MEB4 que en GM95, indicando que muchos de los receptores bloqueados por las lectinas serían gangliósidos. Por otro lado, como se discutirá más adelante, la línea celular MEB4 y la línea mutante GM95 presentaron niveles similares de fusión con el NDV, a pesar de la ausencia de gangliósidos en esta última (Figura 37 de pág. 102). En las células Lec1 no se detectó ningún efecto en la infectividad del NDV tras la preincubación con las lectinas de manera similar a los datos relativos a la fusión.

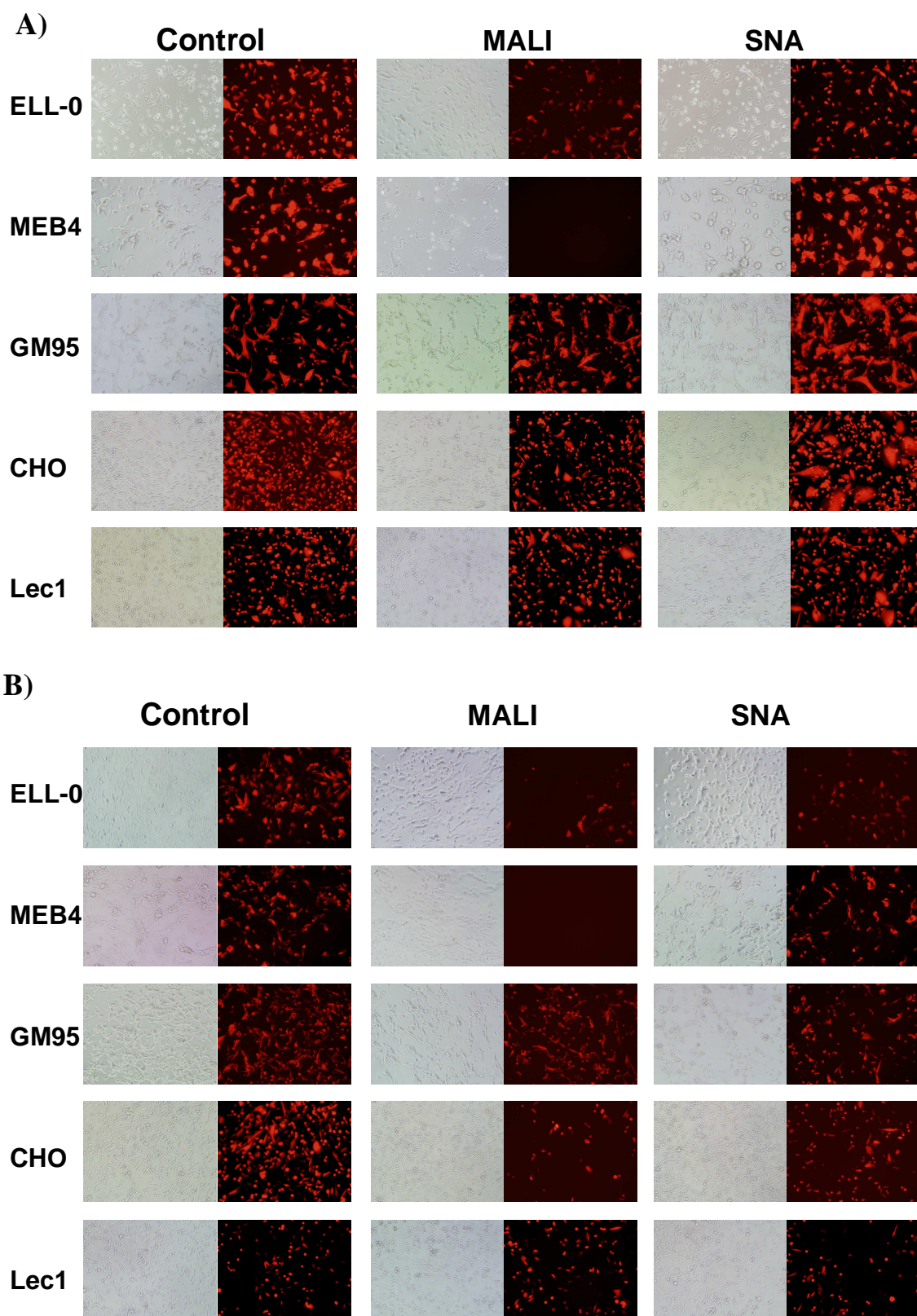
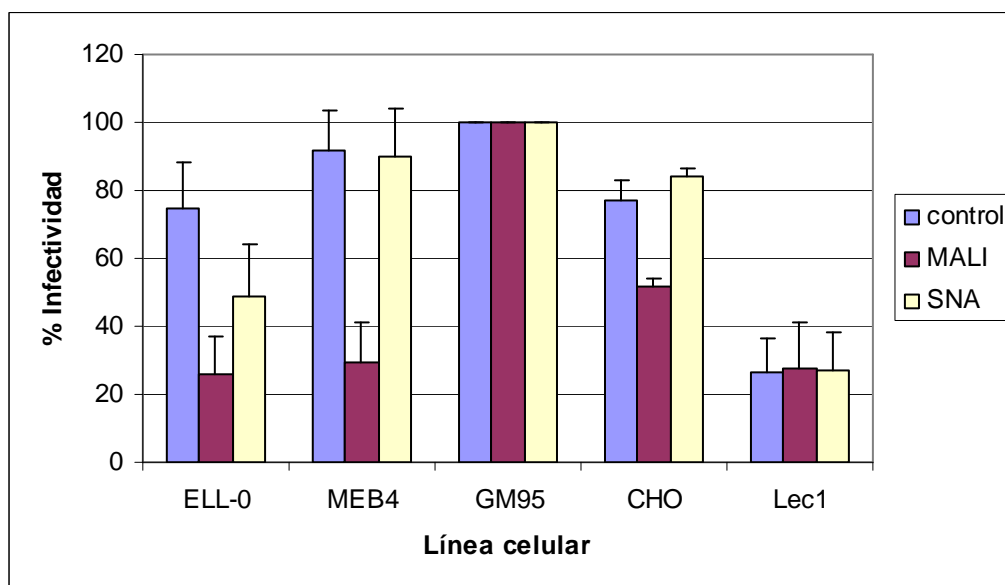


Figura 26- Fotografías que muestran cómo afecta el pretratamiento de las células con lectinas de *Maackia amurensis* (MALI) y *Sambucus nigra* (SNA) a la infectividad del NDV en diferentes líneas celulares. A) dilución del virus 10^{-3} y B) dilución del virus 10^{-4} . Fotografías tomadas con el objetivo 10x.

A)



B)

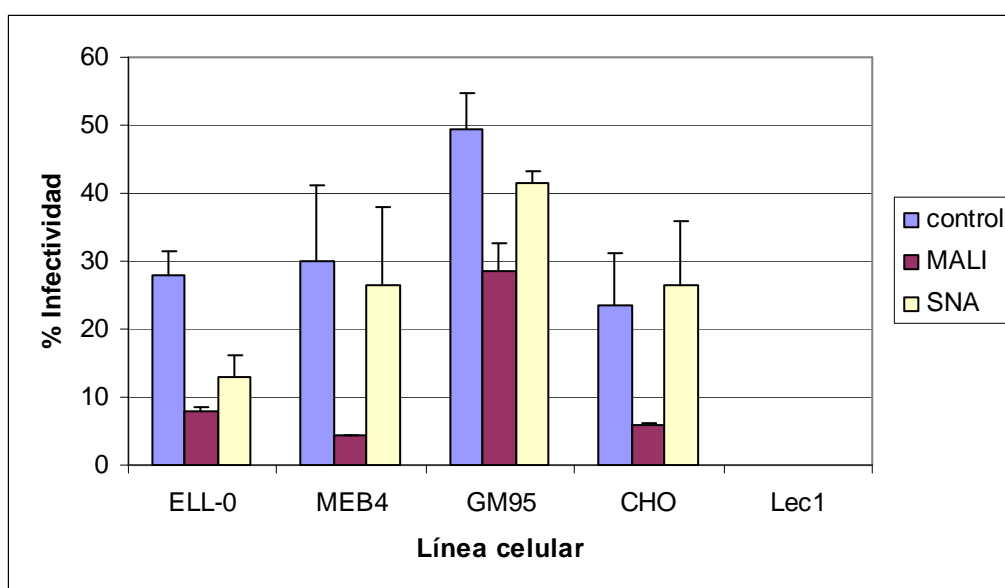


Figura 27- Efecto de la incubación de las células con las lectinas de SNA (50 $\mu\text{g/ml}$) y de MALI (50 $\mu\text{g/ml}$) sobre la infectividad del NDV en las diferentes líneas celulares A) dilución del virus 10^{-3} B) dilución del virus 10^{-4} . Los datos corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes obtenidos de la cuantificación de fotografías como las mostradas en la Figura 26.

4.3.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON DIFERENTES LECTINAS SOBRE LA UNIÓN DEL NDV CON CÉLULAS DE CULTIVO

Una vez estudiado el efecto de las lectinas sobre la fusión e infectividad del NDV, analizamos mediante FACS el efecto sobre el grado de unión del NDV con células de cultivo preincubadas con las lectinas como se explica en los apartados de Métodos 3.5.13 y 3.5.9. Los resultados se cuantificaron a partir de la “G mean” de tres experimentos llevados a cabo de forma independiente. Los resultados se normalizaron asignando al control el 100 % del grado de unión virus-célula. Los datos obtenidos se muestran en la siguiente figura:

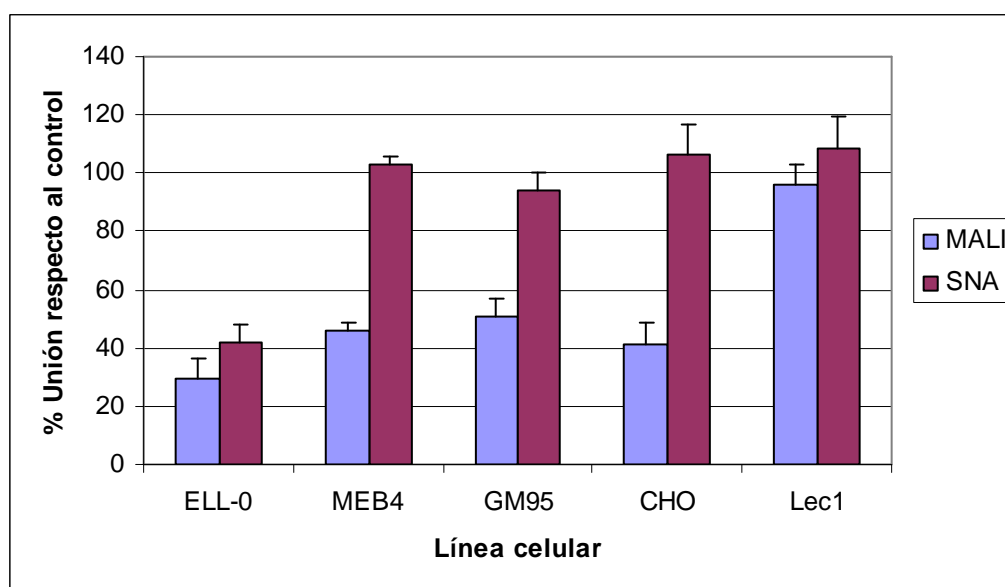


Figura 28- Efecto de las lectinas sobre el grado de unión del NDV con células de cultivo. Los datos corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes.

Los resultados muestran que la inhibición del grado de unión del NDV tras la preincubación de las células diana con lectinas son coincidentes con los de inhibición de la fusión señalando que la lectina MALI inhibe la unión del virus en las células ELL-0, MEB4, GM95 y CHO mientras que no se observa ninguna inhibición de la unión en células Lec1. Además, la preincubación de células ELL-0 con la lectina SNA determinó una gran disminución del grado de unión del NDV (aproximadamente del 60 %), mientras que, como se esperaba por los resultados de fusión e infectividad, no se observó ningún efecto en las otras líneas celulares.

En la siguiente tabla (Tabla 8) se muestra un resumen de los resultados obtenidos sobre las diferentes actividades tras el tratamiento de las células con las diferentes lectinas:

LECTINA	EFECTO	LÍNEA CELULAR				
		ELL-0	MEB4	GM95	CHO	Lec1
Lectina de <i>Maackia amurensis I</i> (enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$) (50 $\mu\text{g/ml}$)	Fusión	0	51.7 \pm 4	64.6 \pm 5	33.8 \pm 2.6	100
	Infectividad (10 m.o.i.)	33.3 \pm 12.1	31.8 \pm 11.7	100	67.1 \pm 2.4	100
	Unión	29.3 \pm 7	46 \pm 3	51 \pm 6	41 \pm 8	96 \pm 7
Lectina de <i>Sambucus nigra</i> (enlaces $\alpha 2 \rightarrow 6$) (50 $\mu\text{g/ml}$)	Fusión	61.2 \pm 3	100	100	100	100
	Infectividad (10 m.o.i.)	61.9 \pm 6.3	100	100	100	100
	Unión	42 \pm 6	103 \pm 3	94 \pm 6	106.6 \pm 10	108.6 \pm 11
Lectina de lenteja (100 $\mu\text{g/ml}$)	Fusión	100	100	100	100	100

Tabla 8- Efecto de las lectinas sobre las diferentes actividades del NDV. Los datos se expresan como % respecto al control excepto los datos de infectividad que se muestra el valor del control (C) y de las células tratadas (T).

En resumen, la preincubación con la lectinas bloquea los sitios de unión del NDV traduciéndose en una disminución de la fusión e infectividad víricas.

4.4 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON DIFERENTES SIALILTRANSFERASAS SOBRE LA FUSIÓN E INFECTIVIDAD DEL NDV CON CÉLULAS DE CULTIVO

Una vez visto que las sialidasas y las lectinas ejercían un efecto inhibitorio sobre la fusión e infectividad del NDV, quisimos comprobar si la recuperación de los niveles de ácidos siálicos por la acción de las sialiltransferasas (SIATs) revertía el efecto.

Las SIATs son enzimas que añaden ácidos siálicos a restos de galactosa de glicoconjugados mediante enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$ o $\alpha 2 \rightarrow 6$ según su especificidad, en presencia del sustrato CMP-NANA que actúa como donador de ácidos siálicos. En estos experimentos, se analizó la especificidad del NDV respecto al tipo de enlace del ácido siálico utilizando diferentes SIATs que unían ácidos siálicos con enlaces $\alpha(2 \rightarrow 3)-N$ y $\alpha(2 \rightarrow 6)-N$. Estas dos SIATs añaden ácidos siálicos con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$ o $\alpha 2 \rightarrow 6$ a restos de galactosa unidos a *N*-acetilglucosamina de proteínas *N*-glicosiladas. También empleamos la $\alpha(2 \rightarrow 3)O$ -SIAT que une ácidos siálicos a restos de galactosa unidos a *N*-acetilgalactosamina de glicolípidos y glicoproteínas. Previamente a la incubación con SIATs, las células fueron desialiladas mediante incubación con la sialidasa de *V.cholerae*, tal como se describe en el apartado 3.5.14 de Métodos. Después las células se incubaron durante 4 h con una de las tres SIATs en presencia de 1 mM de CMP-NANA a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, se lavaron y se llevaron a cabo los experimentos de fusión con NDV marcado con R₁₈, o de infectividad con el virus recombinante rNDV-3Faa-mRFP.

4.4.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON DIFERENTES SIATs SOBRE LA FUSIÓN DEL NDV CON CÉLULAS DE CULTIVO

Tras el tratamiento con SIATs como se describe más arriba, se estudió la fusión con el NDV-R₁₈; en la Figura 29 se muestran fotografías representativas de estos experimentos para cada una de las líneas celulares. Los datos de la Figura 30 se obtuvieron a partir de fotografías como las de la Figura 29, tomadas en campos al azar, contando el número de células rojas, dividido por el total de células y multiplicado por 100 (% de fusión).

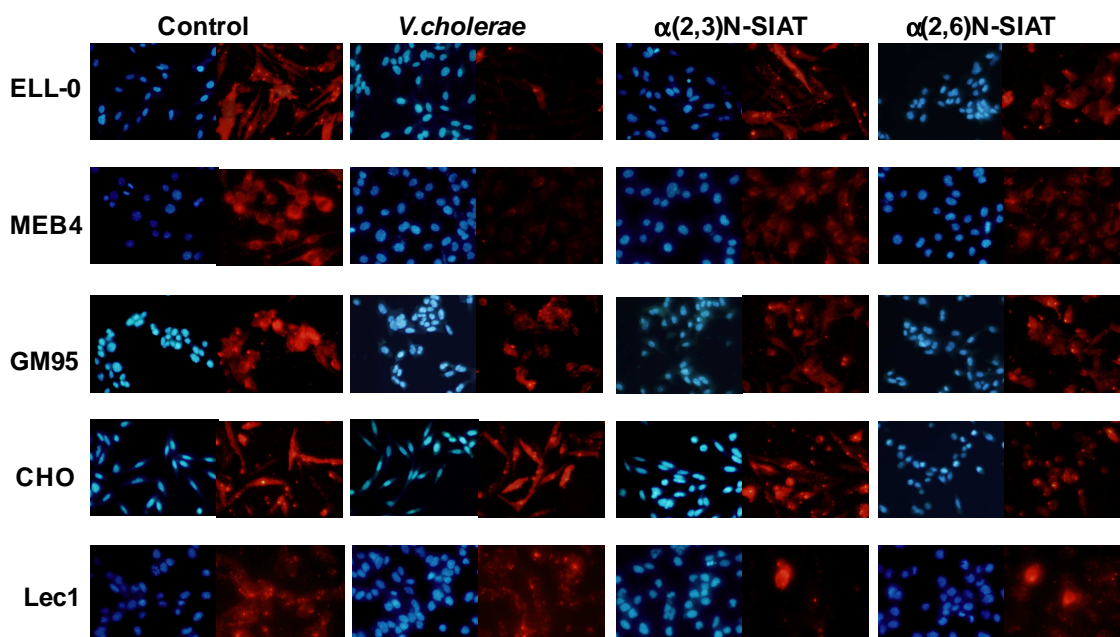


Figura 29- Fotografías representativas de experimentos de fusión en los que diferentes líneas celulares se trataron con las SIATs indicadas a la concentración de 50 mU/ml, excepto en MEB4 y Lec1 donde la concentración de $\alpha(2\rightarrow6)N$ -SIAT fue de 25 mU/ml.

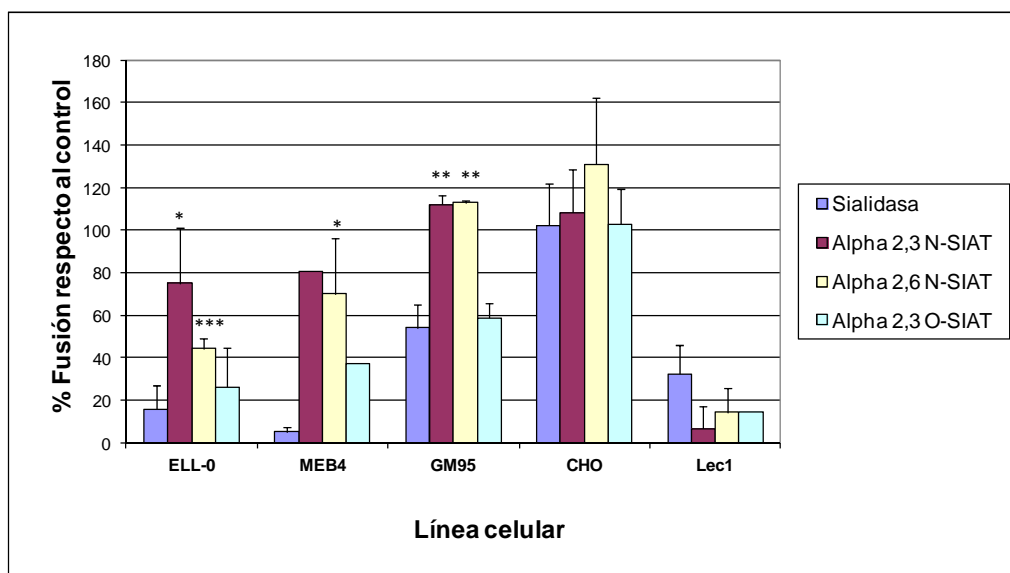


Figura 30- Efecto de la adición de ácidos siálicos sobre la fusión del NDV en diferentes líneas celulares. Las concentraciones de SIATs utilizadas fueron de 50 mU/ml en las líneas ELL-0, GM95 y CHO; en MEB4 y Lec1 la concentración de $\alpha(2\rightarrow6)N$ -SIAT fue de 25 mU/ml y 50 mU/ml para $\alpha(2\rightarrow3)N$ -SIAT. Estadística test t de Student, *** extremadamente significativo $p < 0.001$, ** muy significativo $p < 0.01$ y * significativo $p < 0.05$.

Como puede verse, en el caso de las células ELL-0 (Figura 30), se observó la recuperación significativa de los niveles de fusión virus-célula tras el tratamiento con $\alpha(2\rightarrow3)N$ -SIAT y $\alpha(2\rightarrow6)N$ -SIAT confirmándose el papel de los ácidos siálicos con enlace $\alpha 2\rightarrow 6$ en la interacción del NDV con esta línea celular (Figuras 29 y 30). Además el incremento de ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2\rightarrow 6$ en las células MEB4 y GM95 determinó una recuperación parcial de los niveles de fusión del NDV los cual indicaría que, si están presentes, el NDV puede usar eficientemente estos glicoderivados como receptores. En CHO no se observaron diferencias significativas tras el tratamiento con SIATs, probablemente porque el tratamiento con la sialidasa de *V.cholerae* no produce disminución de los niveles de fusión (Figura 30) con lo cual no se puede observar la recuperación de la fusión aunque estas células se preincuban con SIATs. El tratamiento de las células Lec1 con las tres SIATs no recuperó la fusión vírica sino que, al contrario, observamos la reducción de los niveles de fusión. Estos resultados son lógicos en el caso de $\alpha(2\rightarrow3)N$ -SIAT y $\alpha(2\rightarrow6)N$ -SIAT puesto que estas células carecen de *N*-glicoproteínas que actúen como sustratos de estas enzimas. Como esperábamos por nuestros datos anteriores que indican que las *O*-glicoproteínas no son necesarias para las actividades del NDV (Ferreira *et al.*, 2004b) la resialilación con $\alpha(2\rightarrow3)O$ -SIAT no recuperó la fusión del NDV.(El aumento de fusión detectado en las células ELL-0 y MEB4 (Figura 30) no fue estadísticamente significativo según el análisis realizado mediante el test t de Student).

4.4.2 EFECTO DE LAS SIATs SOBRE LA INFECTIVIDAD DEL NDV EN CÉLULAS ELL-0

Teniendo en cuenta los resultados que se han mostrado en apartados anteriores, estos experimentos se llevaron a cabo con la línea celular ELL-0: en esta línea celular el NDV interacciona con sialoglicoconjugados con ácidos siálicos unidos con enlaces $\alpha 2\rightarrow 6$, ya que se produce una disminución de la fusión tras el tratamiento con la sialidasa de *A.ureafaciens* que hidroliza enlaces $\alpha 2\rightarrow 6$ con mayor afinidad que $\alpha 2\rightarrow 3$ (Figura 19). También se produce una inhibición tanto de la fusión como de la infectividad del NDV tras la incubación con la lectina de SNA que reconoce ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2\rightarrow 6$. Por ello realizamos un experimento en el cual se desialilaron primero las células con sialidasa de *V.cholerae* (25mU/ml) y después se

incubaron con una de las dos *N*-sialiltransferasas en presencia de CMP-NANA (Métodos 3.5.14). Después se infectaron con rNDV-F3aa-mRFP (dilución 10^{-3}) durante una hora a temperatura ambiente y se incubaron en medio completo hasta el día siguiente. En la Figura 31 pueden verse los resultados obtenidos.

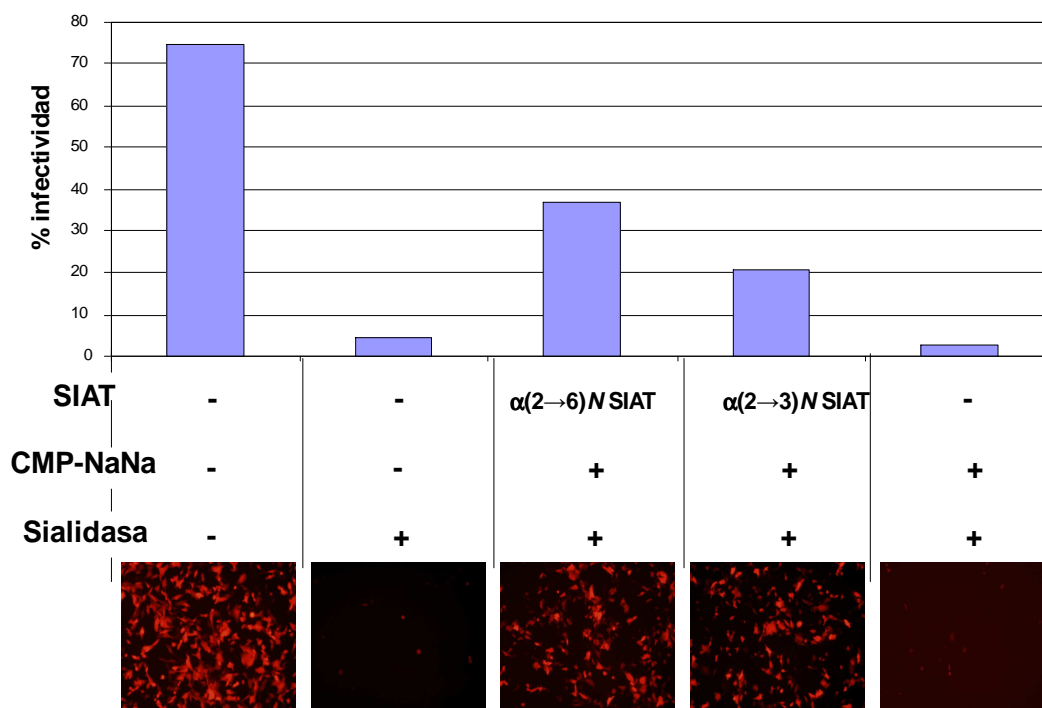


Figura 31- Efecto de las SIATs sobre la infectividad del NDV en células ELL-0. Las enzimas se utilizaron a las siguientes concentraciones: la sialidasa de *V.cholerae* a 25 mU/ml, la SIAT $\alpha(2\rightarrow6)N$ a 20 mU/ml y la SIAT $\alpha(2\rightarrow3)N$ a 25 mU/ml; el CMP-NANA se utilizó a una concentración 1mM. Los datos corresponden a la media de dos experimentos independientes. Imágenes de un experimento representativo (objetivo 10x).

Como se deduce de los resultados de la figura anterior de la figura anterior (Figura 31), se produjo una recuperación de la infectividad tras el tratamiento con ambas SIATs. En el caso de $\alpha(2\rightarrow6)N$ - SIAT se recuperó el 49.3 % respecto al control (considerado el 100 %) y en el caso de $\alpha(2\rightarrow3)N$ -SIAT se recuperó el 27.8 % con respecto al control. Estos resultados indican que en las células ELL-0 hay receptores con ácidos siálicos unidos en $\alpha(2\rightarrow6)N$ y $\alpha(2\rightarrow3)N$ y que ambos son utilizados por el NDV, confirmando los datos de acción de sialidasas y lectinas. La diferencia que hay entre los niveles de recuperación de la infectividad del NDV producida en células ELL-0 tras el tratamiento

con $\alpha(2\rightarrow3)N$ -SIAT y la inhibición producida por las sialidasas de *V.cholerae* y *C.perfringens* así como la producida por la lectina de MALI específicas de enlace $\alpha 2\rightarrow 3$, podría deberse a diferencias en la eficacia de incorporación de ácidos siálicos por acción de las SIATs a las concentraciones utilizadas.

Además, en células ELL-0 también llevamos a cabo un experimento para comprobar que efectivamente la $\alpha(2\rightarrow6)N$ -SIAT había incorporado los ácidos siálicos con ese enlace ya que la unión a receptor $\alpha 2\rightarrow 6$ es un resultado novedoso. Para ello, una vez desialiladas las células con la sialidasa de *V.cholerae* o de *A.ureafaciens* y ser incubadas con la enzima $\alpha(2\rightarrow6)N$ -SIAT en presencia de CMP-NANA, se tiñeron con la lectina marcada con FITC de SNA que se une específicamente a restos de ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2\rightarrow 6$ (Figura 32).

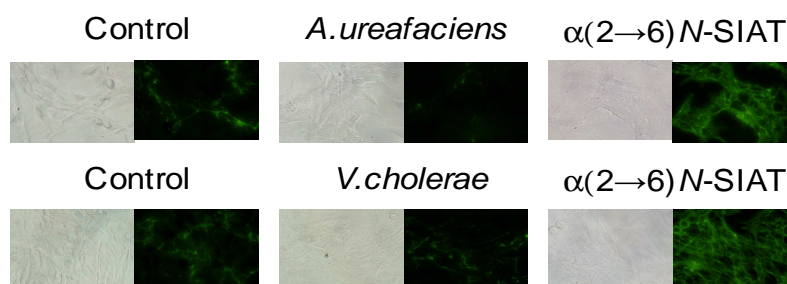


Figura 32- Fotografías representativas de un experimento en el que se tiñeron células ELL-0 con la lectina fluorescente FITC-SNA (20 µg/ml) tras ser tratadas con la SIAT $\alpha(2\rightarrow6)N$ a 25 mU/ml . Las sialidasas de *V.cholerae* y *A.ureafaciens* se utilizaron a la concentración de 25 mU/ml.

En resumen, el empleo de SIATs que unen ácidos siálicos con diferente tipo de enlace revela que los receptores del NDV poseen ácidos siálicos unidos a las *N*-glicoproteínas con enlaces $\alpha 2\rightarrow 3$, ya que se produce la recuperación de la fusión del NDV tras el tratamiento con $\alpha(2\rightarrow3)N$ -SIAT en todas las líneas celulares excepto en Lec1 y CHO (como se ha visto en esta línea la sialidasa no produjo disminución de la fusión). De manera interesante, el ácido siálico también podría estar unido con enlaces $\alpha(2\rightarrow6)N$ ya que observamos la recuperación de la fusión del NDV en las líneas ELL-0, MEB4 y GM95 después de la incubación con $\alpha(2\rightarrow6)N$ -SIAT, lo cual de nuevo señala que el NDV además de reconocer enlaces $\alpha 2\rightarrow 3$, reconoce enlaces $\alpha 2\rightarrow 6$. Estos datos se confirman con el estudio de infectividad realizado en células ELL-0 donde hemos

visto cómo se recupera la infectividad al incubar las células con las $\alpha(2\rightarrow3)N$ y $\alpha(2\rightarrow6)N$ SIATs, coincidiendo estos resultados con los obtenidos con el tratamiento con sialidasas y lectinas en esta línea celular. Además de con las 5 líneas celulares mencionadas, también hemos llevado a cabo experimentos de fusión (datos no mostrados) e infectividad con la línea celular 293 la cual expresa en su superficie solo sialoglicoconjugados con ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2\rightarrow 6$ (Walters *et al.*, 2001). Estos ensayos revelan que el rNDV-F3aa-mRFP infecta estas células con eficacia similar a la infección de células que expresan receptores con ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2\rightarrow 3$ (Figura 33).

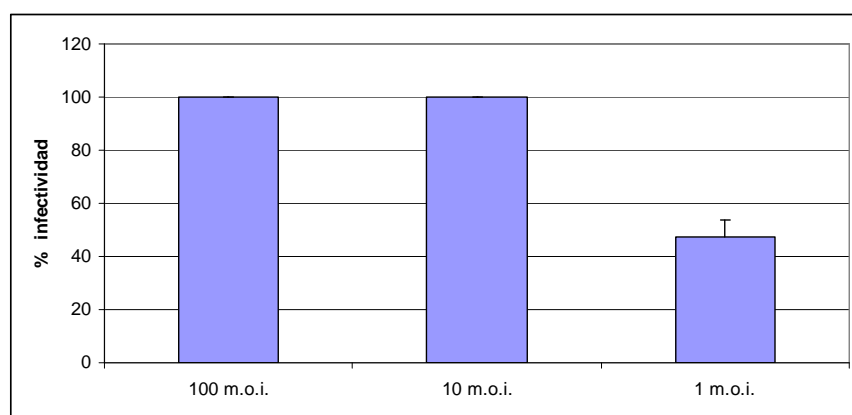


Figura 33- Infectividad del rNDV-F3aa-mRFP en células 293. Los datos corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes. El % de infectividad se calculó como número de células rojas (infectadas) sobre el total de células de 3 campos tomados al azar con el objetivo 10x.

Estos datos son un apoyo adicional a la conclusión de que el NDV puede utilizar eficientemente receptores sialilados con ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2\rightarrow 6$.

4.5 INCORPORACIÓN DE GANGLIÓSIDOS EN CÉLULAS Lec1 Y EFECTO SOBRE LA FUSIÓN DEL NDV

Como se ha comentado a lo largo de esta Memoria, la línea celular Lec1 es una línea derivada de la línea CHO que carece de proteínas *N*-glicosiladas puesto que tiene una mutación en la GlcNAc-transferasa 1 (GlcNAc-T1). Aunque el NDV fusiona con las células Lec1, los niveles de fusión detectados fueron menores que los obtenidos con células CHO, entre el 40 y el 75 % menos dependiendo de la concentración de virus utilizada (Figura 34).

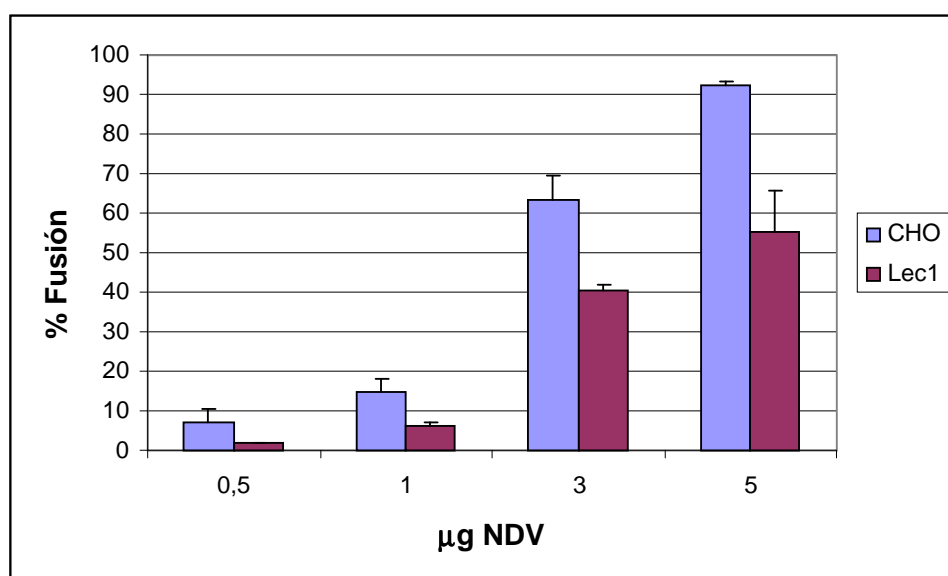
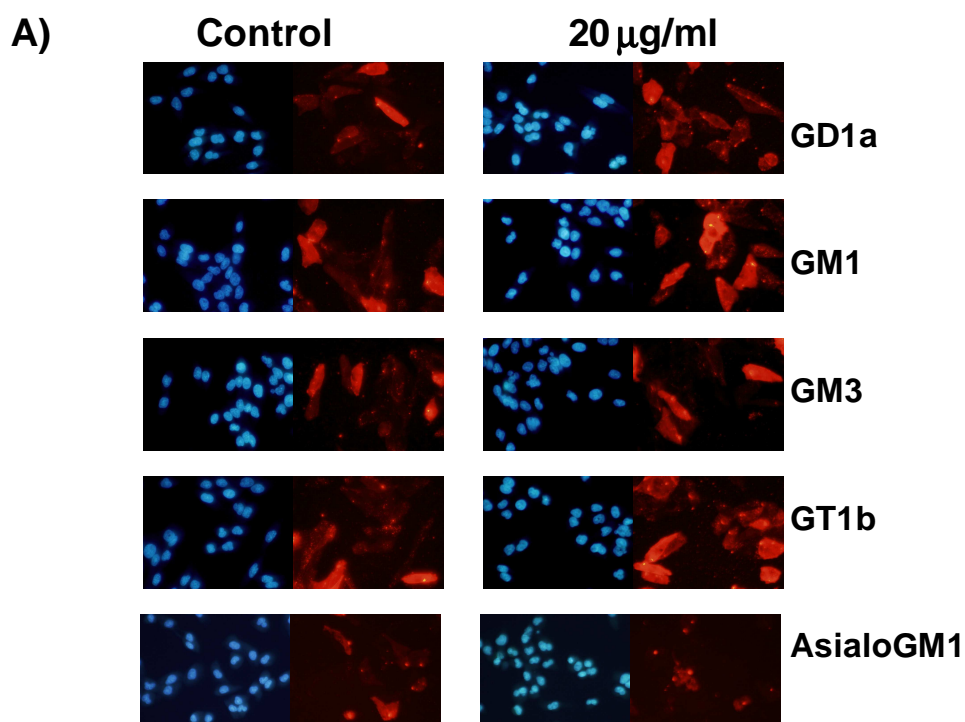


Figura 34- Fusión del NDV-R₁₈ con las células CHO y Lec1. Los datos se expresan como la media \pm SD de tres experimentos independientes.

Teniendo en cuenta estas diferencias, en la serie de experimentos que se resumen a continuación quisimos comprobar si la adición a las células Lec1 de gangliósidos específicos podría aumentar los niveles de fusión del NDV con estas células. La incorporación de gangliósidos se llevó a cabo mediante el método que se detalla en el apartado 3.5.15 de Métodos. Una vez incorporados, realizamos experimentos de fusión con NDV-R₁₈. Como se puede observar en la Figura 35, el grado de fusión del NDV aumentó después de incorporar cuatro de los gangliósidos excepto el utilizado como

control, asialoGM1. El aumento resultó significativo cuando se incorporaron GM1, GD1a y GT1b (t de Student $p < 0,01$ para GD1a y GT1b; $p < 0,05$ para GM1).



B)

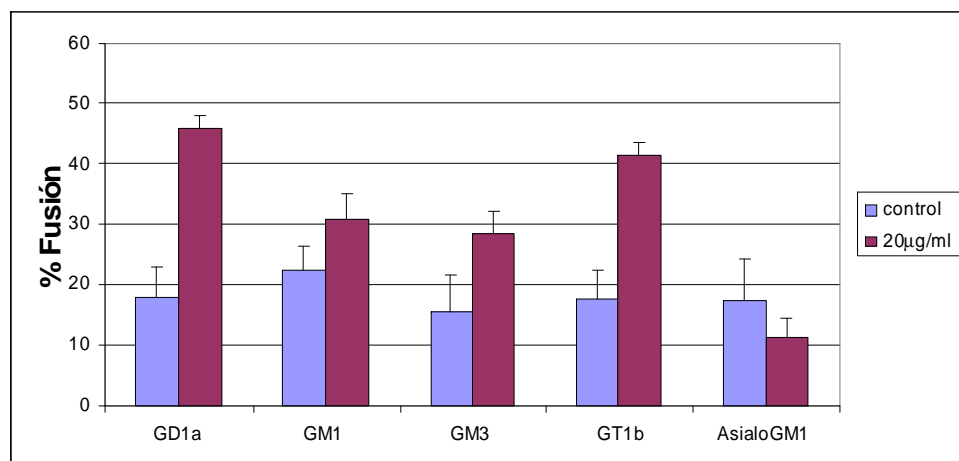


Figura 35- Efecto de la incorporación de gangliósidos sobre la fusión del NDV con células Lec1. A) Fotografías de un experimento representativo. B) % de fusión virus-célula. Control, células a las que no se añadieron gangliósidos. La concentración de gangliósidos utilizada fue 20 $\mu\text{g/ml}$. Los datos corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes.

La incorporación efectiva de gangliósidos se analizó mediante la tinción de las células con la lectina de *Maackia amurensis* marcada con la sonda FITC después de incorporar los gangliósidos en células GM95, ya que esta lectina apenas interacciona con Lec1. En todos los casos se observó un aumento de la fluorescencia, lo que reflejó un aumento del contenido de gangliósidos en la membrana celular (Figura 36). En las células GM95 también se realizaron experimentos de fusión virus-célula después de incorporar gangliósidos; sin embargo, como estas células presentan un alto porcentaje de fusión en el control no se apreció un aumento significativo de fusión después de incorporar gangliósidos (datos no mostrados).

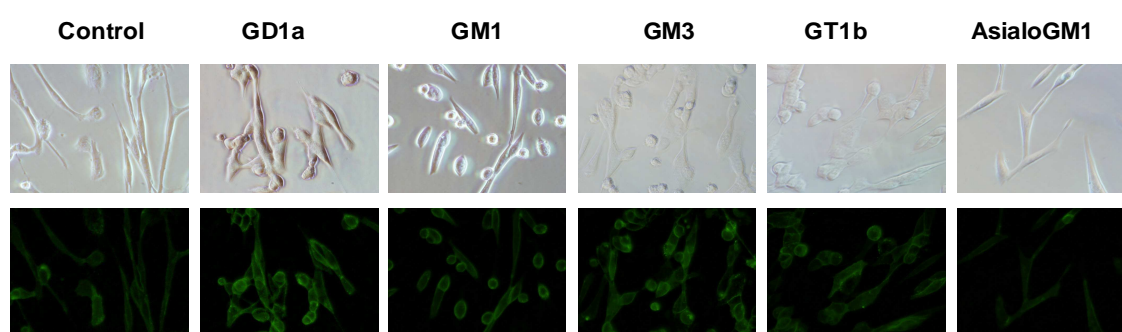


Figura 36- Fotografías representativas de un experimento de incorporación de gangliósidos en células GM95. Las células fueron teñidas con la lectina fluorescente FITC-MALI (20 $\mu\text{g/ml}$) (Objetivo 40x).

La diferencia en los niveles de fusión del NDV con células CHO y Lec1 que se resume en la Figura 34, junto con diferencias en el nivel de infectividad (Figuras 21 y 27) confirman de nuevo que el NDV utiliza *N*-glicoproteínas como receptores para entrar en la célula diana ya que en su ausencia (células Lec1) se reducen los niveles de fusión. Ensayos realizados con estas dos líneas celulares para estudiar los receptores del virus de la gripe también muestran la importancia de las *N*-glicoproteínas como receptores de este virus (Chu y Whittaker, 2004). Con los experimentos resumidos en este apartado, hemos visto que el aumento de la concentración de gangliósidos en la membrana celular determina a su vez un incremento de la fusión del NDV en células Lec1, por lo que el aumento de la concentración de gangliósidos podría suplir, en parte, la deficiencia de *N*-glicoproteínas en la membrana de éstas células.

4.6 EXTRACCIÓN DE GANGLIÓSIDOS DE CÉLULAS MEB4 Y GM95

Como se ha comentado en el apartado de Métodos 3.5.17, la línea celular GM95 carece de gangliósidos debido a la deficiencia de la enzima glicosilceramida sintetasa. Sin embargo, los niveles de fusión del NDV con esta línea celular y con su parental MEB4 fueron muy similares a todas las concentraciones de virus ensayadas (Figura 37). Por ello, llevamos a cabo experimentos de extracción de gangliósidos de ambas líneas celulares para comprobar que, en efecto, las células GM95 carecían de gangliósidos, ya que se ha descrito que podrían incorporarlos del medio de cultivo (Matrosovich *et al.*, 2006).

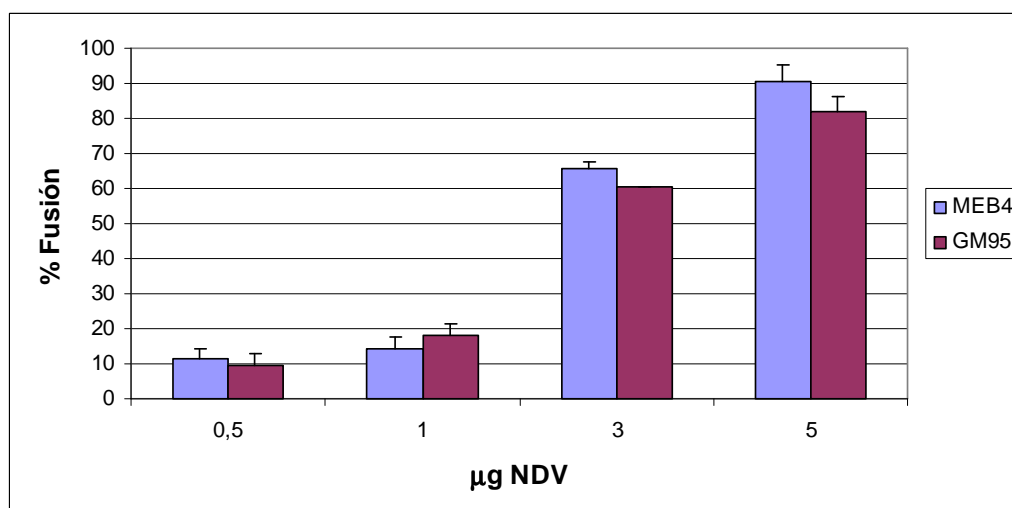


Figura 37- Fusión del NDV-R₁₈ con células MEB4 y GM95. Los datos son la media \pm SD de tres experimentos independientes.

El proceso de extracción se realizó tal como se describe en el apartado 3.5.17 de Métodos. Los extractos se analizaron mediante TLC; los resultados se pueden ver en la siguiente Figura 38 que muestra la fotografía de una placa representativa. Como se observa, la línea celular GM95 no posee gangliósidos, al menos no detectables en las condiciones del experimento. Sin embargo, en MEB4 está presente mayoritariamente GM3 (Figura 38).

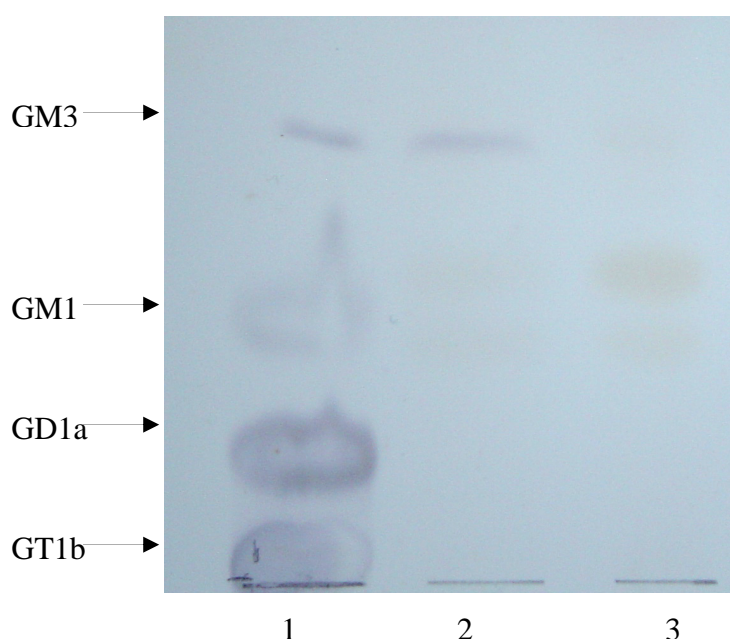


Figura 38- TLC de gangliósidos extraídos de células MEB4 y GM95. Carriles 1- Mezcla estándar de gangliósidos (GT1b + GD1a + GM1 + GM3); 2-MEB4; 3-GM95

Como se ha mostrado a lo largo de este trabajo, las líneas celulares MEB4 y GM95 no muestran apenas diferencias en la fusión e infectividad del NDV. Por tanto, podríamos concluir que la presencia o no de gangliósidos no afecta ni a la fusión ni a la infectividad. Teniendo en cuenta todos los resultados mostrados en estos dos últimos apartados, proponemos que las *N*-glicoproteínas son las moléculas que funcionarían como receptores más específicos del NDV, sirviendo los gangliósidos como moléculas de unión inicial seguida de la unión más específica a otro tipo de moléculas. En este sentido, estudios realizados con el virus de la gripe también muestran que los gangliósidos no son esenciales para que se produzca la infección, proponiendo que las moléculas que actuarían como receptores específicos serían las *N*-glicoproteínas (Matrosovich *et al.*, 2006; Chu y Whittaker, 2004).

4.7 RELEVANCIA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

El primer paso de la entrada del NDV en la célula diana es la interacción de la glicoproteína HN del virus con los ácidos siálicos presentes en los receptores celulares. La unión a receptores con ácidos siálicos está descrita tanto en virus con envoltura como sin ella. Los ácidos siálicos son los glúcidos más abundantes en la superficie celular, por

lo que es lógico que sean usados por muchos virus al menos como moléculas de unión inicial (Olofson y Bergstrom, 2005). Las células pueden presentar ácidos siálicos con uniones diferentes a los glicoderivados de la superficie celular. En el caso del virus de la gripe y los virus parainfluenza humanos, el tipo de enlace con el que está unido el ácido siálico al resto de la cadena glucídica determina el rango del hospedador así como el tropismo tisular y la patogénesis. Por ejemplo, el virus de la gripe A humana se une preferentemente a ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2 \rightarrow 6$ mientras que el virus de la gripe A aviar se une a ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2 \rightarrow 3$ (Ito *et al.*, 1997; Vines *et al.*, 1998). Las mutaciones en la proteína HA son críticas para la adaptación del virus de la gripe A al tracto respiratorio humano, donde las células epiteliales expresan ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2 \rightarrow 6$ (Matrosovich *et al.*, 2004). Otros paramixovirus como hPIV-1, se unen preferentemente a oligosacáridos unidos con enlace $\alpha 2 \rightarrow 3$, pero no a enlaces $\alpha 2 \rightarrow 6$ (Suzuki *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos en el presente trabajo después del tratamiento de diferentes líneas celulares con sialidasas, confirman que el ácido siálico del receptor del NDV estaría unido con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$ a una Gal terminal, ya que hemos observado reducción de la infectividad vírica en todas las líneas celulares estudiadas tras el tratamiento con las sialidasa de *V.cholerae*, la cual hidroliza ácidos siálicos terminales pero no ácidos siálicos presentes en ramificaciones internas. Los datos obtenidos de los experimentos de fusión también indican que el ácido siálico estaría unido con enlace $\alpha 2 \rightarrow 3$, puesto que se produce disminución de la fusión tras el tratamiento con las sialidasas de *V.cholera* y *C.perfringens* que hidrolizan preferentemente enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$. En el caso de la sialidasa de *C.perfringens* se requieren concentraciones más altas para conseguir la misma reducción que con la de *V.cholerae* seguramente porque sea menos específica. Sin embargo, los datos obtenidos en las células ELL-0 y 293 sugieren que el NDV también podría unirse a ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2 \rightarrow 6$ cuando están presentes, al igual que por ejemplo, los virus adeno asociados AAV1 y AAV6 que reconocen tanto ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2 \rightarrow 3$ como $\alpha 2 \rightarrow 6$ (Wu *et al.*, 2006). También los poliomavirus pueden unirse a *N*-glicanos con ácidos siálicos unidos con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$ y $\alpha 2 \rightarrow 6$ (Chen y Benjamin, 1997).

Existen otros ejemplos de virus que reconocen sólo ácidos siálicos con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$, o sólo $\alpha 2 \rightarrow 6$, y ejemplos que reconocen ambos. En el enterovirus 70 (EV70) donde la lectina MALI inhibe la unión del virus a la célula, se ha sugerido que el ácido siálico unido con $\alpha 2 \rightarrow 3$ en *N*-glicoproteínas es un componente de su receptor

(Nokhbeh *et al.*, 2005). En otras familias como los Picornavirus, en concreto en el virus de rinitis equina A (ERAV), experimentos en los que se utilizaron tanto las lectinas MALI y SNA como las sialidasas de *V.cholerae* y *C. perfringens* indican que este virus muestra preferencia por receptores con ácido siálico unido con enlace $\alpha 2 \rightarrow 3$, puesto que se produce una clara inhibición de la unión e infectividad tras tratar células Vero con MALI y con las sialidasas de *V.cholerae* y *C. perfringens* (Stevenson *et al.*, 2004). No obstante, hay virus que tienen preferencia por enlaces $\alpha 2 \rightarrow 6$ como es el caso del Calicivirus Felino (FCV), en el cual se demostró utilizando las lectinas MALI y SNA que el virus reconoce receptores con ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2 \rightarrow 6$; tras utilizar diferentes proteasas e inhibidores metabólicos se ha visto que ese ácido siálico formaba parte de *N*-glicoproteínas (Stuart y Brown, 2007). Además de los citados adenovirus (Wu *et al.*, 2006) y poliomavirus (Chen y Benjamin, 1997), hay virus que reconocen tanto ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2 \rightarrow 3$ como a $\alpha 2 \rightarrow 6$; ése es el caso del poliomavirus JCV. El tipo de enlace que reconoce JVC fue estudiado también mediante el uso de lectinas, sialidasas y SIATs, revelando que este virus reconoce los dos tipos de enlaces señalados cuando están unidos a *N*-oligosacáridos que tienen el fragmento Gal-GlcNAc (Dugan *et al.*, 2007). Esta unión a ambos tipos de enlace es lo que podría estar ocurriendo con el NDV, a la vista de los datos obtenidos tras el tratamiento con las sialidasas, las lectinas y las SIATs. Ese reconocimiento de receptores con ácidos siálicos unidos con $\alpha 2 \rightarrow 3$ y $\alpha 2 \rightarrow 6$ explicaría que el NDV puede infectar un gran rango de hospedadores así como tejidos y líneas celulares.

Estudios previos realizados por nuestro grupo con inhibidores de la *N*-glicosilación y la *O*-glicosilación en células COS-7 (Ferreira *et al.*, 2004b) mostraron que las *N*-glicoproteínas y los gangliósidos funcionan como receptores de NDV pero no las *O*-glicoproteínas. En los virus adeno asociados AAV1 y AAV6, que como ya se ha mencionado reconocen tanto ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2 \rightarrow 3$ como $\alpha 2 \rightarrow 6$, también se ha demostrado que ambos virus utilizan como receptores *N*-glicoproteínas (Wu *et al.*, 2006). Sin embargo, experimentos realizados con otros adenovirus, AAV4 y AAV5, (Kaludov *et al.*, 2001), en los que también se usaban inhibidores de la *N*- y *O*-glicosilación en células COS-7 y además se resialilaban con SIATs eritrocitos y células Lec2 (derivadas de CHO, con deficiencia en el transporte de CMP-ácido siálico al aparato de Golgi) indicaron que AAV5 utiliza ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha(2 \rightarrow 3)N$ mientras que AAV4 utiliza enlaces $\alpha(2 \rightarrow 3)O$. Estos son ejemplos de la gran variabilidad de receptores en relación con el enlace del ácido siálico que hay incluso

dentro de la misma familia de virus. Nuestros datos sobre la acción de las SIATs también confirman que el NDV utilizaría como receptores *N*-glicoproteínas con ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2 \rightarrow 3$ y $\alpha 2 \rightarrow 6$.

Existen estudios en otros virus en los cuales mediante la incorporación de gangliósidos se muestra cómo éstos actúan como receptores; es el caso de los poliomavirus SV40, poliomavirus murino (mPy), JCV y BKV que utilizan principalmente glicolípidos como receptores de la superficie celular. El virus SV40 usa GM1, mPy usa GD1a y GT1b, JCV utiliza GT1b y BKV utiliza GD1b y GT1b (Campanero-Rhodes *et al.*, 2007; Neu *et al.*, 2009). La incorporación de gangliósidos en células C6, una línea celular deficiente en la síntesis de gangliósidos complejos, muestra que aumenta la infección de poliomavirus y de virus adeno asociado bovino (BAAV) (Schmidt y Chiorini, 2006). Sin embargo, en nuestro caso, el NDV puede infectar células en ausencia de gangliósidos (GM95) lo que indicaría que utiliza principalmente *N*-glicoproteínas como receptores. En células sin *N*-glicoproteínas (Lec1) los niveles de fusión e infectividad son mucho menores, y la fusión puede aumentarse tras la incorporación de gangliósidos. Como ya se ha mencionado se cree que la unión del virus a la superficie celular es un fenómeno complejo, en el que el virus se uniría de manera secuencial a diferentes tipos de moléculas, con diferente afinidad. La unión del NDV a ciertos sialoglicoconjugados podría ser una unión inicial que aumentaría la eficiencia de unión; en algunos casos no serviría para la infección, y en otros no sería un requerimiento absoluto de la infección de las células. El NDV podría unirse a ciertos gangliósidos o incluso a otros sialoglicoconjugados como paso inicial de la unión a otra molécula más específica, una *N*-glicoproteína, sialilada o no.

En definitiva, nuestros resultados muestran que el NDV puede utilizar compuestos sialilados con diversidad de tipo de enlace, $\alpha 2 \rightarrow 3$ o $\alpha 2 \rightarrow 6$. Tampoco descartamos la posibilidad de reconocimiento de otro tipo de enlaces como $\alpha 2 \rightarrow 8$ o $\alpha 2 \rightarrow 9$, aspecto que no se ha estudiado por la dificultad de acceder a enzimas comerciales que reconozcan este tipo de enlaces. También proponemos que las *N*-glicoproteínas son claves en la infección del NDV mientras que los gangliósidos podrían ser receptores auxiliares o correceptores. El conocimiento del receptor podría ser útil para aumentar el conocimiento del tropismo del virus y para el desarrollo potencial de terapias antivíricas bloqueando el primer paso de la interacción del virus con la célula diana.

En este segundo apartado nos centramos en el estudio de la entrada del virus mediante endocitosis (Cantín *et al.*, 2007). Nuestro grupo ya había demostrado que el proceso de fusión del NDV con la célula diana puede activarse a pH ácido (San Román *et al.*, 1999); por ello nos propusimos analizar el papel del pH ácido y la posible implicación del receptor en esta activación llevando a cabo experimentos para intentar dilucidar el mecanismo de activación de la entrada del NDV en células de cultivo a pH ácido. Además también nos centramos en el estudio del papel del receptor en la entrada del NDV mediante endocitosis, analizando esta ruta en diferentes líneas celulares que se diferencian en la expresión de glicolípidos y glicoproteínas y utilizando diferentes inhibidores de la ruta endocítica.

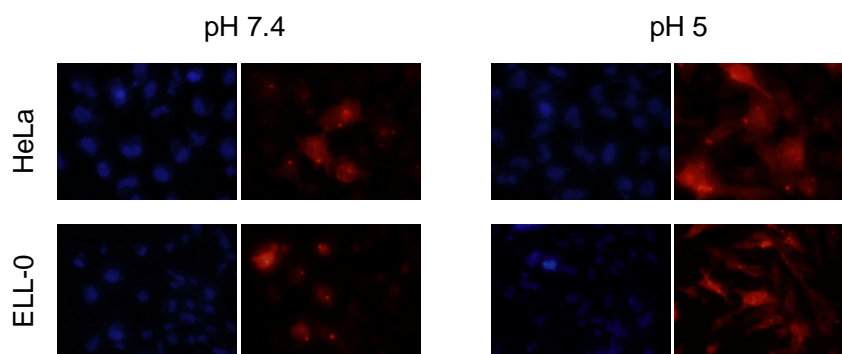
4.8 EFECTO DEL pH ÁCIDO SOBRE LA ENTRADA DEL NDV

4.8.1 EFECTO DEL pH ÁCIDO SOBRE LA FUSIÓN DEL NDV CON CÉLULAS DE CULTIVO

Como se ha mencionado ya a lo largo de esta Memoria, nuestro grupo de investigación ha demostrado la activación a pH ácido de la fusión del NDV con células COS-7 utilizando técnicas espectrofluorométricas (San Román *et al.*, 1999). En el presente trabajo hemos querido seguir estudiando este aspecto utilizando distintas líneas celulares para intentar añadir datos que aporten un mayor conocimiento de los procesos de interacción del NDV con células diana.

Las células de diferentes líneas celulares se incubaron durante media hora a 4 °C con el virus marcado con R₁₈ (para facilitar la unión virus-célula); después recibieron un pulso de pH mediante incubación durante 3 minutos con PBS a pH 5 o PBS a pH 7.4 (control) y se incubaron durante una hora a 37 °C para permitir la fusión del virus. Los resultados obtenidos son los que se muestran en las siguiente Figura:

A)



B)

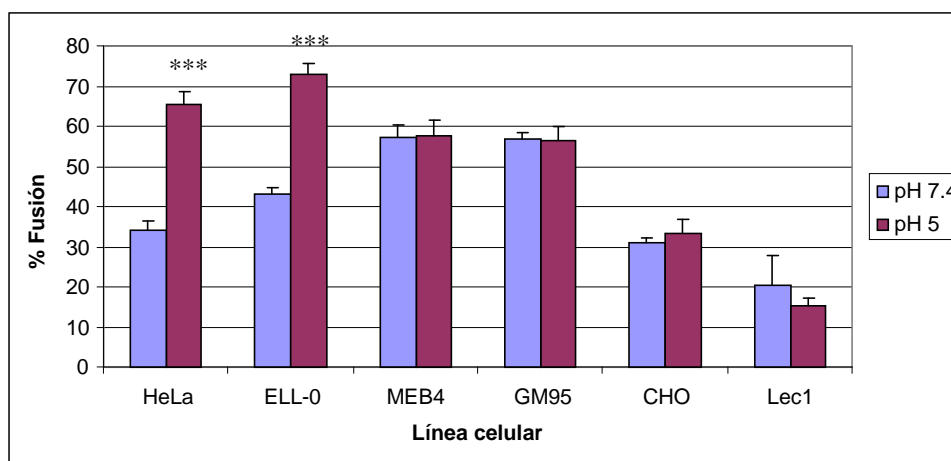


Figura 39: Efecto del pH ácido sobre la fusión del NDV con células de cultivo. A) Fotografías de un experimento representativo tomadas con el objetivo 40 x. B) El grado de fusión virus-célula se calculó como el número de células rojas (fusionadas con el virus) dividido por el total de células y multiplicado por 100. Los datos corresponden a la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Estadística test t de Student, *** extremadamente significativo $p < 0.001$.

Como muestra la Figura 39 los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- En las líneas celulares ELL-0 y HeLa en las muestras que recibieron un pulso de pH ácido se observó un aumento de la fusión de 29.7 % y 31.1 % respectivamente frente a células tratadas a pH neutro.

- En las células MEB4, GM95, CHO y Lec1 no se detectó ningún aumento significativo de la fusión tras ser tratadas con pH ácido.

El aumento observado de la fusión en torno al 30 % en las dos líneas HeLa y ELL-0 está en consonancia con los resultados obtenidos en trabajos anteriores realizados por nuestro grupo, empleando las líneas celulares COS-7 y HeLa (San Román *et al.*, 1999; Cantín *et al.*, 2007). Sin embargo, al no detectar aumento de fusión en el resto de líneas se podría argumentar que la activación por pH ácido dependería de la membrana diana, según se discutirá más adelante.

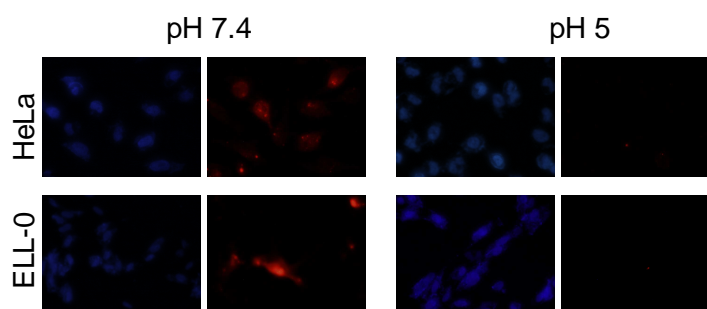
4.8.2 INACTIVACIÓN DEL NDV POR pH ÁCIDO

El virus NDV marcado con rodamina R₁₈ se incubó durante media hora a 37 °C con PBS a pH 5 o PBS a pH 7.4 (control) y después se centrifugó a 21000 x g durante 10 min y a 4 °C; el virus precipitado se resuspendió y se llevaron a cabo ensayos de fusión empleando células HeLa y ELL-0 ya que en ambas líneas, como se indica en el apartado anterior, observamos un aumento de la fusión a pH ácido.

Como control se llevó a cabo la inactivación del virus con luz ultravioleta para descartar la transferencia inespecífica de la sonda desde la membrana del virus a la célula (datos no mostrados).

Los resultados de la Figura 40 señalan que cuando se preincuba el virus a pH ácido es incapaz de fusionar con las membranas diana indicando que el virus se inactiva cuando se expone a pH ácido. Esta inactivación por pH ácido ya se había descrito anteriormente para algunos virus envueltos como el virus Sendai (Lima *et al.*, 1992) otro paramixovirus. El pH ácido podría determinar que se produjeran cambios conformacionales o reajustes de los componentes de la membrana vírica a pH ácido (San Román *et al.*, 1999) que luego impedirían los cambios conformacionales que conducen a la activación de la proteína F en presencia de la membrana diana como se ha descrito en virus que fusionan a pH ácido como el virus de la gripe (Korte *et al.*, 1999); tampoco habría que descartar la posibilidad de que el virus se agregara en complejos más grandes que le impidieran fusionar (Puri *et al.*, 1988).

A)



B)

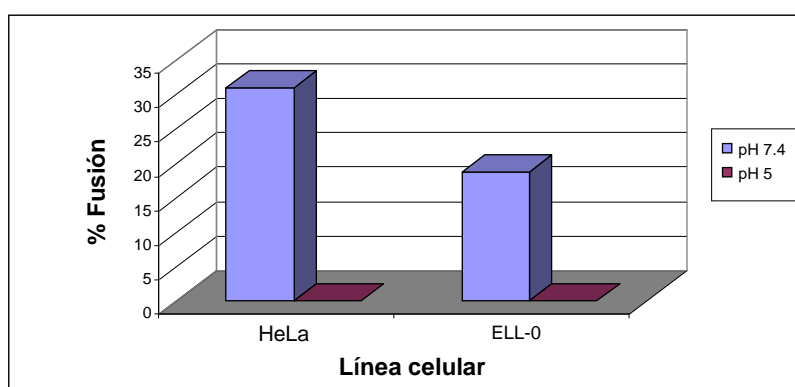


Figura 40- Inactivación de NDV-R₁₈ tras su incubación a pH ácido. A) Fotografías representativas de un experimento de fusión con el virus previamente incubado a pH neutro o ácido. B) El grado de fusión virus-célula se analizó mediante microscopía de fluorescencia cuantificando fotografías tomadas en campos al azar con el objetivo 40x de tres experimentos independientes (SD entre ± 5.3 y ± 9).

4.8.3 EFECTO DEL pH ÁCIDO SOBRE LA FORMACIÓN DE SINCITIOS

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos de fusión a pH ácido que indican una activación en células HeLa y ELL-0, decidimos estudiar cómo afecta el pH a la formación de sincitios en ambas líneas celulares. Como ya se explicó el apartado de Métodos 3.5.7, en estos ensayos las células fueron infectadas con NDV a 1 m.o.i. durante una hora a 37 °C; transcurrido ese tiempo recibieron 3 pulsos de pH con PBS a pH 5 o PBS pH 7.4 (control) de 3 min de duración a 37 °C con intervalos de 1 h

entre cada pulso. A las 7 h postinfección, se activó la proteína F (apartado 3.5.7 de Métodos) y las células se incubaron en medio completo hasta el día siguiente en que se tiñeron con Giemsa. Los resultados se muestran en la siguiente Figura:

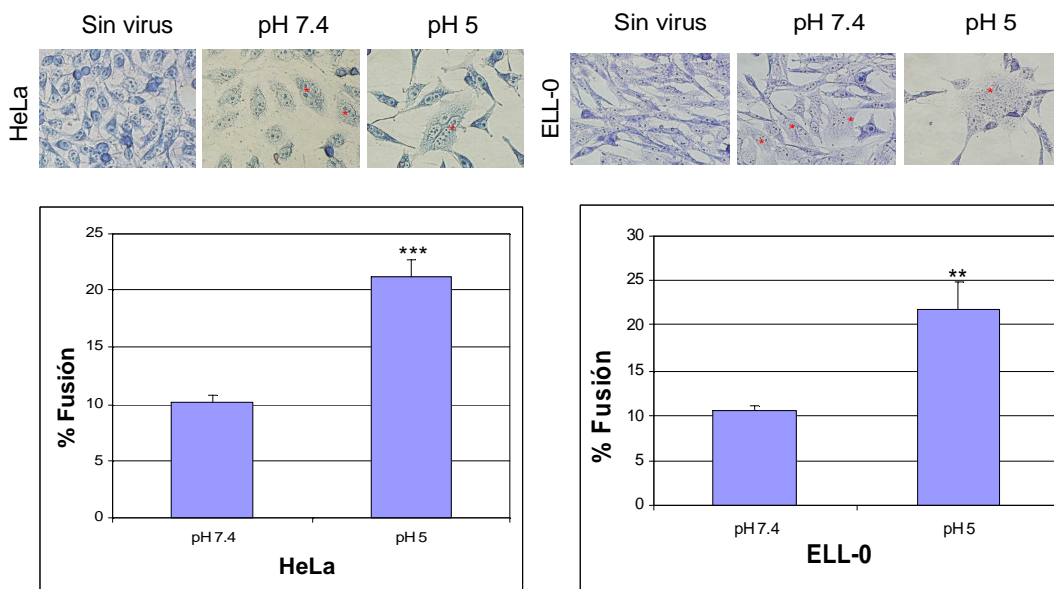


Figura 41- Efecto del pH ácido sobre la formación de sincitios. La cuantificación se llevó a cabo a partir de fotografías como las mostradas obtenidas a 40x. El % de fusión se calculó como el porcentaje de área en píxeles ocupada por los sincitios respecto al área total de la fotografía usando el programa Adobe PhotoShop CS4 extended. Los datos corresponden a la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Estadística test t de Student, *** extremadamente significativo $p < 0.001$, ** muy significativo $p < 0.01$.

Los resultados obtenidos indican que tanto en la línea celular HeLa como en ELL-0 la formación de sincitios después de los tres pulsos de pH ácido aumentó 2 veces respecto de la del control. Estos mismos resultados se obtuvieron tras aplicar un solo pulso de pH ácido de 5 min a 37 °C tras infectar las células con NDV durante 1 h (datos no mostrados).

Estos datos confirman los resultados del aumento de la fusión virus-célula mostrados en el apartado 4.8.1 (Figura 39) indicando que el pH ácido incrementaría el % del virus que penetra en la célula (no solo que fusiona) y por tanto, aumenta el número de proteínas expresadas en la membrana de la célula infectada lo que se traduce

en un aumento de la fusión célula-célula. Es decir, el pH ácido aumenta la eficiencia de la entrada vírica.

4.8.4 EFECTO DEL pH ÁCIDO SOBRE LA INFECTIVIDAD DEL NDV

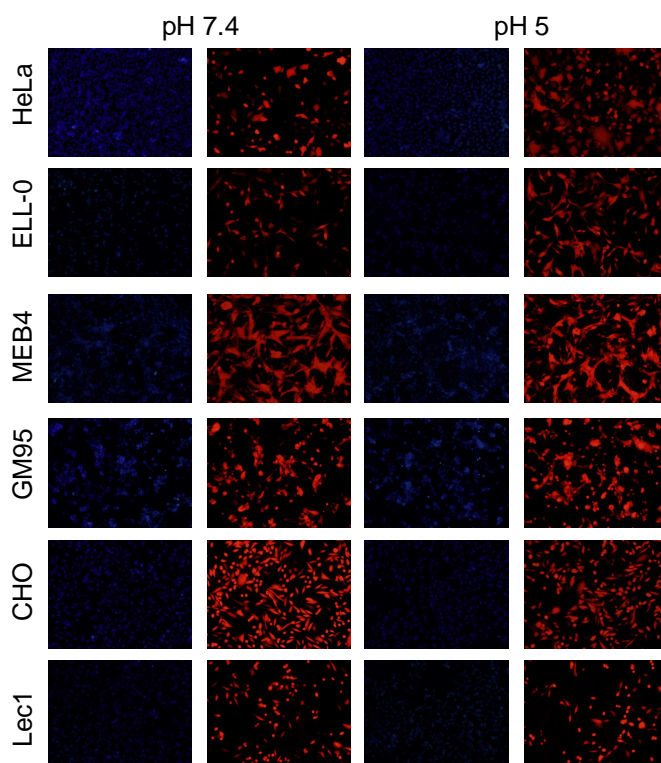
De nuevo se empleó el virus rNDV-F3aa-mRFP para realizar los estudios de infectividad ya que permiten una mejor cuantificación de la infectividad que el análisis de sincitios. Las células ELL-0, HeLa, MEB4, GM95, CHO y Lec1 fueron incubadas con el virus durante 1 h a temperatura ambiente y transcurrido ese tiempo recibieron 3 pulsos de pH de 3 minutos de duración con PBS a pH 7.4 o pH 5 espaciándose 1 h como se indica en el apartado de Métodos 3.5.19.

La Figura 42 resume los resultados obtenidos que fueron los siguientes:

- Se encontró un aumento de la infectividad del 24.5 ± 1.6 % en células ELL-0 y del 27.9 ± 2.2 % en células HeLa tras ser incubadas a pH ácido.
- En el resto de las líneas celulares no se observó ninguna variación tras ser sometidas a pulsos de pH ácido en comparación con los controles.

Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en los experimentos de fusión en los cuales también solo observamos aumento de la fusión en las células ELL-0 y HeLa (Figura 39). Los resultados obtenidos de nuevo señalan que, dependiendo de la línea celular, se produce o no activación por pH ácido (en este caso de grado de infectividad), lo cual podría indicar que el virus utilizaría diferentes mecanismos de entrada dependiendo de la células diana como se discutirá más adelante.

A)



B)

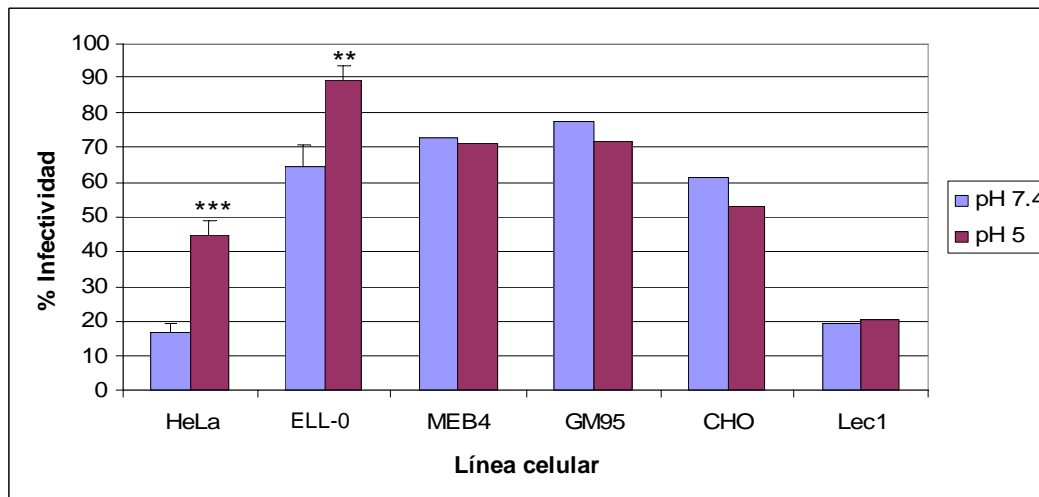


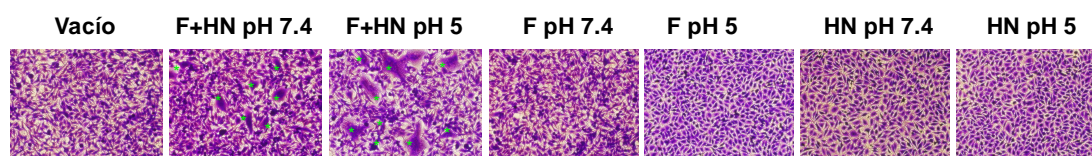
Figura 42- Efecto del pH ácido sobre la infectividad del NDV. A)

Fotografías de un experimento representativo. B) Los datos que se muestran se cuantificaron contando el número de células rojas dividido por el total y multiplicado por 100 (% infectividad), en 3 campos aleatorios de imágenes como las que se muestran en A). Los datos corresponden a la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Estadística test t de Student, *** extremadamente significativo $p < 0.001$, ** muy significativo $p < 0.01$.

4.8.5 EFECTO DEL pH ÁCIDO SOBRE LA FORMACIÓN DE SINCITIOS EN CÉLULAS HeLa TRANSFECTADAS CON LAS PROTEÍNAS HN Y F DEL NDV

Para intentar ahondar en el mecanismo implicado en la activación que el pH ácido ejerce en la fusión e infectividad el NDV, en esta serie de ensayos, se emplearon células HeLa que fueron transfectadas con las proteínas HN y F del NDV como se indica en el apartado de Métodos 3.5.21. A las 24 h de la transfección, se activó la proteína F (apartado 3.5.7 de Métodos) e inmediatamente las células recibieron 3 pulsos de pH ácido de 3 min de duración a 37 °C con un intervalo de 1 h entre cada uno. Tras recibir el último pulso de pH, las células se incubaron en medio completo y a 37 °C hasta el día siguiente en que para su observación y cuantificación se tiñeron los sincitios con cristal violeta. Los datos se resumen en la Figura 43.

A)



B)

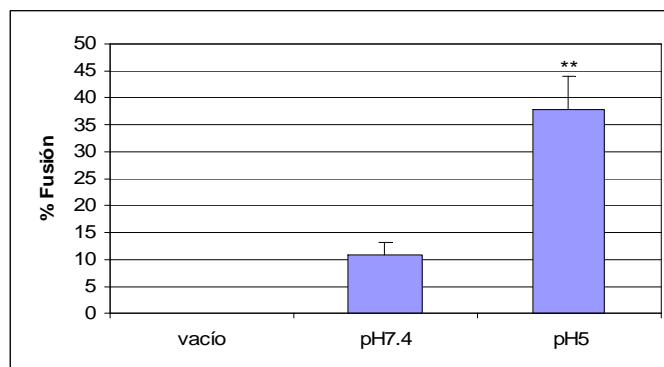


Figura 43- Efecto del pH ácido sobre la formación de sincitios en células HeLa transfectadas con las proteínas HN y F del NDV. A) Fotografías de un experimento representativo (objetivo 10x). B) El % de fusión se calculó cuantificando el área ocupada en píxeles por los sincitios en fotografías tomadas al azar con el objetivo 40x usando el programa Adobe PhotoShop CS4 extended. Los datos corresponden a la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Estadística test t de Student, ** muy significativo $p < 0.01$.

Los resultados obtenidos muestran que la formación de sincitios en células transfectadas con las dos glicoproteínas aumentó 3.5 veces con respecto al control en las células que recibieron los pulsos de pH ácido: el pH ácido determinó un aumento tanto del número como del tamaño de los sincitios. Sin embargo, no se observó fusión en las células transfectadas con solo una proteína (HN o F) ni a pH neutro ni a pH ácido (Figura 43A, controles).

Estos datos indican que la incubación con pH ácido provocaría cambios en la proteína de fusión del virus que facilitarían la fusión célula-célula en células que expresan las proteínas HN y F en su membrana. El pH ácido podría rebajar la barrera energética necesaria para “disparar” los cambios conformacionales de la proteína F que conducen a la fusión de membranas. Sin embargo, a pH ácido la proteína F sigue necesitando la presencia de la proteína HN para fusionar.

También se transfectaron células HeLa con un mutante no fusogénico de la proteína F Q454A (Ayllón *et al.*, 2010), para ver si recuperaba el fenotipo fusogénico tras recibir el tratamiento a pH ácido. En este caso el pH ácido no fue suficiente para recuperar la actividad fusogénica de la proteína F mutada en Q454A (Figura 44) indicando que o bien la barrera energética a superar es mayor, o la mutación de Q454A es irreversible.

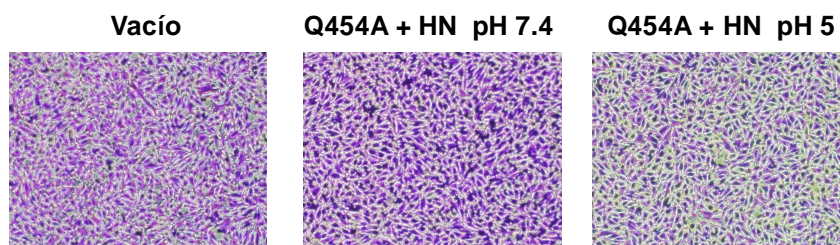


Figura 44- Efecto del pH ácido sobre la formación de sincitios en células HeLa transfectadas con las proteínas HN y el mutante de F no fusogénico Q454A.

4.8.6 EFECTO DEL pH ÁCIDO Y LA TEMPERATURA SOBRE LA FUSIÓN DE ERITROCITOS CON CÉLULAS TRANSFECTADAS CON LAS PROTEÍNAS DEL NDV

Para una mejor cuantificación del efecto del pH ácido y la temperatura en la fusión del NDV y poder discriminar si este efecto era diferente en algún paso de la cascada de fusión (es decir, en la hemifusión y fusión completa), realizamos ensayos de fusión empleando eritrocitos humanos (células diana) marcados con las sondas fluorescentes calceína y rodamina (R₁₈) (apartado 3.5.22 de Métodos), y células HeLa transfectadas con las proteínas víricas HN y F (células efectoras) sin marcar. A las 24 h posttransfección, se activó la proteína F (apartado 3.5.7) e inmediatamente se dio un pulso de pH ácido o neutro de 5 min a 37 °C, y se añadieron los eritrocitos doblemente marcados con calceína y R₁₈. Las células se incubaron durante 1 h a diferentes temperaturas 25 °C, 29 °C, 31 °C o 37 °C. Los resultados se muestran en la Figura 45.

En resumen, los datos indican que:

- A 25 °C no se observó fusión de eritrocitos con las células transfectadas ni a pH neutro ni ácido aunque sí se observó un aumento del grado de unión de los eritrocitos a las células incubadas a pH ácido debido a que la actividad de unión de la proteína HN aumenta a pH ácido.

- A 29 °C y 31 °C se observó un aumento de la fusión a pH ácido con respecto al control, alcanzando la fusión a pH ácido casi los niveles de fusión observados a pH neutro a 37 °C.

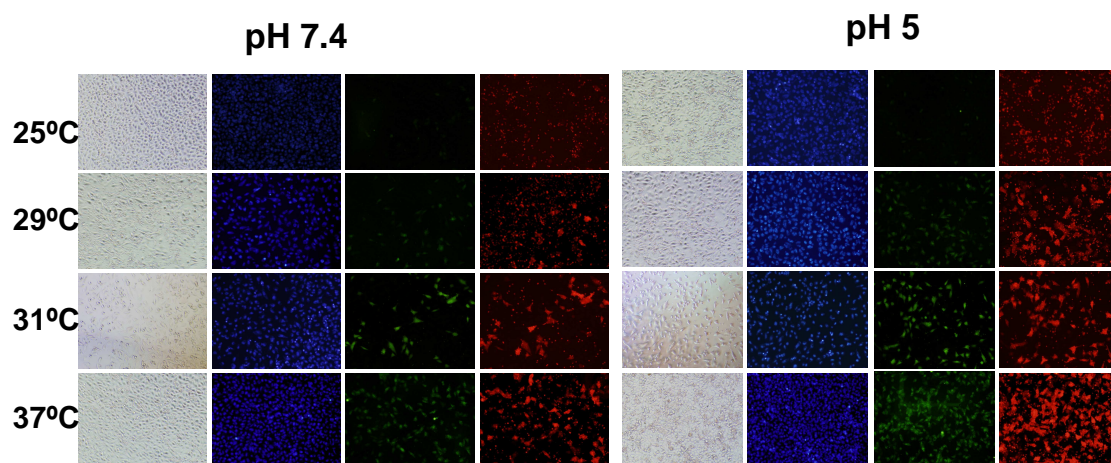
- A 37 °C se produjo un aumento de la fusión a pH ácido de 1.8 veces con respecto del control.

Para analizar si el pH ácido activa preferentemente la hemifusión o la fusión completa, analizamos la diferencia de transferencia de la sonda roja R₁₈ (membrana del eritrocito, indicaría hemifusión) y la transferencia de la sonda verde calceína (interior del eritrocito, fusión completa) (apartado 3.5.22 de Métodos). Los datos indican que el pH ácido activa la transferencia de ambas sondas en igual medida, es decir, activa la fusión hasta que se produce la mezcla total de las dos membranas, sin detenerla en pasos intermedios de la cascada (datos no mostrados).

Estos resultados confirman los obtenidos mediante análisis de sincitios (Figuras 41 y 43) lo que nos reafirma en la hipótesis de que el pH ácido permite superar la barrera energética necesaria para promover la fusión supliendo el efecto de la

temperatura a temperaturas subóptimas como 29 °C y 31 °C, aunque no sería suficiente a temperaturas más bajas (25 °C) ni en mutaciones como Q454A, según se ha comentado más arriba.

A)



B)

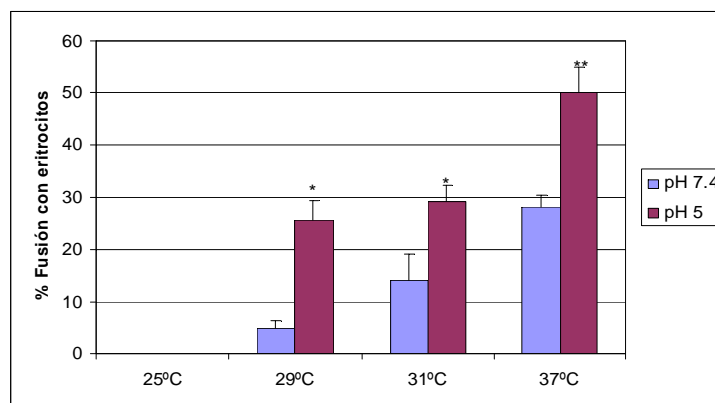


Figura 45- Efecto del pH ácido y la temperatura sobre la fusión de eritrocitos con células HeLa transfectadas con las proteínas HN y F del NDV. A) Fotografías de un experimento representativo. B) El % de fusión con eritrocitos cuantificado a partir de fotografías como las mostradas en A). Se cuantificó el número de células fusionadas con los eritrocitos (doblemente marcados) respecto al total de células y multiplicado por 100. Los datos corresponden a la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Estadística test t de Student, ** muy significativo $p < 0.01$, * significativo $p < 0.05$.

Las glicoproteínas de fusión de los paramixovirus pertenecen a la clase I (apartado 1.4.2 de Introducción), las cuales se pueden activar bien por el descenso del pH o bien por la unión al receptor, o incluso por un mecanismo que combina ambos tipos de activación: primero por la unión al receptor a pH neutro seguida de una activación a pH ácido (Earp *et al.*, 2003; Mothes *et al.*, 2000; Barnard *et al.*, 2004; Matsuyama *et al.*, 2004). También se han descrito proteínas de fusión de paramixovirus, concretamente del metapneumovirus humano que precisa de un doble mecanismo de activación: proteólisis y pH ácido (Schowalter *et al.*, 2006, 2009). Como ya se ha señalado en numerosas ocasiones a lo largo de esta Memoria, el NDV fusiona con las células a pH neutro; sin embargo se obtiene un mayor grado de fusión a pH ácido como hemos mostrado en las Figuras 39 y 41, y en trabajos de nuestro grupo llevados a cabo con células COS-7 (San Román *et al.*, 1999; Cantín *et al.*, 2007). En el presente trabajo, de nuevo observamos un aumento de la fusión e infectividad en células HeLa y ELL-0 a pH ácido en torno al 30 % comparado con los controles. Aunque el NDV no requiere estrictamente del pH ácido para su entrada, la exposición a pH ácido aumentaría el número de proteínas F que se activan para fusionar eficientemente. Sin embargo, la bajada de la barrera energética a pH ácido no es tan importante para activar F ya que hay mutantes del ectodominio de esta proteína como N211A, I463A e I463F que son hiperfusogénicos y capaces de fusionar en ausencia de HN (Ayllón *et al.*, 2010).

En el contexto de una infección *in vivo*, es decir, sin disminuir el pH experimentalmente, el NDV podría fusionar tanto a pH ácido como a pH neutro, dependiendo de la ruta de entrada, la cual dependería también de la línea celular (Figuras 39 y 41). A pH neutro, algunos virus unidos a la superficie celular podrían ser endocitados y después fusionarían con los endosomas. El pH ácido podría acelerar los cambios conformacionales necesarios para que se produzca la fusión. Esto implicaría aumento de la actividad promotora de fusión de la proteína HN (Porotto *et al.*, 2003) y/o de la población de F que es activada independientemente de HN (Sergel *et al.*, 2000; Russell *et al.*, 2001; Cobaleda *et al.*, 2002) dentro de los compartimentos endocíticos. En hPIV3 se ha demostrado que mutaciones en el sitio I y en el sitio II de la proteína HN provocan que la afinidad por el receptor sea dependiente de pH, teniendo en cuenta que el pH óptimo de las neuraminidasas de los paramixovirus es ácido (pH 4.8-5.5) (Ryan *et al.*, 2006), el pH ácido dentro de los endosomas podría aumentar la actividad neuraminidásica del Sitio I de la proteína HN y también, hipotéticamente, podrían producirse los cambios conformacionales requeridos en el sitio II para activarse (Porotto

et al., 2006). Ya que el sitio II presenta una mayor afinidad que el sitio I por el sustrato (Porotto *et al.*, 2006), el aumento del contacto virus-receptor podría ser responsable del aumento del grado de extensión de la fusión observado cuando se disminuye el pH experimentalmente (Figuras 41 y 43). Teniendo en cuenta que de las seis líneas analizadas solo se produce un aumento de la fusión e infectividad del NDV a pH ácido en dos de ellas, esto podría indicar que, en efecto, la activación depende de la línea celular. Las diferencias podrían radicar en el hecho de que cada línea presenta diferentes receptores sialilados en su membrana (según se ha discutido en el bloque I de Resultados y Discusión). Los datos relativos al receptor en células ELL-0 (Bloque I) muestran que a diferencia del resto de células estudiadas en este Trabajo de Tesis el NDV utiliza sialoglicoconjugados con restos de ácidos siálicos unidos con enlace $\alpha 2 \rightarrow 6$. Sin embargo, resulta prematuro concluir que este tipo de receptores estarían implicados en la activación por pH ácido en células ELL-0. Ésta es una hipótesis de partida para futuros experimentos en nuestro laboratorio.

En resumen, los datos expuestos en este apartado en relación con el efecto del pH ácido en el mecanismo de entrada del NDV señalan que el pH ácido es un activador de la entrada del virus, sugiriendo que el mecanismo de activación podría consistir en disminuir la barrera energética necesaria para la activación de la proteína de fusión vírica. El NDV podría unirse a diferentes moléculas dependiendo de la línea celular; solo cuando reconoce la molécula adecuada, se darían las condiciones necesarias para la activación de la proteína F a pH ácido. Como esta activación *in vivo* se daría en los compartimentos endocíticos, esto implicaría que si el NDV (proteína HN) interacciona con la molécula correcta puede entrar por endocitosis además de por fusión directa con la membrana plasmática.

4.9 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON INHIBIDORES DE LA ENDOCITOSIS SOBRE LA FUSIÓN, INFECTIVIDAD Y UNIÓN DEL NDV

Los resultados resumidos en apartados anteriores apoyarían una vez más que el NDV puede utilizar una ruta de entrada por endocitosis. Para analizar este aspecto en mayor profundidad estudiamos el efecto de diferentes inhibidores de la endocitosis

(Tabla 6 del apartado 3.5.24 de Métodos, pág. 66) sobre la interacción del NDV con las diferentes líneas celulares estudiadas, para tratar además de aportar nuevos datos que nos ayuden a entender la implicación del receptor en la entrada del NDV mediante endocitosis.

4.9.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON BISINDOLILMALEIMIDA I SOBRE LA INFECTIVIDAD DEL NDV

Estudiamos el efecto de bisindolilmaleimida I (BIM), compuesto que inhibe la proteína kinasa C (PKC), sobre la infectividad del NDV. Las bisindolilmaleimidias constituyen una nueva generación de inhibidores de PKC descritas por Toullec *et al.*, 1991. Se cree que estos inhibidores bloquean el sitio de unión del ATP en el dominio catalítico de PKC y son altamente específicos; aparentemente inhiben todas las isoenzimas de PKC con la misma potencia (Root *et al.*, 2000).

En esta serie de experimentos, como diana se utilizaron células HeLa, ELL-0, MEB4, GM95, CHO y Lec1, y de nuevo el virus rNDV-F3aa-mRFP a una dilución de 10^{-3} (m.o.i. aproximada de 10) para estudiar el efecto de BIM sobre la infectividad del virus. La Tabla 9 muestra la viabilidad de las diferentes células tratadas con este compuesto que, como puede verse, fue ligeramente inferior a la del control salvo en GM95, donde en las células infectadas y tratadas con el inhibidor se produjo más de un 50 % de muerte celular.

Línea celular	Control negativo	Control positivo	NDV+BIM/BIM	BIM
HeLa	97.6	91.2	93.1	97.5
ELL-0	99.4	96.6	95.3	97.7
MEB4	98.7	97.2	92.4	96.5
GM95	100	87.4	43.3	98.7
CHO	98.2	95.3	92.3	95.5
Lec1	97.4	94.4	91.2	95.2

Tabla 9- El % de viabilidad de células tratadas con BIM analizada mediante el método de exclusión del *trypan blue*. Control negativo células ni tratadas ni infectadas; control positivo: células solo infectadas; BIM: células incubadas solo con BIM; NDV+BIM/BIM: células infectadas en presencia de BIM e incubadas continuamente con el inhibidor.

Ya se ha mencionado que aunque BIM tiene autofluorescencia roja, es de una intensidad muchísimo menor que la de la proteína roja expresada por el virus con lo cual no interfiere con ésta a la hora de cuantificar los resultados de infectividad, fijándose el background para restar la fluorescencia del inhibidor.

Las células de las diferentes líneas se incubaron con BIM (20 μ M) de tres formas diferentes como se indica en el apartado de Métodos 3.5.23.1:

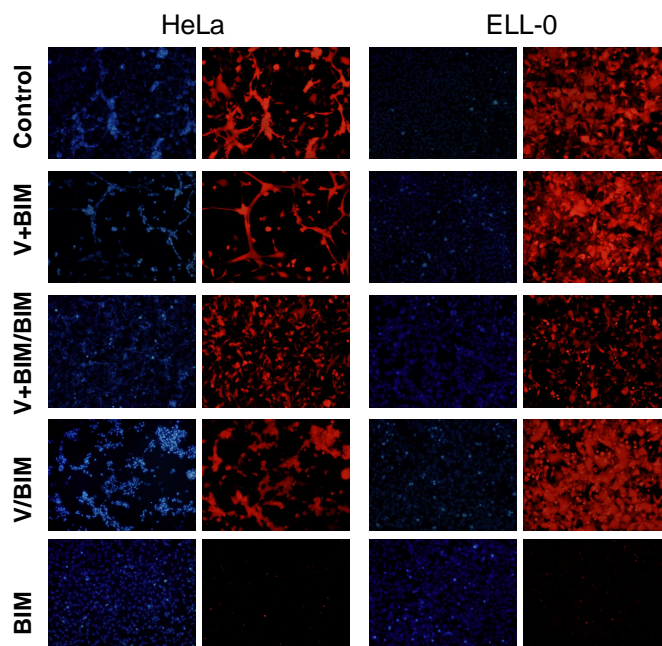
- BIM presente durante 1 h de infección (Virus + BIM)
- BIM presente durante 1 h de infección y 24 h postinfección (Virus + BIM/BIM)
- BIM añadido después de 1 h de infección y presente 24 h postinfección (Virus/BIM)
- Control, células sin infectar y en presencia de BIM.

Los resultados del efecto del tratamiento del inhibidor de la PKC sobre la infectividad del NDV se resumen en la Figura 46. En la Figura 46B se observa que solo se detectó una disminución significativa de la infectividad en las células HeLa y ELL-0 cuando el inhibidor estuvo presente durante todo el experimento (Virus + BIM/BIM). La disminución respecto al control fue de un 25.7 % en HeLa y de un 26.5 % en ELL-0 ($p= 0.0066$ y $p= 0.0006$ respectivamente, de acuerdo con test t de Student). En la línea celular GM95 también se observó una disminución de la infectividad del 25 % pero como se ha visto la viabilidad de estas células tratadas con BIM disminuyó hasta el 43 % (Tabla 9), lo cual explicaría la disminución de infectividad. En el resto de líneas celulares no se produjo ningún efecto negativo de la infectividad tras ser tratadas con BIM (ni tampoco en la viabilidad).

Los resultados además muestran que BIM estaría actuando durante los primeros 60 min de la infección, puesto que si se añade transcurrido ese tiempo no produce efecto inhibitorio. También se puede ver que su acción es reversible, ya que si se añade BIM durante la hora de infección y después se retira, el nivel de infección es el mismo que el del control.

Estos datos están en consonancia con los obtenidos al estudiar el efecto de pH sobre la fusión e infectividad del NDV resumidos en el apartado anterior que muestran un aumento de aproximadamente al 30 % solo en células HeLa y ELL-0, al igual que BIM que solo inhibe en estas dos líneas celulares. Sería un apoyo más a la hipótesis de que en ambas líneas se produce una entrada del virus por endocitosis mediada por receptor y que podría depender del pH.

A)



B)

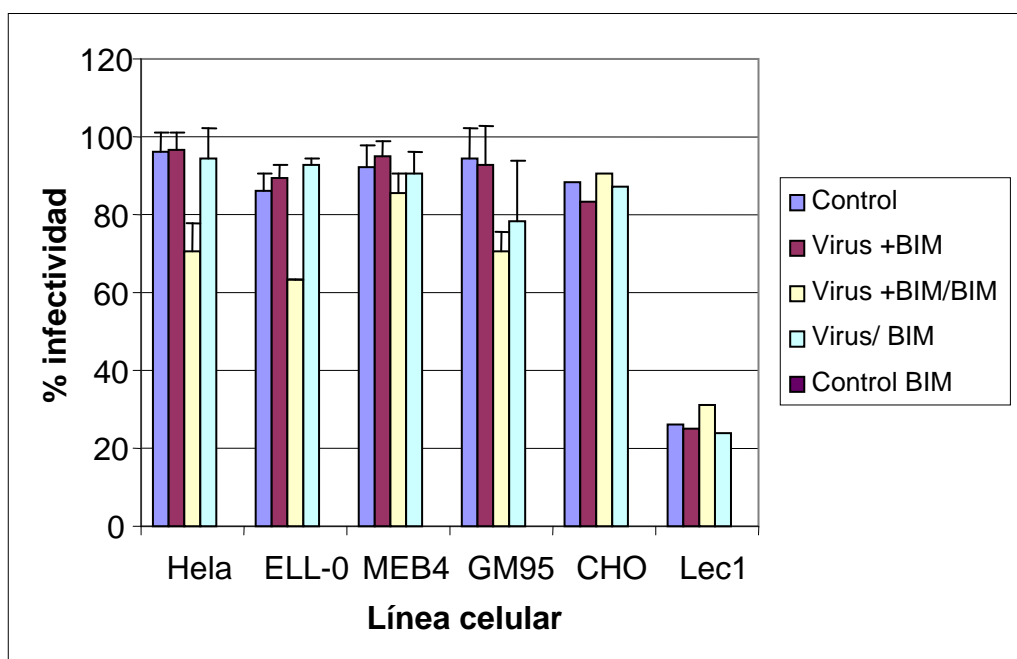


Figura 46- Efecto de BIM sobre la infectividad del NDV. A) Fotografías de un experimento representativo con células HeLa y ELL-0 (objetivo 10x). B) El % de infectividad fue cuantificado como el número de células rojas infectadas por el virus dividido por el número total de células y multiplicado por 100. Los datos se expresan como la media \pm SD de 3 experimentos independientes.

4.9.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON DYNASORE SOBRE LA FUSIÓN, INFECTIVIDAD Y UNIÓN DEL NDV

El *dynasore* es un compuesto que inhibe la actividad GTPásica de la dinamina 1, proteína que es necesaria para la endocitosis tanto mediada por clatrina como por caveolas, por tanto ambas rutas resultarán bloqueadas después de tratar con *dynasore*. Debido a la gran toxicidad del *dynasore* sobre MEB4, GM95, CHO y Lec1 (Tabla 10) el efecto de la incubación de este compuesto sobre las actividades del NDV se estudió exclusivamente en las líneas HeLa y ELL-0 donde la viabilidad resultó ser del 96 % y 95.2 % respectivamente (Tabla 10) en células tratadas e infectadas.

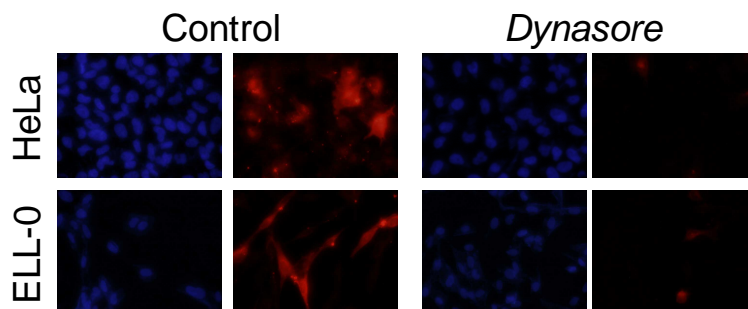
Línea celular	Control negativo	Control positivo	<i>Dynasore</i> 80µM	<i>Dynasore</i> 80µM+NDV	Control DMSO
HeLa	98.8	97.5	98.7	96	97.9
ELL-0	98.4	95.8	96.4	95.2	95.1
MEB4	98.5	97.5	10	7.8	97.3
GM95	98.3	96.4	5.7	4.5	96.3
CHO	97,6	97.3	3.4	4.2	96.1
Lec1	98.2	96.7	5.6	4.7	95.7

Tabla 10- El % de viabilidad de células tratadas con *dynasore* determinada por el método *trypan blue*. Control negativo: células sin tratar ni infectar; control positivo: células infectadas sin tratar con el inhibidor; control DMSO: células incubadas con DMSO e infectadas.

4.9.2.1 Efecto del tratamiento de las células diana con *dynasore* sobre la fusión del NDV con células de cultivo

En estos ensayos, se empleó NDV marcado con la sonda fluorescente R₁₈, y *dynasore* a una concentración 80 µM. Las células ELL-0 y HeLa se preincubaron con el compuesto durante media hora a 37 °C, se incubaron con 2 µg de NDV-R₁₈ durante 30 min a 4 °C y en presencia del inhibidor y después en medio completo durante 1 h a 37 °C y en presencia de *dynasore*. Transcurrido ese tiempo, se fijaron las células con PFA al 2.5 % durante 20 min y se observaron al microscopio de fluorescencia. Los resultados se muestran en la siguiente Figura:

A)



B)

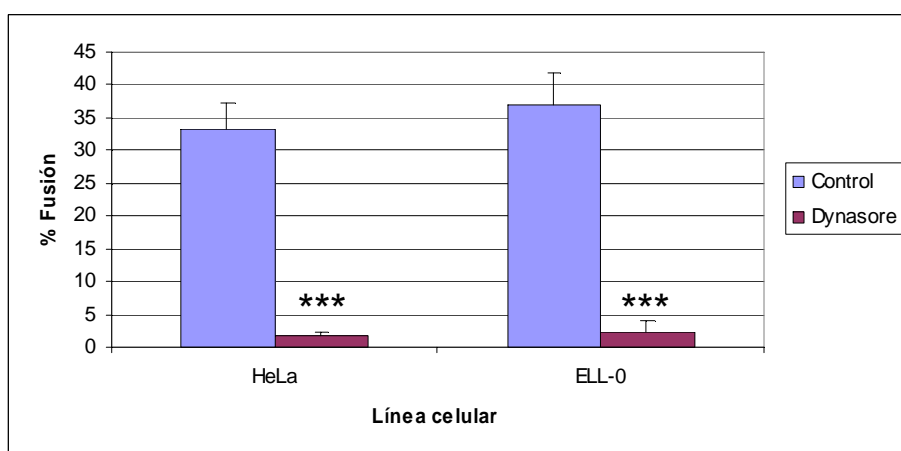


Figura 47- Efecto del *dynasore* sobre la fusión del NDV con células de cultivo. A) Fotografías de un experimento representativo (objetivo 40x) B) El % de fusión se calculó como el número de células rojas dividido por el número total de células y multiplicado por 100. Los datos corresponden a la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Estadística test t de Student, *** extremadamente significativo $p < 0.001$.

Los resultados (Figura 47 y Tabla 12, pág. 141) señalan que el tratamiento con *dynasore* determinó la inhibición casi total de la fusión del NDV con las células tratadas. Estos datos indican un mayor grado de inhibición de la fusión que los de inactivación por pH ácido (Figura 40), o por BIM (Figura 46) y que los de activación por pulsos de pH ácido (Figura 39).

La dinamina es una proteína clave en la fisión de las vesículas endocíticas pero también se ha descrito su interacción con el citoesqueleto de actina (Macia *et al.*, 2006) y en la fusión de membranas (Low y Löwe, 2010). Por tanto, la inhibición de la actividad de la dinamina por *dynasore* podría afectar a los procesos de remodelación de membranas que deben ocurrir para que fusionen la membrana vírica y la membrana plasmática. En conclusión, además de la endocitosis mediada por receptor, el tratamiento con *dynasore* afectaría a la fusión del virus con la membrana plasmática bloqueando casi completamente la entrada del virus; por tanto, la dinamina también podría estar implicada en la entrada del virus por fusión directa con la membrana plasmática.

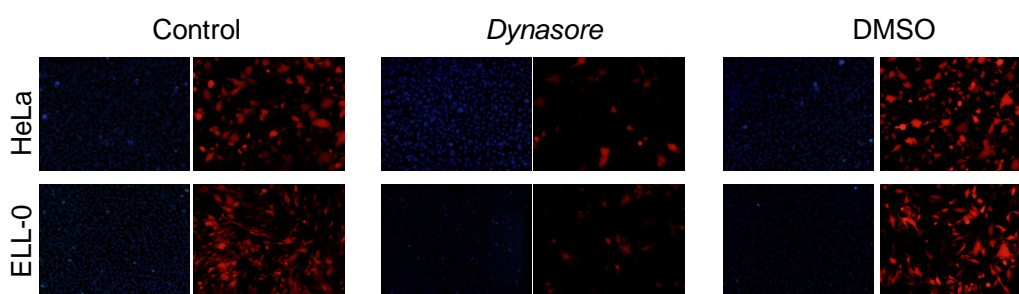
4.9.2.2 Efecto del tratamiento de las células diana con *dynasore* sobre la infectividad del NDV

4.9.2.2.1 Análisis de la infectividad mediante microscopía de fluorescencia

Las células HeLa y ELL-0 fueron preincubadas en presencia de *dynasore* 80 μM durante 30 minutos a 37 °C, se lavaron y se incubaron con el virus rNDV-F3aa-mRFP a una dilución 10^{-5} (0.1 m.o.i.) en el caso de HeLa y 10^{-4} (1 m.o.i.) en el caso de ELL-0 y en presencia de *dynasore* durante 1 h a 37 °C. Después se incubaron otras 2 h más en presencia del inhibidor a 37 °C y la infectividad se cuantificó a las 24 h. Los resultados obtenidos sobre el efecto del tratamiento de este inhibidor de dinamina en la infectividad del NDV se muestran en la siguiente figura (Figura 48).

Debe señalarse que en este estudio de infectividad así como con el resto de inhibidores de la endocitosis excepto BIM, se emplearon diluciones de rNDV-F3aa-mRFP para conseguir un nivel de infectividad en las muestras control en torno al 40 %-50 %, ya que si se emplean concentraciones mayores no se observan diferencias entre muestras control y tratadas debido a la gran infectividad de este virus (Schowalter *et al.*, 2009).

A)



B)

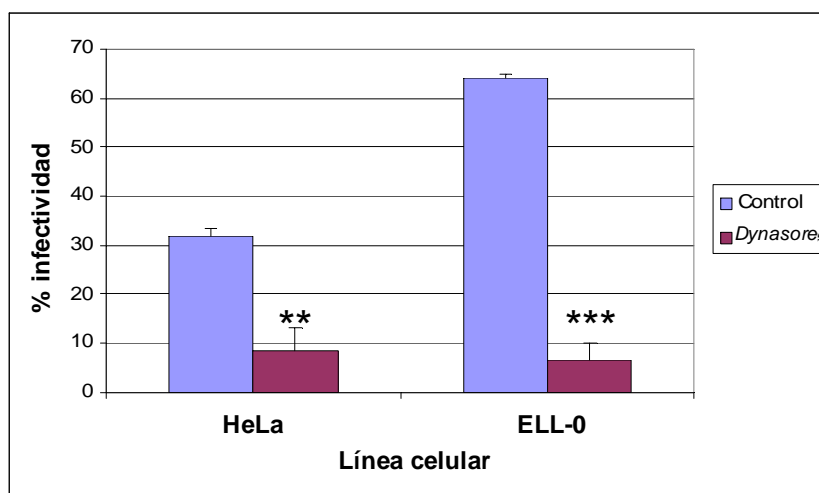


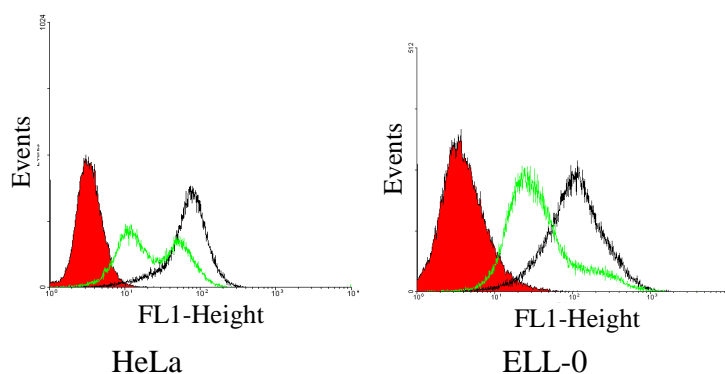
Figura 48- Efecto del *dynasore* sobre la infectividad del NDV. A) Fotografías de un experimento representativo. B) El % de infectividad cuantificado a partir de fotografías tomadas en 3 campos al azar con el objetivo 10x contando el número de células rojas respecto del número total de células y multiplicado por 100. Los datos corresponden a la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Estadística test t de Student, *** extremadamente significativo $p < 0.001$, ** muy significativo $p < 0.01$.

Los datos (Figura 48 y Tabla 12 de la pág. 141) señalan que en ambas líneas celulares el *dynasore* determina una inhibición de infectividad de aproximadamente el 80 % (con la concentración 80 μ M). Este dato coincide con la inhibición de la fusión por *dynasore*, aunque de manera similar a los estudios de fusión el bloqueo de la infectividad fue muy superior a la activación del pH ácido (Figura 42) o a la inhibición por BIM (Figura 46) concluyendo, como se ha señalado en el apartado anterior, que la dinamina es importante en la entrada del virus más allá de la entrada por endocitosis.

4.9.2.2.2 Análisis de la infectividad mediante FACS

Para estos estudios se infectaron células HeLa y ELL-0, previamente tratadas con *dynasore* a una concentración 80 μM , con NDV Clone 30 a 1 m.o.i. según se resume en el apartado anterior. La infectividad del NDV se analizó mediante FACS según se recoge en el apartado de Métodos 3.5.23.2. La Figura 49 muestra los resultados obtenidos en esta serie de experimentos.

A)



B)

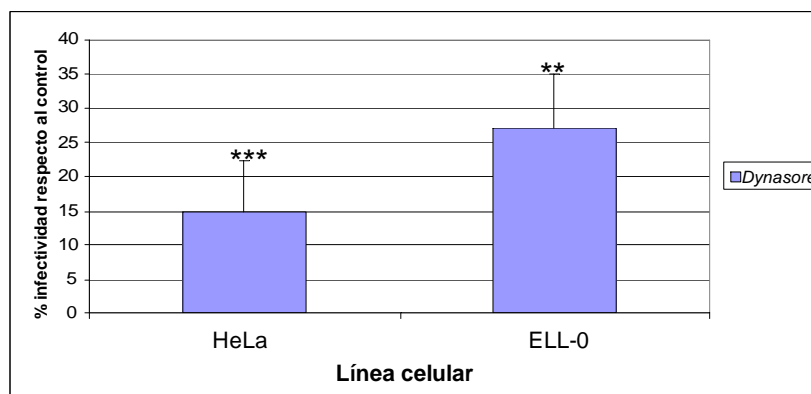


Figura 49 – A) Análisis mediante FACS. Se muestra un experimento representativo (Rojo: control negativo; negro: control positivo; verde: células tratadas con *dynasore*). B) El % de infectividad cuantificado a partir de la “G mean” de tres experimentos llevados a cabo de forma independiente. Los resultados se normalizaron asignando al control 100% de infectividad. Los datos corresponden a la media \pm SD de 3 experimentos independientes.

Como puede observarse, Figura 49 y Tabla 12, el tratamiento con *dynasore* determina una disminución del nivel de infectividad del NDV de aproximadamente 75 % - 80 % en ambas líneas celulares, coincidiendo con los datos obtenidos en el ensayo de microscopía de fluorescencia. El tratamiento en células HeLa determinó la aparición de dos poblaciones (verde) con una inhibición de la infectividad mayor en una población que en la otra.

4.9.2.3 Efecto del tratamiento de las células diana con *dynasore* sobre la unión virus-célula

Para analizar si el efecto negativo del *dynasore* mostrado en los apartados anteriores se debe a la inhibición de la unión del virus a la célula se analizó el grado de unión del NDV a las células tratadas con este compuesto mediante ensayos de FACS (apartado 3.5.9 de Métodos). Las células HeLa y ELL-0 se preincubaron con *dynasore* a una concentración 80 μ M. Después se incubaron con NDV "Clone 30" a 1 m.o.i. en presencia del inhibidor durante 1 h a 4 °C para permitir la unión del virus, se lavaron varias veces para eliminar el virus no unido y se prepararon las muestras para FACS. Los resultados se muestran en la siguiente figura:

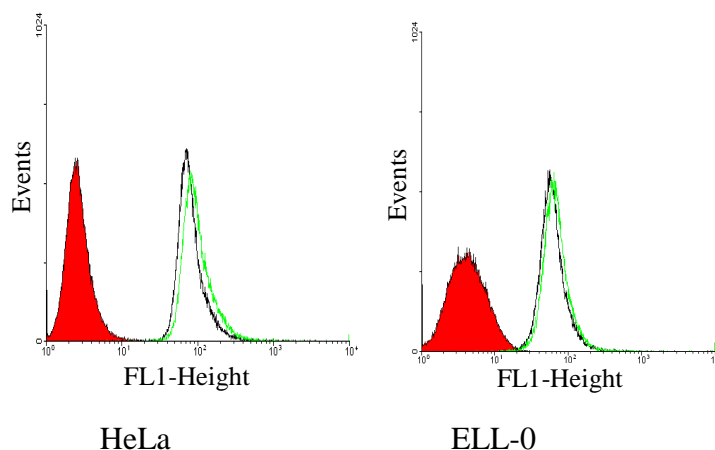


Figura 50- Efecto del *dynasore* sobre el grado de unión virus-célula analizado mediante FACS (Rojo: control negativo; negro: control positivo; verde: células tratadas con *dynasore*).

Por tanto, los resultados obtenidos indican que el grado de unión virus-célula no es afectado por el tratamiento con *dynasore*, es decir, que el efecto negativo observado en la fusión e infectividad víricas se ejerce en una fase del ciclo vírico posterior a la unión.

4.9.2.4 Efecto del *dynasore* postinfección

Las células HeLa y ELL-0 se infectaron con rNDV-F3aa-mRFP a una dilución de 10^{-5} y 10^{-4} respectivamente (0.1 y 1 m.o.i.) durante 1 h a 37 °C, y a distintos tiempos una vez añadido el virus se incubaron con *dynasore* 80 μ M (apartado de Métodos 3.5.24.2). Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente Figura:

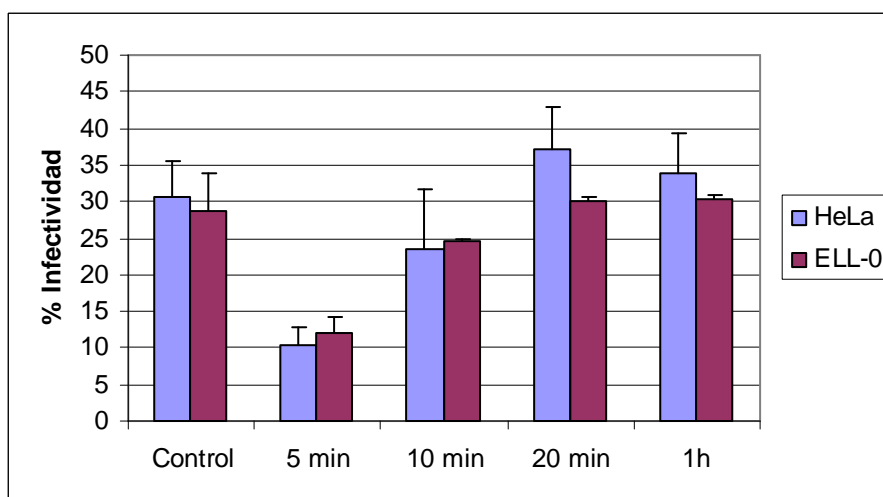


Figura 51- Efecto del tiempo de adición de *dynasore* sobre la infectividad del NDV. El % de infectividad se calculó a partir de fotografías tomadas en 3 campos al azar con el objetivo 10x contando el número de células rojas respecto del número total de células y multiplicado por 100. Los datos se expresan como la media \pm SD de 3 experimentos independientes.

En la Figura 51 se observa que el efecto negativo del *dynasore* se ejerce durante los primeros 5 minutos de la interacción del virus con la célula diana. Se ha descrito que la cinética de acción del *dynasore* es muy rápida, con una habilidad para bloquear la mitad de las nuevas vesículas endocíticas formadas después de 3-4 minutos, y capaz de bloquear casi totalmente la iniciación de vesículas a los 6.5 minutos (Abban *et al.*,

2008), lo que explica que a partir de los 10 minutos de infección no se observe ningún efecto negativo sobre la infectividad del NDV.

En resumen, los resultados mostrados en relación con la acción del *dynasore* sobre las actividades del NDV indicarían que, al menos en células HeLa y ELL-0, el virus necesita dinamina para entrar en la célula diana al igual que se ha descrito para virus como el HIV (Miyachi *et al.*, 2009), HPV16 y BPV1 (Abban *et al.*, 2008). Nuestro grupo ya había señalado que el NDV podía utilizar la ruta endocítica mediada por caveolas (Cantín *et al.*, 2007); estos resultados serían consistentes con los obtenidos anteriormente ya que el *dynasore* bloquea tanto la ruta mediada por caveolas como por clatrina porque en ambas se necesita que se produzca la hidrólisis de GTP por dinamina.

4.9.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS DIANA CON CONCANAMICINA A, MONENSINA O CLOROQUINA SOBRE LA FUSIÓN, INFECTIVIDAD Y UNIÓN DEL NDV

Los siguientes inhibidores de endocitosis que estudiamos fueron tres compuestos que impiden la acidificación del endosoma (Tabla 6 del apartado de Métodos 3.5.24, pág. 66): concanamicina A (ConA), que es un inhibidor de la ATPasa vacuolar; monensina, un ionóforo que previene la acidificación del endosoma, y cloroquina (CQ) agente lisosomotrópico que alcaliniza las vesículas endocíticas. Los tres compuestos inhiben la entrada de virus que requieren pH ácido.

De nuevo se utilizó como diana las líneas celulares HeLa, ELL-0, MEB4 y GM95 ya que la incubación de las líneas CHO y Lec1 con estos inhibidores provocó gran daño celular, como se muestra en los resultados de viabilidad mostrados en la siguiente Tabla:

Línea celular	Control negativo	Control positivo	ConA 5 nM	ConA 5 nM +NDV	Monensina 2.5 µM	Monensina 2.5 µM +NDV	CQ 10 nM	Control DMSO
HeLa	98.4	96.9	99	96.8	96.5	98.3	97.7	97.9
ELL-0	98.9	95.2	94.9	94.7	95.7	95.9	98.4	95.9
MEB4	97.8	96.3	96	95.5	96.2	94.6	96.3	96.7
GM95	96.5	97.2	95.2	94.3	94.6	94.5	95.3	96.3
CHO	97.9	98.1	15	10.3	16.2	11.3	32	97.9
Lec1	98.2	97.4	7.8	11.1	10.6	9.3	37	95.7

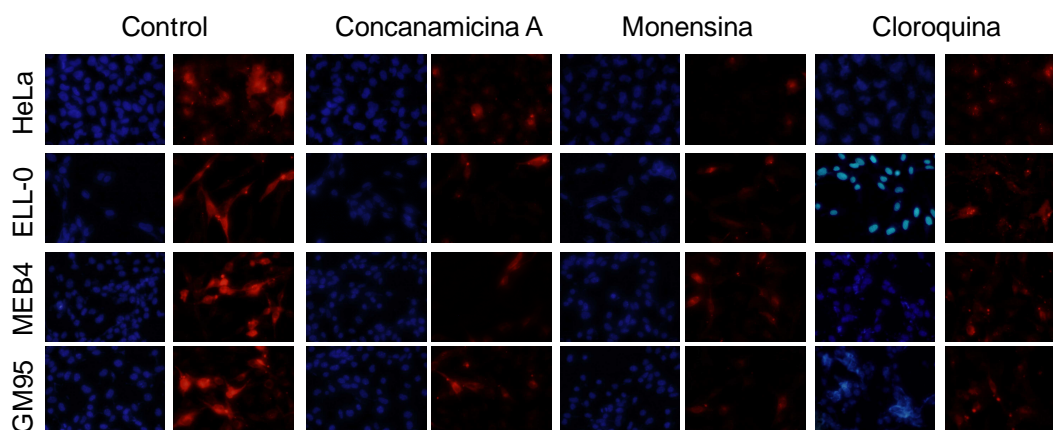
Tabla 11- El % de viabilidad en células tratadas o no con diferentes inhibidores de la endocitosis calculado mediante la técnica de *trypan blue*. Control negativo: células sin tratar ni infectar; control positivo: células infectadas sin tratar con el inhibidor; control DMSO: células incubadas con DMSO e infectadas.

4.9.3.1 Efecto del tratamiento de las células diana con ConA, monensina o CQ sobre la fusión del NDV con células de cultivo

Para analizar el efecto de estos tres compuestos en la fusión virus-célula, las células se incubaron durante 1 h y 30 min en presencia de ConA (5 nM) o monensina (2.5 µM) o 1 h con CQ (10 nM); se lavaron y se incubaron con 2 µg NDV-R₁₈ durante 30 min a 4 °C para facilitar la unión (en presencia de los inhibidores). Después se lavaron de nuevo y se incubaron durante 1 h a 37 °C también en presencia de los inhibidores para permitir la fusión virus-célula. Transcurrido ese tiempo, las células se fijaron con PFA al 2.5 % durante 20 minutos y se observaron al microscopio de fluorescencia.

Como muestran los datos de la Figura 52 y la Tabla 12 (pág. 141), el tratamiento de las células con ConA y monensina produjo una inhibición de la fusión virus-célula de aproximadamente el 80 % (con respecto al control) mientras que con cloroquina la inhibición que se observó fue menor, en torno al 60 %, siendo las diferencias altamente significativas en los 3 casos y en la 4 líneas celulares estudiadas (datos estadísticos resumidos en la leyenda de la Figura 52).

A)



B)

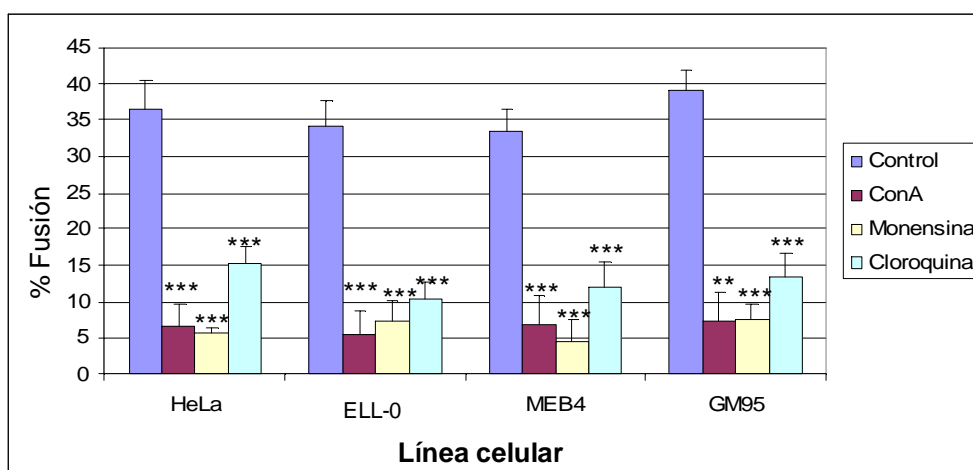


Figura 52- Efecto de ConA, Monensina y cloroquina sobre la fusión del NDV con células de cultivo. A) Fotografías que muestran la fusión de NDV con células de cultivo tratadas o no con los inhibidores (objetivo 40x). B) El % de fusión se calculó como el número de células rojas respecto del número total de células y multiplicado por 100 a partir de fotografías tomadas en 6 campos al azar con el objetivo 40x. Los datos corresponden a la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Estadística test t de Student, *** extremadamente significativo $p < 0.001$, ** muy significativo $p < 0.01$.

4.9.3.2 Efecto del tratamiento de las células diana con ConA, monensina o cloroquina sobre la infectividad del NDV

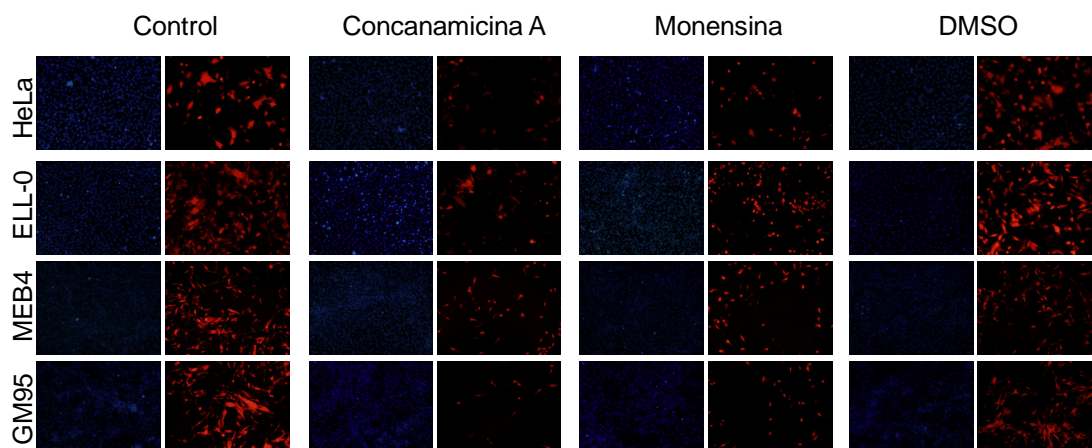
4.9.3.2.1 Análisis de la infectividad mediante microscopía de fluorescencia

A) Efecto de ConA y monensina

Las células se incubaron en presencia de ConA a 5 nM o monensina a 2.5 μ M durante 1 h y 30 min a 37 °C, se lavaron y se incubaron con rNDV-F3aa-mRFP durante una 1 h en presencia del inhibidor a 37 °C a una dilución 10^{-4} (1 m.o.i.) excepto en HeLa que se empleó la dilución 10^{-5} (0.1 m.o.i.). Después se incubaron 4 h más con los compuestos; y en medio completo hasta el día siguiente. Los resultados se pueden observar en la Figura 53.

Los dos compuestos determinaron la disminución de la infectividad de aproximadamente el 80 % del control (Figura 53 y Tabla 12 de la pág. 141) en las 4 líneas celulares estudiadas. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en los ensayos de fusión resumidos en el apartado anterior y son un apoyo más que indicaría que la ruta de endocitosis utilizada por el NDV dependería del pH. El dato más sorprendente es la inhibición observada en células MEB4 y GM95 donde no hemos detectado activación a pH ácido (apartados 4.8.1 y 4.8.4) y sin embargo sí observamos efecto negativo de estos inhibidores. Este resultado se discutirá más adelante.

A)



B)

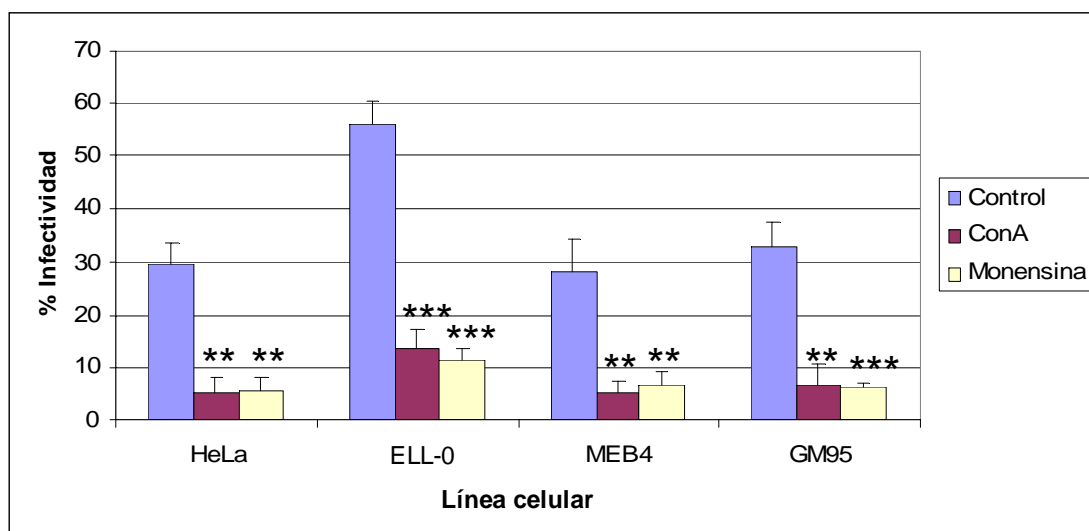


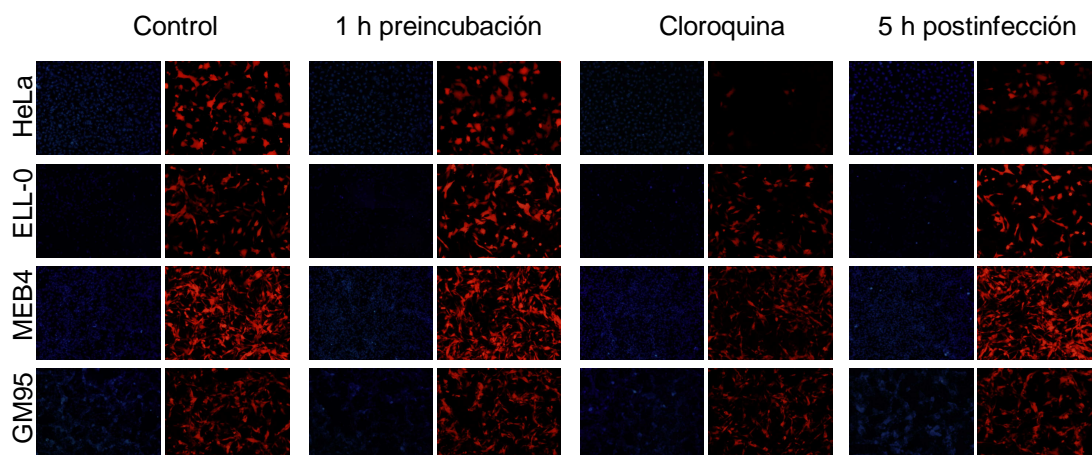
Figura 53- Efecto de ConA y monensina sobre la infectividad del NDV. A) Fotografías representativas de un experimento. B) El % de infectividad se calculó a partir de fotografías tomadas en 3 campos al azar con el objetivo 10x contando el número de células rojas dividido por el número total de células y multiplicado por 100. La infectividad de los controles fue en torno al 40 %. Los datos corresponden a la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Estadística test t de Student, *** extremadamente significativo $p < 0.001$, ** muy significativo $p < 0.01$.

B) Efecto de Cloroquina

Las células se preincubaron durante 1 h a 37 °C con cloroquina a la concentración 10 nM, después se infectaron con rNDV-F3aa-mRFP con una dilución 10^{-4} (1 m.o.i.), excepto en HeLa que se utilizó 10^{-5} (0.1 m.o.i.) ,durante 1 h a 37 °C en presencia o no del inhibidor como se describe en el apartado de Métodos 3.5.23.3. También se analizó el efecto de la adición de cloroquina a las 5 h postinfección incubando con el inhibidor durante 6 h. Los resultados se resumen en la siguiente Figura 54.

Los datos (Figura 54 y Tabla 12 pág. 141) indican que en la línea celular HeLa la incubación con CQ produjo una inhibición casi total de la infectividad mientras que en ELL-0, MEB4 y GM95 la inhibición fue de aproximadamente el 60 % cuando el inhibidor estuvo presente durante la infección. La infectividad no se vio afectada si CQ fue añadida a las 5 h postinfección, de lo que se deduce que el efecto inhibitorio del compuesto se ejerce sobre los primeros estadios del ciclo vírico.

A)



B)

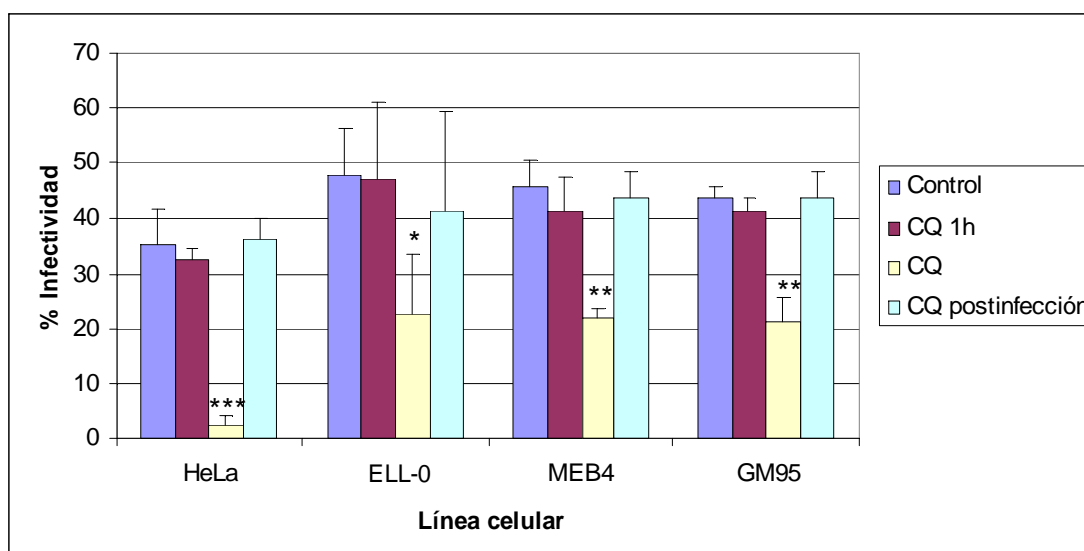


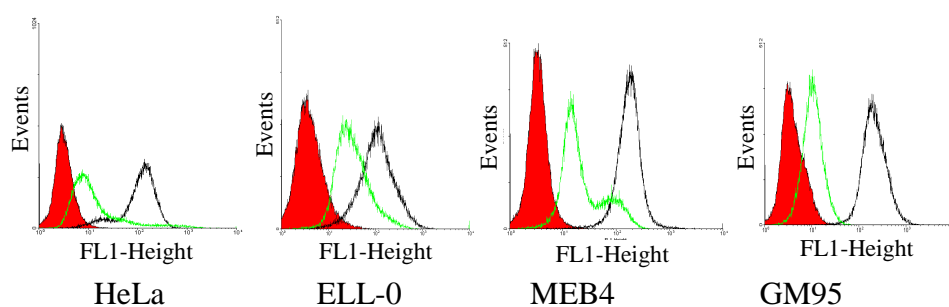
Figura 54- Efecto de la cloroquina sobre la infectividad del NDV. A)

Fotografías representativas de un experimento. B) El % de infectividad se calculó a partir de fotografías tomadas en 3 campos al azar con el objetivo 10x contando el número de células rojas dividido por el número total de células y multiplicado por 100. Los datos corresponden a la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Estadística test t de Student, *** extremadamente significativo $p < 0.001$, ** muy significativo $p < 0.01$ y * significativo $p < 0.05$. CQ 1 h: Células preincubadas con CQ solo 1 h antes de la infección. CQ: Células preincubadas con CQ durante 1 h, durante la infección y 4 h más postinfección. CQ postinfección: Células incubadas con CQ a las 5 h postinfección.

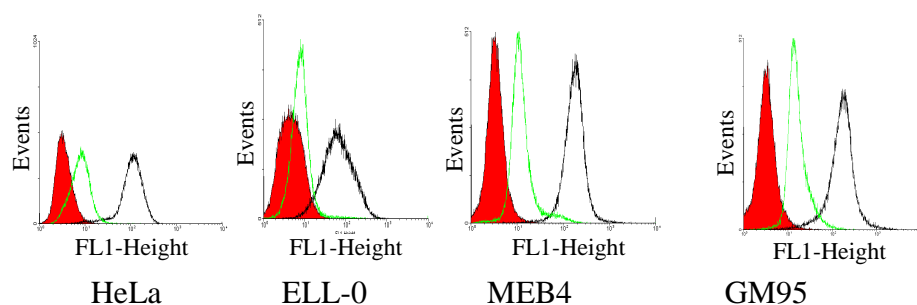
4.9.3.2 Análisis de la infectividad mediante FACS

Las células fueron tratadas de igual forma que en los apartados anteriores pero infectadas con NDV “Clone 30” a 1 m.o.i., y el grado de infectividad vírica se analizó mediante FACS como se explica en el apartado de Métodos 3.5.11. Los resultados se muestran en las siguientes Figuras 55 y 56:

A) ConA



B) Monensina



C) Cloroquina

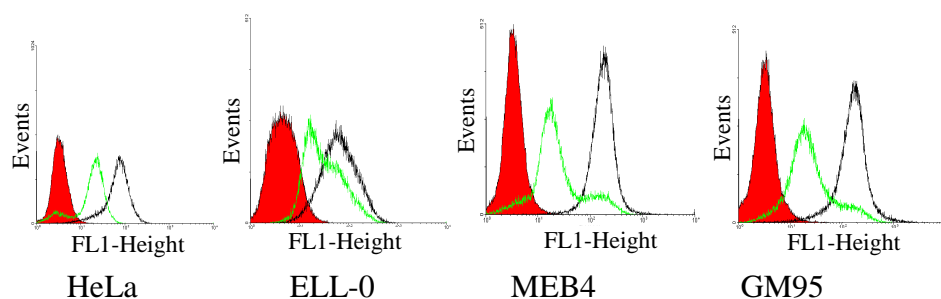


Figura 55- Análisis mediante FACS del efecto de ConA, monensina y CQ sobre la infectividad del NDV. Rojo: control negativo, Verde: efecto del inhibidor y Negro: control positivo (Datos de un experimento representativo).

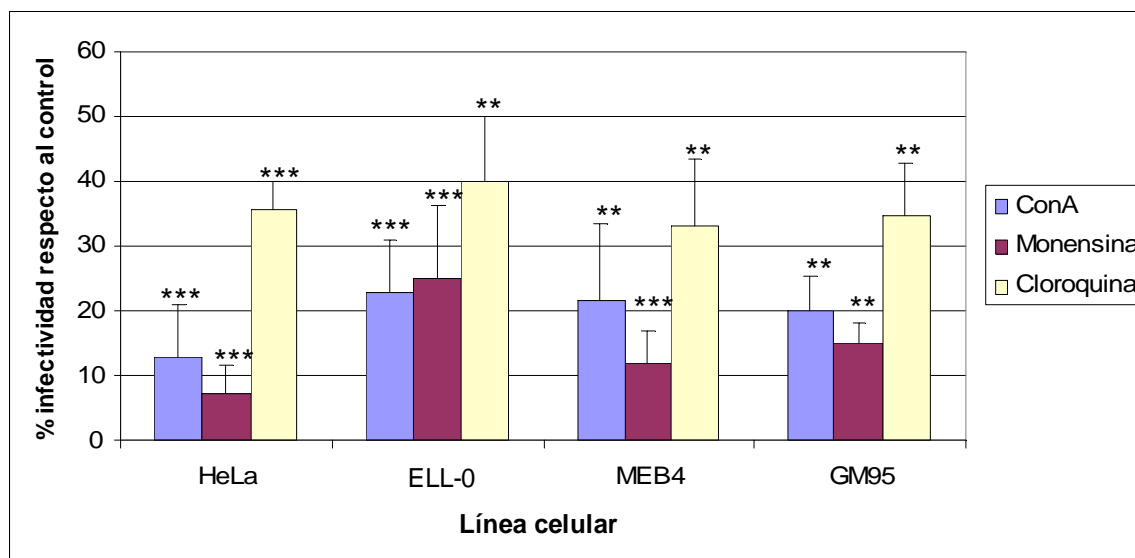


Figura 56- Efecto de ConA, monensina y cloroquina sobre la infectividad del NDV. Los resultados se calcularon a partir de la “G mean” de tres experimentos llevados a cabo de forma independiente. Los resultados se normalizaron considerando el control (células infectadas no tratadas) como el 100 %. Los datos corresponden a la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Estadística test t de Student, *** extremadamente significativo $p < 0.001$, ** muy significativo $p < 0.01$.

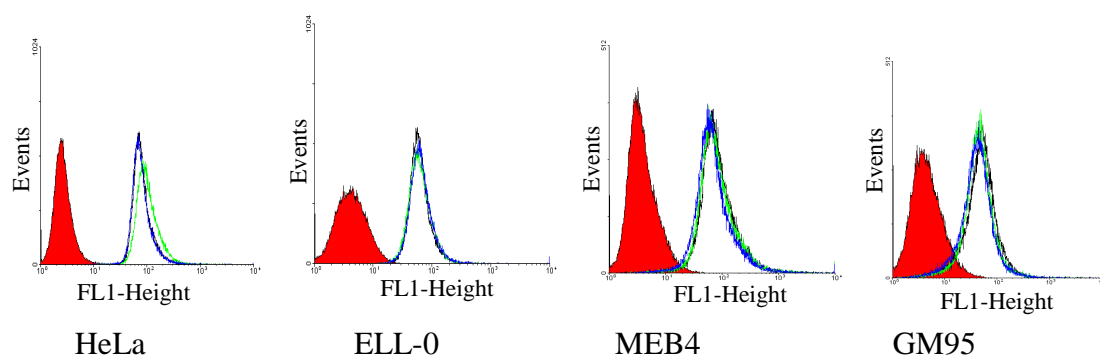
Los resultados son coincidentes con los mostrados en el apartado anterior utilizando técnicas de microscopía de fluorescencia. El % de inhibición de la infectividad del NDV “Clone30” tras incubación con uno de los tres compuestos fue similar al observado en el virus recombinante rNDV-F3aa-mRFP, estando en torno al 80 % en las células tratadas con ConA y monensina (Tabla 12 pág. 141). Tras el tratamiento con cloroquina, también los resultados indican que se produjo una disminución de aproximadamente un 60 % en todas las líneas celulares analizadas. En el caso de HeLa se observó menos inhibición que empleando el virus rNDV-F3aa-mRFP; probablemente esta diferencia se deba a que se emplearon diferentes concentraciones de virus 0.1 m.o.i. en los ensayos de microscopía de fluorescencia y 1 m.o.i. en los de citometría de flujo.

4.9.3.3 Efecto del tratamiento de las células diana con ConA, monensina o cloroquina sobre la unión virus-célula

También analizamos el grado de unión virus-célula después de tratar con ConA, monensina o cloroquina para descartar que el efecto negativo observado de los tres compuestos sobre la fusión e infectividad del NDV se ejerciera sobre la unión virus-célula. Por ello, las células se incubaron en presencia del inhibidor a la misma concentración utilizada en ensayos anteriores y después se incubaron con NDV “Clone 30” a 1 m.o.i. durante 1 h a 4 °C y en presencia del compuesto. Transcurrido ese tiempo, se prepararon las muestras para su análisis por FACS. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con estos compuestos, como esperábamos, no afecta al grado de unión virus-célula en ninguna de las 4 líneas celulares estudiadas (Figura 57).

En resumen, la fusión e infectividad del NDV es inhibida por los 3 agentes que modifican el pH sin afectar a la unión del virus a la superficie celular. Los resultados son consistentes con que el NDV utiliza el entramado endocítico para infectar la célula diana ya que la subida de pH en los orgánulos endocíticos bloquea la infección.

A) ConA y monensina



B) Cloroquina

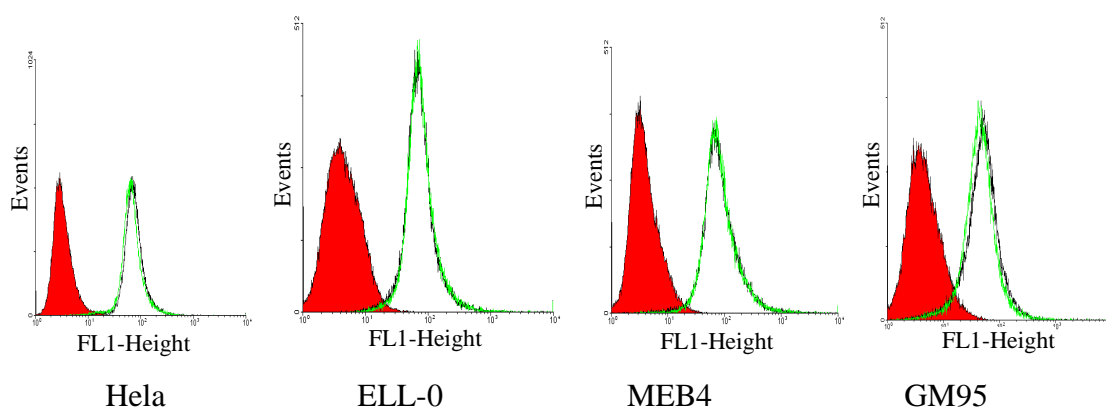


Figura 57- A) Efecto de ConA y monensina sobre el grado de unión virus-célula (Rojo: control negativo; Negro: control positivo; Verde: células tratadas con ConA; Azul: Células tratadas con monensina. B) Efecto de la cloroquina (Rojo: control negativo; Negro: control positivo; Verde: células tratadas con cloroquina)

4.10 RELEVANCIA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

En la siguiente tabla, se resume el efecto de los cinco inhibidores de endocitosis sobre la interacción del NDV con las células utilizadas como células diana del virus.

INHIBIDOR	EFECTO	LÍNEA CELULAR			
		HeLa	ELL-0	MEB4	GM95
BIM	Infectividad	74.2	73.4	100	76.2
Dynasore	Fusión	5 ± 1.5	1.5 ± 0.5	ND	ND
	Infectividad	24 ± 7.1	18.2 ± 7.1	ND	ND
	Infectividad FACS	14.7 ± 7.7	27 ± 8	ND	ND
	Unión	100	100	ND	ND
ConA	Fusión	19.3 ± 3.3	16.3 ± 6	21 ± 7	20.8 ± 2.2
	Infectividad	18.5 ± 7	24.5 ± 3.7	25.3 ± 6.5	9.4 ± 2
	Infectividad FACS	13 ± 8	23 ± 8	21.6 ± 12	20 ± 5.2
	Unión	100	100	100	100
Monensina	Fusión	20.4 ± 5	20.7 ± 4.2	13.2 ± 6	31.8 ± 4.4
	Infectividad	20.1 ± 4.1	20.6 ± 4.3	17.6 ± 5	20.1 ± 2.4
	Infectividad FACS	7.5 ± 4	25.1 ± 11	12.1 ± 5	15.1 ± 3.2
	Unión	100	100	100	100
Cloroquina	Fusión	37.5 ± 5.6	38.3 ± 7.5	30 ± 5	34.7 ± 7
	Infectividad	7 ± 0.8	52.6 ± 6	48.3 ± 1.6	47.1 ± 4
	Infectividad FACS	35.7 ± 4	40 ± 10	33.3 ± 10	34.6 ± 8
	Unión	100	100	100	100

Tabla 12 -Resumen de los resultados obtenidos en el estudio con inhibidores de endocitosis. Los datos son % de actividad respecto al control.

Estos datos apoyarían que en las líneas celulares HeLa y ELL-0 el NDV puede utilizar una ruta de entrada alternativa a la fusión directa con la membrana plasmática que sería endocitosis mediada por receptor puesto que el tratamiento con BIM produce una inhibición de la infectividad del NDV del 30 %, dato que coincide con la activación que produce el tratamiento a pH ácido (apartados 4.8.4 y 4.9.1 Figuras 42 y 46). Resultados similares se han obtenido con virus de la gripe (Root *et al.*, 2000);

alphavirus, rabdovirus, poxvirus y herpesvirus también requieren proteína kinasa C para penetrar en la célula (Cirone *et al.*, 1990; Constantinescu *et al.*, 1991). Además, nuestros resultados muestran que en estas dos líneas celulares, HeLa y ELL-0, inhibidores de la ATPasa vacuolar como ConA o compuestos que alcalinizan los endosomas como monensina y cloroquina provocan una fuerte inhibición tanto de la fusión como de la infectividad del NDV, señalando que la ruta de endocitosis empleada es dependiente de pH al menos en ambas líneas. Asimismo, en el mecanismo de endocitosis utilizado por el NDV intervendría la dinamina ya que el tratamiento con *dynasore* disminuye la fusión e infectividad víricas en los primeros minutos de entrada del virus en la célula. Además de utilizar la entrada independiente de pH (es decir, fusión directa con la membrana plasmática), el NDV también utilizaría otra ruta que sería la endocitosis dependiente de dinamina y requeriría un pH ácido. La posibilidad de utilizar diferentes rutas de entrada se ha descrito también para otros virus como los retrovirus JSRV y ASLV, cuya fusión y entrada puede ser independiente de pH o no, y además implica un paso en el cual para que se produzca la entrada y fusión se necesita de la cooperación del receptor y el pH ácido (Côté *et al.*, 2009). Ambos virus comparten características de virus pH independientes y pH dependientes.

Los resultados obtenidos tras el tratamiento con ConA y monensina resumidos en la tabla 12 serían un apoyo adicional a la conclusión de que el pH ácido de los endosomas juega un papel en la infectividad del NDV, según ya se ha mencionado en el apartado de los estudios del efecto de pH sobre estas células. Sin embargo, resulta sorprendente que en las líneas MEB4 y GM95 también se observe una fuerte inhibición por ConA, monensina y cloroquina y sin embargo no se observe activación de la fusión a pH ácido ni efecto del inhibidor de PKC (BIM). Este dato podría indicar que en estas líneas celulares se estaría usando un tipo de endocitosis diferente al utilizado en HeLa y ELL-0 o bien que estos inhibidores estuvieran interfiriendo en MEB4 y GM95 en el tráfico de otros compuestos o en otras funciones celulares afectando negativamente a la infectividad del virus. Son necesarios futuros experimentos para esclarecer los resultados obtenidos en MEB4 y GM95.

Nuestros datos indican que la incubación con cloroquina determina una menor inhibición que con los otros inhibidores también estudiados. Esto podría deberse a que al medir el pH en las vesículas celulares durante el tratamiento con inhibidores de la acidificación, se ha encontrado que ningún inhibidor consigue que el pH dentro del endosoma llegue a ser neutro a menos que se usen concentraciones muy altas. Por ello,

la efectividad de ConA y de cloroquina a la hora de subir el pH dentro del endosoma no sería equivalente y dependería del tipo celular (Schowalter *et al.*, 2009). Sin embargo, podemos concluir que la inhibición de la infectividad del NDV producida por este agente lisosomotrópico de en torno al 60 % explicaría que el ambiente de pH ácido que se da en la vía endocítica estimula la fusión y la entrada del virus.

En resumen, nuestros datos apoyan que el NDV puede utilizar diferentes rutas de entrada dependiendo de la línea celular. La ruta principal sería la fusión directa con la membrana plasmática. Un porcentaje de virus podría también utilizar la entrada endocítica. Dependiendo de la línea celular, esta entrada dependería de receptor y dinamina (en ELL-0 o HeLa por ejemplo). En este caso, el pH ácido sería un acelerador de los cambios conformacionales que debe sufrir la proteína F para mediar la fusión de membranas, bien directamente, o a través de la interacción HN-F. En otras líneas celulares que poseen una composición diferente de sialogliconjugados como GM95 (sin gangliósidos) y MEB4 (solo GM3), no existiría el receptor adecuado para permitir la endocitosis mediada por receptor. En este caso, el efecto negativo de los agentes que bloquean la acidificación de los endosomas sería debido a que se están afectando otros aspectos víricos y/o celulares a esclarecer.

1. El NDV reconoce preferentemente receptores sialilados de la célula diana con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$.
2. El NDV también puede reconocer receptores sialilados con enlaces $\alpha 2 \rightarrow 6$ bien presentes de forma natural en la célula o bien añadidos mediante resialilación por la acción de la $\alpha(2 \rightarrow 6)N$ -SIAT.
3. Los gangliósidos de la célula diana no son imprescindibles para la fusión de membranas y la infectividad del NDV.
4. Las proteínas *N*-glicosiladas son necesarias en la fusión e infectividad del NDV.
5. El aumento de la concentración de gangliósidos en la membrana diana suple el requerimiento de *N*-glicoproteínas en la entrada del NDV.
6. La activación ejercida por el pH ácido sobre la fusión del NDV depende de la composición de la membrana diana.
7. El NDV se inactiva cuando se expone a pH ácido previamente a la interacción con la célula diana.
8. El pH ácido podría rebajar la barrera energética necesaria para “disparar” los cambios conformacionales de la proteína F del NDV que conducen a la fusión de membranas.
9. La entrada del NDV mediante endocitosis es dependiente de la proteína quinasa C (PKC) y de la GTPasa dinamina.
10. El descenso de pH en los compartimentos endocíticos de la célula diana es importante para la entrada del NDV.

1. **Abban, C. Y., N. A. Bradbury, and P. I. Meneses.** 2008. HPV16 and BPV1 infection can be blocked by the dynamin inhibitor dynasore. *Am J Ther* **15**:304-11.
2. **Aloia, R. C., H. Tian, and F. C. Jensen.** 1993. Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:5181-5.
3. **Alymova, I. V., G. Taylor, T. Takimoto, T. H. Lin, P. Chand, Y. S. Babu, C. Li, X. Xiong, and A. Portner.** 2004. Efficacy of novel hemagglutinin-neuraminidase inhibitors BCX 2798 and BCX 2855 against human parainfluenza viruses in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1495-502.
4. **Ayllon, J., E. Villar, and I. Munoz-Barroso.** 2010. Mutations in the ectodomain of newcastle disease virus fusion protein confer a hemagglutinin-neuraminidase-independent phenotype. *J Virol* **84**:1066-75.
5. **Bagai, S., and R. A. Lamb.** 1995. Individual roles of N-linked oligosaccharide chains in intracellular transport of the paramyxovirus SV5 fusion protein. *Virology* **209**:250-6.
6. **Bagai, S., A. Puri, R. Blumenthal, and D. P. Sarkar.** 1993. Hemagglutinin-neuraminidase enhances F protein-mediated membrane fusion of reconstituted Sendai virus envelopes with cells. *J Virol* **67**:3312-8.
7. **Barnard, R. J., S. Narayan, G. Dornadula, M. D. Miller, and J. A. Young.** 2004. Low pH is required for avian sarcoma and leukosis virus Env-dependent viral penetration into the cytosol and not for viral uncoating. *J Virol* **78**:10433-41.
8. **Blumberg, B., J. Chan, and S. A. Udem.** 1991. The molecular biology of Paramyxovirus genus. En: "The Paramyxoviruses" 8 (Kingsbury, D.W., ed.) Plenum Press, New York **8**.

9. **Bose, S., B. D. Welch, C. A. Kors, P. Yuan, T. S. Jardetzky, and R. A. Lamb.** 2011. Structure and mutagenesis of the parainfluenza virus 5 hemagglutinin-neuraminidase stalk domain reveals a four-helix bundle and the role of the stalk in fusion promotion. *J Virol* **85**:12855-66.
10. **Bratt, M. A., and W. S. Robinson.** 1971. Evidence for an RNA replicative intermediate in cells infected with Newcastle disease virus. *J Gen Virol* **10**:139-45.
11. **Campanero-Rhodes, M. A., A. Smith, W. Chai, S. Sonnino, L. Mauri, R. A. Childs, Y. Zhang, H. Ewers, A. Helenius, A. Imberthy, and T. Feizi.** 2007. N-glycolyl GM1 ganglioside as a receptor for simian virus 40. *J Virol* **81**:12846-58.
12. **Campbell, R. E., O. Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias, and R. Y. Tsien.** 2002. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7877-82.
13. **Cantin, C., J. Holguera, L. Ferreira, E. Villar, and I. Munoz-Barroso.** 2007. Newcastle disease virus may enter cells by caveolae-mediated endocytosis. *J Gen Virol* **88**:559-69.
14. **Chan, D. C., and P. S. Kim.** 1998. HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**:681-4.
15. **Chang, P.** 1975. Newcastle Disease. *CRC Handbook Series in Zoonoses: Viral Zoonoses*.
16. **Chen, L., P. M. Colman, L. J. Cosgrove, M. C. Lawrence, L. J. Lawrence, P. A. Tulloch, and J. J. Gorman.** 2001. Cloning, expression, and crystallization of the fusion protein of Newcastle disease virus. *Virology* **290**:290-9.
17. **Chen, M. H., and T. Benjamin.** 1997. Roles of N-glycans with alpha2,6 as well as alpha2,3 linked sialic acid in infection by polyoma virus. *Virology* **233**:440-2.

18. **Chernomordik, L. V., and M. M. Kozlov.** 2003. Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu Rev Biochem* **72**:175-207.
19. **Chernomordik, L. V., J. Zimmerberg, and M. M. Kozlov.** 2006. Membranes of the world unite! *J Cell Biol* **175**:201-7.
20. **Choppin, P. W., and R. W. Compans.** 1975. Reproduction of Paramyxoviruses En H. Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner (Eds) , "Comprehensive Virology" Plenum Press, New York 95-178.
21. **Chu, V. C., and G. R. Whittaker.** 2004. Influenza virus entry and infection require host cell N-linked glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:18153-8.
22. **Chua, K. B., W. J. Bellini, P. A. Rota, B. H. Harcourt, A. Tamin, S. K. Lam, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, S. R. Zaki, W. Shieh, C. S. Goldsmith, D. J. Gubler, J. T. Roehrig, B. Eaton, A. R. Gould, J. Olson, H. Field, P. Daniels, A. E. Ling, C. J. Peters, L. J. Anderson, and B. W. Mahy.** 2000. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* **288**:1432-5.
23. **Cirone, M., A. Angeloni, G. Barile, C. Zompetta, M. Venanzoni, M. R. Torrisi, L. Frati, and A. Faggioni.** 1990. Epstein-Barr virus internalization and infectivity are blocked by selective protein kinase C inhibitors. *Int J Cancer* **45**:490-3.
24. **Cobaleda, C., A. Garcia-Sastre, and E. Villar.** 1994. Fusion between Newcastle disease virus and erythrocyte ghosts using octadecyl Rhodamine B fluorescence assay produces dequenching curves that fit the sum of two exponentials. *Biochem J* **300 (Pt 2)**:347-54.
25. **Cobaleda, C., I. Munoz-Barroso, A. Sagraera, and E. Villar.** 2002. Fusogenic activity of reconstituted newcastle disease virus envelopes: a role for the hemagglutinin-neuraminidase protein in the fusion process. *Int J Biochem Cell Biol* **34**:403-13.

26. **Collins, P. L., M. A. Mink, and D. S. Stec.** 1991. Rescue of synthetic analogs of respiratory syncytial virus genomic RNA and effect of truncations and mutations on the expression of a foreign reporter gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:9663-7.
27. **Collins, P. L., and G. Mottet.** 1991b. Homooligomerization of the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of human parainfluenza virus type 3 occurs before the acquisition of correct intramolecular disulfide bonds and mature immunoreactivity. *J Virol* **65**:2362-71.
28. **Collins, P. L., and G. Mottet.** 1991a. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* **72** (Pt 12):3095-101.
29. **Connolly, S. A., and R. A. Lamb.** 2006. Paramyxovirus fusion: real-time measurement of parainfluenza virus 5 virus-cell fusion. *Virology* **355**:203-12.
30. **Constantinescu, S. N., C. D. Cernescu, and L. M. Popescu.** 1991. Effects of protein kinase C inhibitors on viral entry and infectivity. *FEBS Lett* **292**:31-3.
31. **Cosset, F. L., and D. Lavillette.** 2011. Cell entry of enveloped viruses. *Adv Genet* **73**:121-83.
32. **Cote, M., Y. M. Zheng, and S. L. Liu.** 2009. Receptor binding and low pH coactivate oncogenic retrovirus envelope-mediated fusion. *J Virol* **83**:11447-55.
33. **Crennell, S., T. Takimoto, A. Portner, and G. Taylor.** 2000. Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. *Nat Struct Biol* **7**:1068-74.
34. **de Leeuw, O., and B. Peeters.** 1999. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J Gen Virol* **80** (Pt 1):131-6.
35. **Diederich, S., L. Thiel, and A. Maisner.** 2008. Role of endocytosis and cathepsin-mediated activation in Nipah virus entry. *Virology* **375**:391-400.

36. **Doms, R. W., R. A. Lamb, J. K. Rose, and A. Helenius.** 1993. Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* **193**:545-62.
37. **Dugan, A. S., M. L. Gasparovic, N. Tsomaia, D. F. Mierke, B. A. O'Hara, K. Manley, and W. J. Atwood.** 2007. Identification of amino acid residues in BK virus VP1 that are critical for viability and growth. *J Virol* **81**:11798-808.
38. **Earp, L. J., S. E. Delos, R. C. Netter, P. Bates, and J. M. White.** 2003. The avian retrovirus avian sarcoma/leukosis virus subtype A reaches the lipid mixing stage of fusion at neutral pH. *J Virol* **77**:3058-66.
39. **Earp, L. J., S. E. Delos, H. E. Park, and J. M. White.** 2005. The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **285**:25-66.
40. **Ebe, Y., A. Kuno, N. Uchiyama, S. Koseki-Kuno, M. Yamada, T. Sato, H. Narimatsu, and J. Hirabayashi.** 2006. Application of lectin microarray to crude samples: differential glycan profiling of lec mutants. *J Biochem* **139**:323-7.
41. **Egelman, E. H., S. S. Wu, M. Amrein, A. Portner, and G. Murti.** 1989. The Sendai virus nucleocapsid exists in at least four different helical states. *J Virol* **63**:2233-43.
42. **Empig, C. J., and M. A. Goldsmith.** 2002. Association of the caveola vesicular system with cellular entry by filoviruses. *J Virol* **76**:5266-70.
43. **Faaberg, K. S., and M. E. Peeples.** 1988. Association of soluble matrix protein of Newcastle disease virus with liposomes is independent of ionic conditions. *Virology* **166**:123-32.
44. **Farzan, S. F., L. M. Palermo, C. C. Yokoyama, G. Orefice, M. Fornabaio, A. Sarkar, G. E. Kellogg, O. Greengard, M. Porotto, and A. Moscona.** 2011. Premature activation of the paramyxovirus fusion protein before target cell attachment with corruption of the viral fusion machinery. *J Biol Chem* **286**:37945-54.

45. **Ferreira, L., I. Munoz-Barroso, F. Marcos, V. L. Shnyrov, and E. Villar.** 2004a. Sialidase, receptor-binding and fusion-promotion activities of Newcastle disease virus haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein: a mutational and kinetic study. *J Gen Virol* **85**:1981-8.
46. **Ferreira, L., E. Villar, and I. Munoz-Barroso.** 2004b. Gangliosides and N-glycoproteins function as Newcastle disease virus receptors. *Int J Biochem Cell Biol* **36**:2344-56.
47. **Galinski, M. S., and S. L. Wechsler.** 1991. The molecular biology of *Paramyxovirus* genus. En: "The Paramyxoviruses" (Kingsbury, D.W.,ed) Plenum Press, New York:41-42.
48. **Garcia-Sastre, A., J. A. Cabezas, and E. Villar.** 1989. Proteins of Newcastle disease virus envelope: interaction between the outer hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein and the inner non-glycosylated matrix protein. *Biochim Biophys Acta* **999**:171-5.
49. **Glazier, K., R. Raghow, and D. W. Kingsbury.** 1977. Regulation of Sendai virus transcription: evidence for a single promoter in vivo. *J Virol* **21**:863-71.
50. **Gottschalk, A.** 1959. The viruses: Biochemical Biological and Biophysical Properties. eds. Burnet, F.M. and Stanley, W.M. (Academic, New York) **Vol.3**:51-61.
51. **Guo, Y., E. Rumschlag-Booms, J. Wang, H. Xiao, J. Yu, J. Wang, L. Guo, G. F. Gao, Y. Cao, M. Caffrey, and L. Rong.** 2009. Analysis of hemagglutinin-mediated entry tropism of H5N1 avian influenza. *Virol J* **6**:39.
52. **Hamaguchi, M., T. Yoshida, K. Nishikawa, H. Naruse, and Y. Nagai.** 1983. Transcriptive complex of Newcastle disease virus. I. Both L and P proteins are required to constitute an active complex. *Virology* **128**:105-17.
53. **Hanson, L. A.** 1972. Newcastle Disease. En : "Diseases and poultry" (Hofstad, M.S., ed.) Iowa State University Press, Ames, Iowa.

54. **Hanson, R. P., and C. A. Brandly.** 1955. Identification of vaccine strains of Newcastle disease virus. *Science* **122**:156-7.
55. **Harrison, S. C.** 2008. Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**:690-8.
56. **Harty, R. N., and P. Palese.** 1995. Mutations within non coding terminal sequences of model RNAs of Sendai virus: influence on reporter gene expression. *J Virol* **69**:5128-31.
57. **Hayden, F. G., A. D. Osterhaus, J. J. Treanor, D. M. Fleming, F. Y. Aoki, K. G. Nicholson, A. M. Bohnen, H. M. Hirst, O. Keene, and K. Wightman.** 1997. Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza virus infections. GG167 Influenza Study Group. *N Engl J Med* **337**:874-80.
58. **Hernandez, L. D., L. R. Hoffman, T. G. Wolfsberg, and J. M. White.** 1996. Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**:627-61.
59. **Herrler, G., J. Hausmann, and H. D. Klenk.** 1995. Sialic acid as receptor determinant of Ortho- and Paramyxoviruses. In: A. Rosenberg(Ed.) *Biology of the Sialic Acid*, (Plenum Press, NewYork, 1995),: 315–336.
60. **Hoekstra, D., T. de Boer, K. Klappe, and J. Wilschut.** 1984. Fluorescence method for measuring the kinetics of fusion between biological membranes. *Biochemistry* **23**:5675-81.
61. **Hu, A., T. Cathomen, R. Cattaneo, and E. Norrby.** 1995. Influence of N-linked oligosaccharide chains on the processing, cell surface expression and function of the measles virus fusion protein. *J Gen Virol* **76 (Pt 3)**:705-10.
62. **Imberty, A., C. Gautier, J. Lescar, S. Perez, L. Wyns, and R. Loris.** 2000. An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two *Maackia amurensis* lectins complexed with sialic acid-containing oligosaccharides. *J Biol Chem* **275**:17541-8.
63. **Iorio, R. M., and P. J. Mahon.** 2008. Paramyxoviruses: different receptors - different mechanisms of fusion. *Trends Microbiol* **16**:135-7.

64. **Ito, T., Y. Suzuki, L. Mitnaul, A. Vines, H. Kida, and Y. Kawaoka.** 1997. Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species. *Virology* **227**:493-9.
65. **Jain, S., L. W. McGinnes, and T. G. Morrison.** 2007. Thiol/disulfide exchange is required for membrane fusion directed by the Newcastle disease virus fusion protein. *J Virol* **81**:2328-39.
66. **Kaludov, N., K. E. Brown, R. W. Walters, J. Zabner, and J. A. Chiorini.** 2001. Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *J Virol* **75**:6884-93.
67. **Kielian, M., and F. A. Rey.** 2006. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nat Rev Microbiol* **4**:67-76.
68. **Kingsbury, D. W.** 1966. Newcastle disease virus RNA. II. Preferential synthesis of RNA complementary to parental viral RNA by chick embryo cells. *J Mol Biol* **18**:204-14.
69. **Kingsbury, D. W., M. A. Bratt, P. V. Choppin, R. P. Hanson, Y. Hosaka, V. ter Meulen, E. Norrby, W. Plowright, R. Rott, and W. H. Wunner.** 1978. Paramyxoviridae. *Intervirology* **10**:137-152.
70. **Klenk, H. D., and P. W. Choppin.** 1970. Glycosphingolipids of plasma membranes of cultured cells and an enveloped virus (SV5) grown in these cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **66**:57-64.
71. **Klenk, H. D., R. W. Compans, and W. P. Choppin.** 1970. An electron microscopic study of the presence or absence of neuraminic acid in enveloped viruses. *Virology* **42**:1158-62.
72. **Klenk, H. D., and R. Rott.** 1988. The molecular biology of influenza virus pathogenicity. *Adv Virus Res* **34**:247-81.

73. **Klenk, H. D., and R. Rott.** 1988. The molecular biology of influenza virus pathogenicity. *Adv Virus Res* **34**:247-81.
74. **Kolakofsky, D., T. Pelet, D. Garcin, S. Hausmann, J. Curran, and L. Roux.** 1998. Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J Virol* **72**:891-9.
75. **Kolakofsky, D., S. Vidal, and J. Curran.** 1991. Paramyxovirus RNS synthesis and P gene expression. En: "The Paramyxoviruses" (Kingsbury, D.W.,ed) Plenum Press, New York:215-231.
76. **Kolokoltsov, A. A., D. Deniger, E. H. Fleming, N. J. Roberts, Jr., J. M. Karpilow, and R. A. Davey.** 2007. Small interfering RNA profiling reveals key role of clathrin-mediated endocytosis and early endosome formation for infection by respiratory syncytial virus. *J Virol* **81**:7786-800.
77. **Korte, T., K. Ludwig, F. P. Booy, R. Blumenthal, and A. Herrmann.** 1999. Conformational intermediates and fusion activity of influenza virus hemagglutinin. *J Virol* **73**:4567-74.
78. **Krishnamurthy, S., and S. K. Samal.** 1998. Nucleotide sequences of the trailer, nucleocapsid protein gene and intergenic regions of Newcastle disease virus strain Beaudette C and completion of the entire genome sequence. *J Gen Virol* **79** (Pt **10**):2419-24.
79. **Kuzmin, P. I., J. Zimmerberg, Y. A. Chizmadzhev, and F. S. Cohen.** 2001. A quantitative model for membrane fusion based on low-energy intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:7235-40.
80. **Ladisch, S., and B. Gillard.** 1985. A solvent partition method for microscale ganglioside purification. *Anal Biochem* **146**:220-31.

81. **Laliberte, J. P., L. W. McGinnes, M. E. Peeples, and T. G. Morrison.** 2006. Integrity of membrane lipid rafts is necessary for the ordered assembly and release of infectious Newcastle disease virus particles. *J Virol* **80**:10652-62.
82. **Lamb, R. A.** 1993. Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology* **197**:1-11.
83. **Lamb, R. A., and D. Kolakofsky.** 1996. Paramyxoviridae: the viruses and their replication
Fields Virology 3rd Edition:1177-1204.
84. **Lamb, R. A., and D. Kolakofsky.** 2001. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. *Fundamental Virology* 1305-1340.
85. **Lamb, R. A. a. P., G.D.** 2007. Paramyxoviridae: The viruses and their replication, p. 1450-1497. *In* D. M. H. Knipe, Peter M. (ed.), *Fields Virology 5th Edition*, vol. Volume I, Section II
86. **Lancaster, J., and D. Alexander.** 1975. Newcastle disease virus and spread.
87. **Li, J., E. Quinlan, A. Mirza, and R. M. Iorio.** 2004. Mutated form of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase interacts with the homologous fusion protein despite deficiencies in both receptor recognition and fusion promotion. *J Virol* **78**:5299-310.
88. **Locke, D. P., H. S. Sellers, J. M. Crawford, S. Schultz-Cherry, D. J. King, R. J. Meinersmann, and B. S. Seal.** 2000. Newcastle disease virus phosphoprotein gene analysis and transcriptional editing in avian cells. *Virus Res* **69**:55-68.
89. **Low, H. H., and J. Lowe.** 2010. Dynamin architecture--from monomer to polymer. *Curr Opin Struct Biol* **20**:791-8.
90. **Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-75.

91. **Macia, E., M. Ehrlich, R. Massol, E. Boucrot, C. Brunner, and T. Kirchhausen.** 2006. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* **10**:839-50.
92. **Marcos, F., L. Ferreira, J. Cros, M. S. Park, T. Nakaya, A. Garcia-Sastre, and E. Villar.** 2005. Mapping of the RNA promoter of Newcastle disease virus. *Virology* **331**:396-406.
93. **Markwell, M. A., S. M. Haas, L. L. Bieber, and N. E. Tolbert.** 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* **87**:206-10.
94. **Markwell, M. A., and J. C. Paulson.** 1980. Sendai virus utilizes specific sialyloligosaccharides as host cell receptor determinants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:5693-7.
95. **Markwell, M. A., L. Svennerholm, and J. C. Paulson.** 1981. Specific gangliosides function as host cell receptors for Sendai virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:5406-10.
96. **Marsh, M., and A. Helenius.** 2006. Virus entry: open sesame. *Cell* **124**:729-40.
97. **Martin, J. J., J. Holguera, L. Sanchez-Felipe, E. Villar, and I. Munoz-Barroso.** 2012. Cholesterol dependence of Newcastle Disease Virus entry. *Biochim Biophys Acta* **1818**:753-761.
98. **Matrosovich, M., T. Suzuki, Y. Hirabayashi, W. Garten, R. G. Webster, and H. D. Klenk.** 2006. Gangliosides are not essential for influenza virus infection. *Glycoconj J* **23**:107-13.
99. **Matrosovich, M. N., T. Y. Matrosovich, T. Gray, N. A. Roberts, and H. D. Klenk.** 2004. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:4620-4.

100. **Matsuyama, S., S. E. Delos, and J. M. White.** 2004. Sequential roles of receptor binding and low pH in forming prehairpin and hairpin conformations of a retroviral envelope glycoprotein. *J Virol* **78**:8201-9.
101. **McGinnes, L., T. Sergel, J. Reitter, and T. Morrison.** 2001. Carbohydrate modifications of the NDV fusion protein heptad repeat domains influence maturation and fusion activity. *Virology* **283**:332-42.
102. **Mebatsion, T., S. Versteegen, L. T. De Vaan, A. Romer-Oberdorfer, and C. C. Schrier.** 2001. A recombinant newcastle disease virus with low-level V protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos. *J Virol* **75**:420-8.
103. **Mercer, J., and A. Helenius.** 2009. Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol* **11**:510-20.
104. **Mercer, J., M. Schelhaas, and A. Helenius.** 2010. Virus entry by endocytosis. *Annu Rev Biochem* **79**:803-33.
105. **Mibayashi, M., L. Martinez-Sobrido, Y. M. Loo, W. B. Cardenas, M. Gale, Jr., and A. Garcia-Sastre.** 2007. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol* **81**:514-24.
106. **Miyauchi, K., Y. Kim, O. Latinovic, V. Morozov, and G. B. Melikyan.** 2009. HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell* **137**:433-44.
107. **Monto, A. S., D. M. Fleming, D. Henry, R. de Groot, M. Makela, T. Klein, M. Elliott, O. N. Keene, and C. Y. Man.** 1999. Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivirin the treatment of influenza A and B virus infections. *J Infect Dis* **180**:254-61.

108. **Morrison, T., C. McQuain, and L. McGinnes.** 1991. Complementation between avirulent Newcastle disease virus and a fusion protein gene expressed from a retrovirus vector: requirements for membrane fusion. *J Virol* **65**:813-22.
109. **Morrison, T. G.** 2003. Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochim Biophys Acta* **1614**:73-84.
110. **Morrison, T. G., M. E. Peeples, and L. W. McGinnes.** 1987. Conformational change in a viral glycoprotein during maturation due to disulfide bond disruption. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:1020-4.
111. **Mothes, W., A. L. Boerger, S. Narayan, J. M. Cunningham, and J. A. Young.** 2000. Retroviral entry mediated by receptor priming and low pH triggering of an envelope glycoprotein. *Cell* **103**:679-89.
112. **Muñoz-Barroso, I., C. Cobaleda, G. Zhadan, V. Shnyrov, and E. Villar.** 1997. Dynamic properties of Newcastle Disease Virus envelope and their relations with viral hemagglutinin-neuraminidase membrane glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* **1327**:17-31.
113. **Murray, K., P. Selleck, P. Hooper, A. Hyatt, A. Gould, L. Gleeson, H. Westbury, L. Hiley, L. Selvey, B. Rodwell, and et al.** 1995. A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. *Science* **268**:94-7.
114. **Muthing, J., and F. Unland.** 1994. A comparative assessment of TLC overlay technique and microwell adsorption assay in the examination of influenza A and Sendai virus specificities towards oligosaccharides and sialic acid linkages of gangliosides. *Glycoconj J* **11**:486-92.
115. **Nakamura, K., M. Homma, and R. W. Compans.** 1982. Effect of tunicamycin on the replication of Sendai virus. *Virology* **119**:474-87.

116. **Neitchev, V. Z., and L. P. Dumanova.** 1992. Effects of the components of Newcastle disease virus on the structural order of lipid assemblies. *Mol Biol Rep* **16**:27-31.
117. **Neu, U., T. Stehle, and W. J. Atwood.** 2009. The Polyomaviridae: Contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry. *Virology* **384**:389-99.
118. **Niwa, H., K. Yamamura, and J. Miyazaki.** 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**:193-9.
119. **Nokhbeh, M. R., S. Hazra, D. A. Alexander, A. Khan, M. McAllister, E. J. Suuronen, M. Griffith, and K. Dimock.** 2005. Enterovirus 70 binds to different glycoconjugates containing alpha2,3-linked sialic acid on different cell lines. *J Virol* **79**:7087-94.
120. **Oku, N., K. Inoue, S. Nojima, T. Sekiya, and Y. Nozawa.** 1982b. Electron microscopic study on the interaction of Sendai virus with liposomes containing glycoporphin. *Biochim Biophys Acta* **691**:91-6.
121. **Oku, N., S. Nojima, and K. Inoue.** 1982a. Studies on the interaction of HVJ (Sendai Virus) with liposomal membranes. HVJ-induced permeability increase of liposomes containing glycoporphin. *Virology* **116**:419-27.
122. **Oku, N., S. Nojima, and K. Inoue.** 1981. Studies on the interaction of Sendai virus with liposomal membranes. Sendai virus-induced agglutination of liposomes containing glycoporphin. *Biochim Biophys Acta* **646**:36-42.
123. **Olofsson, S., and T. Bergstrom.** 2005. Glycoconjugate glycans as viral receptors. *Ann Med* **37**:154-72.
124. **O'Sullivan, J. D., A. M. Allworth, D. L. Paterson, T. M. Snow, R. Boots, L. J. Gleeson, A. R. Gould, A. D. Hyatt, and J. Bradfield.** 1997. Fatal encephalitis due to novel paramyxovirus transmitted from horses. *Lancet* **349**:93-5.

125. **Otto, V. I., E. Damoc, L. N. Cueni, T. Schurpf, R. Frei, S. Ali, N. Callewaert, A. Moise, J. A. Leary, G. Folkers, and M. Przybylski.** 2006. N-glycan structures and N-glycosylation sites of mouse soluble intercellular adhesion molecule-1 revealed by MALDI-TOF and FTICR mass spectrometry. *Glycobiology* **16**:1033-44.
126. **Palermo, L. M., M. Porotto, O. Greengard, and A. Moscona.** 2007. Fusion promotion by a paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase protein: pH modulation of receptor avidity of binding sites I and II. *J Virol* **81**:9152-61.
127. **Palermo, L. M., M. Porotto, C. C. Yokoyama, S. G. Palmer, B. A. Mungall, O. Greengard, S. Niewiesk, and A. Moscona.** 2009. Human parainfluenza virus infection of the airway epithelium: viral hemagglutinin-neuraminidase regulates fusion protein activation and modulates infectivity. *J Virol* **83**:6900-8.
128. **Pantua, H. D., L. W. McGinnes, M. E. Peeples, and T. G. Morrison.** 2006. Requirements for the assembly and release of Newcastle disease virus-like particles. *J Virol* **80**:11062-73.
129. **Park, M. S., A. Garcia-Sastre, J. F. Cros, C. F. Basler, and P. Palese.** 2003a. Newcastle disease virus V protein is a determinant of host range restriction. *J Virol* **77**:9522-32.
130. **Park, M. S., M. L. Shaw, J. Munoz-Jordan, J. F. Cros, T. Nakaya, N. Bouvier, P. Palese, A. Garcia-Sastre, and C. F. Basler.** 2003b. Newcastle disease virus (NDV)-based assay demonstrates interferon-antagonist activity for the NDV V protein and the Nipah virus V, W, and C proteins. *J Virol* **77**:1501-11.
131. **Pedroso de Lima, M. C., J. Ramalho-Santos, M. F. Martins, A. Pato de Carvalho, V. Bairos, and S. Nir.** 1992. Kinetic modeling of Sendai virus fusion with PC-12 cells. Effect of pH and temperature on fusion and viral inactivation. *Eur J Biochem* **205**:181-6.
132. **Peeples, M. E., and M. A. Bratt.** 1982. Virion functions of RNA⁺ temperature-sensitive mutants of Newcastle disease virus. *J Virol* **42**:440-6.

133. **Porotto, M., I. Devito, S. G. Palmer, E. M. Jurgens, J. L. Yee, C. C. Yokoyama, A. Pessi, and A. Moscona.** 2011. Spring-Loaded Model Revisited: Paramyxovirus Fusion Requires Engagement of a Receptor Binding Protein beyond Initial Triggering of the Fusion Protein. *J Virol* **85**:12867-80.
134. **Porotto, M., M. Fornabaio, O. Greengard, M. T. Murrell, G. E. Kellogg, and A. Moscona.** 2006. Paramyxovirus receptor-binding molecules: engagement of one site on the hemagglutinin-neuraminidase protein modulates activity at the second site. *J Virol* **80**:1204-13.
135. **Porotto, M., M. Fornabaio, G. E. Kellogg, and A. Moscona.** 2007. A second receptor binding site on human parainfluenza virus type 3 hemagglutinin-neuraminidase contributes to activation of the fusion mechanism. *J Virol* **81**:3216-28.
136. **Porotto, M., M. Murrell, O. Greengard, L. Doctor, and A. Moscona.** 2005. Influence of the human parainfluenza virus 3 attachment protein's neuraminidase activity on its capacity to activate the fusion protein. *J Virol* **79**:2383-92.
137. **Porotto, M., M. Murrell, O. Greengard, M. C. Lawrence, J. L. McKimm-Breschkin, and A. Moscona.** 2004. Inhibition of parainfluenza virus type 3 and Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase receptor binding: effect of receptor avidity and steric hindrance at the inhibitor binding sites. *J Virol* **78**:13911-9.
138. **Porotto, M., M. Murrell, O. Greengard, and A. Moscona.** 2003. Triggering of human parainfluenza virus 3 fusion protein (F) by the hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein: an HN mutation diminishes the rate of F activation and fusion. *J Virol* **77**:3647-54.
139. **Porotto, M., S. G. Palmer, L. M. Palermo, and A. Moscona.** 2012. Mechanism of Fusion Triggering by Human Parainfluenza Virus Type III: COMMUNICATION BETWEEN VIRAL GLYCOPROTEINS DURING ENTRY. *J Biol Chem* **287**:778-93.

140. **Puri, A., J. Winick, R. J. Lowy, D. Covell, O. Eidelman, A. Walter, and R. Blumenthal.** 1988. Activation of vesicular stomatitis virus fusion with cells by pretreatment at low pH. *J Biol Chem* **263**:4749-53.
141. **Rasmusson, B. J., T. D. Flanagan, S. J. Turco, R. M. Epand, and N. O. Petersen.** 1998. Fusion of Sendai virus and individual host cells and inhibition of fusion by lipophosphoglycan measured with image correlation spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **1404**:338-52.
142. **Richman, A. V., F. A. Pedreira, and N. M. Tauraso.** 1971. Attempts to demonstrate hemagglutination and hemadsorption by respiratory syncytial virus. *Appl Microbiol* **21**:1099-100.
143. **Roberts, P. C., and R. W. Compans.** 1998. Host cell dependence of viral morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:5746-51.
144. **Root, C. N., E. G. Wills, L. L. McNair, and G. R. Whittaker.** 2000. Entry of influenza viruses into cells is inhibited by a highly specific protein kinase C inhibitor. *J Gen Virol* **81**:2697-705.
145. **Rott, R.** 1979. Molecular basis of infectivity and pathogenicity of myxovirus. Brief review. *Arch Virol* **59**:285-98.
146. **Rott, R., and H. D. Klenk.** 1988. Molecular basis of infectivity and pathogenicity of Newcastle Disease Virus. *Newcastle Disease (Alexander, D.J., ed.) Kluwer, Norwell*:98-112.
147. **Rott, R., A. P. Waterson, and I. M. Reda.** 1963. Characterization of "Soluble" Antigens Derived from Cells Infected with Sendai and Newcastle Disease Viruses. *Virology* **21**:663-5.
148. **Rueda, R., K. Tabsh, and S. Ladisch.** 1993. Detection of complex gangliosides in human amniotic fluid. *FEBS Lett* **328**:13-6.

149. **Russell, C. J., T. S. Jardetzky, and R. A. Lamb.** 2001. Membrane fusion machines of paramyxoviruses: capture of intermediates of fusion. *EMBO J* **20**:4024-34.
150. **Ryan, C., V. Zaitsev, D. J. Tindal, J. C. Dyason, R. J. Thomson, I. Alymova, A. Portner, M. von Itzstein, and G. Taylor.** 2006. Structural analysis of a designed inhibitor complexed with the hemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus. *Glycoconj J* **23**:135-41.
151. **San Roman, K., E. Villar, and I. Munoz-Barroso.** 1999. Acidic pH enhancement of the fusion of Newcastle disease virus with cultured cells. *Virology* **260**:329-41.
152. **Sanchez, A.** 2007. Analysis of filovirus entry into vero e6 cells, using inhibitors of endocytosis, endosomal acidification, structural integrity, and cathepsin (B and L) activity. *J Infect Dis* **196 Suppl 2**:S251-8.
153. **Sanderson, C. M., R. Avalos, A. Kundu, and D. P. Nayak.** 1995. Interaction of Sendai viral F, HN, and M proteins with host cytoskeletal and lipid components in Sendai virus-infected BHK cells. *Virology* **209**:701-7.
154. **Saqr, H. E., D. K. Pearl, and A. J. Yates.** 1993. A review and predictive models of ganglioside uptake by biological membranes. *J Neurochem* **61**:395-411.
155. **Schmidt, M., and J. A. Chiorini.** 2006. Gangliosides are essential for bovine adeno-associated virus entry. *J Virol* **80**:5516-22.
156. **Schmitt, A. P., and R. A. Lamb.** 2005. Influenza virus assembly and budding at the viral budzone. *Adv Virus Res* **64**:383-416.
157. **Schowalter, R. M., A. Chang, J. G. Robach, U. J. Buchholz, and R. E. Dutch.** 2009. Low-pH triggering of human metapneumovirus fusion: essential residues and importance in entry. *J Virol* **83**:1511-22.

158. **Schowalter, R. M., S. E. Smith, and R. E. Dutch.** 2006. Characterization of human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH. *J Virol* **80**:10931-41.
159. **Schuy, W., W. Garten, D. Linder, and H. D. Klenk.** 1984. The carboxyterminus of the hemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus is exposed at the surface of the viral envelope. *Virus Res* **1**:415-26.
160. **Seal, B. S., J. M. Crawford, H. S. Sellers, D. P. Locke, and D. J. King.** 2002. Nucleotide sequence analysis of the Newcastle disease virus nucleocapsid protein gene and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. *Virus Res* **83**:119-29.
161. **Seal, B. S., D. J. King, and R. J. Meinersmann.** 2000. Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among the paramyxoviridae. *Virus Res* **66**:1-11.
162. **Sergel, T., L. W. McGinnes, and T. G. Morrison.** 1993b. The fusion promotion activity of the NDV HN protein does not correlate with neuraminidase activity. *Virology* **196**:831-4.
163. **Sergel, T., L. W. McGinnes, M. E. Peeples, and T. G. Morrison.** 1993a. The attachment function of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein can be separated from fusion promotion by mutation. *Virology* **193**:717-26.
164. **Shibuya, N., I. J. Goldstein, W. F. Broekaert, M. Nsimba-Lubaki, B. Peeters, and W. J. Peumans.** 1987. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(alpha 2-6)Gal/GalNAc sequence. *J Biol Chem* **262**:1596-601.
165. **Shimizu, K., and N. Ishida.** 1975. The smallest protein of Sendai virus: its candidate function of binding nucleocapsid to envelope. *Virology* **67**:427-37.

166. **Shnyrova, A. V., J. Ayllon, Mikhalyov, II, E. Villar, J. Zimmerberg, and V. A. Frolov.** 2007. Vesicle formation by self-assembly of membrane-bound matrix proteins into a fluidlike budding domain. *J Cell Biol* **179**:627-33.
167. **Skehel, J. J., and D. C. Wiley.** 1998. Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell* **95**:871-4.
168. **Skehel, J. J., and D. C. Wiley.** 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* **69**:531-69.
169. **Smith, A. E., and A. Helenius.** 2004. How viruses enter animal cells. *Science* **304**:237-42.
170. **Smith, E. C., A. Popa, A. Chang, C. Masante, and R. E. Dutch.** 2009. Viral entry mechanisms: the increasing diversity of paramyxovirus entry. *FEBS J* **276**:7217-27.
171. **Stenback, W. A., and D. P. Durand.** 1963. Host Influence on the Density of Newcastle Disease Virus (Ndv). *Virology* **20**:545-51.
172. **Stevenson, R. A., J. A. Huang, M. J. Studdert, and C. A. Hartley.** 2004. Sialic acid acts as a receptor for equine rhinitis A virus binding and infection. *J Gen Virol* **85**:2535-43.
173. **Steward, M., I. B. Vipond, N. S. Millar, and P. T. Emmerson.** 1993. RNA editing in Newcastle disease virus. *J Gen Virol* **74 (Pt 12)**:2539-47.
174. **Stuart, A. D., and T. D. Brown.** 2007. Alpha2,6-linked sialic acid acts as a receptor for Feline calicivirus. *J Gen Virol* **88**:177-86.
175. **Suzuki, T., A. Portner, R. A. Scroggs, M. Uchikawa, N. Koyama, K. Matsuo, Y. Suzuki, and T. Takimoto.** 2001. Receptor specificities of human respiroviruses. *J Virol* **75**:4604-13.

176. **Suzuki, Y., T. Suzuki, M. Matsunaga, and M. Matsumoto.** 1985. Gangliosides as paramyxovirus receptor. Structural requirement of sialo-oligosaccharides in receptors for hemagglutinating virus of Japan (Sendai virus) and Newcastle disease virus. *J Biochem* **97**:1189-99.
177. **Takimoto, T., and A. Portner.** 2004. Molecular mechanism of paramyxovirus budding. *Virus Res* **106**:133-45.
178. **Toullec, D., P. Pianetti, H. Coste, P. Bellevergue, T. Grand-Perret, M. Ajakane, V. Baudet, P. Boissin, E. Boursier, F. Loriolle, and et al.** 1991. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* **266**:15771-81.
179. **Varghese, J. N., W. G. Laver, and P. M. Colman.** 1983. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* **303**:35-40.
180. **Varki, A.** 2008. Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med* **14**:351-60.
181. **Villar, E., and I. M. Barroso.** 2006. Role of sialic acid-containing molecules in paramyxovirus entry into the host cell: a minireview. *Glycoconj J* **23**:5-17.
182. **Vines, A., K. Wells, M. Matrosovich, M. R. Castrucci, T. Ito, and Y. Kawaoka.** 1998. The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. *J Virol* **72**:7626-31.
183. **Walters, R. W., S. M. Yi, S. Keshavjee, K. E. Brown, M. J. Welsh, J. A. Chiorini, and J. Zabner.** 2001. Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer. *J Biol Chem* **276**:20610-6.
184. **Weissenhorn, W., A. Dessen, L. J. Calder, S. C. Harrison, J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1999. Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Mol Membr Biol* **16**:3-9.

185. **Wu, P. S., R. W. Ledeen, S. Udem, and Y. A. Isaacson.** 1980. Nature of the Sendai virus receptor: glycoprotein versus ganglioside. *J Virol* **33**:304-10.
186. **Wu, Z., E. Miller, M. Agbandje-McKenna, and R. J. Samulski.** 2006. Alpha2,3 and alpha2,6 N-linked sialic acids facilitate efficient binding and transduction by adeno-associated virus types 1 and 6. *J Virol* **80**:9093-103.
187. **Yao, Q., and R. W. Compans.** 1996. Peptides corresponding to the heptad repeat sequence of human parainfluenza virus fusion protein are potent inhibitors of virus infection. *Virology* **223**:103-12.
188. **Yao, Q., X. Hu, and R. W. Compans.** 1997. Association of the parainfluenza virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins on cell surfaces. *J Virol* **71**:650-6.
189. **Yin, H. S., X. Wen, R. G. Paterson, R. A. Lamb, and T. S. Jardetzky.** 2006. Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature* **439**:38-44.
190. **Yoshida, T., S. Takao, K. Kiyotani, and T. Sakaguchi.** 1989. Endoproteolytic activation of Newcastle disease virus fusion proteins requires an intracellular acidic environment. *Virology* **170**:571-4.
191. **Yoshima, H., M. Nakanishi, Y. Okada, and A. Kobata.** 1981. Carbohydrate structures of HVJ (Sendai virus) glycoproteins. *J Biol Chem* **256**:5355-61.
192. **Young, J. K., R. P. Hicks, G. E. Wright, and T. G. Morrison.** 1997. Analysis of a peptide inhibitor of paramyxovirus (NDV) fusion using biological assays, NMR, and molecular modeling. *Virology* **238**:291-304.
193. **Yuan, P., K. A. Swanson, G. P. Leser, R. G. Paterson, R. A. Lamb, and T. S. Jardetzky.** 2011. Structure of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase (HN) ectodomain reveals a four-helix bundle stalk. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:14920-5.

194. **Yuan, P., T. B. Thompson, B. A. Wurzburg, R. G. Paterson, R. A. Lamb, and T. S. Jardetzky.** 2005. Structural studies of the parainfluenza virus 5 hemagglutinin-neuraminidase tetramer in complex with its receptor, sialyllactose. *Structure* **13**:803-15.
195. **Zaitsev, V., M. von Itzstein, D. Groves, M. Kiefel, T. Takimoto, A. Portner, and G. Taylor.** 2004. Second sialic acid binding site in Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase: implications for fusion. *J Virol* **78**:3733-41.