

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología



**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LA ENVUELTA
DEL VIRUS ÉBOLA CON LA LECTINA DC/L-SIGN**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

Fátima Lasala Sánchez

Bajo la dirección del Doctor:

Rafael Delgado Vázquez

Madrid, 2015

ISBN:978-84-606-9051-1

© Fatima Lasala Sánchez, 2005

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Dpto. de MICROBIOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LA ENVUELTA DEL VIRUS
ÉBOLA CON LA LECTINA DC/L-SIGN**

FÁTIMA LASALA SÁNCHEZ

TESIS DOCTORAL

Madrid, 2005

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LA ENVUELTA DEL VIRUS
ÉBOLA CON LA LECTINA DC/L-SIGN**

Memoria de Tesis Doctoral
FÁTIMA LASALA SÁNCHEZ

Director: Dr. Rafael Delgado Vázquez
Sección de Microbiología Molecular y Retrovirología
Departamento de Microbiología
Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid

Tutor: Dr. Joaquín Rodríguez-Otero
Departamento de Microbiología
Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid

Madrid, 2005

AGRADECIMIENTOS:

A los Dr: Angel Corbí (CIB,CSIC, Madrid); Javier Rojo (CSIC, Instituto de Investigaciones Químicas, CSIC, Sevilla); Laura Barrientos (National Center for Infectious Diseases, CDC, Atlanta, Georgia) y Jose María Casanovas (CSIC, Madrid) por el material biológico aportado para el desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral.

A todas las personas que durante este periodo me guiaron y apoyaron: familia, amigos, compañeros becarios y personal del Hospital 12 de Octubre.

El trabajo experimental descrito en la presente Memoria de Tesis Doctoral fue realizado en la Sección de Microbiología Molecular y Retrovirología del Departamento de Microbiología, Hospital Universitario 12 de Octubre; entre los años 2001 y 2004, bajo la dirección del Doctor Rafael Delgado Vázquez.

Esta Tesis se ha realizado con el apoyo económico de una beca FIPSE (hasta 2002) y otra procedente de la Red Temática de Investigación en SIDA (RIS).

Fátima Lasala Sánchez

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	14
1 ANTECEDENTES	14
1.1 Filovirus: Virus Marburg y Ébola	14
1.2 Taxonomía y clasificación	14
1.3 Historia (Antecedentes)	15
1.4 Distribución geográfica	17
1.5 Reservorio del virus	17
2 ASPECTOS CLÍNICOS DE LA INFECCIÓN POR FILOVIRUS	19
2.1 Epidemiología y transmisión de los filovirus.....	19
2.2 Síntomas clínicos de la infección	19
2.3 Histopatología	20
2.4 Patogenicidad	20
2.5 Prevención y Control	22
2.6 Diagnóstico	23
3 ESTRUCTURA DEL GENOMA Y PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS VÍRICAS	24
3.1 Estructura del genoma de los filovirus	24
3.2 Propiedades del virión	25
3.3 Propiedades físicas de los filovirus	26
3.4 Propiedades de las proteínas víricas	26
• Complejo ribo-núcleo-proteico	27
• Proteínas estructurales	27
• Proteína L	27
• Glicoproteína (GP)	27
3.5 Diferencias estructurales entre los virus Marburg y Ébola	28
3.6 Diferencias entre virus del género Ébola: cepas Zaire y Reston	29
4 CICLO REPLICATIVO DE LOS FILOVIRUS	31
4.1 Visión de conjunto del ciclo replicativo	31
4.2 Mecanismo de transcripción	33
4.3 Mecanismo de replicación	34
4.4 Formación de la cápside	35
4.5 Proceso de salida de los filovirus	35
4.5.1 Implicación de VP40 y GP en la formación de nuevos viriones ...	35
4.5.2 Papel de los L-dominios en el ensamblaje vírico	36

5 GLICOPROTEÍNA DEL VIRUS ÉBOLA	38
5.1 Expresión y regulación de la glicoproteína en el virus Ébola	38
5.2 Procesamiento de la glicoproteína transmembrana del virus Ébola	40
5.2.1. Papel de la Furina y capacidad infectiva del virus Ébola.....	42
5.3 Estructura de GP1	42
5.3.1 Residuos N-glicosilados	42
5.3.2 Región Mucina	43
5.4 Estructura de GP2	45
5.4.1 Posible péptido de fusión	45
5.4.2 Región de homología con dominios inmunosupresores	45
5.4.3 Dominio transmembrana	46
5.5 Conformación de la glicoproteína.....	47
5.5.1 Papel de los residuos de Cisteína en la conformación.....	48
6 PAPEL DE LAS GLICOPROTEÍNAS EN LA PATOGÉNESIS DEL VIRUS ÉBOLA	50
6.1 Tropismo celular	50
6.1.1 Células susceptibles	51
6.1.2 Células no permisivas	51
6.1.3 Diferencias en el tropismo de los virus Ébola y Marburg	52
6.2 Toxicidad celular	53
6.2.1 Relación entre infección y lisis celular	53
6.2.2 Papel de la GP en la patogénesis.....	53
6.3 Respuesta inmune.....	55
6.4 Activación de monocitos y su papel en la patogénesis del virus Ébola.....	55
7 RECEPTORES Y MECANISMOS DE ENTRADA DE LOS FILOVIRUS	56
7.1 Receptores y moléculas con afinidad por la envuelta de los filovirus.....	56
7.1.1 Integrinas.....	56
7.1.2 Receptor alfa del folato (FR- α)	57
7.2 Mecanismos de entrada de los filovirus	59
7.2.1 La entrada de filovirus no parece estar mediada por fusión directa con la membrana celular	59
7.2.2 La liberación del material génico de los filovirus es un proceso pH dependiente	60
7.2.3 Papel de los Rafts lipídicos en la infección de filovirus	60
7.2.4 Papel de las caveolas en la infección de filovirus.....	62

8 DC-SIGN; UNA NUEVA LECTINA DE TIPO C	65
8.1 Descubrimiento de DC-SIGN	65
8.2 Lectinas	66
8.2.1 Aspectos generales de las lectinas	66
8.2.2 Especificidad de las lectinas	66
8.2.3 Lectinas de tipo-C	67
8.2.4 Clasificación de las lectinas de tipo-C	67
8.3 Estructura molecular de DC-SIGN	67
8.4 Conformación de la región lectina.....	69
8.5 Especificidad de DC-SIGN por carbohidratos	70
8.6 Localización cromosómica de DC-SIGN	71
8.7 Expresión de DC-SIGN <i>in vivo</i>	71
8.8 L-SIGN; lectina relacionada con DC-SIGN aislada de hígado y nódulos linfáticos	72
9 FUNCIONES PROPUESTAS DE LA LECTINA DC-SIGN	73
9.1 Introducción. Función de las células dendríticas en el sistema inmune.....	73
9.2 Papel inmunológico de DC-SIGN.....	73
9.2.1 Papel de DC-SIGN en la interacción entre células dendríticas y linfocitos T a través de ICAM-3	73
9.2.2 DC-SIGN interviene en la migración de células dendríticas hacia los tejidos	75
9.3 DC-SIGN funciona como receptor de antígenos	75
9.4 Papel de DC-SIGN en la infección por VIH	76
9.4.1 DC-SIGN presenta afinidad por gp120	76
9.4.2 DC-SIGN como “trans” receptor del virus VIH	77
9.4.3 DC-SIGN como vehículo para diseminar el virus VIH.....	80
9.5 Relacion entre DC-SIGN, otros patógenos y respuesta inmune	81

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS	82
OBJETIVOS	84
MATERIALES Y METODOS	86
1 Líneas celulares:	87
1.1 Líneas en suspensión	87
1.2 Líneas adherentes	87
2 Obtención de PBMCs	88
3 Plásmidos:	89
• pNL4.3 lucR ⁺ E ⁻	89
• P1012-EBO-GP	89
• PNGVL-VSV-G	90
• LZRS-L-SIGN-Cite-gfp	90
• LZRS-DC-SIGN-Cite-gfp	91
• LZRS-DC- SIGN- _{AA} -Cite-gfp y LZRS-L- SIGN- _{AA} -Cite-gfp	92
• PNGVL-MBG-GP	93
4 Esferas magnéticas (Dynabeads)	94
4.1 Preparación de las esferas magnéticas.....	94
4.2 Separación de células DC-SIGN positivas con las esferas magnéticas.....	95
5 Proteínas: sGP-Fc y GP1-Fc	95
5.1 Construcción de los plásmidos pEF-GP1-Fc y pEF-sGP-Fc	96
5.2 Producción de proteínas quiméricas GP1-Fc y sGP-Fc	97
6 Producción de retrovirus recombinantes con diferentes envueltas virales	97
7 Titulación de sobrenadantes retrovirales	98
8 Expresión transitoria de las lectinas DC/L-SIGN	100
9 Construcción de líneas estables DC/L-SIGN positivas	100
9.1 Producción de partículas retrovirales con la secuencia de DC/L-SIGN	100
9.2 Transducción de líneas celulares con los retrovirus DC/L-SIGN	101
9.3 Selección de células DC/L-SIGN positivas con las esferas magnéticas	101

10 Citometría	101
10.1 Análisis de la expresión de las lectinas DC/L-SIGN	101
10.2 Análisis de la unión de las proteínas quiméricas a células DC/L-SIGN positivas	102
10.3 Internalización de la lectina L-SIGN _{AA} mediada por anticuerpos.....	102
11 “Trans” infección mediada por células DC-SIGN positivas.....	102
12 Tratamiento de los retrovirus rEBO-GP con el enzima EndoGlicosidasaH.....	103
13 Diseño de una construcción multivalente con residuos de manosa.....	103
14 Cianovirina-N (CV-N).....	104
15 Evaluación de inhibidores de la infección de rEBO-GP.....	104
15.1 Ensayos de infección con el dendrímero BH30-SucMan.....	104
15.2 Ensayos de inhibición con CV-N.....	105
15.3 Cálculo de la concentración inhibitoria 50 (IC ₅₀)	106
15.4 Evaluación de la toxicidad de (CV-N) y BH30-SucMan	106
16 Glicoproteínas mutantes del virus Ébola	106
RESULTADOS	108
1 Producción de retrovirus recombinantes con envuelta de filovirus	109
2 Tropismo de los retrovirus recombinantes con envuelta de virus Ébola	111
3 Afinidad de las lectinas DC/L-SIGN por la glicoproteína del virus Ébola	112
3.1 Expresión estable de las lectinas DC/L-SIGN en células linfocitarias.....	112
3.2 Unión de la glicoproteína del virus Ébola a células DC/L-SIGN positivas.114	
3.3 Especificidad de la unión entre DC-SIGN y la glicoproteína del virus Ébola	
3.3.1 Anticuerpos anti DC-SIGN bloquean la interacción entre GP1 y DC-SIGN	115
3.3.2 Mutaciones en la región lectina de DC-SIGN impiden la unión de GP1 a DC-SIGN.....	116
4 Papel de las lectinas DC/L-SIGN en la infección del virus Ébola	118
4.1 DC-SIGN y L-SIGN aumentan la infección de r-EBO-GP en células susceptibles	118

5 La expresión de DC/L-SIGN en células no permisivas confiere susceptibilidad a la infección de rEBO-GP	120
5.1 Especificidad de la infección de rEBO-GP en células DC/L-SIGN positivas.....	121
6 Las lectinas DC/L-SIGN median la internalización de rEBO-GP	122
6.1 Expresión y afinidad de la lectina L-SIGN _{AA} por la glicoproteína del virus Ébola	123
6.2 La mutación dileucina de L-SIGN _{AA} dificulta la internalización de la lectina	124
6.3 La mutación dileucina de L-SIGN _{AA} reduce de manera específica la infección de rEBO-GP	126
7 DC-SIGN puede actuar como “trans” receptor de rEBO-GP	127
8 Papel de la glicosilación de la glicoproteína del virus Ébola en la interacción con la lectina DC-SIGN	130
8.1 Inhibición de la unión entre rEBO-GP y células DC-SIGN positivas por Manano	130
8.2 Los residuos N-glicosilados son responsables de la interacción de rEBO-GP a DC-SIGN	131
8.3 Contribución de diferentes residuos N-glicosilados en la infección de rEBO-GP mediada por DC-SIGN.....	132
9 Una construcción de manosas multivalente: BH30-Man, inhibe la interacción de rEBO-GP con DC-SIGN	134
9.1 BH30-Man se une de manera específica a las células dendríticas y compete con GP1 en su unión a DC-SIGN.....	135
9.2 BH30-Man bloquea la infección en “trans” de rEBO-GP mediada por DC-SIGN.....	137
10 Estudio de la inhibición de la infección de rEBO-GP por CV-N	138

DISCUSIÓN	140
CONCLUSIONES	158
APENDICE	161
BIBLIOGRAFÍA	165

INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES

1.1 Filovirus: Virus Marburg y Ébola

Los filovirus son agentes infecciosos víricos responsables de causar fiebre hemorrágica severa en humanos y en algunas especies de primates superiores¹.

La denominación de filovirus proviene del latín *filo* (hilo, fibra, hebra, filamento) y hace referencia a la morfología que presentan estos virus al observarlos al microscopio electrónico.

En base a las diferencias genéticas encontradas en las distintas cepas, se han establecido dos géneros dentro de la familia *Filoviridae*: el virus Marburg (MBG) y el virus Ébola (EBO)².

La elección del nombre Marburg está relacionada con la ciudad alemana donde por primera vez se aisló y caracterizó el agente causal de esta patología (1967); mientras que el virus Ébola debe su nombre al río que cruza la zona noroeste del Congo, que es donde ocurrió el primer brote hemorrágico debido a este género de filovirus (1976)³.

1.2 Taxonomía y clasificación

Los filovirus pertenecen al orden *Mononegavirales*, pues su material genético está compuesto por una única hebra de RNA, no segmentada y de sentido negativo⁴. A pesar de que comparten características comunes con otros virus de su mismo orden, sin embargo, tanto el virus Marburg como el Ébola poseen características únicas que son suficientes para diferenciarlos en una nueva familia de virus: la *Filoviridae*.

Clasificación de los filovirus

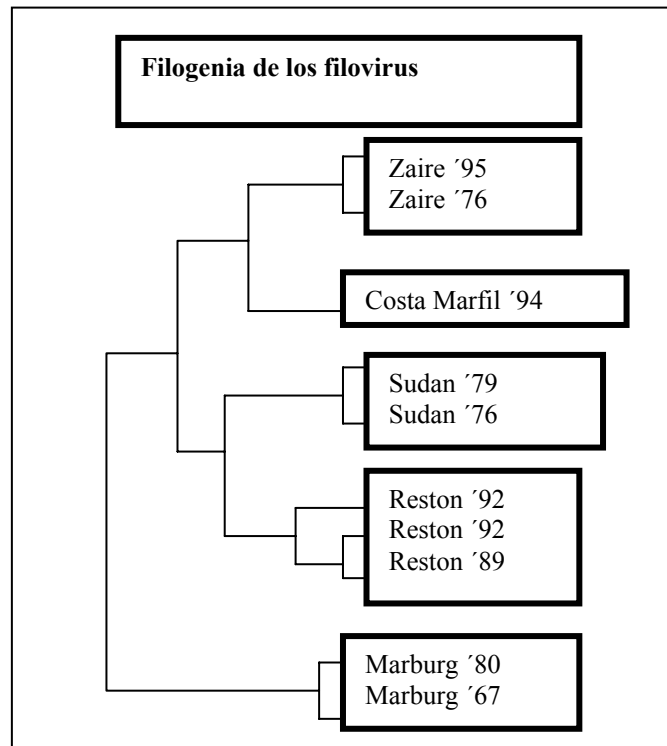
Aunque ultraestructuralmente el virus Marburg se asemeja al Ébola y sus patrones moleculares son similares; sin embargo, su genética y antigenicidad son distintas, por lo que se les ha clasificado como géneros diferentes^{5,6}.

Por otro lado, parece que hasta la fecha existen 4 tipos de virus de Ébola (EBO): EBO-Z (Zaire), EBO-S (Sudan), EBO-CI (Côte d'Ivoire) y EBO-R (Reston).

Todos estos virus causan un cuadro similar, aunque, difieren en su letalidad.

Los dos primeros presentan las tasas de mortalidad más altas, mientras que el virus Reston parece ser menos letal en humanos pero sí en primates⁷.

Figura 1.
Relación filogenética entre los distintos brotes causados por filovirus.
Se muestra en forma de dendrograma el grado de similitud genética entre las cepas caracterizadas como virus



1.3 Historia (Antecedentes)

- Brotos causados por virus Marburg

Los primeros brotes de fiebre hemorrágica donde el agente causal fue documentado como filovirus, ocurrieron de manera simultánea en Belgrado (Serbia) y en Marburg (Alemania) en 1967 y como consecuencia de este brote, se contabilizaron 25 casos de infección primaria, otros 6 casos de infección secundaria que resultaron en 7 muertes.

Las personas afectadas por este brote eran trabajadores de un laboratorio biológico, y todas ellas habían estado manipulando tejidos y sangre de primates, en concreto de monos verdes africanos (*Cercopithecus aethiops*) que se importaron desde Uganda.

Desde ese momento, han ocurrido brotes esporádicos confirmados como virus Marburg en Sur-Africa, Kenia y Congo (1975,1980,1987 y 1998)^{2,8}.

- Brotos causados por virus Ébola

El virus Ébola, fue aislado por primera vez en 1976, en la región de Yambuku- Zaire (desde 1997 República Democrática del Congo), coincidiendo con otro brote simultáneo en Sudán⁹, y como consecuencia, alrededor de unas 500 personas se infectaron. La tasa de mortalidad debida al virus Ébola fue del 88% en Zaire y 53% en Sudan, índice muy superior comparado con el registrado con el virus Marburg.

En 1977, se aisló el virus en una única persona infectada en Zaire (Tandala), y en 1979 tuvo lugar otro brote en Sudán, en el mismo lugar que en el año 1976.

Otros cuatro episodios más de infección por Ébola ocurrieron en Zaire (Kikwit) durante 1995^{10,11,12}; en Gabon durante los años 1996¹³ y 2001; en Uganda durante el año 2000; y el más reciente en el Congo en 2003¹⁴.

Tras comparar el genoma de las muestras procedentes de Yambuku (1976), Tandala (1977) y Kikwit (1995), los expertos han decidido incluir todas estas cepas en un mismo subtipo: Ébola- Zaire, pues en los 19 años que separan el primer brote (Yambuku) y el sucedido en Kikwit, el virus tan sólo presenta un 1.6% de diferencia nucleotídica, lo cual parece indicar que el virus presenta un alto grado de estabilidad genética en la naturaleza.

Sin embargo, las cepas responsables de los brotes ocurridos en Congo, Sudan, Gabon y Costa de Marfil¹⁵, presentan más de un 40% de diferencia en la secuencia de nucleótidos con las muestras de virus EBO-Zaire¹⁶, por lo cual, se las ha clasificado como otros subtipos: Ébola-Sudan y Ébola- Costa de Marfil.

En el año 1989 en Reston (Virginia, Estados Unidos) tuvo lugar un nuevo brote de fiebre hemorrágica causado por virus Ébola que afectó a un grupo de monos en una instalación para cuarentena de primates. En este caso se infectaron 6 personas sin mortalidad alguna¹⁷. Una vez caracterizado el virus, se clasificó como un nuevo subtipo: Ébola-Reston.

El mismo subtipo fue el causante de otros dos brotes en Pennsylvania, 1990; Texas, en 1996¹⁸ y en Italia en el año 1992¹⁹.

De acuerdo con las evidencias actuales, el virus Reston parece haber entrado en Estados Unidos a través de la importación de una especie de primate (*Macaca fascicularis*) originario de las islas Filipinas. Este subtipo a pesar de ser infeccioso para los humanos, aparentemente no causa enfermedad grave como otros virus Ébola¹⁶.

1.4 Distribución geográfica

Diversos estudios serológicos sugieren que la mayoría de las cepas de virus Ébola, son endémicas en Zaire, Sudan, República Centro-Africana, Gabon, Nigeria, Costa de Marfil, Liberia, Camerún y Kenia.

Sin embargo la cepa Ébola-Reston, ha sido aislada únicamente a partir de animales importados de Filipinas; por tanto, aunque el espectro geográfico de los filovirus está ubicado mayormente en el continente africano, pudiera encontrarse en otras regiones hasta ahora desconocidas².

1.5 Reservorio del virus

A pesar de los esfuerzos realizados para encontrar el hospedador natural de los filovirus, todavía se desconoce este dato²⁰. Se han examinado unas 30.000 especies de artrópodos, roedores y primates²¹ sin éxito alguno^{22,16}. Lo que sí parece evidente que éste debe encontrarse en África pues es la región donde se han desarrollado un mayor número de episodios^{7,4}.

Fecha	Lugar	Fuente de infección	Número de casos	% de mortalidad
<u>Marburg</u>				
1967	Europa	Monos verdes africanos	31	23
1975	Sudafrica	Desconocido	3	33
1980	Kenia	Desconocido	2	50
1987	Kenia	Desconocido	1	100
1998	República Democrática del Congo (RDC)	Desconocido	141	82
<u>Ebola-Zaire</u>				
1976	Zaire (RDC)	Desconocido	318	88
1977	RDC	Desconocido	1	100
1994	Gabon	Desconocido	49	65
1995	RDC	Desconocido	317	77
1996	Gabon	Chimpancé muerto	37	57
1996	Gabon	Desconocido	60	75
2001	Gabon	Contacto con primate no humano	123	79
2003	República del Congo	Contacto con primate no humano	143	90
<u>Ebola-Sudan</u>				
1976	Sudan	Desconocido	284	53
1979	Sudan	Desconocido	34	65
2000	Uganda	Desconocido	425	53
<u>Ebola-Costa de Marfil</u>				
1994	Costa de Marfil	Chimpancé muerto	1	0
<u>Ebola-Reston</u>				
1989	Virginia, USA	Macacos importados		
1990	Pennsylvania, USA	Macacos importados		
1992	Italia	Macacos importados		
1996	Texas, USA	Macacos importados		

Figura 2.

Brotos de infección causados por Filovirus en humanos y primates no-humanos

2 ASPECTOS CLÍNICOS DE LA INFECCIÓN POR FILOVIRUS

2.1 Epidemiología y transmisión de los filovirus

Aunque los primates se infectan con filovirus y desarrollan síntomas similares a los humanos, probablemente también sean hospedadores transitorios²³ y no constituyan el reservorio natural del virus.

En la mayoría de los brotes por virus Ébola, el paciente infectado disemina la enfermedad a los miembros más cercanos de la familia a través del contacto con sangre o fluidos que contienen cantidades elevadas del virus^{24,25}.

Si el paciente recibe atención sanitaria sin las medidas adecuadas, el virus frecuentemente contagia al personal sanitario a través de las mismas vías de contacto directo.

Por otro lado, aunque no hay evidencias epidemiológicas que apoyen la idea de que el virus utilice la vía aérea^{28,29} en condiciones experimentales sí se ha conseguido infectar primates por medio de aerosoles^{26,27}. Finalmente no existen datos sobre la transmisión de la enfermedad a través de insectos³⁰.

2.2 Síntomas clínicos de la infección

El período de incubación de los filovirus oscila entre 5 a 7 días³¹, apareciendo a partir de ese momento los primeros síntomas clínicos de la infección que suelen ser similares para el virus Marburg y Ébola³. Estos síntomas son bastante inespecíficos y consisten generalmente en fiebre, temblores, dolor de cabeza, anorexia y mialgia. En estos primeros exámenes los pacientes suelen estar deshidratados, apáticos y desorientados.

Posteriormente, aparecen otros síntomas como: náusea, vómitos, dolor abdominal, diarrea y exantema eritematoso en el 50% de los pacientes infectados por Ébola-Zaire. En estos estadios, es posible detectar virus circulantes en sangre³¹.

En algunos pacientes se ha observado una disminución gradual de la carga viral alrededor de los días 7-10, coincidiendo con un pico de producción de anticuerpos específicos, por lo que se piensa que la respuesta humoral puede tener un papel protector en esta infección³².

Los pacientes en los que sigue aumentando la carga viral, desarrollan manifestaciones hemorrágicas graves, donde el sangrado se produce en localizaciones múltiples: zona gingival, tracto gastrointestinal y pulmón³³.

Esta fase hemorrágica desemboca frecuentemente en muerte por shock entre los días 12 y 16^{34,35}.

2.3 Histopatología

Las lesiones más evidentes ocurren en el hígado, bazo y riñón y consisten en una necrosis focalizada, con débil respuesta inflamatoria³⁶.

Los parámetros de coagulación suelen estar alterados, lo cual sugiere que la coagulación intravascular es un evento terminal. También se puede encontrar leucopenia y un aumento de los niveles séricos de aspartato y alanina aminotransferasas³⁸.

2.4 Patogenicidad

Los filovirus están considerados agentes infecciosos de nivel 4, por tanto, su manejo debe realizarse empleando medidas de seguridad e instalaciones de máxima contención. Estas medidas son más estrictas que las recomendadas para otros virus como por ejemplo el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (nivel 2-3) y limitan la investigación con estos agentes a un número muy limitado de centros en todo el mundo.

Aunque el virus Marburg y Ébola causan fiebre hemorrágica grave en humanos y en algunos primates, también pueden infectar ratones³⁹, hamsters y cobayas⁴⁰.

Los mecanismos patogénicos que contribuyen de manera significativa a causar fiebre hemorrágica, podemos clasificarlos en dos tipos: aquellos debidos a la propia infección y replicación del virus dentro de las células, que causa daño tisular y necrosis; y aquellos fenómenos en los que la infección vírica afecta la respuesta del sistema inmune.

Estudios recientes con el virus Ébola, muestran que tanto células dendríticas como macrófagos y monocitos parecen ser las primeras dianas de infección, donde el virus puede replicarse^{41,42,43,44}.

Otras células susceptibles de infección son fibroblastos de varios órganos, células de endotelio vascular, hepatocitos, células corticales y epitelio de túbulo renal³⁷.

En cuanto a la respuesta inmune, la propia infección de células dendríticas y macrófagos, favorecería no solo la diseminación del virus, sino una supresión de la respuesta inmune, pues la activación de los linfocitos T a través de las células dendríticas, también podría estar afectada. Estos linfocitos T, aunque no son susceptibles de infección por los filovirus, sufren apoptosis, que contribuye al estado general de inmunosupresión²³.

Por otro lado, tras la infección de monocitos y macrófagos, éstos expresan factores tisulares, que favorecen la coagulación intravascular; liberan citoquinas que inducen disfunción vascular, hipotensión y fallo orgánico múltiple^{23,45}.

Tal y como ocurre con otros virus que causan fiebre hemorrágica, como el dengue hemorrágico, fiebre de Lassa y síndrome renal con fiebre hemorrágica, la infección por filovirus está asociada con problemas de distribución general de fluidos, hipotensión y desórdenes en la coagulación⁴⁶.

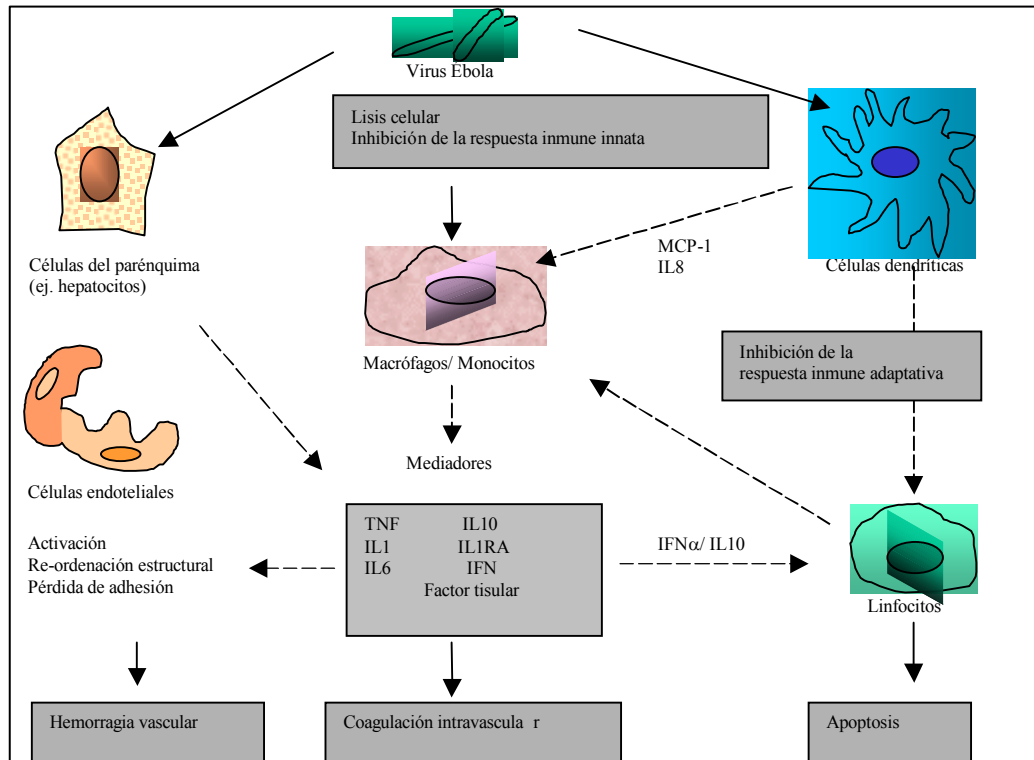


Figura 3.

Modelo de patogénesis causada por Filovirus, basado en estudios de infección con la cepa Ébola-Zaire.

2.5 Prevención y Control

A pesar de los esfuerzos realizados, hoy en día no hay disponible ningún tratamiento específico frente a filovirus. Se han desarrollado modelos animales³⁹ para probar la efectividad de diferentes terapias, entre las que cabe mencionar la utilización de interferón humano⁵⁰, plasma de paciente convaleciente⁵¹, transferencia pasiva de anticuerpos⁵² y terapia de anticoagulación; pero en todos los casos, los resultados obtenidos son controvertidos.

Las medidas principales en caso de un brote por filovirus son las de contención: los pacientes deben ser convenientemente aislados y en cuanto al personal sanitario, debe tomar medidas de protección y recibir entrenamiento específico^{47,48,49}.

En cuanto a los trabajos realizados para lograr una vacuna, se han empleado antígenos víricos o partículas totales inactivadas, pero ninguna de estas estrategias ofrecieron protección frente al virus vivo^{56,47}.

Recientemente se ha ensayado un modelo de inmunización basado en vacunas genéticas y vectores adenovirales que codifican dos proteínas: la glicoproteína (GP) y la nucleoproteína (NP). Estos estudios han sido muy prometedores ya que han demostrado que son capaces de generar una respuesta inmunológica protectora, tanto celular como humoral en primates no humanos^{57,59, 60}.

2.6 Diagnóstico

La sospecha de un brote de fiebre hemorrágica debido a filovirus debe estar basada inicialmente en datos tanto clínicos como epidemiológicos característicos de este tipo de infección.

Las muestras a partir de las cuales se ha podido aislar e identificar el virus han sido muestras de suero, lavados de garganta, orina, tejidos blandos, semen, fluidos anteriores de los ojos, así como hígado, bazo, nódulos linfáticos, riñón y corazón obtenidos a partir de autopsias, pero rara vez a partir de cerebro u otros tejidos nerviosos.

Sin embargo, debido a la alta virulencia del virus Marburg y Ébola, el cultivo y aislamiento de las partículas víricas sólo se puede realizar en centros especializados que cuenten con nivel 4 de bioseguridad.

Los métodos diagnósticos más habituales, están basados en la detección de anticuerpos específicos o antígenos que demuestren la presencia del virus, mediante técnicas de ELISA y fluorescencia^{61,62,63,64,65}.

Más recientemente, ante la sospecha de un posible caso de fiebre hemorrágica por virus Ébola, se está utilizando diagnóstico molecular basado en RT-PCR para la detección de RNA de filovirus³², esta metodología, rápida y práctica, se encuentra disponible en diferentes centros regionales africanos.

3 ESTRUCTURA DEL GENOMA Y PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS VÍRICAS

3.1 Estructura del genoma de los filovirus

El genoma de los filovirus consiste en una molécula de RNA simple, con un tamaño de unas 19 kb (19.1 kb para el virus Marburg y 18.9 kb en el virus Ébola), no está segmentado y es de sentido negativo⁶. Por tanto, la hebra de RNA no es infecciosa, no está poli-adenilada y es complementaria al RNA mensajero vírico. Además, es rica en residuos de adenina y uridina⁶⁶.

La disposición de los genes en el RNA vírico tiene el siguiente orden a partir del extremo 3': región sin traducción 3' - nucleoproteína (NP) - proteína estructural (VP 35) - proteína estructural (VP 40) – glicoproteína (GP) - proteína estructural (VP 30) – proteína estructural (VP 24) – polimerasa (L) – región sin traducción 5'.

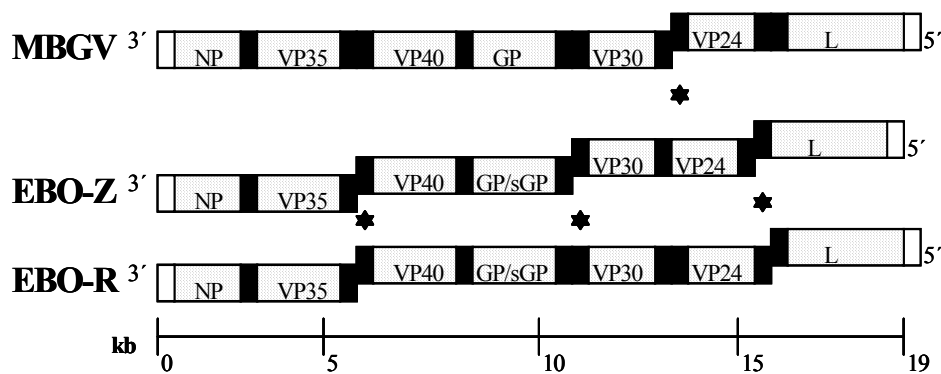


Figura 4.

Organización del genoma en el RNA del virus Marburg, Ébola-Zaire y Ébola-Reston.

Se muestra en los extremos (zonas en blanco) las regiones altamente conservadas; las secuencias codificantes (en punteado) y las regiones intergénicas con sus zonas de solapamiento (negro).

En los extremos 3' y 5' del genoma de los filovirus, se encuentran las secuencias extragénicas, que son complementarias en sus extremidades y están muy conservadas en todos los filovirus. Este tipo de secuencias es comparable con las secuencias que se encuentran en el genoma de otros virus de RNA negativo no-segmentado, y se denominan secuencias “*leader*” y “*trailer*”⁶.

Existen también regiones genómicas solapadas cuya función sería regular la transcripción de los genes⁶. Tanto el número como la localización de estas regiones, se ha utilizado como criterio para diferenciar y clasificar los dos géneros de filovirus: el virus Marburg (MBG) y el virus Ébola (EBO).

Así por ejemplo el virus Ébola tiene 3 zonas de solapamiento entre genes que alterna con las secuencias intergénicas, mientras que el genoma del virus Marburg, contiene un solo lugar de solapamiento en distinta posición.

3.2 Propiedades del virión

Las partículas de filovirus, son morfológicamente similares a los rhabdovirus, aunque su tamaño es algo más largo. Los viriones purificados mediante gradiente de centrifugación, son baciliformes y su longitud media varía de 665 nm. para el virus Marburg a 805 nm. para el virus Ébola, aunque el diámetro suele ser uniforme, de unos 80 nm.

Excepto esta diferencia en longitud, los filovirus son muy similares en morfología, con formas pleomórficos, de aspecto filamentosos, a veces con ramificaciones, en forma de “U”, “b” o circular.

Los viriones contienen una nucleocápside, que consta de una parte central (20 nm. de diámetro), rodeada de una cápside helicoidal (50 nm. de diámetro) de aspecto estriado, donde las estriaciones se disponen cada 5 nm. Esta nucleocápside presenta un canal axial de 10-15 nm.

La nucleocápside está envuelta de membrana lipoproteica, derivada de la membrana celular del huésped, donde se insertan las espículas (de aproximadamente 7 nm. de longitud), que se encuentran separadas cada 10 nm. en la superficie del virión⁶⁷.

3.3 Propiedades físicas de los filovirus

Las partículas víricas tienen una masa molecular de aproximadamente $3-6 \times 10^8$ y una densidad en tartrato de potasio de 1.14 gr/cm^3 .

Las partículas baciliformes, tienen un coeficiente de sedimentación de 1.300-1.400 s, mientras que las partículas de mayor tamaño, poseen un coeficiente de sedimentación mayor.

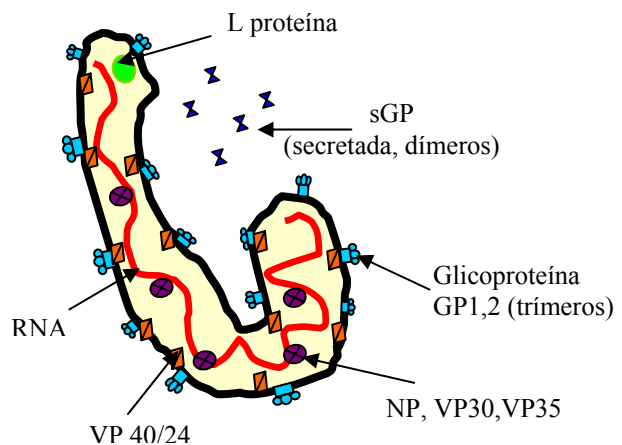
La capacidad infecciosa del virus es bastante estable a temperatura ambiente y este se puede inactivar empleando radiaciones UV, Gamma, formaldehído al 1%, β -propiolactona, desinfectantes fenólicos y solventes lipídicos como el éter y el deoxicolato.

3.4 Propiedades de las proteínas víricas

Todos los viriones de la familia *Filoviridae* contienen al menos 7 proteínas con funciones idénticas en cada virus; estas proteínas son:

- RNA polimerasa (L)
- Proteínas estructurales: Nucleoproteína (NP), VP30, VP35, VP40 (matriz) y VP24
- Glicoproteína de la envuelta (GP)

Figura 5.
Estructura y composición proteica de un filovirus.
Se muestra un esquema simplificado del tipo de proteínas que conforman la partícula de filovirus y su ubicación en el virión.



Los patrones de movilidad electroforética de estas proteínas estructurales, son característicos de cada género: virus Marburg o Ébola.

El **complejo ribo-nucleo-proteico**, tiene 4 proteínas asociadas:

la nucleoproteína (NP), la RNA polimerasa (L) y las proteínas estructurales VP30 y VP35.

La nucleoproteína (NP) (96kD en el caso del virus Marburg y 104kD para el Ébola) junto con VP30 (Marburg 28kD, Ébola 30kD), parecen estar íntimamente asociadas con la RNP.

VP30 forma parte de la nucleocápside, está fosforilada y posee un posible dominio de unión a Zn localizado en la región amino-terminal.

VP35 (32y 35 kD en el virus Marburg y Ébola respectivamente), tiene poca relación con la RNP y parece ser un componente del complejo transcriptasa, análogo a la proteína P de los paramixovirus y análoga también a la proteína NS (P) de los rhabdovirus⁶⁸.

Las **proteínas estructurales** VP40 (38 y 40 kD para el Marburg y Ébola) y VP24 (24kD en ambos virus) se piensa que están asociadas a la membrana lipídica, siendo VP40 la proteína de la matriz, pero no se sabe exactamente su localización en el virión.

La **proteína L**, es la más larga y como otras proteínas de virus RNA negativos no-segmentadas, presenta función RNA-polimerasa RNA dependiente⁶⁶. Su peso, calculado a partir de la secuencia de aminoácidos del virus Marburg (cepa Musoke), es de 267 kD.

La **glicoproteína (GP)** (Marburg 170kD, Ébola 125kD), es única, está integrada en la membrana y forma la superficie del virión.

Es una proteína transmembrana de tipo I (el extremo amino-terminal forma el ectodominio o zona externa de la proteína) y se cree que se estructura en forma de trímeros cuando está madura.

Se supone que la GP es la estructura que posibilita la entrada del virus en la célula, aunque los lugares de reconocimiento y unión al receptor celular, están todavía por determinar.

La GP de los filovirus está altamente glicosilada, representando estos azúcares más del 50% del peso molecular de la proteína madura.

Además de la glicoproteína de la envuelta, todas las cepas de virus Ébola, codifican una glicoproteína no estructural, que es secretada al medio extracelular (sGP), y que constituye el producto mayoritario del gen, pero cuya función no está completamente esclarecida hasta ahora. A diferencia del virus Ébola, el virus Marburg no expresa una sGP.

3.5 Diferencias estructurales entre los virus Marburg y Ébola

Las diferencias más significativas entre el virus Marburg y Ébola, que han hecho que se les clasifique como géneros distintos, las podemos encontrar en los siguientes aspectos:

-Patrones de movilidad electroforética distintos para las proteínas víricas.

-Diferencias en la estructura del RNA vírico.

El virus Ébola tiene 3 zonas de solapamiento entre genes que alterna con las secuencias intergénicas, mientras que el genoma del virus Marburg, contiene un solo lugar de solapamiento en distinta posición⁶.

-Glicoproteína (GP):

Tan sólo comparten un 31% de similitud en aminoácidos⁶⁹.

En cuanto al mecanismo de transcripción; la GP del virus Marburg se sintetiza como un único transcrito, mientras que el virus Ébola puede generar dos tipos de glicoproteínas. La primera es una proteína soluble (sGP) de 50-70 kD de tamaño que se secreta en forma de dímero y la segunda (GP), forma parte del virión, es transmembranal (120-150 kD) y es la responsable del tropismo del virus⁷⁰.

3.6 Diferencias entre virus del género Ébola: cepas Zaire y Reston

Comparando la secuencia nucleotídica de diferentes cepas de virus Reston y cepas Zaire se pudo determinar que regiones del RNA del virus Ébola se encuentran más conservadas y cuales difieren más⁷¹.

Las regiones más conservadas dentro del género Ébola, son las que corresponden a la secuencia 3' "*leader*", 5' "*trailer*" (situadas en los extremos del RNA), las señales de inicio de transcripción así como las regiones codificantes (ORF).

Por el contrario, las regiones menos conservadas entre las cepas Ébola-Reston y Ébola-Zaire corresponden a las regiones no-codificantes, pues no existe homología entre ellas y las regiones intergénicas, que son totalmente diferentes.

Estos datos apoyarían la hipótesis de que existe una evolución distinta entre estas cepas de virus Ébola y que ambas, aun compartiendo muchas similitudes, han desarrollado estrategias de transcripción y replicación diferentes.

Regiones no codificantes e intergénicas

Las cepas de virus Reston no tienen región de solapamiento entre los genes de la glicoproteína (GP) y la proteína VP30.

También existen diferencias en la secuencia que se ha propuesto como final de transcripción de los genes que codifican las proteínas NP, VP30 y VP40.

Mientras las cepas Reston tienen sólo 5 residuos de adenosina (A) en los genes NP y VP40, la cepa Zaire tiene 6.

Por otro lado, las cepas Reston poseen una señal más larga con una adenosina más en el gen VP30, mientras que la cepa Zaire presenta 5 As.

Por este motivo, Groseth y col. proponen como secuencia consenso de parada en la transcripción de los seis primeros genes de las cepas Ébola la secuencia:

3'-UAAUUCU₍₅₎-5' en lugar de la secuencia 3'-UAAUUCU₍₆₎-5'.

Estas diferencias en la secuencia de parada pueden influir en la poliadenilación del RNA mensajero, y por tanto en el modo de regulación de la transcripción de los genes.

Otra diferencia significativa entre las cepas Zaire y Reston, es que estas últimas, han perdido la señal de parada de transcripción entre los genes quinto (VP24) y sexto (L). Esta diferencia puede traducirse en la generación de un RNA mensajero bicistrónico con las secuencias de VP24 y L por parte de las cepas Reston, aunque este hecho está todavía por demostrar.

Regiones codificantes

El análisis comparativo entre las cepas Zaire y Reston revela una identidad (número de nucleótidos idénticos en la secuencia de RNA) entre el 59.4 y el 69%.

El valor más bajo de homología corresponde a la glicoproteína (GP) (cuarto gen), con un valor de identidad y similitud (número de aminoácidos idénticos) del 58.5 y 72.2% respectivamente.

Este dato no es sorprendente, si tenemos en cuenta que la glicoproteína es el único antígeno de superficie y constituye la diana para los anticuerpos neutralizantes.

La mayoría de las diferencias en la GP transmembrana, se localizan en la zona C-terminal de la GP.

Por otro lado, la forma soluble de la glicoproteína (sGP), la cual se expresa en una proporción mayor que la GP transmembrana, está más conservada.

Las proteínas L y VP24, a diferencia de la glicoproteína, presentan el mayor grado de identidad.

La proteína L es la RNA polimerasa RNA dependiente y está muy conservada entre el orden Mono-nega-virales, particularmente en los dominios lineales que son importantes para su correcto funcionamiento.

VP24 parece estar asociada con el proceso de adaptación celular.

En cuanto al resto de proteínas víricas; por ejemplo, la región C-terminal de la NP es una zona poco conservada entre los filovirus, y se piensa juega un papel importante en el proceso de ensamblaje.

También existen diferencias significativas en la zona amino-terminal de la proteína VP35 (11 primeros aminoácidos).

VP40 presenta la mayoría de las diferencias en la zona C-terminal con una extensión de 5 aminoácidos (QNSYQ) y la proteína VP30 contiene la mayoría de los cambios en la zona C-terminal (26 últimos aminoácidos)⁷¹.

4 CICLO REPLICATIVO DE LOS FILOVIRUS

Además de las similitudes morfológicas y bioquímicas, todos los virus de RNA de cadena negativa no-segmentados (Mononegavirales), comparten características comunes en cuanto a los mecanismos de transcripción y replicación, lo cual hace suponer que todos estos virus, derivan de un progenitor común .

4.1 Visión de conjunto del ciclo replicativo

El ciclo replicativo de los filovirus, de manera similar al resto de los virus, pasa necesariamente por la entrada de éstos en células susceptibles, pues los virus necesitan la maquinaria celular para generar nuevas proteínas virales.

- Entrada en las células

El mecanismo de entrada de los filovirus no se conoce bien, pero seguramente la glicoproteína viral (GP) que es la única proteína transmembrana del virión sea la responsable de la unión y entrada del virus en la célula.

La descripción de los estudios que se han realizado para conocer los mecanismos de entrada de los filovirus, se abordará de manera más extensa en el capítulo siete.

- Síntesis proteica

Una vez que las partículas víricas han alcanzado el citoplasma de las células, tiene lugar la transcripción y replicación del virus en el interior celular.

En el caso de los filovirus, la región 3' no codificadora (3' "*leader*") del genoma, contiene señales para el inicio de la RNA-polimerasa y también para la encapsidación de las nucleoproteínas⁷².

El hecho de que los filovirus contengan RNA de sentido negativo, significa que el RNA viral purificado no es infeccioso, es de polaridad opuesta al RNA mensajero (son hebras complementarias) y por tanto, el genoma viral no puede utilizarse directamente para generar proteínas, lo cual implica que las partículas víricas necesitan contar con la RNA polimerasa.

- Salida de los nuevos viriones

Por último, las diferentes proteínas víricas junto con el material genético deben empaquetarse y conformar nuevas estructuras víricas, que en el caso de los filovirus se ensamblan y son expulsadas fuera de la célula a través de la membrana celular.

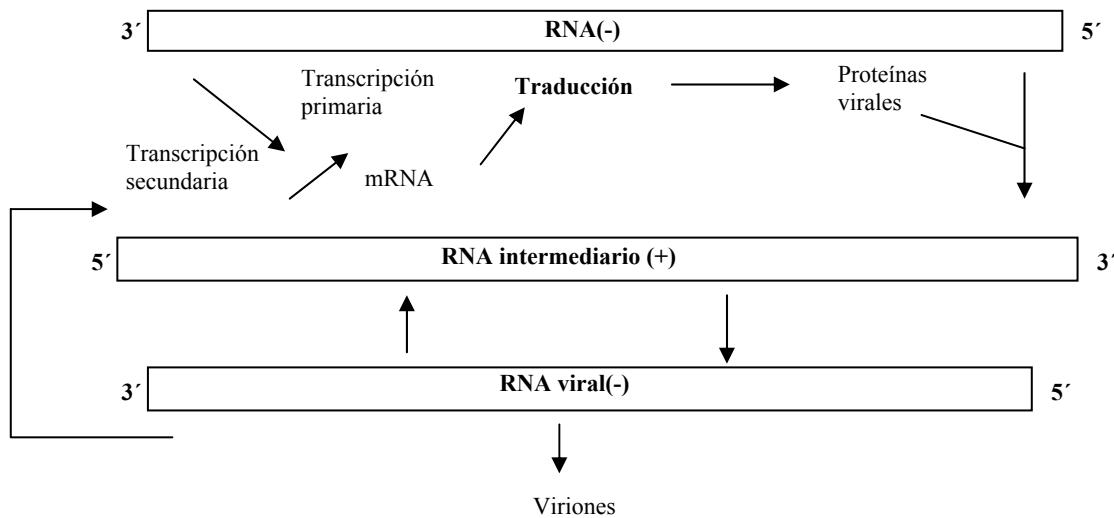


Figura 6.

Esquema simplificado donde se relacionan los procesos de transcripción y traducción del ciclo replicativo de los filovirus .

A partir del RNA de sentido negativo, los filovirus sintetizan un RNA mensajero que codifica las proteínas víricas. A su vez, el RNA intermediario sirve de molde para las nuevas hebras de RNA viral.

4.2 Mecanismo de transcripción

El genoma de los filovirus, es transcrito como un RNA mensajero subgenómico (de tamaño menor al genoma del virión), monocistrónico (a partir de un único promotor), y se generan distintos fragmentos (cada RNA mensajero codifica una única proteína) pues ocurren interrupciones en la síntesis de RNA mensajero⁷³.

En el extremo 5' del RNA subgenómico, empieza en la señal de inicio de la transcripción y el extremo 3' de este subgenoma, contiene un tallo de poli(A), generado por la polimerasa a partir de una secuencia de poli-uridinas que se localizan en el extremo 5' del genoma viral.

La eficiencia en la transcripción depende del orden en que se transcriben los genes, la formación de estructuras secundarias en los extremos 3' de los genes, la formación de estructuras secundarias entre las secuencias intergénicas, la presencia de secuencias solapadas y también la presencia de regiones de terminación duplicadas.

Esto ocurre así, pues existen señales de inicio y parada de transcripción que flanquean todos y cada uno de los genes.

Al existir un único promotor de la transcripción, localizado en el extremo 3' del genoma viral, la polimerasa siempre inicia la transcripción en este punto. A medida que avanza por el RNA, la polimerasa encuentra distintas señales de parada e inicio de los genes, lo que retrasa la transcripción completa del genoma.

Esto significa que se transcribe un mayor número de RNA mensajeros de aquellos genes que se encuentran más cerca del promotor; es decir, que existe una polaridad en la transcripción.

Esta estrategia permite al virus regular la expresión de sus genes, y así por ejemplo las proteínas estructurales que se requieren en gran cantidad, son las más cercanas al promotor, mientras que las proteínas que se necesitan en menor proporción como por ejemplo la polimerasa, se encuentran lejos de la región promotora.

Estudios recientes indican que aunque el inicio de la transcripción en los filovirus, parece ser independiente de VP30, sin embargo, esta proteína juega un papel importante en este mecanismo.

La función de VP30 sería activar la transcripción gracias a la la formación de una estructura secundaria en el RNA. Su mecanismo de actuación, difiere por tanto de otras proteínas virales como M2-1 (una proteína del virus respiratorio sincitial (RSV), también del orden Mono-nega-virales), las cuales actúan como factores antiterminadores o factores de elongación durante la transcripción⁷⁴.

4.3 Mecanismo de replicación

La replicación del genoma de los filovirus, es mediada a través de la síntesis de un antígenoma (sentido positivo) complementario, de longitud completa, que servirá de molde para la síntesis de los RNAs de sentido negativo, anticomplementarios al molde de RNA parental.

La complementariedad de los extremos del genoma, parece indicar que existe un único e idéntico sitio de encapsidación en el genoma y en el antígenoma y un único sitio de inicio de la polimerasa tanto para la transcripción como para la replicación.

4.4 Formación de la cápside

Para la formación de la cápside viral es suficiente la expresión de las proteínas NP, VP35 y VP24⁷⁵ y por tanto ni el RNA viral (cadena negativa) ni la RNA polimerasa, son esenciales para la formación de esta estructura.

La secuencia de las NP de varias cepas de virus Ébola y Marburg⁵ presentan un alto grado de conservación, y además, se ha demostrado la necesidad de que la NP contenga O-glicosilaciones y residuos de ácido siálico para poder interactuar con la proteína VP35⁷⁵.

4.5 Proceso de salida de los filovirus

El proceso de salida o gemación de los filovirus, tiene lugar a través de la membrana de las células infectadas, las cuales ven alterada su estructura y composición debido a la inserción de la glicoproteína viral, la presencia de proteínas celulares reclutadas por el virus, y la acumulación de las cápsides víricas que ya están preformadas.

La separación completa de las partículas víricas de la célula hospedadora es un proceso que está mediado por factores víricos y celulares donde se produce fusión de membrana. Por este motivo, los filovirus contienen una envuelta lipoproteica derivada de la célula donde están incluidas tanto las glicoproteínas del virus como otras proteínas celulares de membrana.

4.5.1 Implicación de VP40 y GP en la formación de nuevos viriones

La expresión conjunta de VP40 (proteína de la matriz de los filovirus) y la glicoproteína de la envuelta viral (GP), es necesaria para generar partículas semejantes al virus vivo (“virus-like particles” VLP), que son capaces de separarse físicamente de la célula⁷⁶, y presentan una morfología similar al virus real.

Este hecho, contrasta con lo observado para otros virus como el VIH, donde la proteína de la matriz es suficiente para generar VLP por sí sola. Esto implica que la formación de nuevas partículas de filovirus es un proceso que está controlado por la interacción de ambas proteínas.

Mediante microscopia confocal, se observa cómo durante la formación de los virus, VP40 se localiza cerca de la membrana celular, siendo el extremo C-terminal de esta proteína el que posibilita esta localización. Este extremo C-terminal, es posteriormente eliminado para que la proteína adopte una conformación hexamérica, que es necesaria para el ensamblaje viral⁷⁷.

4.5.2 Papel de los L-dominios en el ensamblaje vírico

VP40 presenta en el extremo amino-terminal la secuencia: P₇TAPPEY₁₃, la cual contiene de manera solapada los motivos: PTAP y PPXY.

Estos dominios de VP40, forman parte de lo que se denominan “dominios tardíos” (L-dominios), que están presentes en algunas proteínas retrovirales como Gag y que se piensa juegan un papel importante en el proceso de ensamblaje y salida de los retrovirus⁷⁸.

De hecho, cuando se deleccionan estos motivos de la proteína Gag se generan fenotipos víricos incapaces de separarse de la célula.

La funcionalidad de estos dominios, no parece depender de su localización física en la proteína, ya que empleando mutantes donde se cambia la localización de este L-dominio a otra zona de la proteína Gag o incluso transfiriendo estos dominios entre diferentes cepas, no se altera la capacidad de formación y expulsión de los virus.

Todos estos datos hacen pensar que, los dominios L, más que alterar la conformación de la proteína Gag o afectar la morfogénesis del virus, actúan reclutando o atrayendo factores celulares. Se ha demostrado que los L dominios retrovirales forman parte de regiones de unión específica con proteínas celulares que pueden estar implicadas en el proceso de “*budding*”, incluyendo Tsg101 (una proteína asociada con los cuerpos multivesiculares (MVB)) y proteínas ubiquitin ligasas como Nedd4 y AP2.

Dominio PTAP

El péptido PTAP, presente tanto en la proteína p6^{Gag} del VIH y del SIV como en la proteína VP40 del virus Ébola, parece ser necesario y suficiente para atraer moléculas de Tsg101 a los lugares donde los virus se ensamblan. Además, la presencia de Tsg101 en estas zonas de ensamblaje es necesario para la correcta formación de los nuevos viriones de VIH-1 y Ébola.

De hecho, empleando microscopia confocal se ha observado que la proteína Vp40 del Ébola, induce relocalización de Tsg101 en la membrana plasmática.

Dominio PPXY

El otro motivo presente en VP40: PPXY, interacciona con la proteína celular Nedd4 y es esencial para generar las partículas de aspecto filamentoso que presentan los filovirus. Parece que esta secuencia es inactiva si no tiene la secuencia PTAP solapada⁷⁹.

Mecanismo de actuación de Tsg101

Aunque el mecanismo preciso por el cual Tsg101 media el proceso de salida de los virus todavía no se conoce, se piensa que probablemente esta proteína celular actúe seleccionando proteínas ubiquinadas procedentes de los cuerpos multi-vesiculares⁸⁰.

Tsg101 (homóloga a la proteína Vps23 en levaduras), es un componente de 350 kDa perteneciente al complejo ESCRT-1 que es esencial para la selección de proteínas ubiquinadas en el cuerpo multi-vesicular (MVB) de las levaduras y en los endosomas de células de mamíferos⁸¹.

Según esta hipótesis las proteínas víricas serían las responsables de atraer la maquinaria que normalmente emplea la célula para formar MVB como son Tsg101 y proteínas ubiquitin ligasas y favorecer el ensamblaje de los nuevos virus en la membrana plasmática.

El hecho de que ESCRT-1 se asocie con proteínas mono-ubiquinadas, sugiere que existe una relación entre el reclutamiento de proteína ubiquitin ligasa por los dominios PPXY y el proceso de “*budding*” mediado por Tsg101/ESCRT-1.

Esto explicaría por qué la depleción de ubiquitina libre mediante la inhibición de los proteosomas, interfiere en el proceso, maduración y salida del virus VIH-1.

Sin embargo todavía no está claro si la interacción entre el dominio PTAP de la proteína Vp40 del Ébola y Tsg101 es análoga a la interacción entre los complejos Tsg101 y las proteínas de la propia célula o si por el contrario este es un mecanismo exclusivo de los virus para reclutar Tsg101.

5 GLICOPROTEÍNA DEL VIRUS ÉBOLA

5.1 Expresión y regulación de la glicoproteína en el virus Ébola

Una de las características más significativa que diferencia al virus Marburg (MBG) del Ébola (EBO) es la estructura y la forma que emplea cada virus para expresar y sintetizar la glicoproteína de la envuelta.

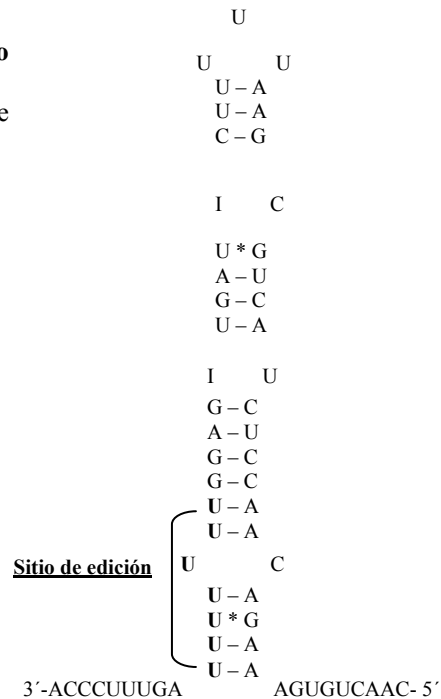
Mientras el virus MBG solamente expresa la glicoproteína transmembrana (GP), el virus Ébola es capaz además de sintetizar otra molécula de menor tamaño, altamente glicosilada, y que es secretada por las células infectadas.

Esta glicoproteína secretada (sGP) se encuentra en grandes cantidades en los fluidos de enfermos infectados por virus Ébola, aunque su papel en el curso de la infección no está todavía esclarecido.

El mecanismo que ha desarrollado el virus Ébola para sintetizar dos glicoproteínas distintas a partir de una misma secuencia, fue esclarecido por el Dr. Victor Volchkov y col. y se debe a la posibilidad de edición del RNA mensajero en la secuencia de este gen⁷⁰.

Estos autores, demuestran que la síntesis de la glicoproteína que se encuentra en la envuelta de los viriones (GP) se produce gracias a la formación en el RNA mensajero de una estructura secundaria en forma de horquilla que contiene la secuencia de edición y que consiste en la introducción de una adenosina (A) extra⁷⁰.

Figura 7.
Probable estructura secundaria del RNA mensajero del gen de la glicoproteína del virus Ébola.
 Se destacan los 7 residuos de Uracilo donde se produce la edición de la glicoproteína



La glicoproteína transmembrana (GP) inicia su transcripción en el ORFI, pero en la posición 1019, la polimerasa coloca 8 adeninas (inserta una más), generándose otro marco de lectura que posibilita la síntesis completa hasta el final del ORFII. Por tanto, esta glicoproteína posee entre 125-140kDa (aproximadamente 670 aminoácidos)⁸².

La glicoproteína secretada (sGP), se expresaría a partir del ORFI y al llegar a la posición 1019, la polimerasa colocaría 7 adeninas manteniéndose el marco de lectura hasta llegar al triplete de parada en la posición 1232 .

Por tanto, la proteína sGP, es idéntica a la glicoproteína transmembrana en su zona N-terminal (294 aminoácidos)⁶ pero posee otros 70 aminoácidos que pertenecen a la zona final del ORFI.

Estos 70 aminoácidos, no están presentes en la glicoproteína transmembrana debido a que la introducción de la adenina cambia el marco de lectura y se generan otros tripletes de nucleótidos, de tal manera que sGP no posee el dominio de anclaje en la membrana y se excreta al medio^{83,6}.

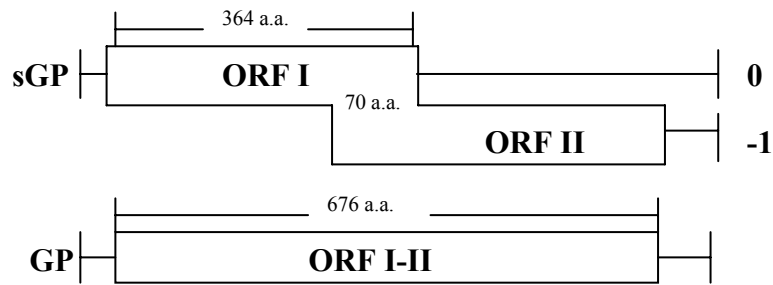


Figura 8.

Representación esquemática del gen de la glicoproteína del virus Ébola, donde se observan los dos productos del gen: sGP ; proteína secretada (364 aminoácidos)

GP ; glicoproteína viral, (676 aminoácidos), resultado de la edición del RNA mensajero.

Además, estos investigadores observaron que la mayoría de los transcritos de RNA de este gen, codificaban una proteína de unos 364 aminoácidos, que es la forma secretada (sGP), mientras que solamente el 20% del RNA mensajero codificaba la proteína transmembrana de 676 aminoácidos⁷⁰.

5.2 Procesamiento de la glicoproteína transmembrana del virus Ébola

La glicoproteína transmembrana (GP_{1,2}), se expresa como una única cadena precursora de 676 aminoácidos que es posteriormente procesada en 2 fragmentos : GP1(dominio de unión al receptor) y GP2 (dominio transmembrana), mediante una convertasa celular, la furina⁸⁴.

Sin embargo, estas dos proteínas: GP1 y GP2, se mantienen unidas mediante puentes disulfuro y conforman las espículas del virión, a diferencia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), donde las glicoproteínas de la envuelta: gp120 y gp41 se mantienen unidas por enlaces débiles (puentes de hidrógeno), lo cual hace al virus VIH mucho más frágil.

En su forma madura GP_{1,2} es una proteína transmembrana de tipoI; es decir, presenta su extremo amino-terminal en el medio extracelular, mientras que el extremo C-terminal se ubica en la región citoplásmica.

Esta glicoproteína, presenta diferentes modificaciones desde su síntesis inicial hasta su inserción en la bicapa lipídica de las células eucariotas⁸⁵.

La glicoproteína precursora (pre-glicoproteína) pasa al retículo endoplásmico (RE) donde pierde el péptido señal⁸⁶; tiene lugar la N-glicosilación^{70,86,85} y ocurre la oligomerización de la glicoproteína⁸⁶.

Desde el RE, la proteína pasa al complejo pre-Golgi donde es acilada⁸⁷ y más tarde en el aparato de Golgi tiene lugar la O-glicosilación y madura la N-glicosilación⁷⁰.

Finalmente, la glicoproteína es procesada por la Furina en el trans-Golgi de tal manera que se disocia la proteína en dos subunidades: GP1 y GP2, y esta glicoproteína ya madura, es transportada y anclada en la membrana celular gracias al dominio hidrofóbico carboxi-terminal de la subunidad GP₂⁸⁴.

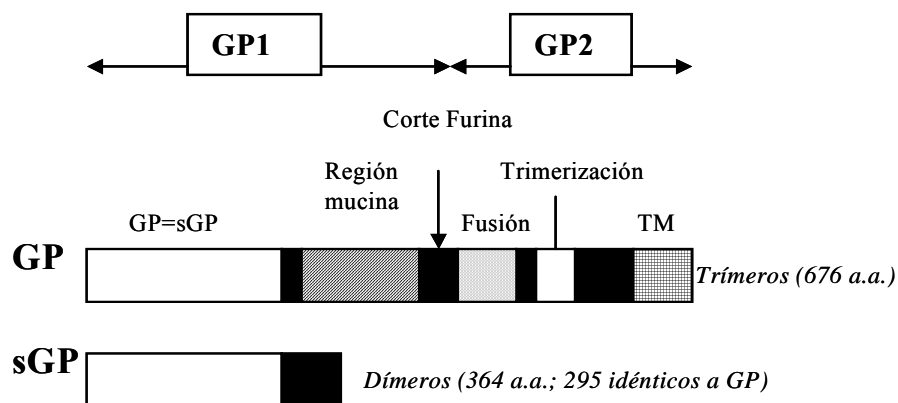


Figura 9.

Comparación entre la proteína secretada (sGP) y la glicoproteína transmembrana (GP) del virus Ébola.

GP y sGP son idénticas en la zona N-terminal de la proteína (295 aminoácidos).

GP es posteriormente procesada en dos subunidades: GP1, de mayor tamaño y con la mayoría de los residuos glicosilados. GP2 es la porción de la glicoproteína que se ancla en la bicapa lipídica.

5.2.1 Papel de la Furina y capacidad infectiva del virus Ébola

Para muchos virus de la familia *Orthomyxoviridae* y *Paramyxoviridae*, la proteólisis post-traducción de las glicoproteínas de membrana, mediante enzimas como la furina u otras proteasas celulares, es un requisito necesario antes de la fusión entre la envuelta viral y las membranas celulares. Por tanto, la función de estas enzimas es clave en la infectividad de estos virus⁸⁵.

Sin embargo, otras glicoproteínas son capaces de promover infección sin necesidad de ser procesadas por la Furina, como por ejemplo la proteína espicular del virus de la hepatitis de ratón, el virus Sindbis y la glicoproteína del virus de la leucemia murina (MLV).

En el caso del virus Ébola, la región de reconocimiento de la endoproteasa celular furina (R-X-K/ R-R), está muy conservada, y este hecho, hizo pensar que tal vez la enzima podía jugar un papel importante en el ciclo de vida del virus.

Sin embargo, varios autores han demostrado que el procesamiento proteolítico en el virus Ébola no parece ser necesario en la infectividad, ni constituye un proceso fundamental para la replicación del virus, al menos en cultivo celular^{87,88,89}.

Estos resultados sugieren que el procesamiento de la glicoproteína por la Furina, no es necesario ni para la activación ni para el funcionamiento de ésta⁹⁰.

A pesar de estos resultados, no se puede descartar la hipótesis de que tal vez la proteólisis de la glicoproteína del virus Ébola, pueda ser un paso necesario en la replicación en vivo y/o en su reservorio natural y por tanto se requieren todavía estudios con animales para conocer este fenómeno⁸⁷.

5.3 Estructura de GP1

GP1 es la subunidad de la glicoproteína transmembrana del virus Ébola más grande (468 aminoácidos), abarca los residuos más cercanos al extremo amino-terminal (aminoácidos 33 al 501) y contiene el péptido señal y una zona donde se localizan la mayoría de las glicosilaciones.

Esta región de glicosilación es variable entre cepas, de naturaleza hidrofílica y contiene tanto N- como O- glicosilaciones (región mucina), que constituyen más de un tercio de la masa molecular de la proteína madura⁷⁰.

5.3.1 Residuos N-glicosilados

Para explorar la importancia de los residuos N-glicosilados en la funcionalidad de la glicoproteína del virus Ébola, Jeffers y col. realizaron mutaciones en diferentes residuos N-glicosilados y analizaron la implicación de cada uno de estos cambios tanto a nivel de expresión de la proteína, conformación, capacidad de generar retrovirus recombinantes con estas envueltas y capacidad de transducción en la línea murina NIH 3T3, en comparación con la glicoproteína nativa⁹¹.

De manera individual parece que ninguno de estos residuos altera drásticamente ninguno de estos aspectos (conformación y expresión de la proteína, título viral y capacidad infectiva).

Sin embargo la mutante N40D (primer residuo N-glicosilado en la secuencia del virus Ébola), es donde observan mayores cambios. Esta mutante (N40D) es secretada en gran cantidad al medio, no se incorpora a las partículas víricas y por tanto, pierde capacidad de transducción.

Aunque este residuo de Asparagina (N) está conservado en todas las cepas de virus Ébola, en el caso del virus Marburg, no existe una Asparagina equivalente.

Todo parece indicar que este residuo N-glicosilado es necesario para una correcta conformación de la proteína durante el procesamiento y plegamiento de la misma en el retículo endoplásmico.

5.3.2 Región Mucina

La región comprendida entre los aminoácidos 277-501 es una región rica en aminoácidos Prolina, Serina y Treonina y es donde ocurre la mayoría de las O-glicosilaciones (región mucina).

Jeffers y col. observaron que cuando se elimina esta región de la glicoproteína, se produce un número mayor de partículas víricas pseudotipadas⁹¹. Este resultado puede deberse a que mientras la proteína natural es retenida en el aparato de Golgi hasta que todos los residuos son glicosilados, la mutante que carece de la región mucina, puede agilizar el tránsito a través de estos compartimentos y acumularse en la superficie celular, generándose así más partículas víricas.

Otro factor a tener en cuenta para explicar este resultado, es que con esta delección, disminuye la toxicidad celular⁵⁸ y la pérdida de adherencia de las células que expresan esta glicoproteína⁹². Estudios realizados por Volchkov y col. señalan que la expresión de la glicoproteína viral, agota la maquinaria celular dedicada a la glicosilación⁸⁵.

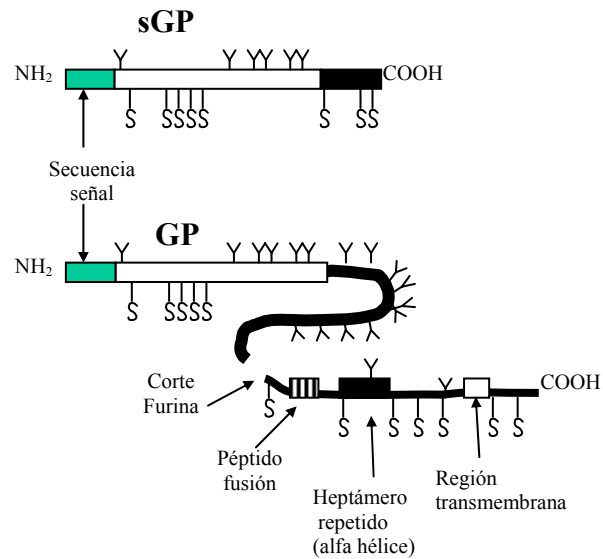
Otros autores han obtenido resultados similares al emplear esta misma mutante (delección de los aminoácidos 309 a 489)⁹³, observando un incremento en el título de partículas virales producidas de hasta 74 veces, comparado con la glicoproteína nativa. Además, parece que esta delección no afecta al tropismo celular, por lo menos en células epiteliales humanas.

Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con el virus Ébola, la delección de los aminoácidos comprendidos entre las posiciones 294 y 424 del virus Marburg, resulta en una pérdida de título importante⁹³.

La región mucina es la zona de la glicoproteína del virus Ébola más variable entre cepas, aunque de manera general es una región conservada entre los filovirus.

Este hecho apunta a que, tal vez juegue un papel importante en la ecología o en la patogénesis de este virus. Según apunta Jeffers y col., es posible que este dominio mucina pudiera estar implicado en el reconocimiento de anticuerpos, de tal manera que la variabilidad de esta región permitiría al virus escapar del reconocimiento del sistema inmune a través de mutaciones⁹¹.

Figura 10.
Diagrama de la localización de los
residuos N-glicosilados (Y) y de
cisteína (S) de las proteínas
secretada (sGP) y transmembrana
(GP) del virus Ébola.



5.4 Estructura de GP2

GP2 es la subunidad de la glicoproteína transmembrana del virus Ébola mas pequeña (174 aminoácidos), abarca desde los residuos 502 al 676 y es la responsable de la inserción en la bicapa lipídica.

5.4.1 Posible péptido de fusión

GP2 contiene en su zona más amino-terminal un posible péptido de fusión (aminoácidos 524-539) y aunque se ha especulado que puede mediar la fusión del virus a la membrana de la célula huésped, parece una hipótesis no consistente pues solamente algunas mutaciones puntuales en dicha secuencia bloquean parcialmente la entrada del virus⁹⁴.

5.4.2 Región de homología con dominios inmunosupresores

A continuación del potencial péptido de fusión, hay una región (aminoácidos 584-610) cuya secuencia es similar a la que se ha propuesto como supresora en algunos retrovirus⁸³.

En esta misma zona se localizan 3 residuos de cisteína en posición: 601, 608 y 609, los cuales son importantes para la conformación de la glicoproteína madura.

5.4.3 Dominio transmembrana

El dominio transmembrana (TM) abarca desde los aminoácidos 651-672 y permite a la glicoproteína del virus Ébola anclarse a la bicapa lipídica.

Este dominio posee dos residuos de cisteínas cerca de la bicapa lipídica (Cys-670 y Cys-672 para el virus Ébola; Cys-671 y Cys-673 para el Marburg) que están muy conservados en muchas glicoproteínas víricas, incluida la región transmembrana de los retrovirus.

Ambos residuos de Cisteína parecen ser señales de acilación, donde se insertan dos moléculas de ácido palmítico.

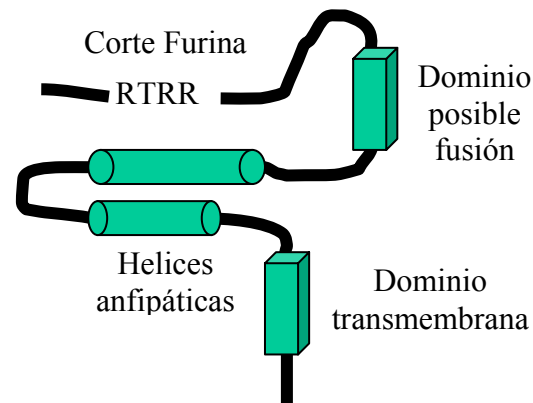
La acilación de las glicoproteínas es una modificación post-traduccional, que normalmente consiste en la unión de ácidos grasos (en general ácido palmítico), a los residuos de Serina o Treonina en forma de oxi-ésteres, o bien uniones de tipo tio-éster a los residuos de Cisteína⁸⁷.

El papel de estos ácidos palmíticos en la glicoproteína de los filovirus parece ser importante durante la formación de partículas víricas, ensamblaje y expulsión de los virus⁷⁷.

En cuanto a la contribución de la acilación de la glicoproteína en el proceso infeccioso del virus Ébola, los trabajos de Ito y col. parecen indicar que no existen diferencias significativas entre los virus nativos y aquellos con mutaciones en las posiciones 670 y/o 672 de la glicoproteína⁸⁷, al menos en ese tipo de líneas empleadas.

Estos resultados sugieren que la acilación de la glicoproteína del virus Ébola no es necesaria para la infección del virus y que este fenómeno ocurre por defecto mediante acil-transferasas presentes en la célula eucariota⁸⁷.

Figura 11.
Estructura de la subunidad transmembrana de la glicoproteína del virus Ébola (GP2).



5.5 Conformación de la glicoproteína

Para estudiar la conformación que adquiere la glicoproteína de los filovirus en su forma madura, se han realizado análisis de rayos x y espectroscopia, y parece que ésta adquiere una conformación en forma de homo-trímeros.

Según estos investigadores, cada subunidad de GP2 se estructura en forma de α -hélice con dos regiones antiparalelas conectadas por un bucle u horquilla^{95,96}.

La región amino-terminal de cada uno de los monómeros de GP2, se dispondría en el centro, mientras que la región antiparalela estaría ubicada en la superficie de este complejo proteico y la región bucle u horquilla, estaría formada por el puente disulfuro entre los residuos de Cys: 601 y 608.

La estructura trimérica en forma de horquilla aparece en muchas proteínas de fusión a membrana de distintos virus: filovirus como el Ébola, oncorretrovirus como el MO-MLV y el HTLV-1, orthomyxovirus como el influenza, lentivirus como el VIH-1, SIV, y el paramyxovirus SV5⁹⁷.

Se piensa que la función de esta disposición en forma de horquilla sería facilitar la superposición de las membranas víricas y celulares.

Sin embargo no se conoce exactamente cómo esta disposición conduce a la fusión de las membranas, aunque se especula que probablemente ocurra o bien por distorsión y/o a través de la formación de poros de fusión^{96,98}.

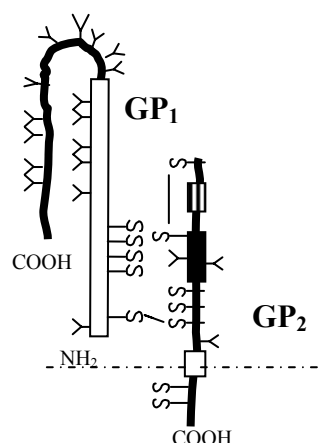
De todas formas, esta conformación trimérica en forma de horquilla probablemente corresponde al estado activo de fusión, distinto a la forma nativa de la proteína. Así por ejemplo, en el virus influenza, la exposición a un pH bajo, activa la conformación fusogénica⁹⁹ a diferencia del VIH, en el que ocurre el cambio conformacional después de la unión a CD4, que hace que gp120 pueda interactuar con los receptores de quimoquinas apropiados¹⁰⁰.

5.5.1 Papel de los residuos de Cisteína en la conformación de la glicoproteína

La glicoproteína del virus Ébola contiene 10 residuos conservados de cisteína; 5 en la región GP1 y 5 en GP2. Estos 5 últimos residuos están conservados no sólo en la glicoproteína GP2 del virus Ébola, sino también en GP2 del virus Marburg y en la región transmembrana del ASLV⁹¹.

Basándose en estudios de rayos X y análisis de secuencias de la región GP2 del virus Ébola, Jeffers y col. trataron de analizar la manera en que las subunidades GP1 y GP2 están unidas por puentes disulfuro a través de los residuos de Cisteína⁹¹.

Figura 12.
Representación de las uniones que establecen las subunidades de la glicoproteína del virus Ébola.



Unión intermolecular entre GP1 y GP2

Parece que el primer residuo de cisteína en GP1 (Cys-53) estaría implicado en la unión a la subunidad GP2 mediante un enlace con la cisteína 609 (Cys-609), pues la sustitución de Cys-53 por glicina, genera moléculas de GP1 que se excretan al medio y por tanto, se pierde la unión con la porción GP2 que es la que se ancla en la bicapa lipídica.

Esta Cys53 también está conservada en el virus Marburg y participa igualmente en la unión de las dos subunidades glicoproteicas (GP1 y GP2).

Además, parece que la unión entre las cisteínas 53 y 609 no es un requisito necesario en el transporte y procesado de la subunidad GP1, aunque sí se observa una acumulación de la pre-proteína probablemente antes de pasar al aparato de Golgi⁹¹.

Uniones intramoleculares en GP2

Por otro lado, la sustitución de cualquiera de los residuos de cisteína en GP2 (Cys-511, Cys-556, Cys-601, Cys-608 y Cys-609) produce un aumento de moléculas de GP1 que se secretan al medio y en consecuencia el número de partículas víricas es muy bajo, además de que estas partículas son incapaces de infectar células susceptibles⁹¹.

Estudios de difracción de rayos X de la porción GP2 del virus Ébola, sugieren que los residuos Cys-601 y Cys-608 formarían un puente disulfuro entre ellos, de igual manera que los residuos Cys-511 y Cys-556 también forman otro enlace covalente.

Uniones intramoleculares en GP1

La porción GP1 del virus Ébola, parece contener 2 pares de puentes disulfuro intramolecular: Cys-121, Cys-147 y el par Cys-108, Cys-135 estando estos residuos conservados también en la región GP1 del virus Marburg⁹¹.

6 PAPEL DE LAS GLICOPROTEINAS EN LA PATOGÉNESIS DEL VIRUS ÉBOLA

A pesar de que todos los componentes del virus en principio pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad, se piensa que las glicoproteínas, tanto la secretada (sGP) como la transmembrana (GP), juegan un papel importante en el proceso de infección y en la patogenicidad.

Aunque ambas glicoproteínas derivan del mismo gen viral y tienen una región común, parece que tanto la especificidad en la unión a las células¹⁰¹ como las funciones que desarrollan ambas glicoproteínas podrían ser distintas.

La glicoproteína transmembrana es la responsable del tropismo celular, mientras que la función de la proteína secretada parece estar más relacionada con un mecanismo de evasión inmune¹⁰¹.

6.1 Tropismo celular

Basándose en estudios morfológicos realizados a partir de material post-mortem con primates infectados por filovirus, parece que las células mononucleares fagocíticas y las células dendríticas son las primeras células diana donde los filovirus se replican^{41,42,43,44,45}; siendo los fibroblastos, células endoteliales vasculares, hepatocitos, células corticales y epitelio de túbulo renal las siguientes dianas en el transcurso de la infección³⁷.

Para poder estudiar el tropismo del virus Ébola de manera más segura sin emplear el virus natural, se han desarrollado diferentes estrategias, siendo la más común, la producción en laboratorio de partículas víricas recombinantes no replicativas que contienen la envuelta del virus (pseudotipado).

De esta manera, empleando retrovirus recombinantes con envuelta de virus Ébola o Marburg, varios grupos de trabajo han podido caracterizar el tropismo celular sobre poblaciones celulares específicas^{102,103,86,101,104}.

6.1.1 Células susceptibles:

Los primeros pseudotipos con envuelta de virus Ébola, se realizaron empleando proteínas estructurales derivadas de un retrovirus murino (virus Moloney)^{101,103}. Posteriormente, se han utilizado otros sistemas basados en el virus VIH y VSV para la producción de pseudotipos Ébola^{104,87}.

En todos estos casos se confirmó la capacidad de los pseudotipos Ébola de infectar un amplio espectro de poblaciones celulares humanas que incluía células endoteliales pero no linfocitos.

Diferentes líneas de laboratorio son también susceptibles de infección, entre ellas: HOS, 293T, HeLa y HepG2.

También se ha estudiado la capacidad de infección del virus Ébola en otras especies animales utilizando pseudotipos, encontrando que células de varias especies: simios, murciélagos, ratones, palomas, hamster y perro¹⁰⁴ se infectan con pseudotipos MLV-EBO-GP¹⁰³ y por lo tanto, pueden ser potencialmente infectadas por el virus natural.

6.1.2 Células no permisivas:

A pesar del amplio tropismo que presentan los filovirus, los linfocitos parecen no ser susceptibles a la infección^{101,103}.

Bates y colaboradores, empleando retrovirus recombinantes murinos con envuelta del virus Ébola comprobaron que líneas linfoides como las C8166, Sup T1, MT-2 y Jurkat eran resistentes a la transducción y que las células T humanas: HUT-78 y CEM(E), son resistentes a la infección por todos los subtipos de virus Ébola y Marburg¹⁰³.

La explicación de esta imposibilidad de los filovirus para entrar en los linfocitos, puede deberse por un lado a la ausencia de receptores víricos en las células B o T y/o también a la existencia de algún factor que produzcan las líneas linfoides que interfiera en la unión entre la envuelta del virus y el receptor celular, al igual que las quimioquinas secretadas por las células T CD8⁺ (RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β) bloquean la infección del VIH-1.

Para averiguar esta posibilidad, los investigadores co-cultivaron células 293T con líneas celulares B humanas y tras un periodo de tiempo, añadieron los retrovirus recombinantes, observando que los niveles de transducción de estas células con respecto al control eran similares. Por tanto, el bloqueo del virus Ébola al entrar en células linfoides, no se debe a factores solubles, sino probablemente a la falta de receptor en este tipo de célula¹⁰³.

La demostración de que los linfocitos B y T no se infectan por el virus Ébola, abrió la posibilidad de utilizarlos para realizar el screening de posibles receptores celulares.

6.1.3 Diferencias en el tropismo de los virus Ébola y Marburg

Para investigar los posibles receptores de estos dos virus, Chan y col. emplearon retrovirus recombinantes basados en VIH con envuelta procedente de virus MBG ó EBO¹⁰⁴ y observaron que ambos virus presentan el mismo patrón de infectividad frente a una serie de líneas endoteliales. Además la capacidad de infección de ambos virus disminuye al tratar las células con agentes lisosomotrópicos, lo cual indica que el proceso de infección es pH dependiente.

Únicamente observaron diferencias en el tropismo entre el virus Marburg y Ébola, después de tratar células HeLa con diferentes glicosidasas y proteasas que afectan el patrón de glicosilación de las proteínas y su ubicación en la membrana celular¹⁰⁴.

Para averiguar el papel de las proteínas N-glicosiladas de la superficie celular, estos autores incubaron células HeLa con tunicamicina (inhibe la N-glicosilación de las proteínas intracelulares) o con endoglicosidasa-H (excinde residuos N-glicosilados de tipo “high-mannose” en la superficie celular) en medio libre de suero, antes de la infección con los retrovirus recombinantes y tras 48h. analizaron el grado de infección con respecto al control.

Mientras que con el virus Marburg no se observó inhibición de la infección; sin embargo, el virus Ébola-Zaire pierde mas de un 90% de capacidad infectiva¹⁰⁴.

Estos resultados con inhibidores de N-glicosilación, revelan que alteraciones en los residuos N-glicosilados de las células diana parece afectar únicamente la entrada del virus EBO-GP-Z, pero no al MBG, y por tanto, los receptores celulares de ambos virus podrían ser distintos¹⁰⁴.

6.2 Toxicidad celular

6.2.1 Relación entre infección y lisis celular

La infección por filovirus, provoca en algunos tejidos como el hígado y zonas del endotelio vascular una lisis celular que puede contribuir a producir las hemorragias que sufren los pacientes en los estadios finales de la infección.

Sin embargo, el mecanismo por el cual las células son destruidas no está del todo esclarecido, aunque se sospecha que puede deberse por un lado a la propia generación y acumulación de partículas virales; al efecto citopático de la glicoproteína transmembrana (GP) o a la propia generación de citoquinas o factores inflamatorios como respuesta a la infección de determinadas células (macrófagos, monocitos y células dendríticas)⁶⁰.

6.2.2 Papel de la GP en la patogénesis

Aunque la maduración de los viriones en la membrana celular y su separación de la célula infectada pueden contribuir a la destrucción celular, diferentes estudios apuntan a que la expresión *per se* de la glicoproteína transmembrana del virus Ébola, contribuye de manera decisiva a la destrucción celular^{105,106,58}.

Los estudios realizados por Volchkov y col. demuestran que la citotoxicidad del virus Ébola depende del nivel de expresión de la glicoproteína transmembrana y por tanto el mecanismo de edición de la glicoproteína, ayudaría a evitar esa toxicidad celular¹⁰⁷.

Este fenómeno, exclusivo de las cepas Ébola se debe a que el producto mayoritario (más de un 80%) de los transcritos del gen de la glicoproteína, corresponden a la forma secretada (sGP) y no a la glicoproteína transmembrana.

Volchkov y col. construyeron un virus recombinante con una mutación que elimina el sitio de edición en el gen de la glicoproteína¹⁰⁷.

Este virus mutante mantenía la estructura tridimensional de la GP transmembrana, así como la morfología; sin embargo, no producía la forma secretada (sGP), lo cual se tradujo en un aumento de toxicidad en las células comparado con el virus natural.

La mutación en el sitio de edición de la glicoproteína no afectó a la cinética de producción de virus en los 4 primeros días, aunque a partir de ese momento, sí se observó un descenso en el número de partículas generadas debido probablemente a la muerte de las células infectadas¹⁰⁷.

Curiosamente, aunque detectaron un exceso de producción de glicoproteína transmembrana a partir de la secuencia mutada, el título viral era igual al virus natural. Esto era debido a que muchas moléculas de GP eran retenidas como precursores inmaduros en el retículo endoplásmico o en el Golgi, con un alto porcentaje de residuos glicosilados de tipo “high-mannose” que suponen un mayor gasto energético para las células y también un aumento de toxicidad.

Todas estas observaciones sugieren que las células infectadas por el virus mutante tienen una capacidad limitada para procesar tanta cantidad de GP glicosilada y por tanto la sobreexpresión de glicoproteína transmembrana (GP), puede conducir a la muerte celular por agotamiento de su maquinaria¹⁰⁷.

Otros investigadores han confirmado el efecto citotóxico que produce la glicoproteína transmembrana del virus Ébola en células endoteliales, células de laboratorio (293T) y tejido vascular, empleando vectores adenovirales recombinantes que expresan esta glicoproteína⁵⁸.

Por otro lado, los cambios morfológicos que presentan las células infectadas parecen deberse al dominio extracelular de la glicoproteína vírica y también a la propia inserción en la membrana celular, que altera la expresión y conformación de otras moléculas de membrana¹⁰⁶.

6.3 Respuesta inmune

La respuesta humoral frente a la infección por virus Marburg y Ébola puede detectarse al cabo de 7-10 días tras la infección, siendo la mayoría de los anticuerpos específicos de la glicoproteína de superficie viral¹⁰⁸.

Se ha detectado producción de anticuerpos neutralizantes en experimentos de protección inmune empleando ratones y cobayas⁵², pero estos modelos no ofrecen garantía pues es relativamente fácil lograr protección inmune en un modelo de ratón.

Actualmente, se conoce muy poco acerca de la respuesta inmune mediada por células, de tal manera que se desconoce qué componentes o factores del sistema inmune pueden proteger frente a la infección de filovirus⁶⁰.

6.4 Activación de monocitos y su papel en la patogénesis del virus Ébola

Los estudios realizados sobre la infección de células monocíticas y su implicación en la infección por filovirus, parecen indicar que éste es un fenómeno que puede contribuir a la aparición de algunos síntomas como son las alteraciones en la coagulación y el shock que sufren algunos pacientes.

Parece que la infección de los monocitos tanto en suspensión como macrófagos adherentes, provoca una activación de éstos con la subsiguiente liberación de citoquinas y quimioquinas⁴⁵.

La propia activación de los monocitos genera agregados celulares que pueden ser la causa de la formación de trombos especialmente en vénulas pequeñas, mientras que la liberación de citoquinas puede favorecer el shock⁴⁵.

Sin embargo, la activación de los monocitos a partir de la infección por filovirus, parece ser independiente de la replicación viral, es decir, que la replicación del virus no contribuiría directamente con estos síntomas.

Aunque hasta el momento no ha sido demostrado, estos autores apuntan a que determinados productos víricos, muy probablemente las diferentes formas de las glicoproteínas, pueden tener importancia en la activación de los monocitos, uniéndose a receptores de membrana y desencadenando cascadas de señalización celular⁴⁵.

7 RECEPTORES Y MECANISMOS DE ENTRADA DE LOS FILOVIRUS

El amplio espectro de células tanto humanas como de otras especies animales que son capaces de infectar los filovirus, hizo pensar a los investigadores que el receptor celular de estos virus podía ser una molécula ubicua (de amplio espectro celular) y bastante conservada entre especies, o bien que existieran diferentes receptores en diferentes células.

Conocer la naturaleza de estas interacciones entre los filovirus y el huésped, tanto a nivel celular como a nivel de organismo, es esencial antes de poder desarrollar estrategias profilácticas y terapéuticas.

7.1 Receptores y moléculas con afinidad por la envuelta de los filovirus

7.1.1 Integrinas

A partir del conocimiento del tipo de células susceptibles a la infección por filovirus y del papel que juega la glicoproteína transmembrana como mediadora en la unión y entrada en estas células^{102,103,86,101,104} se pensó que las integrinas, en especial las del grupo $\beta 1$, podían interactuar con la glicoproteína y quizás estar implicadas en el proceso de entrada del virus¹⁰⁶.

Esta hipótesis se basó en el dato de que la mayoría de las células infectadas son células adherentes, mientras que los linfocitos T en suspensión: C8166, Sup T1, MT-2 y Jurkat, no se infectan.

Se especuló que tal vez, el receptor celular/res de los filovirus, pudiera jugar un papel en la adhesión celular, quizás un miembro de la familia de las integrinas, que además está altamente conservado entre las especies de mamíferos.

Sin embargo, empleando anticuerpos neutralizantes contra un amplio rango de complejos integrina, no se observó inhibición de la infección en las líneas celulares testadas, por lo que el papel de las integrinas como posibles receptores de los filovirus no parece probable¹⁰⁴.

7.1.2 Receptor alfa del folato (FR- α)

Otra molécula que se ha propuesto como mediadora en la entrada celular del virus Marburg (MBG) y Ébola (EBO) en algunas células, es el receptor alfa del folato (FR- α)¹¹².

El receptor alfa del folato, es una proteína que se expresa en la superficie de muchos tipos de células humanas, tiene unos 38-39 kDa, se encuentra unido a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), se ha localizado en los rafts lipídicos y es el responsable de la unión e internalización del ácido fólico extracelular mediante la formación de vesículas, probablemente caveolas, aunque todavía existe controversia sobre la naturaleza del tráfico intracelular de esta molécula¹¹³.

Los estudios sobre la implicación del (FR- α) en la infección de los filovirus los llevaron a cabo Chan y col., mediante transferencia aleatoria de genes procedentes de células susceptibles en células resistentes a la infección¹¹².

Cuando los diferentes *pools* de células transfectadas se expusieron a los virus Ébola y Marburg, solamente se infectaron las que expresaban el receptor del folato¹¹². Además, para demostrar la relevancia del receptor del folato como mediador en la entrada de los filovirus, estos investigadores utilizaron anticuerpos específicos (frente al receptor del folato) y también altas concentraciones del ligando natural (ácido fólico), observando que la infección se inhibía de manera considerable, al menos en algunas líneas celulares¹¹².

Sin embargo, resultados más recientes apuntan a que el receptor del folato no actúa como receptor de filovirus sino que funciona como un co-factor en la internalización de estos virus. De entre las observaciones que se disponen y que no justifican al FR- α como receptor de filovirus caben destacar las siguientes:

No se observó una relación entre los niveles de expresión de RNA específico de la proteína FR- α en determinadas células susceptibles y los niveles de infección en esas células. Por ejemplo la línea 293T que expresa poco FR- α se infecta 20 veces más que la línea HeLa, cuya expresión de FR- α es alta¹¹⁴.

El FR- α no es estrictamente necesario para la entrada de filovirus. De hecho, existen células que no expresan esta molécula y sin embargo se infectan ; además, el bloqueo del receptor del folato en algunas células no disminuye la capacidad de internalización de las partículas víricas.

Por ejemplo, los macrófagos, presentan niveles muy bajos de RNAm específico de FR- α y sin embargo, son las primeras células “in vivo” que infectan los filovirus¹¹⁴. De igual manera, determinadas líneas de laboratorio (ej: A549) aunque no expresan FR- α , tienen niveles de infección mas altos que otras líneas (células HeLa o Cos-7) que si poseen esta molécula.

Por otro lado, el FR- α no es suficiente para mediar la infección por filovirus. Cuando se expresa esta molécula en células no susceptibles (Jurkat), éstas no adquieren la capacidad de internalización del virus. Este dato sugiere que, tal vez los filovirus necesiten de un mecanismo mas global en el que el FR- α solo contribuiría en parte a la infección¹¹⁴.

Por último, los trabajos realizados por Sinn y col , empleando células primarias de epitelio aéreo humano, apuntan a que la entrada de retrovirus recombinantes con envuelta de filovirus puede realizarse de manera independiente al receptor del folato⁹³. Las células primarias de epitelio aéreo humano, tienen una expresión abundante de FR- α , sobre todo en la zona apical que está en contacto directo con el medio aéreo. Sin embargo, el uso de fosfolipasa C y anticuerpos específicos anti-FR α , que eliminan y bloquean el receptor del folato respectivamente, no impide la infección de retrovirus recombinantes basados en el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) con envuelta del virus Marburg o Ébola⁹³.

Por tanto, a pesar de conocer el tropismo celular de los filovirus, poco se sabe sobre las moléculas y mecanismos que median la entrada del virus en las células. El hecho de que ni las integrinas ni el FR- α expliquen del todo el tropismo de estos virus, abre la posibilidad de que existan otras moléculas todavía sin explorar que puedan actuar como receptores celulares.

7.2 Mecanismos de entrada de los filovirus

7.2.1 La entrada de filovirus no parece estar mediada por fusión directa con la membrana celular.

Dependiendo de las características de la glicoproteína vírica, el proceso de entrada de los virus puede ocurrir por fusión directa con la membrana celular o mediante un proceso de endocitosis.

La glicoproteína transmembrana del virus Ébola (GP2) contiene una región hidrofóbica, altamente conservada en todas las cepas de filovirus (posición 524 a 539), que presenta un alto grado de similitud topológica con el dominio transmembrana de los retrovirus. Además, esta región presenta similitudes estructurales con la proteína del virus influenza (HA2), la cual regula la fusión de este virus con las células^{104,95} y es inducible a pH bajo.

Sin embargo, aunque existen similitudes estructurales entre el virus Ébola y otros virus de fusión¹¹⁵, todavía no existen datos experimentales que corroboren la existencia de fusión entre ambas membranas.

Por tanto, aunque el mecanismo de entrada de los filovirus en las células no ha sido del todo descrito, se piensa que este fenómeno no sucede por fusión con la membrana plasmática.

7.2.2 La liberación del material génico de los filovirus es un proceso pH dependiente

Aunque todavía no está del todo esclarecido, mas bien parece que, la internalización de las partículas víricas requiere endocitosis, siendo necesaria la acidificación de la vesícula endocítica para que el virus libere su material génico. La acidificación en estas vesículas tardías, favorecería cambios conformacionales en la glicoproteína y facilitaría la fusión de las membranas con la liberación del núcleo viral en el citoplasma de las células.

Para analizar los mecanismos que rigen el fenómeno de entrada de los filovirus en las células, Bates y col. emplearon agentes lisosomotrópicos, que evitan la acidificación de los endosomas y vesículas, y observaron una inhibición de la entrada de pseudotipos Ébola¹⁰³.

El uso de cloroquina y cloruro de amonio, bloquean la infección de aquellos virus que necesitan un pH ácido para liberar el material genético en el citosol. Por tanto, parece claro que la entrada del virus Ébola en las células es un proceso pH-dependiente¹⁰⁴.

7.2.3 Papel de los Rafts lipídicos en la infección de filovirus

Descripción de los rafts lipídicos

Los rafts lipídicos, son regiones de la membrana celular ricas en colesterol, con características físicas de naturaleza fase líquido-ordenada, poco fluidas que facilitan la movilidad tanto lateral como rotacional de las moléculas insertadas en estas regiones.

En cuanto a las características bioquímicas, los rafts lipídicos son fracciones de la membrana de baja densidad, insolubles en detergentes y que albergan una serie de moléculas muy específicas: gangliósidos, glicoesfingolípidos, proteínas ancladas a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) y proteínas señalizadoras como las kinasas de la familia Src, receptores de células T y B, y fosfolipasa C.

Debido a estas características tanto físicas como de composición, los rafts lipídicos, son zonas de la membrana que funcionan como compartimentos especializados, transformando los estímulos externos en cambios específicos dentro de la célula.

Así por ejemplo, los raft lipídicos juegan un papel muy importante en las interacciones célula-célula (estimulación de linfocitos T) y en el tráfico de membranas.

Todas estas funciones son posibles gracias a la concentración de moléculas implicadas en cada proceso^{116,117}.

Relación entre patógenos y rafts lipídicos

Además de las funciones señaladas antes, los rafts lipídicos parecen jugar un papel importante durante los fenómenos de internalización y salida de ciertos patógenos.

Por ejemplo, se ha demostrado que la infección de micobacterias en macrófagos y del virus VIH en ciertas líneas de linfocitos T, depende de la presencia de colesterol en las membranas plasmáticas, por lo que se piensa que este proceso ocurre a través de los rafts lipídicos.

Por otro lado, también se han asociado los rafts lipídicos como zonas especializadas por donde salen determinados virus. Este hecho ha sido explorado utilizando microscopía confocal, donde se ha podido co-localizar algunas proteínas de los virus influenza, sarampión, la glicoproteína B del virus HSV y VIH con determinadas moléculas específicas de los rafts lipídicos.

Relación entre rafts y filovirus

En el caso de los filovirus, parece que tanto el proceso de entrada como el de ensamblaje y salida es dependiente de los rafts lipídicos⁷⁷.

La relación entre el proceso de entrada de los filovirus y los rafts lipídicos queda de manifiesto al observar una pérdida de infectividad cuando se emplean agentes que desestabilizan la integridad de los rafts lipídicos como Filipina, Nistatina (desestabilizadores del colesterol) y metil- β -ciclodextrina (M β CD; secuestra el colesterol de las membranas)^{118,77}.

Sin embargo, no está claro si esta pérdida de infección se debe a una disminución en la capacidad de unión entre la glicoproteína y los receptores celulares o a que se afecta el mecanismo de entrada⁷⁷.

Por otro lado, la producción de partículas no replicativas con aspecto de filovirus (“virus like particles”; VLP), compuestas por la proteína de la matriz (VP40) y la glicoproteína de la envuelta (GP) del virus Ébola, ha permitido co-localizar estas proteínas virales con determinadas moléculas específicas de los rafts lipídicos.

7.2.4 Papel de las caveolas en la infección de filovirus

Descripción de las caveolas

Los virus que infectan las células a través de endocitosis mediada por receptor, pueden utilizar un mecanismo dependiente de la formación de vesículas de clatrina o un sistema de vesículas llamadas caveolas.

Morfológicamente las caveolas aparecen como invaginaciones en la superficie de la membrana celular, de aspecto variable, con forma de vesículas o de túbulos y que topológicamente pueden corresponder con compartimentos tanto endocíticos como exocíticos^{119,120}.

Las caveolas están implicadas en un amplio rango de eventos biológicos como señalizaciones trans-membrana, homeostasis del colesterol, entrada en la célula de diferentes patógenos como bacterias y virus, internalización de ligandos naturales, toxinas, transporte de moléculas a través de las células endoteliales, transcitosis, e incluso importación y liberación de moléculas en zonas específicas de la membrana^{121,122}.

Entre las moléculas que componen las caveolas destaca la proteína caveolina¹²³, el colesterol, esfingolípidos, proteínas de membrana unidas a lípidos y proteínas unidas a GPI (glucosil fosfoinositol).

A pesar de que todas las membranas plasmáticas presentan dominios con esta composición, sólo algunas células como las endoteliales, fibroblastos, adipocitos y músculo liso son capaces de formar caveolas¹¹⁹ y sin embargo, linfocitos y monocitos presentan niveles bajos de caveolina y por tanto no pueden generar caveolas¹¹⁹.

El colesterol es un componente importante en la formación de caveolas, pues se ha visto que se encuentra unido a las moléculas de caveolina, estabilizando los oligómeros de esta proteína. Por otro lado, la deficiencia de colesterol tanto inducida por agentes químicos como inherente a las propias células, impide la formación de caveolas^{124,120}.

Formación de las caveolas

Los diferentes componentes de las caveolas se ensamblan todos ellos en el aparato de Golgi. Sin embargo, mientras las proteínas unidas a GPI y la caveolina-1 vienen del retículo endoplásmico, la fracción detergente-insoluble compuesta por GSL/SPH y colesterol de las caveolas se forma en la región transitoria del aparato de Golgi, y una vez formadas las vesículas, se distribuyen a diferentes regiones de la membrana¹¹⁹.

Relación caveolas-filovirus

Para determinar si la entrada de los filovirus en determinadas células depende de la formación de caveolas, Goldsmith y col. utilizaron retrovirus recombinantes con envuelta de virus Ébola y Marburg y observaron que ciertos compuestos que inhiben de manera específica la formación de caveolas como ésteres de forbol (ej. PMA; forbol-12-miristato-13-acetato) y drogas que secuestran colesterol (filipina) o sustancias que deplecionan la producción intracelular del colesterol, provocan no sólo la desaparición de las caveolas, sino que además, inhiben la infección de estos retrovirus recombinantes¹¹³.

Además, utilizando técnicas de inmuno-tinción, estos autores pudieron colocalizar los filovirus con la proteína CAV-1, la cual es un marcador de la formación de caveolas.

Para demostrar la especificidad de este mecanismo, estos investigadores compararon los efectos de estas drogas con otros virus como el virus de la estomatitis vesicular (VSV) y el virus anfotrópico murino (A-MLV), los cuales entran en la célula mediante vesículas de clatrina y por fusión directa respectivamente, de tal manera que ninguno de estos virus perdió infectividad¹¹³.

Por otro lado, Goldsmith y col. compararon la cinética de entrada de los filovirus con respecto al VSV y al virus anfotrópico, observando que en el caso de los filovirus esa cinética de entrada era más lenta.

Al parecer, la endocitosis de ligandos por el sistema de caveolas es más lento que otros mecanismos de endocitosis. Este resultado con los filovirus, coincide con los estudios realizados con el poliomavirus SV40, el cual infecta las células mediante la formación de caveolas¹¹³.

Relación entre rafts lipídicos y caveolas

Aunque la delimitación entre el concepto de “raft lipídicos” y caveolas está todavía en discusión, existe un modelo en el cual se propone que las caveolas se forman a partir de los “raft lipídicos” mediante la polimerización activa de las caveolinas y por lo tanto, los rafts lipídicos actuarían como precursores de este sistema de endocitosis.

A pesar de estos resultados, no se puede descartar la idea de que existan otras vías distintas de entrada para los filovirus o de que las drogas empleadas para inhibir la formación de las caveolas, también impidan la entrada mediante un mecanismo independiente a la formación de caveolas.

El hecho es que la mayoría de los virus con envuelta se valen de interacciones específicas entre la glicoproteína y los receptores celulares de superficie para iniciar la infección. En este sentido, la organización de los receptores en un ambiente ordenado como son los rafts lipídicos, puede facilitar la unión del virus, y también puede ayudar a concentrar componentes del citoesqueleto y reorganizar las moléculas en este entorno, factores todos ellos que pueden ser necesarios para una infección productiva.

8 DC-SIGN; UNA NUEVA LECTINA DE TIPO C

8.1 Descubrimiento de DC-SIGN: Dendritic Cell- Specific, ICAM3-Grabbing

Nonintegrin

En el año 2000, la profesora de biología celular Yvette van Kooyk, del Centro Medico Universitario Vrije (Amsterdam) y el investigador Teunis Geijtenbeek, publicaron sendos artículos en la revista “Cell”, acerca de un receptor específico de células dendríticas, que parecía ser uno de los factores responsables del reconocimiento entre las células dendríticas y los linfocitos T, y que además presentaba una alta afinidad por la glicoproteína de la envuelta del virus VIH (gp120)^{125,126}.

Van Kooyk estaba interesada en el estudio de los receptores de adhesión celular. En concreto quería determinar qué receptor de las células dendríticas interaccionaba directamente con ICAM3 (InterCellular Adhesión Molecule3), una importante molécula de adhesión presente en linfocitos T, ya que el empleo de anticuerpos contra los supuestos receptores primarios de ICAM3 (la integrina $\beta 2$ LFA-1 y $\text{kD } \beta 2$), no se alteraba la interacción entre ICAM3 y las células dendríticas.

El receptor principal de ICAM3 en las células dendríticas resultó ser una molécula que denominaron DC-SIGN: Dendritic Cell- Specific, ICAM3-Grabbing Nonintegrin¹²⁵.

Sin embargo, esta molécula ya había sido descubierta ocho años atrás por un equipo de investigadores de Bristol-Myers Squibb (BMS), que estaban interesados en encontrar receptores humanos con afinidad por gp120 (la glicoproteína de la envuelta del VIH). Estos investigadores lograron aislar esta molécula, a partir de un *screening* de una librería de cDNA de placenta, y mediante análisis de su secuencia de aminoácidos, vieron que se trataba de una lectina de tipo C de unos 44 kDa¹²⁷.

8.2 Lectinas

8.2.1 Aspectos generales de las lectinas

Aunque el término “lectina” se empleó para definir aglutininas que podían discriminar distintos tipos de células de la serie roja, hoy en día este término se utiliza en un sentido más amplio e incluye a aquellas proteínas de distinto origen, que tienen la capacidad de unir azúcares, independientemente de su capacidad para aglutinar células.

Las lectinas son moléculas muy ubicuas, se pueden encontrar en plantas, virus, microorganismos y animales.

Aunque todas las lectinas comparten la propiedad de unirse o interactuar de manera específica a determinadas estructuras azucaradas, sus funciones en los distintos organismos no son las mismas.

8.2.2 Especificidad de las lectinas

La especificidad que muestra cada tipo de lectina hacia un carbohidrato en concreto es tan alta que incluso oligosacáridos con idéntica composición de azúcares, pueden ser distinguidos o separados por diferentes lectinas.

Algunas lectinas se unen únicamente a estructuras que contienen manosa o glucosa, mientras que otras sólo reconocen residuos de galactosa.

Otras lectinas necesitan que el azúcar en cuestión este localizado en una posición terminal y de manera no reducida, mientras que otras lectinas pueden reaccionar con cualquier residuo de la cadena de oligosacáridos.

Algunas lectinas discriminan entre las diferentes formas anoméricas que pueden adquirir los azúcares, e incluso pueden requerir una secuencia determinada de azúcares para unirse a ellos.

La afinidad entre las lectinas y su receptor, puede verse alterada por cambios pequeños de carbohidratos en la estructura del receptor.

Todas estas propiedades tan peculiares de las lectinas, hacen posible que los investigadores puedan discriminar entre estructuras parecidas, aislar un determinado glicoconjugado, célula o virus a partir de una mezcla, o estudiar un proceso concreto.

8.2.3 Lectinas de tipo-C

Las lectinas de tipo-C son lectinas animales dependientes de calcio que tienen la capacidad de unirse a carbohidratos.

La actividad de unión a los carbohidratos depende de la función del dominio de reconocimiento al carbohidrato (CRD) cuya estructura está altamente conservada en esta familia de lectinas.

El calcio no sólo está implicado en la unión al carbohidrato, sino que además contribuye al mantenimiento estructural de este dominio de la lectina, que es esencial para su actividad.

8.2.4 Clasificación de las lectinas de tipo-C

Existen dos grandes grupos de lectinas de tipo-C:

- aquellas que son solubles y que son secretadas por las células
- lectinas transmembrana, cuya función más característica es el reconocimiento entre células, adhesión entre células y captación de moléculas hacia el interior celular.

8.3 Estructura molecular de DC-SIGN

Tiene un tamaño de aproximadamente 1.3 kilobases, que corresponde con una proteína de 404 aminoácidos y con un valor de $M_r=45.775$.

Se pueden distinguir 3 dominios distintos en la molécula:

-La región más cercana al extremo amino-terminal, contiene una zona hidrofóbica de 21 aminoácidos, desde Gly⁴¹ hasta la Ser⁶¹, la cual parece ser la zona transmembrana de la proteína.

-Región de repetición en tandem; está constituida por los aminoácidos ubicados entre la Ile⁷⁷ y la Val²⁴⁹. Esta región está constituida por una secuencia de 23 aminoácidos que se repite 7 veces de manera completa más otra repetición incompleta.

-Zona más alejada al extremo N-terminal, que comprende los aminoácidos ubicados entre los aminoácidos Cys²⁵³ y Ala⁴⁰⁴.

Esta región presenta una alta homología con otras lectinas de tipo C como son la lectina hepática de pollo, receptor de IgE de baja afinidad, receptores de asialoglicoproteínas humanas H1 y H2, receptor de células Kupffer de rata y el receptor de manosa de macrófago humano.

Por ejemplo, con la subunidad H1 del receptor de la asialoglicoproteína existe un 50% de identidad y un 39% con la proteína de unión a manosa de suero de rata (MBP-A)¹²⁸.

Además está presente el motivo formado por los aminoácidos: Trp-Asn-Asp, que es típico de todas las lectinas de tipo C.

Esta zona más terminal de la molécula de DC-SIGN contiene el dominio CRD (aminoácidos 267-381), (carbohydrate recognition domain) por ser la región de la lectina que presenta afinidad por carbohidratos.

Todos estos datos hacen pensar que se trata de una lectina de tipo II, es decir, una proteína transmembrana que está orientada en la membrana celular de tal manera que su extremo N-terminal se localiza en el citoplasma y la región con actividad lectina, que es la región Carboxi-terminal está en el exterior celular¹²⁷.

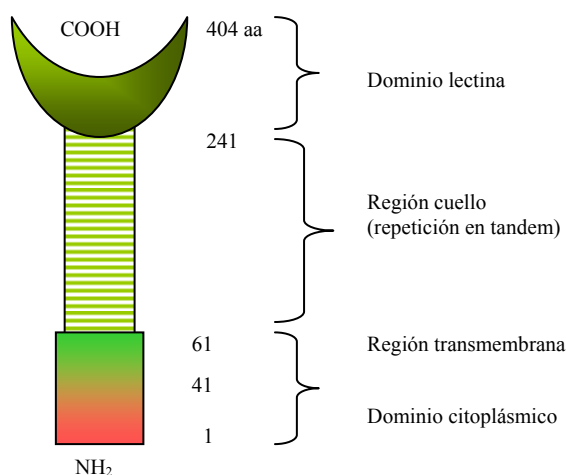


Figura 13.

Estructura de la lectina de tipo C: DC-SIGN

8.4 Conformación de la región lectina

Empleando un modelo tri-dimensional de la región lectina, Geijtenbeek y col. analizaron la conformación de la proteína, encontrando que ésta parece tener un aspecto globular con diferentes estructuras secundarias de los aminoácidos. Existen 12 regiones con plegamiento de tipo lámina β , 2 regiones con conformación en α -hélice y 3 uniones disulfuro¹²⁸.

El núcleo de la proteína estaría formado por las regiones en forma de lámina β (β -strands), que se asociarían para formar 3 láminas (3 β -sheets) y a cada lado de este núcleo se localizarían las regiones en forma de α -hélice.

Existe una zona en forma de bucle que sobresaldría de la superficie de la proteína, la cual forma parte de los sitios de unión a calcio (Ca^{2+}), llamados sitio 1 y sitio 2.

El calcio es esencial para la actividad de las lectinas de tipo C, y DC-SIGN contiene dos iones calcio en 2 sitios diferentes, siendo el sitio 2 el lugar de unión a los ligandos.

El calcio del sitio 1 (sitio auxiliar), estaría localizado en la parte opuesta del bucle proteico. Parece que los residuos de Asp 320, Glu 324, Asn 350 y Asp 355 están implicados en la unión a este calcio. Mutaciones de estos aminoácidos por Ala, resultan en una pérdida de la unión a los ligandos de DC-SIGN, así como la pérdida de unión al propio ión calcio, aunque la estructura de la molécula no se altere en gran medida.

Probablemente este calcio del sitio 1 es necesario para el posicionamiento correcto del bucle proteico¹²⁸.

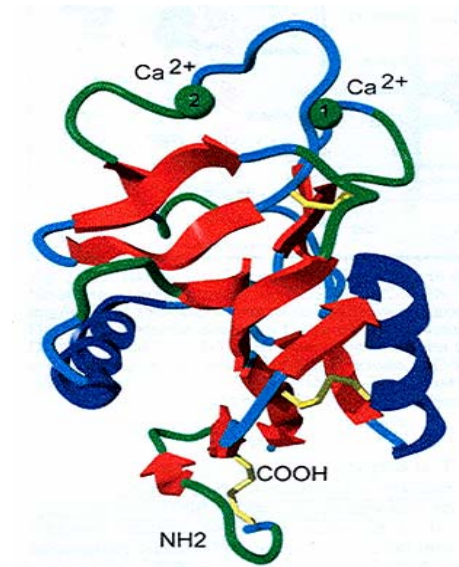
El calcio del sitio 2 estaría rodeado por los aminoácidos Glu 347, Asn 349, Glu 354 y Asn 365 que interaccionarían con éste a través de los grupos carbonilos.

Esta región parece estar directamente relacionada con la interacción entre DC-SIGN y sus ligandos.

Para confirmar esta hipótesis, Geijtenbeek y col. realizaron mutaciones de estos aminoácidos (Glu 347 Gln, Asn 349 Asp, Asn 365 Asp), y observaron una pérdida total de unión de ICAM-3 y gp120 a DC-SIGN, a pesar de que la integridad estructural de la lectina se mantiene y la unión al ión calcio no se afecta.

Por otro lado, el aminoácido Asp 366 intervendría en la unión al calcio, pero no en la interacción con los ligandos¹²⁸.

Figura 14.
Conformación de la región lectina de DC-SIGN
 Se observan los dos iones calcio que forman parte de la molécula.



8.5 Especificidad de DC-SIGN por carbohidratos

Para determinar la especificidad de la unión de esta lectina con los residuos de azúcar, Weis y col. generaron estructuras cristalinas a partir del dominio de reconocimiento a carbohidratos (CRD) de la lectina unida a un pentasacárido¹²⁹.

DC-SIGN y su homólogo DC-SIGN-R (L-SIGN), son lectinas que reconocen de manera específica oligosacáridos de tipo “high-mannose”. En concreto, DC-SIGN y L-SIGN reaccionan con estructuras de manosa interna, lo cual resulta en una unión de alta afinidad¹²⁹.

Este patrón de reconocimiento, difiere de otras lectinas de tipo C, como por ejemplo la proteína de unión a manosa (MBP), la cual, reconoce manosas o residuos de NacGlc, situadas en la zona terminal¹²⁹.

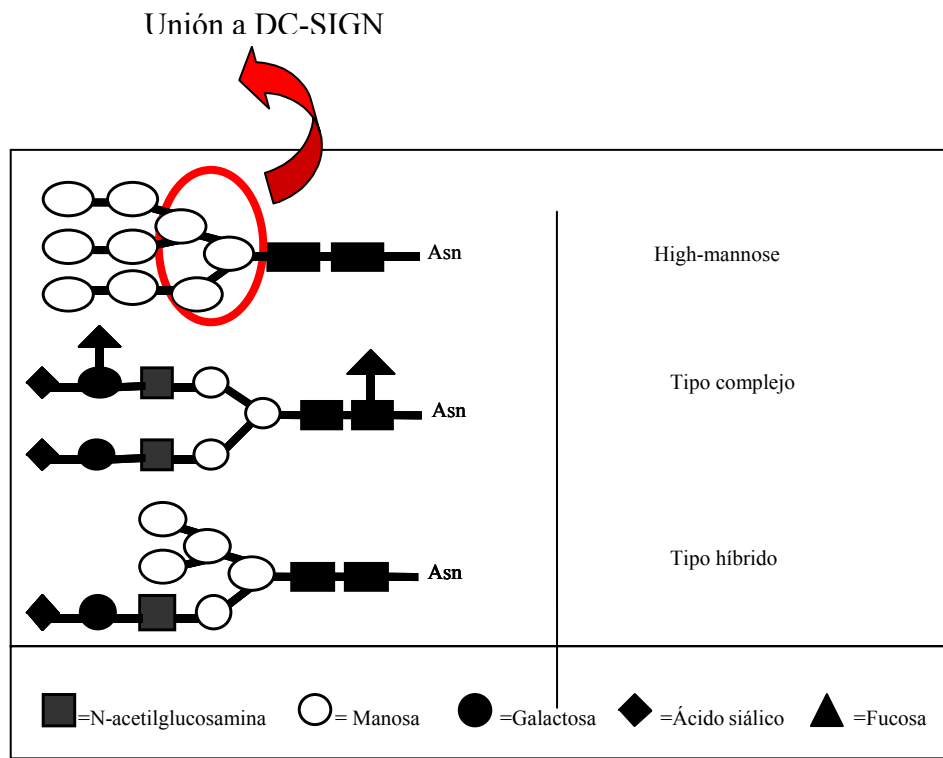


Figura 15.

DC-SIGN reconoce residuos de manosa internos de estructuras glicosiladas tipo “high-mannose”
Representación de los distintos residuos N-glicosilados que puede contener una glicoproteína.

8.6 Localización cromosómica de DC-SIGN

El gen de DC-SIGN se localiza en el cromosoma 19p13, en una región que abarca unos 30kb., y cerca de esta secuencia se encuentran los genes de L-SIGN y otra lectina de tipo C CD23, los cuales forman un cluster.

8.7 Expresión de DC-SIGN *in vivo*

DC-SIGN se expresa exclusivamente en células dendríticas tanto inmaduras como maduras, pero no se ha encontrado ni en monocitos (activados o no), líneas celulares monocitarias, granulocitos, células T y B (activados o no), timocitos y células de médula osea CD34⁺¹²⁶.

En estudios donde se analiza la expresión de DC-SIGN, CD4 y CCR5 en las células dendríticas de la mucosa del útero y recto y se observó que la mayoría de las células dendríticas DC-SIGN positivas, coexpresaban CD4 pero no CCR5¹²⁵.

8.8 L-SIGN; lectina relacionada con DC-SIGN, aislada de hígado y nódulos linfáticos

L-SIGN tiene un 73% de identidad con DC-SIGN a nivel de ácidos nucleicos y un 77% de identidad en la secuencia de aminoácidos¹³⁰.

La alta homología entre estas dos moléculas y su cercanía física en el cromosoma 19p13 parece indicar que se trata de una replicación reciente del gen original¹³⁰.

L-SIGN se expresa mayormente en células sinusoides del hígado y en nódulos linfáticos, pero no en células dendríticas como su homólogo DC-SIGN, por este motivo Bashirova y col. denominaron a esta lectina L-SIGN (liver / lymph node – specific ICAM-3- grabbing nonintegrin).

L-SIGN se comporta de manera similar a DC-SIGN, de tal modo que presenta una alta afinidad por ICAM-3, es capaz de capturar el virus VIH mediante su unión a gp120 y facilita la infección de células T en trans¹³¹.

Sin embargo, existen ciertas diferencias entre DC-SIGN y su homóloga.

L-SIGN únicamente presenta en la región citoplásmica la secuencia dileucina L₁₄L₁₅, como posibles lugares implicados en la internalización y reciclado de la lectina, y por tanto, a diferencia de DC-SIGN, carece de la secuencia YKSL.

Por otro lado, la especificidad de reconocimiento de L-SIGN parece estar restringida a estructuras de tipo “high-mannose”, mientras que DC-SIGN también puede interactuar con residuos glicosilados de tipo Lewis¹³².

9 FUNCIONES PROPUESTAS DE LA LECTINA DC-SIGN

9.1 Introducción. Función de las células dendríticas en el sistema inmune

Las células dendríticas cumplen una función muy importante en la activación de la respuesta inmune, ya que tienen la capacidad de capturar patógenos y antígenos, procesarlos de manera muy eficiente en los endosomas y lisosomas y posteriormente presentarlos como parte de los complejos MHCII a los linfocitos T.

Estas células presentadoras de antígeno (APC) se localizan en los tejidos periféricos como la piel y la mucosa y tras la captura de los antígenos, migran hasta los órganos linfoides secundarios donde se encuentra la mayoría de las células T.

A medida que viajan, las células dendríticas maduran y esto implica un cambio en el patrón de proteínas de superficie, de tal manera que la captación de antígenos cesa y los complejos de péptidos-MHC se redistribuyen desde los orgánulos intracelulares hacia la superficie de las células para poder interactuar con las células T y presentarle dichos antígenos.

9.2 Papel inmunológico de DC-SIGN

9.2.1 Papel de DC-SIGN en la interacción entre células dendríticas y linfocitos T a través de ICAM-3

El conocimiento de cómo se establece y regula el primer contacto entre las células dendríticas y los linfocitos T, así como el mecanismo de activación de los linfocitos, es todavía un proceso que hoy en día no se conoce bien, sin embargo, gracias a los estudios de Geijtenbeek y col., parece que la lectina DC-SIGN estaría implicada en este proceso, mediante su unión a la molécula linfocitaria ICAM-3¹²⁶.

Según los trabajos de Montoya y col., ICAM-3, una molécula que se expresa en grandes cantidades en linfocitos T en reposo, parecía ser importante en el establecimiento de los primeros contactos entre el linfocito T y la célula dendrítica¹³³; de hecho, estos autores demostraron que ICAM-3 es concentrada (“clustering”) en las regiones de contacto entre los linfocitos y las células dendríticas.

Aunque en un principio se pensó que el receptor de ICAM-3 en la célula dendrítica podía ser una integrina de tipo $\beta 2$ como por ejemplo: LFA-1 o bien LFA-3, trabajos posteriores desmienten esta hipótesis.

Por ejemplo, LFA-1 es inactiva en la célula dendrítica y únicamente después de la activación interacciona con ICAM-3 de manera muy débil. Además cuando se emplean anticuerpos anti LFA-1 únicamente se inhibe parcialmente la interacción entre células dendríticas y linfocitos T, por tanto el papel de LFA-1 como mediador en la unión de células dendríticas a los linfocitos T a través de ICAM-3, no parece ser muy relevante¹²⁶.

En la búsqueda de posibles receptores de ICAM-3 en la célula dendrítica, Geijtenbeek y col. observaron que la interacción entre las células dendríticas e ICAM-3 es un mecanismo que dependía de Ca^{2+} , pues el uso de agentes quelantes como el EDTA o el EGTA alteran esta interacción y que además, la relación entre ICAM-3 y su receptor en la célula dendrítica es específica pues al emplear anticuerpos anti ICAM-3, no hay unión entre ambas células.

En experimentos de inhibición se observó que el manano era el inhibidor más potente : $IC_{50}=1mM$ y bloqueaba la unión con ICAM-3 tan eficazmente como los anticuerpos anti DC-SIGN¹²⁶.

Por este motivo, Geijtenbeek y col. concluyeron que la interacción entre las células dendríticas e ICAM-3 es un mecanismo independiente de integrina y denominaron a esta nueva molécula presente en las células dendríticas DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific, ICAM3-Grabbing Nonintegrin¹²⁵, pues es capaz de actuar como receptor de ICAM-3 y mediar así la unión entre células dendríticas y linfocitos T.

Estudios posteriores muestran que DC-SIGN se une con mayor afinidad a ICAM-3 soluble que LFA-1, con una IC_{50} de $7\mu g/mL$, siendo además totalmente activa en las células dendríticas.

La importancia de la unión entre DC-SIGN e ICAM-3 para permitir el contacto inicial entre células dendríticas y células T, se pone de manifiesto al usar anticuerpos anti DC-SIGN, para inhibir la proliferación de células T en reposo inducidas por células dendríticas¹²⁶.

9.2.2 DC-SIGN interviene en la migración de células dendríticas hacia los tejidos.

Para la correcta activación del sistema inmune, las células dendríticas migran a los órganos periféricos para reponer las propias células dendríticas y también en respuesta a factores inflamatorios.

Esta migración desde la sangre a los tejidos es un proceso sumamente regulado y en él, juega un papel muy importante el tipo de interacción que establezcan las células dendríticas con el endotelio de los vasos sanguíneos.

Según los trabajos de Geijtenbeek y col., la interacción entre las células dendríticas y las endoteliales se realiza por medio de la unión entre DC-SIGN e ICAM-2, una integrina que se expresa de manera constitutiva en las células endoteliales, tanto en vasos sanguíneos como en vasos linfáticos¹³⁴.

Como demuestran estos autores, bajo circunstancias fisiológicas, parece que la interacción entre DC-SIGN e ICAM-2 es importante en los procesos de adhesión de las células dendríticas al endotelio, facilitando el transvase de las células dendríticas a través de esta barrera celular y posterior migración¹³⁵.

9.3 DC-SIGN funciona como receptor de antígenos.

La célula dendrítica, como célula presentadora de antígenos, dispone de una serie de moléculas receptoras en membrana que le permiten endocitar diferentes antígenos, procesarlos y presentarlos a los linfocitos T.

Entre estas moléculas receptoras de patógenos están las lectinas de tipo C como el receptor de manosa (MR), DEC-205, BCDA-2 y DC-ASGPR, además de la lectina DC-SIGN.

Engering y col. estudiaron la capacidad de DC-SIGN de actuar como receptor endocítico¹³⁶, observando que esta lectina es rápidamente internalizada en las células dendríticas tras la unión a sus ligandos, y que los ligandos son dirigidos hacia endosomas o lisosomas, donde son procesados y presentados como parte de los complejos MHCII.

Además empleando mutantes de la lectina que pierde parte de la zona citoplásmica donde se supone se localizan los dominios de reconocimiento para la internalización de la lectina, se observa una pérdida considerable de capacidad endocítica; por tanto, DC-SIGN no solo funciona como molécula de adhesión sino que también juega un importante papel como receptor de antígenos al igual que otras lectinas de tipoC.

9.4 Papel de DC-SIGN en la infección por VIH

9.4.1 DC-SIGN presenta afinidad por gp120

Aparte de los propios receptores y co-receptores del VIH (CD4 y CCR5/CXCR4), se han descrito otras moléculas que tienen afinidad por gp120 (la glicoproteína de la envuelta del VIH), entre las cuales está la heparin sulfato proteoglicano de membrana , LFA (linphocyte function asociated) y moléculas de adhesión intercelular (ICAM); todos ellos importantes no tanto en el proceso de entrada celular sino mas bien implicados en el mecanismo de diseminación de este virus.

En la búsqueda de nuevas moléculas con afinidad por gp120, fue que Curtis y col. identificaron una nueva lectina de tipoC a partir de una librería de cDNA de placenta humana¹²⁷ demostrando además que dicha molécula era capaz de unirse tanto a cepas M como T con valores de afinidad mas altos incluso que los observados entre gp120 y su receptor CD4 ($K_d=1.7 \pm 0.4$ nM) y que dicha unión era específica pues se podía inhibir con diferentes compuestos, entre ellos manano¹²⁷.

Otros grupos de investigación, han demostrado que DC-SIGN es capaz de interaccionar tanto con VIH-1, 2 y SIV¹³⁷.

9.4.2 DC-SIGN como “trans” receptor del virus VIH

A pesar de que la célula diana del virus VIH es el linfocito T, esta célula necesita estar en estado de activación para permitir una infección replicativa del virus. Esta activación de los linfocitos T, ocurre gracias a la interacción con las células dendríticas, lo cual explica por qué, únicamente las células dendríticas son capaces de inducir niveles altos de infección en los linfocitos T después de co-cultivar estos dos tipos celulares junto con el VIH-1¹³⁸.

Sin embargo, los mecanismos moleculares que posibilitan que la célula dendrítica aumente la infección por VIH de los linfocitos eran desconocidos hasta que se asoció la afinidad de la lectina DC-SIGN por gp120 y su papel inmunológico en la activación de los linfocitos.

Gracias a los trabajos desarrollados por Geijtenbeek y van Kooyk, estos autores proponen que la lectina DC-SIGN es capaz no sólo de capturar el virus VIH-1, sino también de promover la infección de células susceptibles, las cuales expresan CD4 y el receptor de quimoquinas apropiado¹²⁵.

Esta infección de células susceptibles, se denomina infección en “trans”, pues el virus no infecta directamente al linfocito sino que es presentado a través de una célula intermediaria.

El mecanismo por el cual DC-SIGN promueve una infección eficiente en trans de células susceptibles es todavía incierto.

Una hipótesis es que la unión de la glicoproteína a DC-SIGN pueda inducir cambios conformacionales en gp120 que aumenten la interacción con el receptor CD4 y/o los receptores de quimoquinas y favorecer así la fusión con las células T.

Otra posibilidad es que DC-SIGN actúe concentrando los virus en la superficie de las células dendríticas y aumente así la probabilidad de que la entrada va a ocurrir después de la unión a CD4 y co-receptores en los linfocitos T.

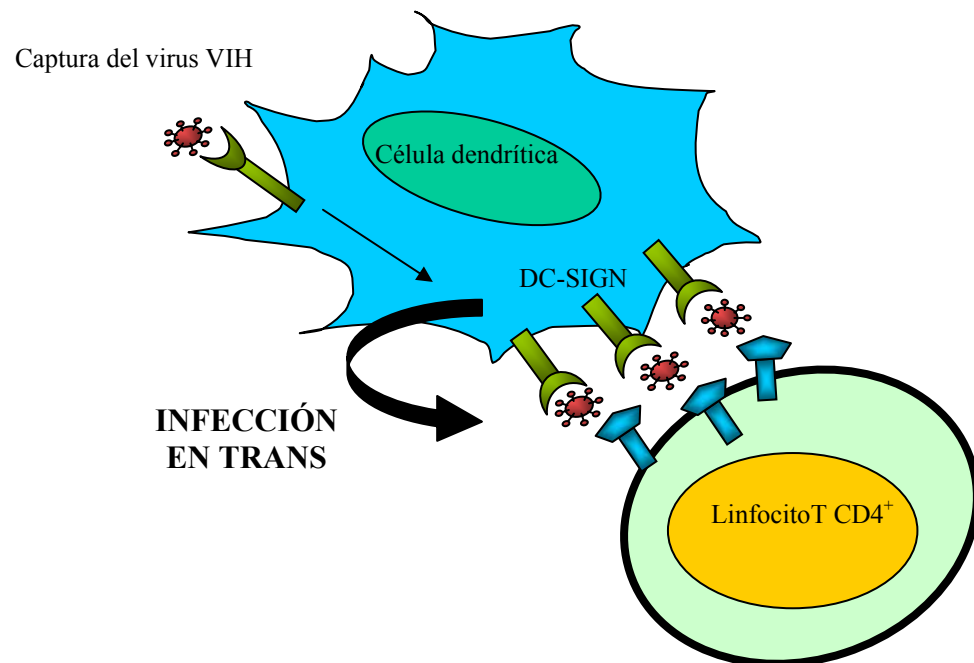


Figura 16.

Esquema de infección en “trans” por VIH, de linfocitos T mediado por DC-SIGN.

Datos experimentales que avalan a DC-SIGN como “trans” receptor del virus VIH

-Empleando líneas de laboratorio, Geijtenbeek y col. demostraron que la expresión de DC-SIGN en células heterólogas (THP-DC-SIGN), facilita tanto la captura de VIH (independientemente de CD4 y CCR5) como la transmisión de éstos a células permisivas¹²⁵.

La captura del VIH-1 es DC-SIGN dependiente, pues anticuerpos anti DC-SIGN, inhiben la infección del virus y las células THP-DC-SIGN negativas, son incapaces de capturar y transmitir el virus¹²⁵.

Además, demuestran que la infección de las células diana, mediada por DC-SIGN es independiente de la interacción entre DC-SIGN e ICAM-3, pues esta línea diana, carece de esta molécula¹²⁵.

-Por otro lado, estos mismos autores han demostrado que la lectina DC-SIGN, no media la infección del VIH, es decir, que no se comporta como un receptor para este virus.

En este caso, también utilizaron líneas de laboratorio, y únicamente detectaron replicación viral (p24 en los sobrenadantes) en los cultivos de células 293T-CD4-CCR5, mientras que los cultivos de células 293-DC-SIGN no contenían p24 en el sobrenadante, indicando que el virus no puede utilizar esta lectina como receptor celular¹²⁵.

Todos estos datos indican que esta lectina no forma un complejo con estas moléculas; por tanto, DC-SIGN no puede sustituirse por CD4 ó CCR5 en el proceso de entrada del virus VIH-1¹²⁵.

-Sin embargo, aunque DC-SIGN no parece funcionar como un receptor para el HIV, es capaz de protegerlo de la degradación celular¹²⁵.

Empleando esferas fluorescentes recubiertas de la glicoproteína gp120, estos investigadores observaron que durante un tiempo de 60 horas, estas esferas son capaces de mantenerse unidas a las moléculas de DC-SIGN.

Además, comprobaron que el virus VIH una vez unido a DC-SIGN, mantiene su capacidad infectiva incluso después de largos periodos de cultivo.

Por el contrario, el virus no unido a DC-SIGN, pierde su infectividad al cabo de un día¹²⁵.

- Pohlmann y col. empleando mutantes de DC-SIGN que carecen de parte de la región lectina o secuencias que se localizan en el cuello de la molécula (zonas de repetición), demostraron la importancia de estas regiones para la unión al virus VIH y su transmisión a las células permisivas¹³⁷.

-Por otro lado, parece que los sitios de unión de DC-SIGN a gp120 e ICAM-3 son diferentes, lo que permitiría a la lectina desarrollar dos funciones al mismo tiempo, por un lado unir el virus VIH y por otro lado activar al linfocito T para presentar el virus y facilitar la infección¹³⁹, sin embargo, esta hipótesis no ha sido confirmada.

-Otros investigadores utilizando microscopía confocal han observado una concentración tanto de partículas VIH, como moléculas receptoras y co-receptoras en la zona de conjunción entre la célula dendrítica y los linfocitos T; que podría facilitar la transmisión del virus¹⁴⁰.

La demostración de que DC-SIGN por si sola es capaz de transmitir los virus VIH a células susceptibles empleando líneas celulares que expresan esta lectina, no excluye la posibilidad de que in vivo, las células dendríticas por su naturaleza como APC posean otros receptores o mecanismos que posibiliten esta función de manera asociada o independiente a DC-SIGN^{141,142}.

De hecho, trabajos recientes apuntan a que el papel de DC-SIGN no es absolutamente imprescindible, pues cuando se bloquean las lectinas de tipo C incubando las células dendríticas con manano, no se pierde ni la capacidad de unir partículas de VIH ni tampoco se ve inhibida la capacidad de infección en “trans” de los linfocitos¹⁴³.

9.4.3 DC-SIGN como vehículo para diseminar el virus VIH

El descubrimiento de la lectina DC-SIGN como parte activa en el proceso de activación de linfocitos T, junto a su capacidad de unión a gp120, así como su capacidad para transmitirlo a células susceptibles, llevaron a los investigadores van Kooyk y Geijtenbeek a formular un modelo de infección in vivo, mediante el cual ambos procesos: la activación de linfocitos y la infección por VIH está mediada por la misma molécula: DC-SIGN.

Según este modelo, el virus VIH utilizaría las células dendríticas como “vehículo” para diseminarse desde las zonas de contacto (mucosas, etc) hasta las células diana (linfocitos T activados) que se encuentran en los órganos linfoides secundarios.

Esta hipótesis explicaría cómo el virus es capaz de infectar las células CD4⁺-T, cuando este tipo de células no están casi presentes en los lugares o zonas por donde el virus entra al organismo humano.

9.5 Relación entre DC-SIGN, otros patógenos y respuesta inmune

Gracias a la identificación de las estructuras glicosiladas que es capaz de reconocer DC-SIGN, diferentes investigadores han analizado la posible participación de esta lectina en el proceso de reconocimiento entre la célula dendrítica y otros patógenos distintos del VIH.

De esta manera se ha demostrado que el citomegalovirus (CMV) es capaz de infectar las células dendríticas a través de su unión a DC-SIGN. Además, de manera similar a lo observado con el VIH, DC-SIGN, sería capaz de transmitir las partículas virales a otras células permisivas¹⁴⁴.

En cuanto a la relación entre la infección por CMV y respuesta inmune, parece que la infección por este virus provoca una inmunosupresión debido a que el propio virus interfiere en la función de la célula dendrítica y como consecuencia el CMV es capaz de prolongar su patogénesis en el tiempo.

Otros estudios muestran cómo diferentes patógenos: Hepatitis C¹⁴⁵; *Leishmania*^{146,147}; virus Dengue^{148,149} y *Mycobacterium tuberculosis*¹⁵⁰, y la levadura *Candida albicans*¹⁵¹ tienen capacidad de unirse a la lectina DC-SIGN gracias a la presencia de estructuras de tipo high-manosa en la superficie de estos agentes.

En el caso de la micobacteria, la célula dendrítica no es la principal diana de infección, pero se cree que la interacción de esta bacteria con las células dendríticas es crítico para el desarrollo de una respuesta inmune que ayudaría a la micobacteria a prolongar su estancia en el huésped.

Por otro lado, también se ha observado una interacción específica entre la lectina DC-SIGN y estructuras como el lipopolisacárido (LPS) de la bacteria gram positiva *Helicobacter pylori* y el parásito *Schistosoma mansoni*¹⁵², aunque en estos dos casos la estructura glicosilada que presentan estos patógenos es el antígeno de grupo sanguíneo Lewis, el cual en vez de manosas contiene fucosas en su composición.

JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

La identificación de la lectina DC-SIGN y su implicación en la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), hizo que muchos grupos de trabajo dirigieran sus estudios a caracterizar las particularidades de esta lectina y la base de su especificidad en la unión al virus VIH.

Gracias a estudios de cristalografía se pudo determinar el tipo de azúcares que reconoce DC-SIGN, encontrando que los residuos de manosa son los más afines a la lectina. Además el reconocimiento de DC-SIGN por manosas depende de la disposición espacial de estos azúcares en una estructura denominada “high mannose”, poco frecuente en moléculas de origen humano pero habitual en patógenos como virus, bacterias y parásitos unicelulares.

La especificidad de DC-SIGN por azúcares “high mannose”, hizo sospechar que otros patógenos, entre ellos los filovirus, podían ser potenciales ligandos de la lectina DC-SIGN.

De hecho, la glicoproteína del virus Ébola, presenta 18 potenciales residuos de N-glicosilación, y comparte muchas características con la glicoproteína del VIH; se dispone en forma de trímeros, con una porción proteica extracelular (GP1 en el virus Ébola vs. gp120 en el VIH) y otra subunidad anclada a la membrana lipídica (GP2 en el virus Ébola vs. gp41 en el VIH).

A pesar de que los filovirus son agentes infecciosos que causan alta tasa de mortalidad, los científicos han desarrollado estrategias que permiten analizar algunos aspectos de la patogénesis de los filovirus de manera más segura.

En este sentido, la técnica del pseudotipado viral ha sido ampliamente utilizada, y a permitido analizar tanto el tropismo de los filovirus como los mecanismos celulares que están implicados en la infección sin necesidad de emplear el virus natural.

Los retrovirus recombinantes contienen las glicoproteínas de la envuelta viral y por tanto son capaces de interactuar con las células susceptibles a la infección.

Esta técnica permite buscar y caracterizar qué moléculas de superficie celular son capaces de reconocer e internalizar el virus Ébola. Este conocimiento, es de vital importancia no solo para entender la patogénesis del virus sino para poder desarrollar estrategias que impidan la infección y diseminación del patógeno.

Por tanto, basándonos en la composición y estructura de la envuelta del virus Ébola y por otro lado, a la identificación de la lectina de tipo C: DC-SIGN y su especificidad en el reconocimiento de estructuras glicosiladas, la presente tesis se plantea el estudio de la interacción entre la lectina DC-SIGN y el virus Ébola.

Más concretamente, se pretende analizar si la lectina DC-SIGN y su homóloga L-SIGN son capaces de reconocer y unirse al virus Ébola, estudiar la implicación de estas lectinas en el proceso de infección del virus y caracterizar la naturaleza de esta interacción para poder emplear compuestos que inhiban de manera específica la unión y entrada del virus Ébola a través de estas lectinas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos del presente estudio serían:

1. Estudiar la capacidad de unión de las lectinas DC-SIGN y L-SIGN a la glicoproteína del virus Ébola.
2. Caracterizar la naturaleza de la interacción entre DC/L-SIGN y el virus Ébola.
3. Analizar la implicación funcional de la lectina en la patogénesis del virus Ébola.
4. Estudiar la capacidad inhibitoria de diferentes moléculas en el proceso de infección del virus Ébola.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Líneas celulares:

1.1 Líneas en suspensión

- Jurkat T, es una línea humana de leucemia T¹⁵³.
- U937 es una línea humana derivada de linfoma histiocítico¹⁵⁴.
- K562-DC-SIGN es una línea eritroleucémica humana que expresa de manera estable la lectina de tipo C; DC-SIGN (cedida por el doctor Angel Corbí; CIB,CSIC, Madrid).
- Namalwa¹⁵³.
- Jurkat-Dectin-1; cedidas por el Hospital de La Princesa, Madrid.

Estas células se mantuvieron con RPMI-1640 completo a una concentración de 2.5×10^5 células por mL de medio.

1.2 Líneas adherentes

- 293 T, es una línea derivada de 293 procedente de riñón embrionario humano inmortalizada con la proteína adenoviral E1A con el antígeno mayor T del virus del simio 40 (SV 40).
- HeLa, procedente de carcinoma de cervix humano¹⁵⁵.
- HOS-fusina¹⁵⁶.

Para mantener estas células, se utilizó medio Dubelcco completo.

Todas las líneas celulares se cultivaron en un incubador humidificado, a 37°C con un 5% de CO₂.

Medios de cultivo

RPMI-1640 (Bio Whittaker, Walkersville, MD) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS, #10099-141, Bibco BRL, Gaithesburg, MD) inactivado a 56°C durante 30 minutos, L-glutamina 2mM (Bio Whittaker) y 50µg/ml de gentamicina (#17-528Z, Bio Whittaker).

DMEM (BioWhittaker Europe) Medio Dubelcco modificado por Eagles con 4.5 g/l de glucosa sin glutamina suplementado con 10% de suero bovino fetal, inactivado por calor, gentamicina (50µg/ml) y L-glutamina (2mM).

2 Obtención de PBMCs

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron a partir de *buffy-coats* frescos procedentes de donantes sanos.

Sobre 20ml de Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Suecia) se depositó lentamente 20ml de sangre y se sedimentó a 2000 rpm durante 30min.

Las células de la interfase (línea blanca) se recolectaron y se lavaron 5 veces en PBS 1x a 1000 rpm durante 5 minutos a 18-20°C.

2.1 Diferenciación a células dendríticas

Para diferenciar las células monocíticas hacia células dendríticas, se resuspenden en medio de cultivo RPMI-1640 completo, y se distribuyen en una placa de 6 pocillos (Falcon, Becton Dickinson, #3046).

Tras incubar las células durante 1 hora en incubador húmedo (sólo los monocitos se adhieren al plástico), se lavó con PBS 1x y se resuspendieron en 3ml/pocillo de RPMI suplementado con 10% suero bovino fetal y las citoquinas GM-CSF (200 ng/ml) e IL-4 (10ng/ml) (Peprotech, Rocky Hill, NJ).

Dos días después, se añaden de nuevo estas citoquinas y al quinto día desde que se inició el proceso ya se tiene una población de células dendríticas inmaduras.

2.2 Diferenciación a linfocitos

Para diferenciar las células monocíticas hacia linfocitos, se resuspendieron las células a razón de 10^6 /ml en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal, PHA (5µg/mL; DIFCO) e IL-2 (100U/mL; Boehringer Mannheim).

3 Plásmidos:

pNL4.3 lucR⁻E⁻

pNL4.3 lucR⁻E⁻ (Dr. Nathaniel Landau, AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH), es un clon proviral de ciclo único de replicación que posee dos cambios de marco de lectura (5' Env y Vpr aa 26) que hacen que no exprese ni el gen de la envuelta ni la proteína Vpr. Contiene además el gen de la luciferasa de luciernaga en lugar de *nef*.

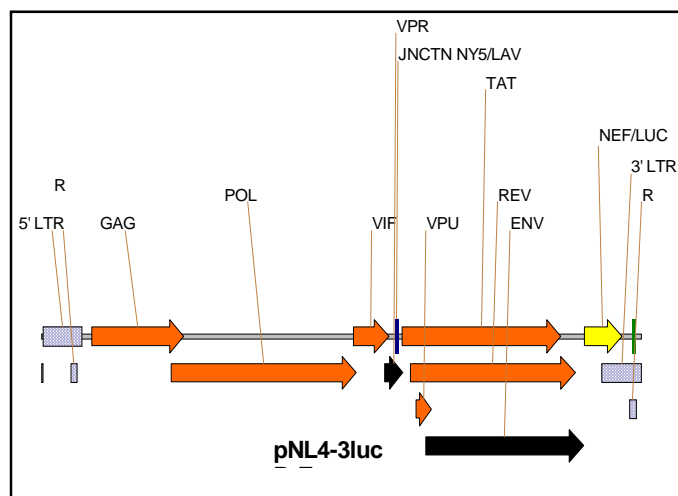


Figura 17.

Esquema con las distintas secuencias génicas del plásmido lentiviral pNL4.3luc

P1012-EBO-GP

Es un vector de expresión que contiene la secuencia editada de la glicoproteína de la envuelta del virus Ébola;

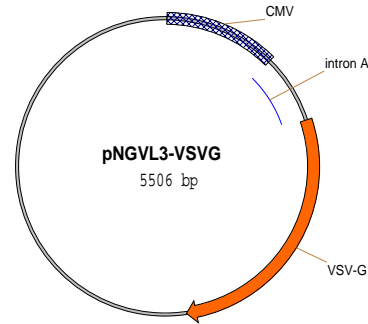
P1012-EBO-Z-GP contiene la secuencia de la glicoproteína de la cepa Zaire

P1012-EBO-R-GP contiene la secuencia de la glicoproteína de la cepa Reston

PNGVL-VSV-G

Vector de expresión que contiene la secuencia completa de la glicoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), la cual se expresa a partir del promotor del gen inmediatamente precoz del citomegalovirus humano (hCMV-IE).

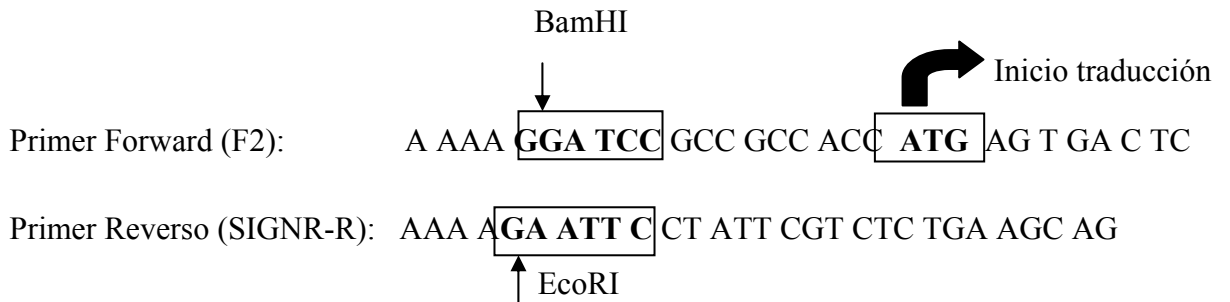
Figura 18.
Plásmido PNGVL-VSV-G que codifica la glicoproteína de la envuelta del Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV)



LZRS-L-SIGN-Cite-gfp

Este plásmido contiene la secuencia completa de la lectina L-SIGN y de la proteína fluorescente verde (gfp), unidas por una región IRES (*internal ribosome entry site*).

La construcción de este plásmido se realizó mediante PCR a partir del plásmido pcDNA3-L-SIGN empleando los siguientes primers:



El fragmento de aproximadamente 1.100 pares de bases, se digirió con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI y se clonó en el vector lentiviral pLZRS-M10-Cite -gfp , en sustitución de la región M10 con estas mismas enzimas.

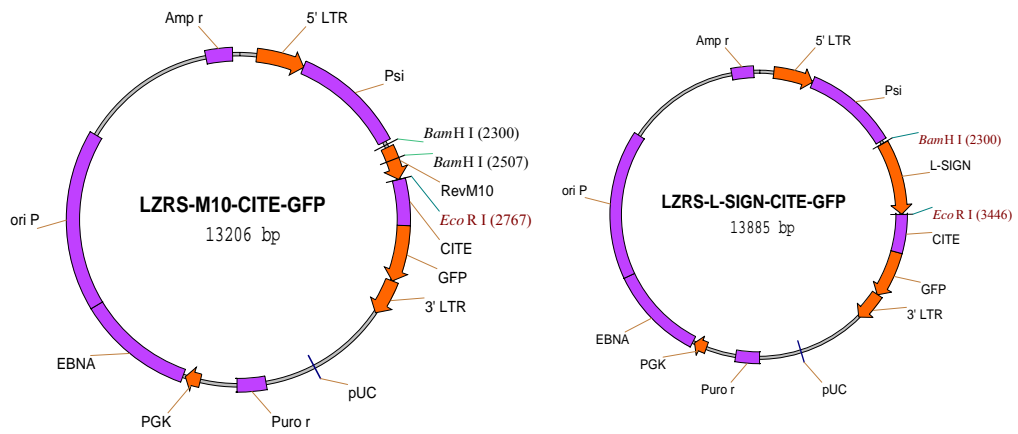
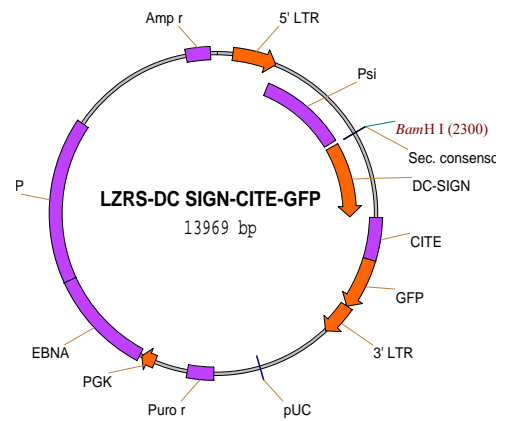


Figura 19.
La lectina L-SIGN se clonó en el vector retroviral LZRS-M10-Cite-gfp

LZRS-DC-SIGN-Cite-gfp

El fragmento de la lectina DC-SIGN se extrajo mediante digestión con las enzimas BamHI y Sal-I del plásmido pMX-DC-SIGN y fue reclonado en pLZRS-L-SIGN-Cite-gfp en sustitución de la secuencia de L-SIGN.

Figura 20.
Plásmido retroviral con la secuencia de la lectina DC-SIGN (LZRS-DC-SIGN-Cite-gfp)



LZRS-DC- SIGN-AA-Cite-gfp v LZRS-L- SIGN-AA-Cite-gfp

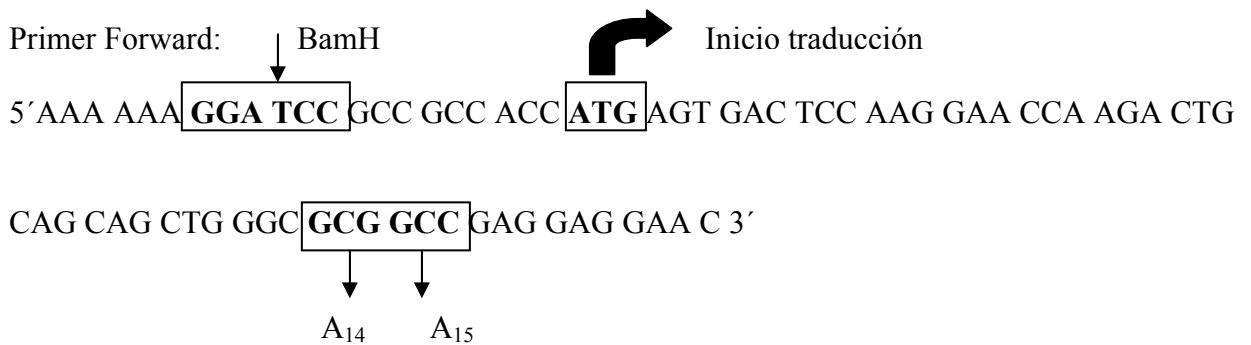
Las lectinas mutantes DC-SIGN-AA y L-SIGN-AA, contienen un cambio de los aminoácidos leucina (L) situados en posición 14 y 15 por alaninas (A).

En concreto la secuencia de nucleótidos que varía es la siguiente:

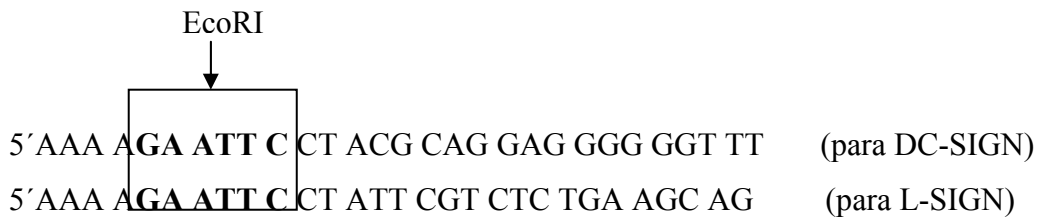
CTC CTG por GCG GCC.

Estas mutantes, se generaron mediante PCR, utilizando un primer forward (común para ambas lectinas), que contiene la secuencia que codifica para las nuevas Alaninas.

Esta nueva secuencia presenta un sitio de restricción para el enzima EclXI .



Primer Reverse:



Por otro lado, los primers contienen secuencias de restricción BamHI en el extremo 5'y EcoRI en el extremo 3'para facilitar el clonaje.

La reacción se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System (Roche Diagnostic) con el siguiente programa: un periodo de desnaturalización a 94°C durante 4 minutos; 10 ciclos consistentes en desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, fijación a 60 °C durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 1 minuto; otros 15 ciclos más, prolongando el tiempo de extensión 5 segundos por ciclo; y finalmente un periodo de extensión de 7 minutos a 72 °C.

Para la generación de los fragmentos de PCR se emplearon como molde los plásmidos pMX-DC-SIGN y pcDNA3-L-SIGN (1ng), Expand High Fidelity (3.5U/μL) (Diagnostics GMBH Germany), 10 μM de cada uno de los primers, 1.25mM de dNTPs y 15mM de Buffer con Magnesio en un volumen final de 50μL.

Los productos de PCR se clonaron inicialmente en el vector comercial pCR2.1-TOPO (Invitrogen), y más tarde en el vector lentiviral LZRS-M10-Cite-gfp en sustitución de la región M10, mediante las enzimas de restricción BamHI y EcoRI.

La secuencia final se verificó por secuenciación automática (ABI PRISM 377- Applied Biosystems).

Construcción del plásmido pNGVL-MBG-GP

pNGVL-MBG-GP es un plásmido que contiene la secuencia genómica de la glicoproteína del virus Marburg (MBG-GP), la cual se expresa a partir del promotor del gen inmediatamente precoz del citomegalovirus humano (hCMV-IE).

El fragmento correspondiente a la glicoproteína del virus Marburg, cepa Musoke (aproximadamente 2kb. de tamaño) fue donado por el Dr. Volchkov, quien lo obtuvo a partir de PCR en la que se incorporaron en los primers los sitios de restricción Sall (extremo 5') y BglII (extremo 3').

Para introducir este producto de PCR en el plásmido pNGVL-3, se digirieron estas dos moléculas con las enzimas Sall y BglII y se religaron empleando la enzima ligasa.

4 Esferas magnéticas (Dynabeads)

Las Dynabeads (M-450 *tosylactivated*, Dynal A.S, Oslo, Noruega) son esferas magnéticas de 4.5µm de grosor que se emplearon para separar de manera específica subpoblaciones de células DC/L-SIGN positivas.

Para realizar esta separación, primeramente se recubren las esferas magnéticas con un anticuerpo específico frente a DC/L-SIGN. Posteriormente se incubaron las esferas magnéticas con la población celular, se sometió la muestra a un campo magnético y la subpoblación deseada unida a las esferas, se separa del resto.

4.1 Preparación de las esferas magnéticas

El protocolo para preparar 10^8 esferas magnéticas fué el siguiente:

-Activación de las esferas magnéticas.

Se resuspendió mediante pipeteo las esferas magnéticas del stock original durante 1-2 minutos.

250µl de Dynabeads M-450 Tosylactivated (10^8 esferas) se depositaron en un tubo eppendorf y se colocaron en el dispositivo de concentración de partículas magnéticas durante 1 minuto. El sobrenadante se retiró y se lavaron las esferas con Buffer Borato (0.1M, pH 9.5) dos veces en un volumen de 250µl.

-Recubrimiento de las esferas con el anticuerpo

Sobre los 250µl de esferas magnéticas, se añadieron 250µl de anticuerpo anti DC-SIGN ó anti L-SIGN (150µg/ml) y se incubó primero a 37°C durante 10 minutos y después toda la noche en rotación a temperatura ambiente con BSA 0.1%.

Los anticuerpos utilizados fueron: anticuerpo monoclonal anti DC-SIGN, clon 120507 (específico para DC-SIGN) y clon 120604 (específico para L-SIGN) ambos de tipo IgG_{2b} (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD).

-Lavado

Tras la incubación con el anticuerpo, se realizaron una serie de lavados: primero con PBS-BSA 0.1% dos veces, después con Tris 0.2M pH8.5 -BSA 0.1% durante 4 horas a 37°C y finalmente dos veces con PBS- BSA 0.1%

-Una vez lavadas las esferas magnéticas, se resuspendieron en un volumen de 500µl con PBS- BSA 0.1% (concentración final 2×10^8 esferas/ml)

4.2 Separación de células DC-SIGN positivas con las esferas magnéticas

Se partió de una población de 10^6 células, y se empleó una cantidad de 4×10^6 esferas magnéticas en 400µl de PBS- BSA 0.1%. La muestra se incubó en rotación durante 30 minutos a 4°C, se colocó en el dispositivo de concentración de partículas magnéticas, y se lavó tres veces con PBS. Finalmente se resuspendieron las células en 1ml de medio de cultivo fresco.

5 Proteínas sGP-Fc y GP1-Fc

La proteína GP1-Fc es una construcción quimérica cuya secuencia de DNA contiene los primeros 500 aminoácidos de la glicoproteína de la envuelta del virus Ébola (GP1) fusionada (en el extremo carboxi-terminal) a la fracción constante de la inmunoglobulina humana IgG1 (Fc).

De igual manera, la proteína sGP-Fc, está formada por la glicoproteína secretada del virus Ébola (sGP), junto a la fracción constante de la inmunoglobulina humana IgG1 (Fc).

Para producir estas proteínas, primero se construyeron los plásmidos pEF-GP1-Fc y pEF-sGP-Fc y posteriormente se expresaron en células 293T mediante transfección. Ambas glicoproteínas carecen de dominio transmembrana por lo que se secretan al medio y se pueden recoger en el sobrenadante celular.

5.1 Construcción de los plásmidos pEF-GP1-Fc y pEF-sGP-Fc

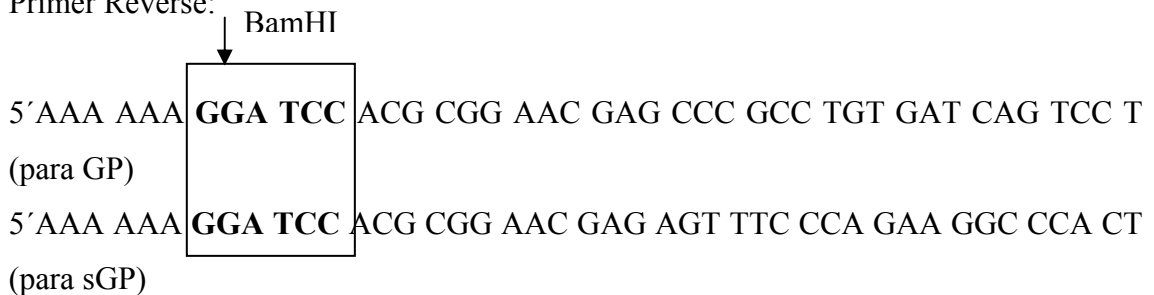
Para construir estos plásmidos, primero se amplificaron los fragmentos GP1 y sGP y en un paso posterior se clonaron en el vector de expresión eucariota pEF- Fc.

Los fragmentos de GP1 y sGP, se obtuvieron mediante PCR, empleando como molde el plásmido p1012-GP-Zaire (1ng), Expand High Fidelity (3.5U/μL), 10 μM de cada uno de los primers, 1.25mM de dNTPs y 15mM de Buffer con Magnesio en un volumen final de 50μL.

Primer Forward (EBO-XH-FW):



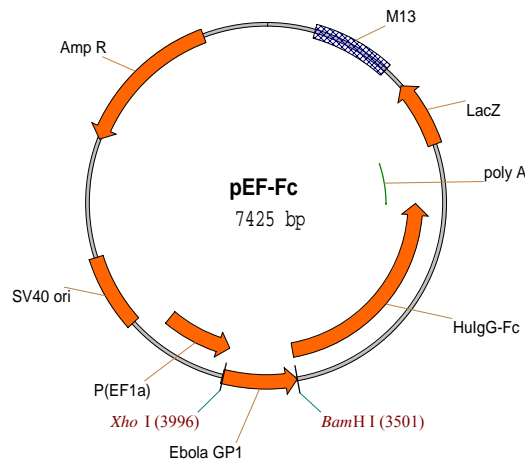
Primer Reverse:



El programa de termociclador (Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer) que se utilizó fue el siguiente: 4 minutos de desnaturalización a 94°C; 10 ciclos que constan cada uno de un periodo de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 60 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 1minuto; otros 15 ciclos iguales pero alargando el tiempo de extensión 5 segundos cada ciclo; y finalmente un periodo de extensión a 72 °C durante 7minutos.

Los productos de PCR (800pb. para la sGP y aprox. unos 1.500pb para la GP1) se clonaron inicialmente en el vector comercial pCR2.1-TOPO (Invitrogen), y posteriormente en el plásmido pEF-Fc (digerido con Sall, BamHI) mediante las enzimas de restricción XhoI (compatible con Sall) y BamHI.

Figura 21.
Plásmido de expresión eucariota con
la secuencia GP1 (glicoproteína
extracelular del virus Ébola)
fusionada a Fc (fracción constante
de las inmunoglobulinas humanas)



5.2 Producción de proteínas quiméricas GP1-Fc y sGP-Fc

Para la obtención a gran escala de estas proteínas, se realizaron transfecciones transitorias empleando 30 μg de cada plásmido, en células 293T mediante fosfato cálcico. Los sobrenadantes se recogieron a las 72 horas desde la transfección.

6 Producción de retrovirus recombinantes con diferentes envueltas virales

La producción transitoria de retrovirus recombinantes de alto título se realizó mediante el método descrito por Yang et al., 1999. Brevemente, se transfectaron 2×10^6 células 293T por placa de cultivo de 6 cm de diámetro (Falcon, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) mediante precipitación con fosfato cálcico de los siguientes vectores: vector lentiviral pNL4.3lucR⁻E⁻ y otro plásmido que codifica la envuelta viral: pNGVL-VSV-G (glicoproteína del virus de la Estomatitis Vesicular), pNGVL-A-MLV (glicoproteína del virus Anfotrópico Murino), pNGVL-MBG-G (glicoproteína del virus Marburg) y p1012 EBO-GP (glicoproteína del virus Ébola), en presencia de cloroquina (25 μM , #C-6628, Sigma).

Al cabo de 8 horas de la transfección, se retiró el medio (con la cloroquina y los complejos DNA/ fosfato cálcico) y se reemplazó con 4 ml de DMEM completo.

24 horas después se reemplaza de nuevo con 3 ml de medio fresco.

Los sobrenadantes retrovirales se recogieron a las 48 y 72 horas después de la transfección, se eliminaron los restos celulares mediante filtración (45µm) y se emplearon para su titulación o bien se congelaron en alícuotas a -80°C.

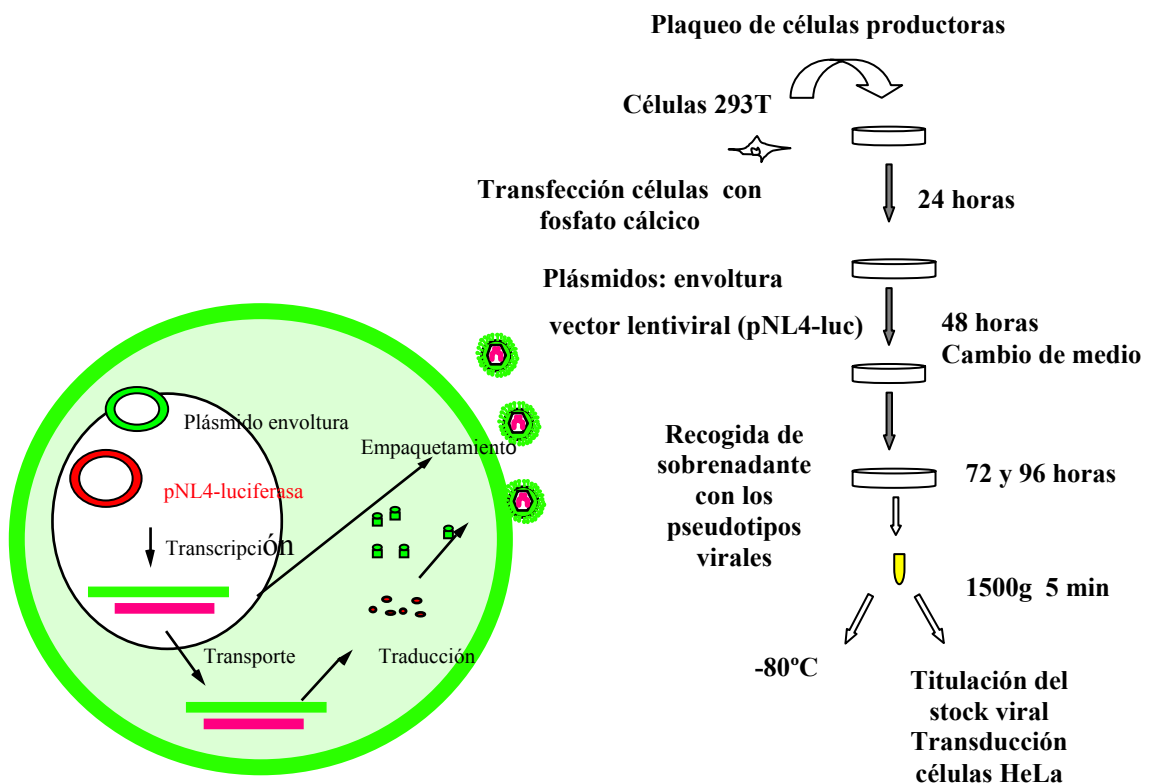


Figura 22.

Esquema de la producción de retrovirus recombinantes con envuelta de virus Ébola.

7 Titulación de sobrenadantes retrovirales

Para estimar la cantidad de partículas infectivas en los sobrenadantes, se emplearon células HeLa, midiendo la producción de luciferasa fruto de la transducción de estas células con los vectores virales.

En una placa de 24 pocillos con 50.000 células HeLa, se añaden a las 24 horas, diluciones seriadas del sobrenadante viral (desde 10^{-1} hasta 10^{-6}) en medio DMEM. La actividad luciferasa se determinó 48 horas después de la transducción con el sistema *Luciferase Assay System* (Promega). Las células se lavaron con PBS y se lisaron con 50 μ l de *Cell Culture Lysis Reagent* 1X (Tris-fosfato pH 7.8 25 mM, DTT 2 mM, 1,2-diaminociclohexano-N,N,N',N'-ácido tetraacético 2 mM, glicerol 10% y Triton[®] X-100 1%) por pocillo. 10 μ l del lisado se introducen en un tubo para luminómetro SIRIUS V2 (Berthold Detection System) programado para inyectar 100 μ l de *Luciferase Assay Reagent* y se midió la producción de luz durante 5 segundos. El rango dinámico de detección se encuentra entre 100 y 1×10^6 URL.

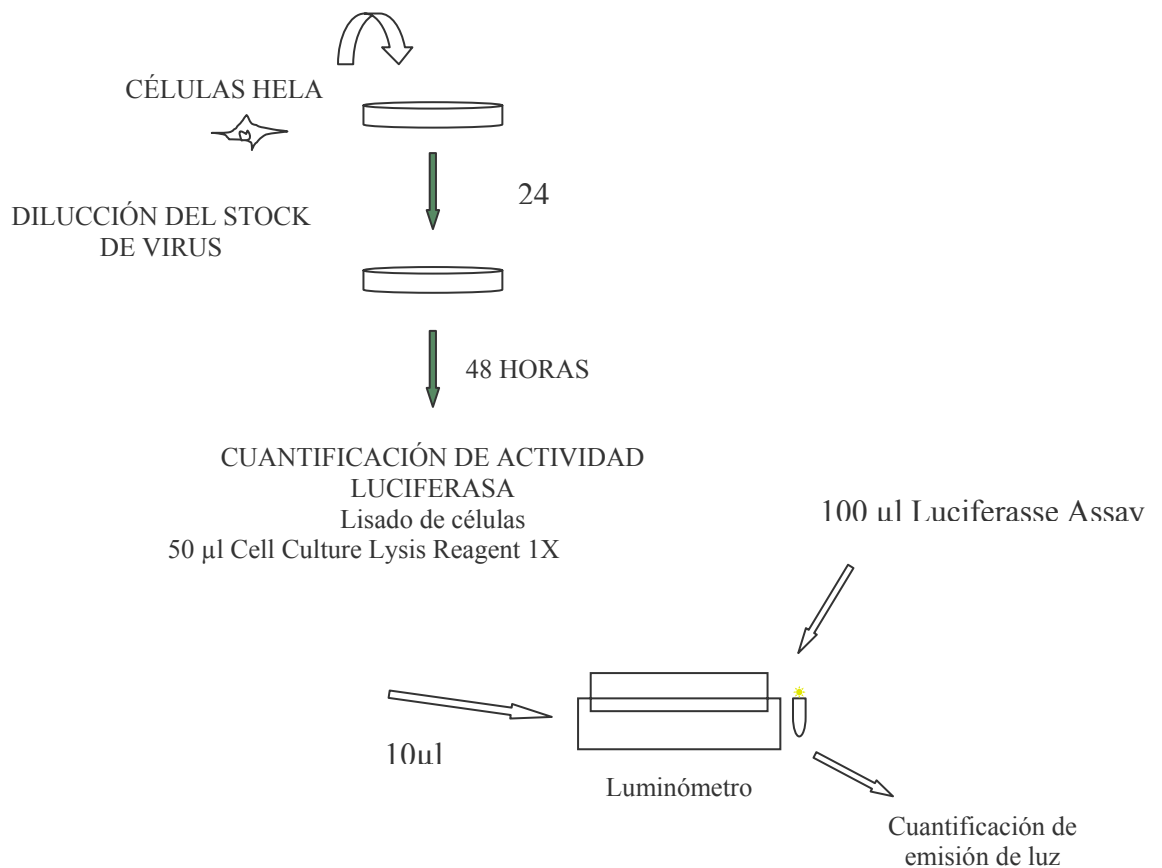


Figura 23.

Titulación de los retrovirus recombinantes producidos en laboratorio.

8 Expresión transitoria de las lectinas DC/L-SIGN

Células 293T (0.5×10^5 cél/pocillo) se transfectaron con 500ng/pocillo de los siguientes plásmidos: LZRS-M10-Cite-gfp, LZRS-DC-SIGN-Cite-gfp, LZRS-L-SIGN-Cite-gfp y pDC-SIGN_{V351G}, mediante el método de la lipofectamina (Invitrogen, Lipofectamine PlusTM Reagent)

La transfección con lipofectamina se realizó de la siguiente manera:

En un tubo eppendorf se mezcló el plásmido (500ng) con 25µL/muestra de DMEM sin suero y 8 µL del reactivo Plus Reagent. Se dejó incubar 15 minutos a 37°C.

En otro tubo eppendorf se hace reaccionar 25 µL de DMEM sin suero con 2 µL de lipofectamina. Se mezclaron los contenidos de ambos tubos y se incubó otros 15 minutos a 37°C.

Finalmente se añadió la mezcla a las células 293T y al cabo de 10 horas se cambió el medio de cultivo por otro fresco.

Tras 48 horas se analizó la expresión de la lectina mediante citometría incubando las células con el anticuerpo monoclonal anti DC/L-SIGN conjugado con ficoeritrina (α 612-PE) (RD Systems).

9 Construcción de líneas estables DC/L-SIGN positivas

9.1 Producción de partículas retrovirales con la secuencia DC/L-SIGN

Mediante transfección transitoria en células 293T, se generaron retrovirus recombinantes que contienen la secuencia de la lectina DC-SIGN ó L-SIGN y la proteína verde fluorescente (gfp). Los plásmidos empleados fueron: pNGVL-VSV-G (codifica la envuelta del virus de la estomatitis vesicular), LZRS-DC-SIGN-Cite-gfp y el plásmido pNGVL-MLV-gag-pol (que codifica las proteínas de la matriz y la cápside).

9.2 Transducción de líneas celulares con los retrovirus DC/L-SIGN

Células linfocitarias: Jurkat, U937 y K562 (1×10^6) se infectaron con retrovirus recombinantes que expresan la lectina DC/L-SIGN en un volumen de 1ml y se mantuvieron en centrífuga (aprox.700 rpm) durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió medio RPMI fresco y se dejó 24-48 horas para que las células se multipliquen.

9.3 Selección de células DC/L-SIGN positivas con las esferas magnéticas

El procedimiento está descrito en el apartado 4.2

10 Citometría

10.1 Análisis de la expresión de las lectinas DC/L-SIGN

Las células que expresan gfp (gfp+) fueron cuantificadas por medida directa de la fluorescencia mediante FACS.

La expresión de DC/L-SIGN se cuantificó incubando 2.5×10^5 células con 1 μ l de anticuerpo α 612-PE (anticuerpo monoclonal anti DC/L-SIGN conjugado con ficoeritrina (α 612-PE) (RD Systems), en un volumen final de 100 μ l de PBS-0.5% BSA-1mM C_aCl_2 durante 30 minutos a 4°C.

Tras lavar la muestra, se fija con PBS-1% formaldehído y se analiza por citometría.

Todos los análisis de citometría se llevaron a cabo en un citómetro EPICS XL-MCL (Coulter Electronics, Miami, FL).

10.2 Análisis de la unión de las proteínas quiméricas a células DC/L-SIGN positivas

La incubación de las células (2.5×10^5) con la proteína quimérica Fc, se realizó empleando 100 μ l de sobrenadante, durante 30 minutos a 4°C.

Tras lavar la muestra 2 veces con 1ml de PBS-0.5% BSA- 1mM CaCl₂, se añadió el anticuerpo conjugado anti-human-Fc-PE (1:200 final) (Immunotech, Coulter Company) en un volumen final de 100 μ l.

10.3 Internalización de la lectina L-SIGN_{AA} mediada por anticuerpos

Células J-L-SIGN y J-L-SIGN_{AA} se incubaron con el anticuerpo dual anti DC/L-SIGN (α 526) durante 30 minutos en frío. A partir de ese momento ($t=0$), se reincubaron las células a 37°C durante periodos de tiempo cada vez mayores ($t = 30, 60$ y 120 minutos) para permitir la internalización de la lectina. Tras lavar las células, éstas se reincubaron con un segundo anticuerpo conjugado anti IgGtotal-PE y mediante citometría de flujo, se analizó el porcentaje y la intensidad de fluorescencia media.

11 “Trans” infección mediada por células DC-SIGN positivas

Células parentales y DC-SIGN positivas (1×10^5), se incubaron con diferentes pseudotipos virales (volumen final 400 μ l) en rotación durante 3 horas a temperatura ambiente.

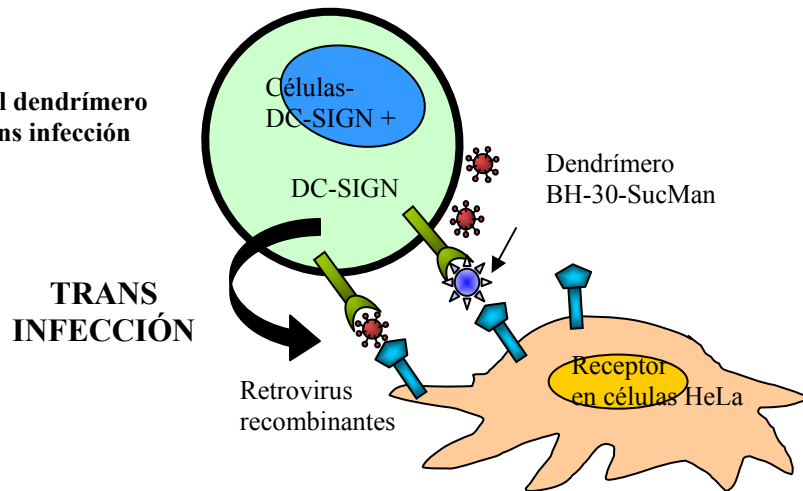
En determinados experimentos, se añadió en este primer paso de incubación el glicodendrímico BH-30-SucMan y el anticuerpo anti DC-SIGN: MR1.

Al cabo de este tiempo, se centrifugaron las células a 800 rpm, 3 minutos, se retiró el sobrenadante y se lavaron con 1ml de PBS-1mM CaCl₂-0.5% BSA.

A continuación, se resuspendieron las células en 200 μ l de RPMI y se co-cultivaron sobre células HeLa (1×10^5) previamente plaqueadas (placas de 24 pocillos), en un volumen final de 400 μ l.

Tras 48h. se retiraron las células en suspensión, se lavaron las células adherentes (HeLa) con PBS y se lisó con 50µl de Buffer Lisis Luciferasa, para medir la producción de luciferasa.

Figura 24.
Esquema de actuación del dendrímero BH-30-SucMan, en la trans infección de rEBO-GP



12 Tratamiento de los retrovirus rEBO-GP con el enzima EndoGlicosidasaH

La enzima EndoGlicosidasa H (Endo H, New England, Biolabs, Beverly MA, USA), rompe el esqueleto de residuos N-glicosilados.

Alícuotas con el mismo volumen de rEBO-GP se trataron o no con el enzima EndoH durante 30 minutos a 37°C y posteriormente se añadieron a células HeLa y Jurkat-DC-SIGN.

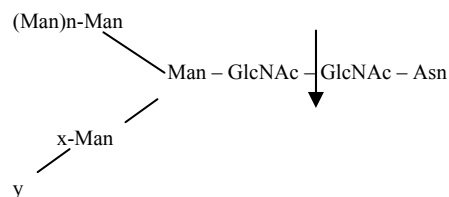


Figura 25.

Sitio de corte de la enzima EndoGlicosidasa H. EndoH corta fundamentalmente residuos de tipo “high mannose”

13 Diseño de una construcción multivalente con residuos de manosa.

BH-30-Man es una molécula química basada en la estructura del polímero Boltorn™ (Perstorp Specialty Chemicals) con estructura de glicodendrímero.

Este glicodendrímico ha sido elaborado por el Dr. Javier Rojo (CSIC, Instituto de Investigaciones Químicas, CSIC, Sevilla) y contiene 32 residuos de manosa terminales.

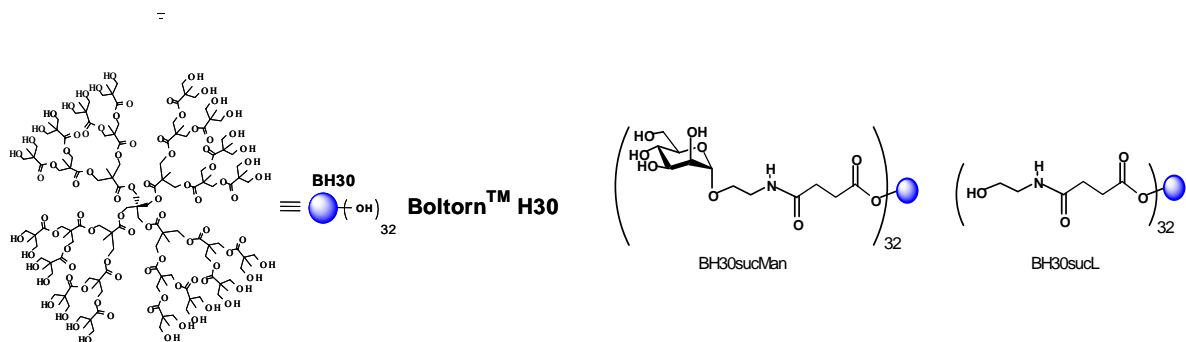


Figura 26.

Estructura y composición del dendrímico BH30-Man

14 Cianovirina N (CV-N)

Cianovirina es una lectina aislada originalmente de la cianobacteria *Nostoc ellipsosporum* que presenta alta afinidad por estructuras de azúcares presentes en la envuelta del Virus de la Inmunodeficiencia Humana VIH (IC₅₀ = 1-9 nM).

Esta molécula fue gentilmente cedida por la doctora Laura G. Barrientos (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, U.S.A).

15 Evaluación de inhibidores de la infección de rEBO-GP

15.1 Ensayos de infección con el dendrímico BH-30-SucMan

Células Jurkat-DC-SIGN se incubaron de manera independiente con retrovirus rVSV-G y rEBO-GP en presencia de concentraciones crecientes del compuesto BH30-Linker ó BH-30-SucMan y al cabo de 48 horas se midió la producción de luciferasa en estas células.

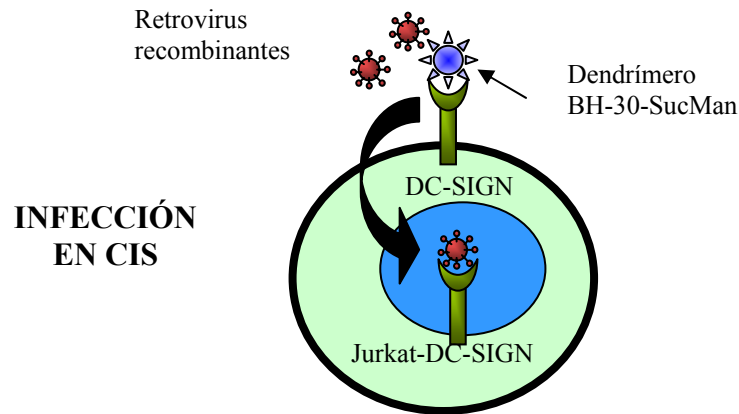


Figura 27.

Esquema de actuación del dendrímero BH-30-Suc-Man en la interacción de rEBO-GP y la lectina DC-SIGN.

15.2 Ensayos de inhibición con CV-N

Células HeLa y células DC-SIGN positivas, se incubaron las partículas rEBO-GP con cantidades crecientes de CV-N durante 20 minutos a temperatura ambiente y al cabo de este tiempo se añadió la mezcla a cada línea celular.

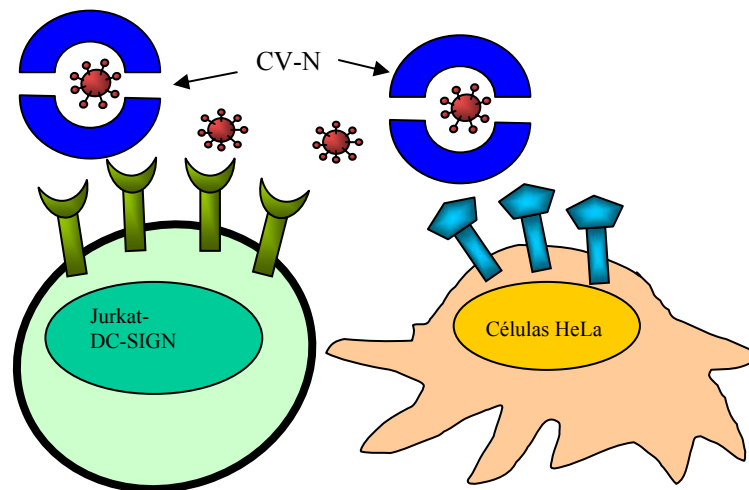


Figura 28.

Actividad de CV-N frente a la infección de rEBO-GP.

15.3 Cálculo de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀)

La concentración inhibitoria 50 (IC₅₀), es la concentración de compuesto necesario para inhibir la infección viral al 50% con respecto al control (en ausencia del compuesto). Se representa como el porcentaje de inhibición de la actividad luciferasa frente al log₁₀ de la concentración del compuesto mediante GraphPad Prism version 3.02 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). El porcentaje de inhibición se calculó: [1-(actividad luciferasa en presencia del compuesto/actividad luciferasa en ausencia del compuesto)]X100.

Para definir la curva sigmoidea dosis-respuesta se empleó una ecuación logística de cuatro parámetros $Y = a + [(b-a)/1 + 10^{-(\text{LogIC}_{50}-X)H}]^{-1}$, siendo *a* el valor de Y en el *plateau* inferior; *b* el valor de Y en el *plateau* superior; LogIC₅₀ el valor medio de X entre *a* y *b*, y H el coeficiente de Hill, que define la pendiente de la curva.

15.4 Evaluación de la toxicidad de (CV-N) y Boltorn

El efecto citotóxico de estos compuestos se analizó mediante método colorimétrico empleando MTS (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega).

Cada pocillo contenía 0.5x10⁵ células en un volumen de 100µl de medio más el compuesto a testar. Al cabo de 24-48 horas se añadieron 20µl de One Solution Reagent y tras 4 horas de incubación a 37°C, se lee la absorbancia a 490nm. en un lector para placas de 96 pocillos.

16 Glicoproteínas mutantes del virus Ébola

Las GP mutantes presentan una alteración en la secuencia proteica que impide la adición de residuos N-glicosilados (N-X-T/S).

Estas construcciones fueron cedidas por el Dr. A. Sánchez (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta.)

En concreto, la mayoría de estas mutaciones consisten en una sustitución del aminoácido Asparragina (N) por Aspartato (D); N204D , N257D , N277D , N296D , N563D y N618D.

Otra de las mutantes presenta la sustitución N223Y.

Por último la mutante: (Δ 309-489) tiene delecionada la mayor parte de la región mucina (donde además de existir 8 posibles residuos de N-glicosilación están también presentes la mayoría de los residuos O-glicosilados).

Cambios	Ubicación en la glicoproteína	Tipo de glicosilación
N204D	GP ₁	N-glicosilación
N238Y	GP ₁	N-glicosilación
N257D	GP ₁	N-glicosilación
N277D	GP ₁	N-glicosilación
N296D	GP ₁	N-glicosilación
Mucina (Δ 309-489)	GP ₁	O-glicosilación N-glicosilación
N563D	GP ₂	N-glicosilación
N618D	GP ₂	N-glicosilación

RESULTADOS

1 Producción de retrovirus recombinantes con envuelta de filovirus

La producción de retrovirus recombinantes con envuelta de filovirus se realizó mediante transfección por el método del fosfato cálcico, empleando la línea celular 293T como célula empaquetadora; el vector lentiviral pNL4.3.lucR^E y otro plásmido que contiene la secuencia de la glicoproteína del virus que se va a producir (materiales y métodos).

48-72 horas después de la transfección se recoge el sobrenadante celular donde se han ido acumulando las partículas virales. Para cuantificar el número de partículas infectivas se realizan diluciones seriadas del stock viral y se mide la producción de luciferasa en la línea celular HeLa.

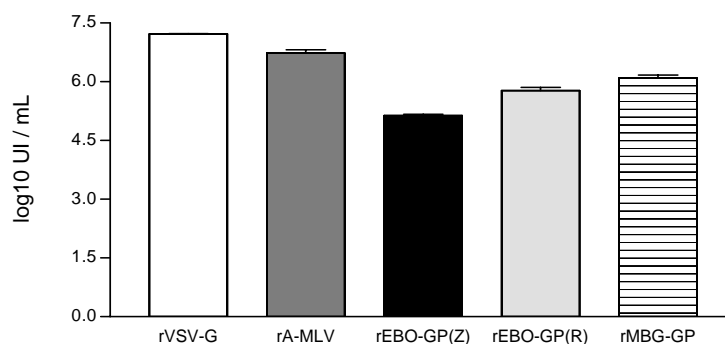


Figura 29.

Producción de retrovirus recombinantes con envuelta de filovirus

Los retrovirus recombinantes con envuelta de virus Ébola: rEBO-GP (Z), rEBO-GP (R) y con envuelta de virus Marburg rMBG-GP, se generaron mediante transfección con fosfato cálcico empleando la línea celular 293T.

Para cuantificar el número de partículas generadas se midió la producción de luciferasa en células HeLa a partir de diluciones seriadas del stock viral.

Mediante el método descrito, se obtienen alrededor de 10^5 partículas infectivas por ml con envuelta del virus Ébola (Fig 27); siendo los títulos de la cepa Reston (rEBO-GP-(R)) más altos (5×10^5 partículas infectivas/ml) que los obtenidos con la glicoproteína de la cepa Zaire (rEBO-GP(Z)) (1×10^5)

En el caso de los retrovirus recombinantes con envuelta de virus Marburg (rMBG-GP), el título viral fue de 1×10^6 partículas /ml, un orden de magnitud superior al obtenido con el rEBO-GP.

Si comparamos estos valores con los obtenidos a partir de la envuelta del Virus de la Estomatitis Vesicular (rVSV-G) (10^8 partículas infectivas/ml) o el virus Anfotrópico Murino (rA-MLV) (10^7 partículas infectivas/ml) se concluye que a nivel general, la producción de retrovirus recombinantes con envuelta de virus Ébola rinde un número menor de partículas virales.

Por otro lado, quisimos examinar a nivel sub-celular el aspecto de los retrovirus recombinantes que generamos con las glicoproteínas procedentes del virus Ébola y observar las partículas víricas en diferentes fases de formación.

Mediante microscopía electrónica se detecta una concentración de material proteico bajo la membrana celular que corresponde a las proteínas víricas que están ensamblándose para formar los nuevos viriones (Fig 30, A)

Estas partículas mediante gemación se van separando de la célula y arrastran consigo parte de la bicapa lipídica donde están insertadas las glicoproteínas de la envuelta vírica (Fig 30, B)

Finalmente los viriones se separan de la célula y adquieren una conformación esférica, similar a la que presentan los viriones de VIH (Fig 30, C)

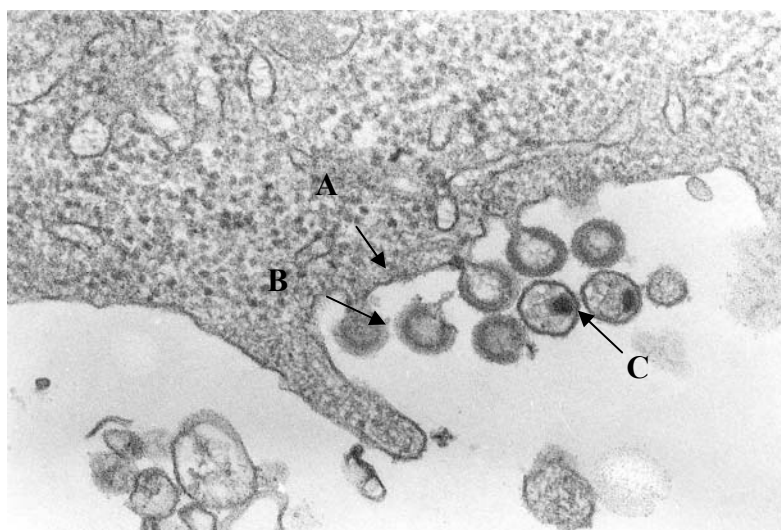


Figura 30.
Retrovirus recombinantes Ébola generados mediante transfección en células 293T.

2 Tropismo de los retrovirus recombinantes con envuelta de virus Ébola

Para validar los retrovirus recombinantes con envuelta de virus Ébola (rEBO-GP) que generamos en el laboratorio como herramienta de estudio del virus natural, analizamos el rango de líneas celulares que estos retrovirus son capaces de infectar.

Diferentes líneas celulares de laboratorio: 293T, HeLa, HOS-fusina y linfocitarias: Jurkat, U937 y K562 se incubaron con los retrovirus rEBO-GP y rVSV-GP y tras 48 horas se midió la infección a través de la producción de luciferasa en cada línea celular.

Mientras los retrovirus rVSV-G son capaces de infectar todas las líneas celulares que se muestran en la tabla; los retrovirus Ébola (rEBO-GP) únicamente infectan las líneas celulares 293T, HeLa y Hos-fusina, mientras que las líneas linfoides como las células Jurkat o U937 y eritroleucémicas K562 no son permisivas a la infección.

Línea celular	Infección de retrovirus recombinantes con envuelta de virus Ébola: rEBO-GP	Infección de retrovirus recombinantes con envuelta de Virus de la Estomatitis Vesicular: r-VSV-G
293T	+	+
HeLa	+	+
HOS-fusina	+	+
Jurkat	-	+
U937	-	+
K562	-	+

Tabla 1

Tropismo de los retrovirus recombinantes con envuelta de virus Ébola

Retrovirus recombinantes con envuelta de virus Ébola (rEBO-GP) y con envuelta de Virus de la Estomatitis Vesicular (rVSV-G), se incubaron con diversas líneas celulares y al cabo de 48 h se midió la infección celular a través de la producción de luciferasa.

Por tanto, el tropismo de los retrovirus rEBO-GP generados en nuestro laboratorio, es similar al descrito en la literatura para el virus Ébola natural, siendo las líneas linfoides resistentes a la infección.

Además, con los resultados que se muestran en la tabla, podemos decir que la susceptibilidad a la infección de las líneas linfoides por retrovirus rEBO-GP es distinto al observado con los rVSV-G.

3 Afinidad de las lectinas DC/L-SIGN por la glicoproteína del virus Ébola

El objetivo de esta tesis es analizar la relación entre el virus Ébola y las lectinas de tipo C: DC/L-SIGN; por ello iniciamos el estudio explorando la capacidad de unión de estas lectinas a la envuelta del virus Ébola.

Para detectar posibles interacciones entre las lectinas DC/L-SIGN y la glicoproteína del virus Ébola, primero expresamos estas lectinas en una línea celular no susceptible a la infección.

3.1 Expresión estable de las lectinas DC/L-SIGN en células linfocitarias

La expresión de la lectina DC/L-SIGN se realizó en una línea linfocitaria, para descartar posibles uniones inespecíficas entre la célula y la envuelta del virus Ébola.

Células Jurkat, se infectaron varias veces con retrovirus recombinantes que codifican simultáneamente la lectina DC-SIGN o su homóloga L-SIGN así como la proteína verde fluorescente (gfp). Mediante selección con esferas magnéticas se obtuvo una población homogénea que expresa de manera estable tanto la lectina DC/L-SIGN como gfp (Fig 31)

La expresión de DC/L-SIGN en las células Jurkat, se comprobó mediante citometría, analizando de manera indirecta la expresión de gfp en la población (Fig 29,A) y también mediante el uso de un anticuerpo monoclonal conjugado con ficoeritrina ($\alpha 612$ -PE) específico para DC/L-SIGN (Fig 29,B)

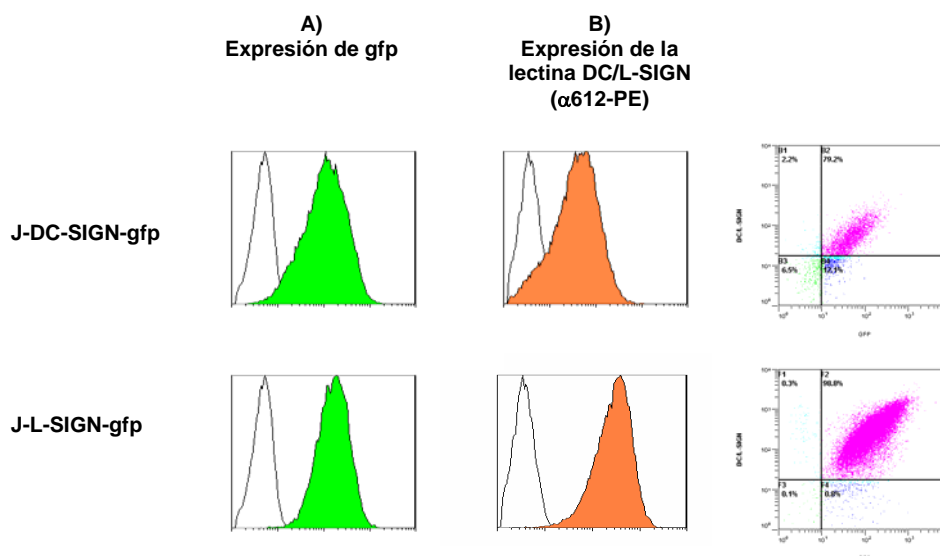


Figura 31.

Expresión estable de la lectina DC-SIGN y su homóloga L-SIGN en la línea linfocitaria Jurkat.

A-Expresión de la proteína verde fluorescente (gfp) en células Jurkat-DC/L-SIGN-gfp positivas.

B-Expresión de la lectina DC/L-SIGN tras incubar células Jurkat y Jurkat-DC/L-SIGN-gfp con el anticuerpo monoclonal $\alpha 612$ -PE.

Como se observa en la Fig 31-A, únicamente las células DC/L-SIGN positivas expresan la proteína gfp. La intensidad media de fluorescencia en la población de J-DC-SIGN-gfp es de 178 frente a un valor de 199 en las células J-L-SIGN-gfp.

Incubando las células con el anticuerpo conjugado $\alpha 612$ -PE, específico para estas lectinas, se detecta un 78% de células J-DC-SIGN-gfp unidas al anticuerpo, con una intensidad media de fluorescencia de 72, mientras que el porcentaje de células J-L-SIGN-gfp unidas al anticuerpo es del 99% con una intensidad de fluorescencia media de 351.

3.2 Unión de la glicoproteína del virus Ébola a células DC/L-SIGN positivas

Para explorar si las lectinas DC/L-SIGN tienen afinidad por la envuelta del virus Ébola comparamos la capacidad de unión de la línea parental Jurkat (J) y J-DC-SIGN con las proteínas quiméricas GP1-Fc y gp120-Fc.

Células Jurkat y Jurkat-DC-SIGN se incubaron de manera independiente con 100µl de proteína quimérica soluble GP1-Fc o gp120-Fc durante 30 minutos a 4°C para evitar la internalización y tras lavar las células para eliminar restos de proteína no unida, se reincubaron con un anticuerpo anti-Fc conjugado con ficoeritrina (PE).

La presencia de proteína quimérica unida a las células se analizó por citometría de flujo, a través de la intensidad de la señal fluorescente roja (PE) en la población celular.

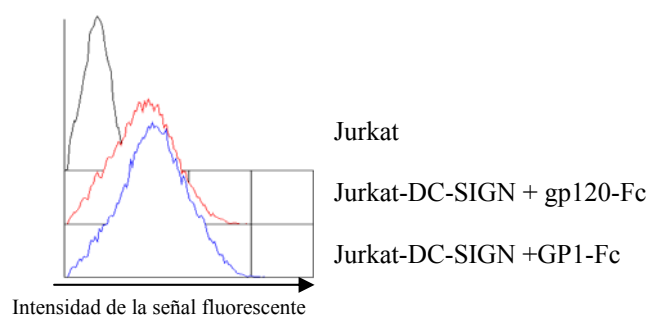


Figura 32.

La glicoproteína del virus Ébola se une a células DC-SIGN positivas.

Jurkat parentales y J-DC/L-SIGN se incubaron con las proteínas quiméricas GP1-Fc y gp120-Fc. Tras lavar las células se añadió un anticuerpo conjugado anti-Fc-PE y mediante citometría de flujo se analizó la intensidad de fluorescencia media.

Mientras la línea parental Jurkat no se une a ninguna de las glicoproteínas analizadas (Fig 32), la población de J-DC-SIGN es capaz de interactuar tanto la glicoproteína del Ébola (GP1-Fc) como la glicoproteína del VIH (gp120-Fc).

La afinidad de las células J-DC-SIGN por la glicoproteína del Ébola (GP1-Fc), es similar a la que observamos para gp120-Fc, con una intensidad fluorescente de 79 frente a una intensidad media de 55 con la proteína gp120-Fc.

Datos similares se obtuvieron con la lectina homóloga L-SIGN.

3.3 Especificidad de la unión entre DC-SIGN y la glicoproteína del virus Ébola

3.3.1 Anticuerpos anti DC-SIGN bloquean la interacción entre GP1 y DC-SIGN

La especificidad de la interacción entre DC/L-SIGN y la glicoproteína del virus Ébola se analizó empleando los anticuerpos monoclonales anti DC-SIGN: $\alpha 526$ y MR1, los cuales reconocen la lectina de manera específica.

Células Jurkat y Jurkat-DC-SIGN se incubaron con la proteína quimérica GP1-Fc en presencia o no (control) de los anticuerpos monoclonales ($\alpha 526$ y MR1). Tras lavar las células, se añadió el anticuerpo conjugado (anti-Fc-PE) y se analizó por citometría de flujo la intensidad de la señal fluorescente.

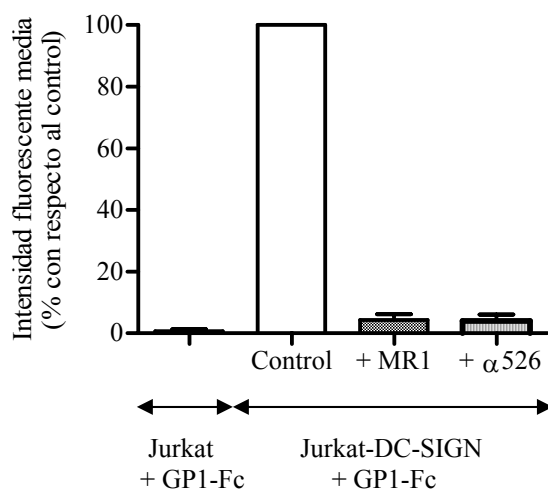


Figura 33.

La unión de DC/L-SIGN a la glicoproteína del Ébola es específica y se puede bloquear con anticuerpos anti DC-SIGN

Como se observa en la Fig 33, los anticuerpos MR1 y $\alpha 526$ reducen más de un 90% la intensidad fluorescente de células J-DC-SIGN unidas a GP1-Fc.

Estos datos indican que la interacción entre DC-SIGN y la glicoproteína del Ébola es una interacción específica, ya que los anticuerpos bloquean o impiden la unión de GP1 con la lectina.

3.3.2 Mutaciones en la región lectina de DC-SIGN impiden la unión de GP1 a DC-SIGN

Otra manera de demostrar la especificidad de la unión entre DC-SIGN y la glicoproteína del Ébola, consistió en comparar la capacidad de unión de la lectina natural (DC-SIGN_{wt}) a las proteínas gp120-Fc y GP1-Fc, con una lectina mutante (DC-SIGN_{V351G}) que presenta un cambio de aminoácido en la región de reconocimiento a carbohidratos (CRD).

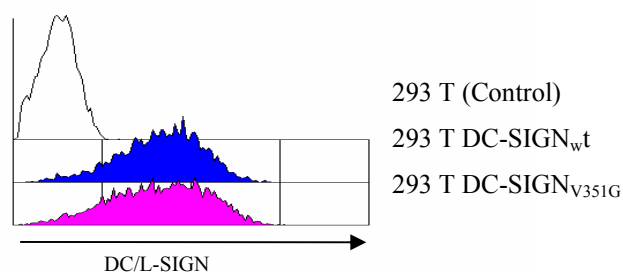
Tanto la lectina natural (DC-SIGN_{wt}) como la mutante (DC-SIGN_{V351G}), se expresaron de manera transitoria en células 293T. Al cabo de 48h. se incubaron las células con el anticuerpo monoclonal anti DC-SIGN α 612-PE y se observó un 80% de expresión de la lectina natural (DC-SIGN_{wt}) con una intensidad media de fluorescencia de 128.6 y un 73% de células que expresan la lectina mutante (DC-SIGN_{V351G}) con valores de IMF de 113.7 (Fig 34,A).

Aunque el número de moléculas de lectina por célula es similar en ambos casos, sin embargo, la capacidad de unión de la lectina mutante DC-SIGN_{V351G} a las proteínas gp120-Fc y GP1-Fc es mucho menor (Fig 34,B)

Mediante citometría observamos que la intensidad de fluorescencia de las células DC-SIGN_{V351G} unidas a GP1-Fc es un 83% menor que el control.

De manera similar, las células que expresan DC-SIGN_{V351G} también pierden afinidad por gp120-Fc, ya que la intensidad de fluorescencia de estas células unidas a la glicoproteína del virus VIH es un 70% menos que el control (células que expresan la lectina natural).

A Control de expresión de DC-SIGN_{V351G}



B Afinidad de DC-SIGN_{V351G} por GP1-Fc

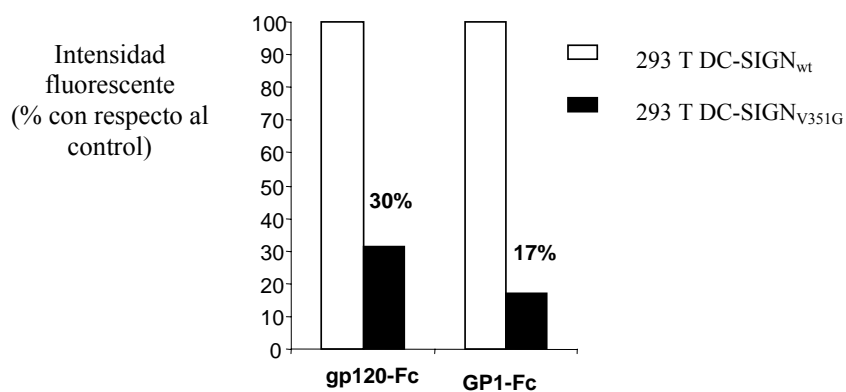


Figura 34.

Cambios en la región lectina de DC-SIGN afectan la unión con sus ligandos.

A-Expresión de la lectina DC-SIGN_{wt} y la mutante DC-SIGN_{V351G} en células 293T.

Células 293T se transfectaron de manera transitoria con plásmidos que contienen la secuencia original de la lectina DC-SIGN o la mutante V351G.

B- La lectina mutante (DC-SIGN_{V351G}) pierde afinidad por la glicoproteína del Ébola.

Células 293 T que expresan de manera transitoria la lectina natural (DC-SIGN_{wt}) o la mutante (DC-SIGN_{V351G}), se incubaron con las proteínas quiméricas GP1-Fc y gp120-Fc y mediante citometría de flujo se analizó la intensidad de fluorescencia emitida.

4 Papel de las lectinas DC/L-SIGN en la infección del virus Ébola

Una vez comprobada la capacidad de DC/L-SIGN de unir la glicoproteína del Ébola, se estudió si además estas lectinas pueden favorecer la internalización de los retrovirus recombinantes con envuelta de virus Ébola (rEBO-GP).

Con este propósito, se analizó el efecto de la expresión de las lectinas DC/L-SIGN en células susceptibles (293T) y en células no permisivas (Jurkat) sobre los niveles de infección de retrovirus r-EBO-GP.

4.1 DC-SIGN y L-SIGN aumentan la infección de r-EBO-GP en células susceptibles.

Células 293T se transfectaron de manera transitoria con el plásmido LZRS-DC/L-SIGN-gfp ó con el plásmido pRC-CMV-DC-SIGN_{V351G}, y al cabo de 48 h. tras comprobar que más del 90% de las células expresan la lectina, se infectaron con diferentes retrovirus recombinantes: rVSV-G, rEBO-GP (Z) y rEBO-GP (R).

Al comparar el grado de infección debido a retrovirus rEBO-GP en las células parentales 293T (control) con las que expresan la lectina natural (293-DC/L-SIGN), se observó un incremento muy significativo de los niveles de luciferasa.

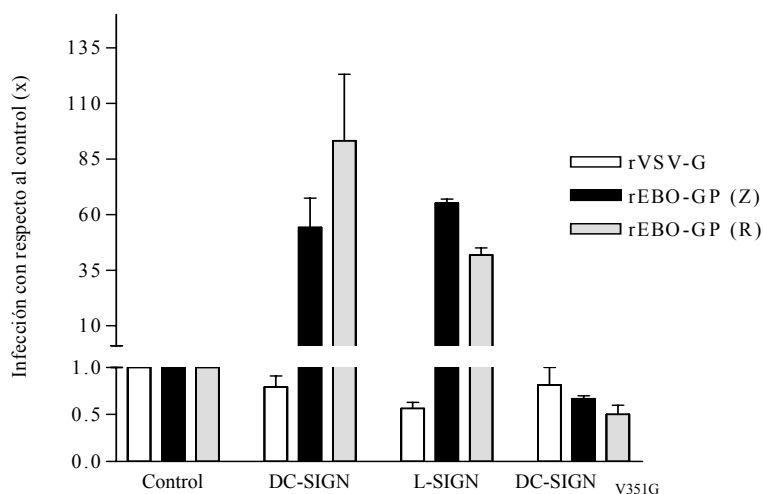


Figura 35.

DC/L-SIGN aumentan la infección de retrovirus recombinantes Ébola en líneas susceptibles.

Células 293T (control) y 293T transfectadas con las lectinas DC/L-SIGN o la mutante DC-SIGN_{v351G} se infectaron con varios retrovirus recombinantes: rVSV-G, rEBO-GP (Z) o rEBO-GP (R). Los valores de infección se expresan como actividad luciferasa relativa al control (293 transfectadas con un plásmido sin lectina) para cada retrovirus recombinante.

Como se ve en la (Fig35), las células 293DC-SIGN se infectan 60 veces más que el control en presencia de retrovirus rEBO-GP(Z) y unas 100 veces más con rEBO-GP(R). Resultados similares se obtienen con las células 293L-SIGN, donde los valores de luciferasa se incrementan por un factor de 60 para retrovirus rEBO-GP (Z) y 40 veces con el retrovirus rEBO-GP (R) en comparación con el control.

Sin embargo, este aumento en la capacidad de entrada de los retrovirus con envuelta Ébola, no afecta de igual manera a los retrovirus rVSV-G; de hecho, el nivel de infección del rVSV-G es el mismo para las células parentales (293) o las células DC/L-SIGN positivas.

Por otro lado, los niveles de infección de los retrovirus rEBO-GP en células 293T que expresan la lectina mutante DC-SIGN_{v351G}, son similares a los obtenidos en el control (293T transfectadas con un plásmido sin lectina).

Como se demostró en el apartado 3.3.2, la mutación V351G de la región lectina de DC-SIGN impide la unión de esta molécula con sus ligandos y por tanto, la pérdida de afinidad de la lectina DC-SIGN_{V351G} por GP1 se traduce también en una inhibición de la infección de rEBO-GP.

5 La expresión de DC/L-SIGN en células no permisivas confiere susceptibilidad a la infección de rEBO-GP.

Para averiguar si las lectinas DC/L-SIGN actúan únicamente como moléculas de unión al virus Ébola o pueden funcionar también como un receptor mediando la entrada de este virus, se comparó el nivel de infección de diferentes retrovirus recombinantes en la línea linfocitaria Jurkat que expresan de manera estable las lectinas DC-SIGN, L-SIGN ó Dectin-1.

Mientras las células parentales Jurkat no se infectan con retrovirus rEBO-GP y sí con el rVSV-G, o el rA-MLV, la presencia tanto de DC-SIGN como L-SIGN posibilitan la entrada de los retrovirus recombinantes con envuelta de virus Ébola (Fig 36)

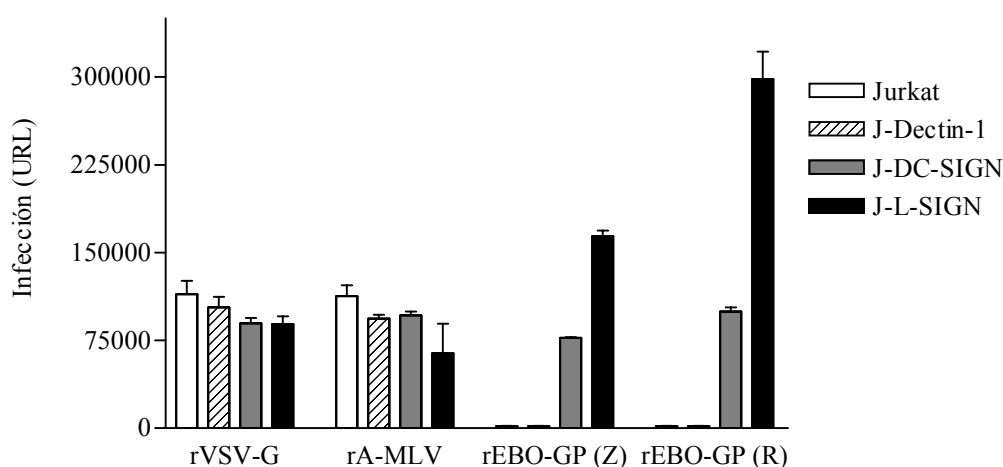


Figura 36.

La expresión de DC/L-SIGN en células no permisivas confiere susceptibilidad a la infección de rEBO-GP.

Células Jurkat , Jurkat-DC/L-SIGN y Jurkat-Dectin-1 se incubaron con diferentes retrovirus recombinantes: rVSV-G, rEBO-GP (Z) y rEBO-GP (R) y al cabo de 48 h. se midió el nivel de infección a través de la producción de luciferasa en cada tipo celular (URL)

El nivel de infección de los retrovirus rEBO-GP en las células Jurkat fue de 200 URL (nivel basal), mientras que en las células DC-SIGN o L-SIGN positivas se obtienen valores de más de 10^5 URL tanto con el retrovirus rEBO-GP (Z) como con el rEBO-GP (R).

Este cambio de tropismo de los retrovirus rEBO-GP es específico, ya que la expresión de las lectinas DC/L-SIGN en la superficie de los linfocitos no afecta en modo alguno los niveles de infección de otros retrovirus recombinantes como el rVSV-G o el rA-MLV (Fig 36).

Además hemos utilizado otra lectina diferente a DC/L-SIGN como es Dectin-1, sin que en este caso los niveles de producción de luciferasa de los retrovirus rEBO-GP difieran del control (500 URL), por tanto, Dectin-1 no media la infección de rEBO-GP.

Estos mismos resultados se obtienen utilizando la línea linfoide U937, eritroleucémica K562 y la línea linfoide de tipo B (Namalwa).

Como conclusión, podemos decir que la presencia de las lectinas DC/L-SIGN en la superficie de células no permisivas es suficiente para mediar la infección de retrovirus rEBO-GP.

5.1 Especificidad de la infección de rEBO-GP en células DC/L-SIGN positivas.

Para demostrar que DC/L-SIGN es la única molécula responsable de la entrada de los retrovirus recombinantes Ébola en células no permisivas, se estudió la capacidad inhibitoria de los anticuerpos monoclonales: $\alpha 526$ y MR1 en la infección de células J-DC-SIGN con los retrovirus rVSV-G y rEBO-GP.

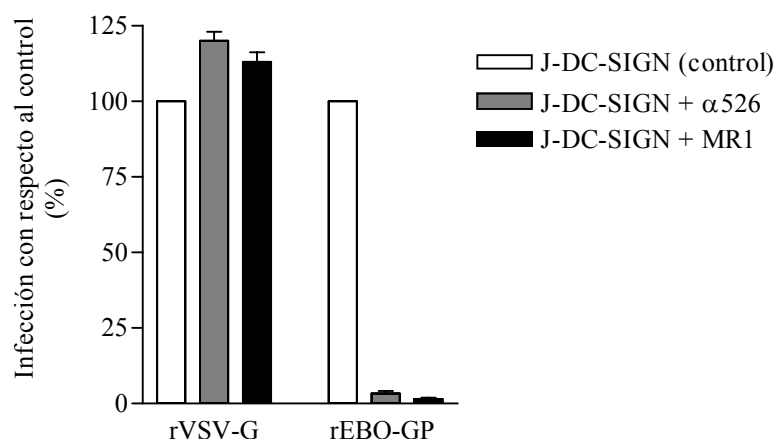


Figura 37.

Inhibición específica de la infección de retrovirus rEBO-GP en células DC-SIGN positivas.

Células Jurkat-DC-SIGN se incubaron con los retrovirus rVSV-G y rEBO-GP en presencia o no (control) de los anticuerpos específicos anti DC-SIGN: α 526 y MR1. Al cabo de 48 horas se midió la infección a través de la producción de luciferasa.

Los valores de infección están representados en % con respecto al control.

Tanto el anticuerpo α 526 como MR1 reducen un 90% la capacidad de infección de los retrovirus recombinantes Ébola cuando se añaden a las células Jurkat-DC-SIGN (Fig 37).

Esta inhibición afecta de manera específica a los retrovirus rEBO-GP, ya que la producción de luciferasa (URL) de los retrovirus rVSV-G no se afecta en presencia de estos compuestos.

6 Las lectinas DC/L-SIGN median la internalización de rEBO-GP.

Las moléculas de DC/L-SIGN contienen en la región citoplásmica varias secuencias que se piensa están implicadas en el proceso de internalización y reciclaje de estas lectinas. En el caso de DC-SIGN, se ha descrito que el cambio de los aminoácidos leucina L₁₄ y L₁₅ por Alaninas A₁₄ A₁₅, reduce considerablemente la capacidad de reciclaje de la propia lectina y en consecuencia, afecta también la internalización de los ligandos¹³⁶.

Basados en la homología que presenta DC-SIGN en esta secuencia citoplásmica con su homóloga L-SIGN, se construyó una mutante: L-SIGN_{AA}, que contiene la sustitución L₁₄ L₁₅ por A₁₄ A₁₅. Con estas células que expresan la lectina mutada, se analizó el grado de infección de los retrovirus rEBO-GP.

6.1 Expresión y afinidad de la lectina L-SIGN_{AA} por la glicoproteína del virus Ébola.

Antes de realizar ensayos de infección con la lectina mutada, se comparó los niveles de expresión de esta mutante L-SIGN_{AA} con la lectina natural L-SIGN, así como la capacidad de unión de ambas lectinas a los ligandos

Jurkat-L-SIGN y Jurkat-L-SIGN_{AA} se incubaron bien con el anticuerpo monoclonal anti DC-SIGN (α 612-PE) o con las proteínas quiméricas solubles GP1-Fc y gp120-Fc, y tras lavar las células y añadir si corresponde el anticuerpo conjugado anti Fc-PE, se midió por citometría de flujo el porcentaje de células fluorescentes y la intensidad media de la señal.

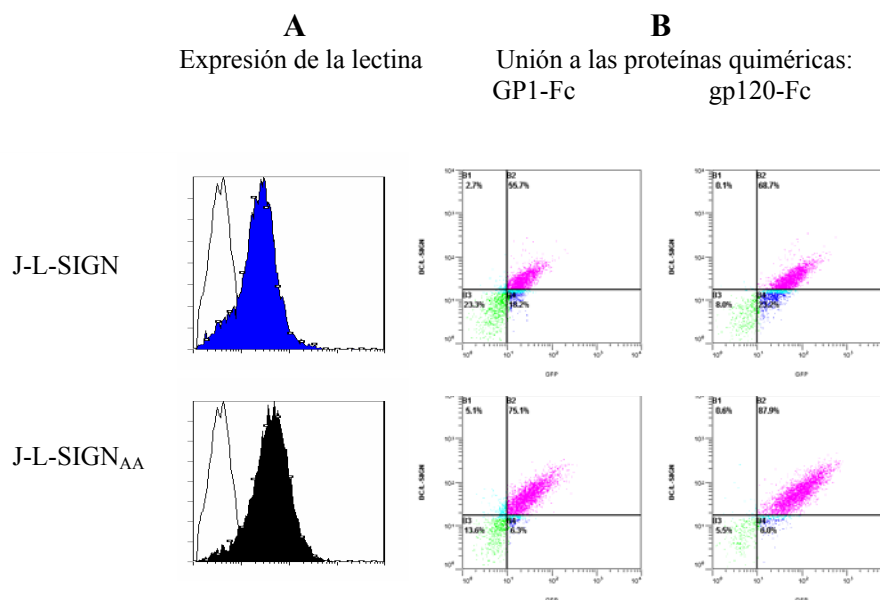


Figura 38.

A-Expresión de la lectina L-SIGN_{AA} en la membrana celular.

B-Capacidad de unión de la lectina L-SIGN_{AA} a los ligandos gp120-Fc y GP1-Fc.

Como se muestra en la figura 38-A , los niveles de expresión de la lectina natural L-SIGN y la lectina mutada L-SIGN_{AA} en la superficie de las células Jurkat son similares; con un 99% de células L-SIGN positivas y una intensidad media fluorescente de 92, frente a un 99% de células que expresan la lectina mutada L-SIGN_{AA} con una intensidad fluorescente de 112.

Además, la afinidad de ambas lectinas (L-SIGN y la mutante L-SIGN_{AA}) por las proteínas quiméricas GP1-Fc y gp120-Fc son equivalentes (Fig.38-B).

Mediante citometría, se observa un 60% de células J-L-SIGN unidas a GP1-Fc con una intensidad media de 54 , frente a un 75 % de células J-L-SIGN_{AA} unidas a GP1-Fc con una intensidad media de 66 .

Resultados similares se obtienen incubando células J-L-SIGN y J-L-SIGN_{AA} con la proteína gp120-Fc.

6.2 La mutación dileucina de L-SIGN_{AA} dificulta la internalización de la lectina.

Para demostrar que la mutación dileucina de la lectina L-SIGN afecta el reciclaje de ésta, se comparó la capacidad de internalización de la lectina mutada frente a la natural.

Células J-L-SIGN y J-L-SIGN_{AA} se incubaron con el anticuerpo anti DC/L-SIGN (α 526) durante 30 minutos en frío para permitir la unión de la lectina con esta molécula.

A partir de ese momento ($t = 0$), se reincubaron las células a 37°C durante periodos de tiempo cada vez mayores ($t = 30, 60, 120$ minutos) con el fin de permitir la internalización de la lectina. Tras lavar las células, se reincubaron con el anticuerpo conjugado anti IgGtotal-PE y mediante citometría de flujo, se analizó el porcentaje y la intensidad de fluorescencia debida a las moléculas de lectina que quedan en la superficie celular.

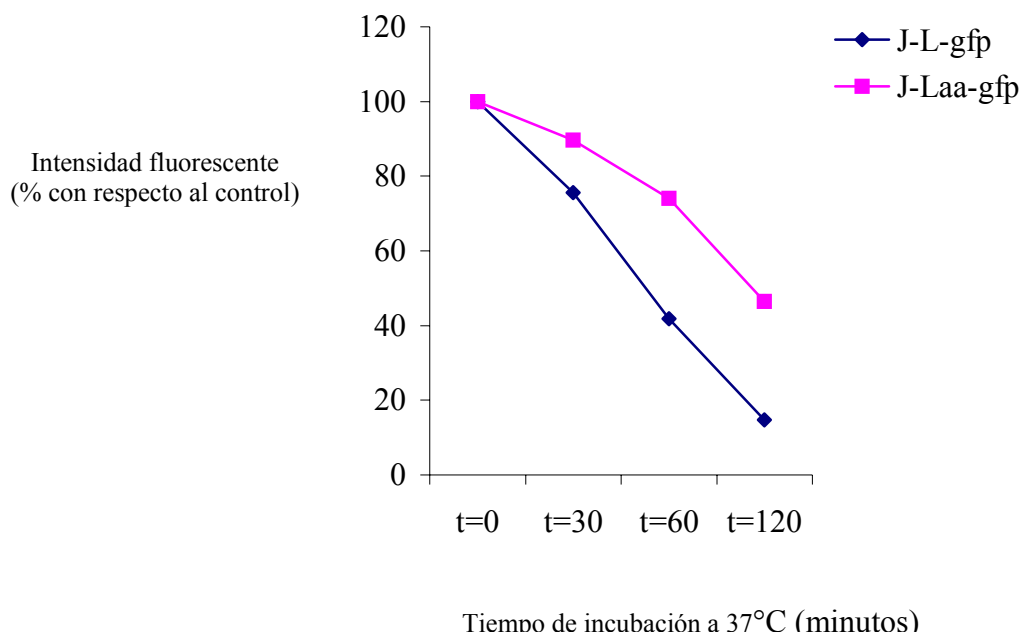


Figura 39.

La mutación dileucina de L-SIGN_{AA} dificulta la internalización de la lectina.

Jurkat-L-SIGN y J-L-SIGN_{AA} se preincubaron con el anticuerpo α 526.

Posteriormente, alícuotas de igual volumen se re-incubaron a 37° durante periodos cada vez más largos y tras reincubar con un anticuerpo conjugado, se analizó mediante citometría el porcentaje y la intensidad de fluorescencia de las células.

Los valores de la gráfica están normalizados y expresados en % a la intensidad fluorescente de células positivas en el control.

En la Fig.39 se muestra cómo la señal fluorescente debida a las lectinas que todavía están en la membrana, es mucho mayor en las células que expresan la lectina mutada J-L-SIGN_{AA}.

Así por ejemplo, tras 2 horas de incubación con el anticuerpo, se observa un 50% de señal fluorescente en las células que expresan la lectina mutada (J-L-SIGN_{AA}), frente a un 10% de señal fluorescente debida a las células J-L-SIGN.

6.3 La mutación dileucina de L-SIGN_{AA} reduce de manera específica la infección de rEBO-GP.

Al comparar los niveles de infección de células Jurkat-L-SIGN y células Jurkat-L-SIGN_{AA} con retrovirus rEBO-GP, se observó una reducción considerable (más del 80%) en las células que expresan la lectina mutada L-SIGN_{AA} (Fig 40).

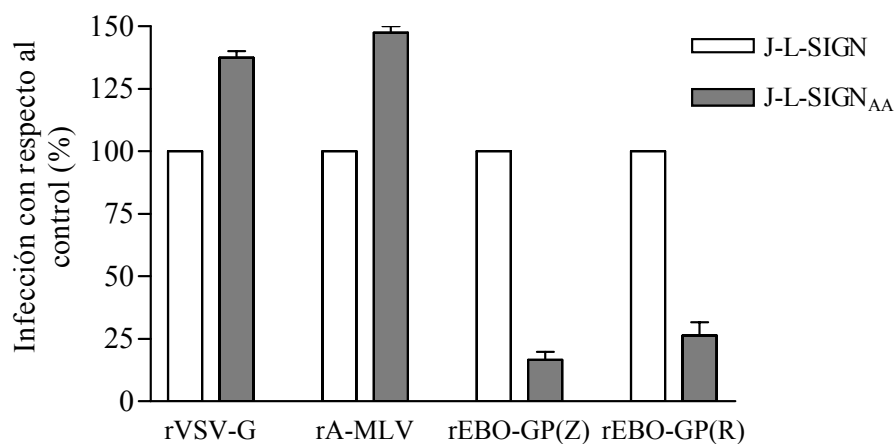


Figura 40.

La mutación dileucina de L-SIGN_{AA} reduce de manera específica la infección de rEBO-GP.

Esta reducción de la infección de células que expresan la lectina mutada (Jurkat-L-SIGN_{AA}), sólo se observa con retrovirus rEBO-GP pero no con otras envueltas como la del retrovirus rVSV-G ó rA-MLV, lo cual indica que el efecto de la mutación dileucina en la lectina L-SIGN_{AA} es específico para aquellos virus que utilizan la lectina como medio para infectar las células.

7 DC-SIGN puede actuar como “trans” receptor de rEBO-GP

Estudios sobre la infección del virus VIH parecen indicar que la lectina DC-SIGN además de unirse a este virus, es capaz de transmitirlo desde la célula dendrítica y presentarlo a los linfocitos T, aumentando la infección de estas células¹²⁵.

Con objeto de analizar si la lectina DC-SIGN puede actuar como mediador de la infección en trans del virus Ébola, se realizaron los siguientes experimentos:

Células linfocitarias Jurkat, tanto parentales como DC-SIGN positivas, se incubaron en rotación durante 1 hora con retrovirus rEBO-GP ó rVSV-G y tras lavar las células para eliminar restos de virus no unidos a las células se co-cultivaron con la línea celular adherente HeLa.

Al cabo de 48h. se analizó el grado de infección de las células HeLa mediante la producción de luciferasa.

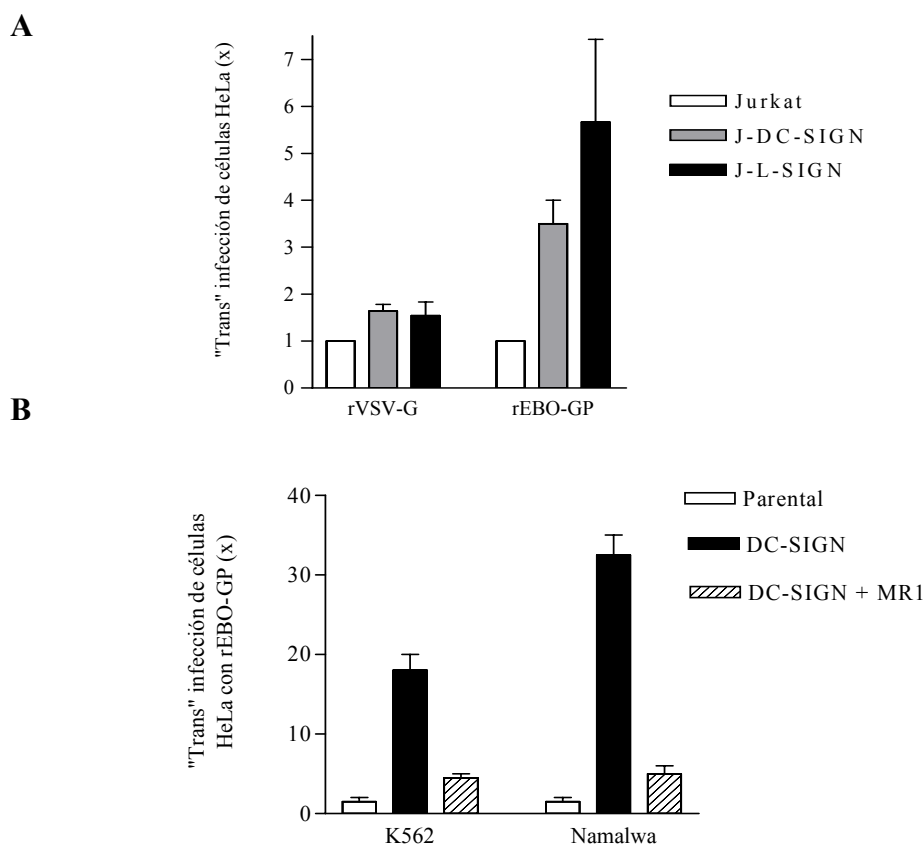


Figura 41.

DC-SIGN puede actuar como “trans” receptor de retrovirus rEBO-GP.

Como se observa en la Fig 41-A, el nivel de infección de células HeLa debido a retrovirus rEBO-GP es mucho mayor (entre 4 y 7 veces más que el control), cuando estas partículas virales han estado en contacto previamente con células que expresan la lectina DC/L-SIGN.

De hecho, la infección de células HeLa con retrovirus rEBO-GP, previamente incubados en rotación con células Jurkat, arroja valores basales (1.000-3.000 URL); mientras que la infección de estas mismas células (HeLa) debida a rEBO-GP incubados previamente con células Jurkat-DC/L-SIGN alcanza valores de 8.000 y 14.000 URL.

Por el contrario, los niveles de infección de células HeLa con retrovirus rVSV-G son similares tanto si este retrovirus recombinante ha estado en contacto con células parentales (Jurkat) como con células DC/L-SIGN positivas (Fig 41-A, parte izquierda)

El efecto de DC-SIGN como trans receptor de retrovirus rEBO-GP, se observa más claramente empleando células eritroleucémica (K562) ó linfocitos B (Namalwa). En el primer caso, las células K562-DC-SIGN son capaces de transmitir los retrovirus rEBO-GP 20 veces más que las células parentales (Fig,41-B); mientras que, las células Namalwa-DC-SIGN promueven la infección de células susceptibles por un factor de 30, comparado con las células parentales.

Además, el efecto de esta trans infección se puede bloquear utilizando anticuerpos monoclonales anti DC-SIGN (Fig 41-B)

Para confirmar este papel de DC-SIGN como trans receptor de retrovirus rEBO-GP, se realizó un experimento similar al descrito para las líneas linfocitarias pero utilizando células dendríticas derivadas de monocitos.

A partir de *buffy-coats*, se aislaron las células mononucleares y tras estimulación con GM-CSF e IL-4, se obtuvo una población de células dendríticas al cabo de 7 días.

La expresión de la lectina DC-SIGN en esta población, se analizó por citometría empleando el anticuerpo monoclonal anti DC-SIGN α 612-PE.

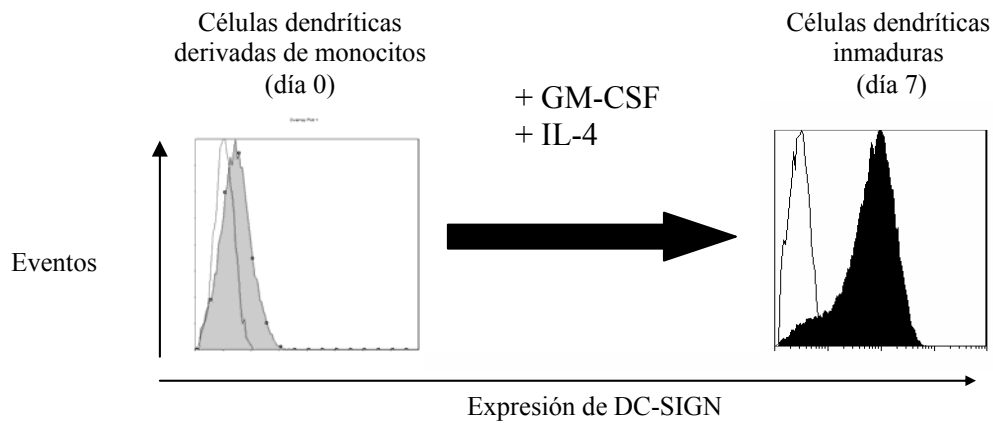


Figura 42.

Expresión de la lectina DC-SIGN en células dendríticas derivadas de monocitos.

Células dendríticas (CD) se incubaron con retrovirus rVSV-G, rEBO-GP (Z) ó rEBO-GP (R) en presencia o no del anticuerpo monoclonal anti DC-SIGN: MR1.

Tras lavar las células se co-cultivaron sobre una monocapa de células HeLa y al cabo de 48 horas se midió el nivel de luciferasa en las células HeLa.

Como control, se utilizó la misma cantidad de sobrenadante infeccioso sin incubar con células dendríticas y se añadió directamente a células HeLa.

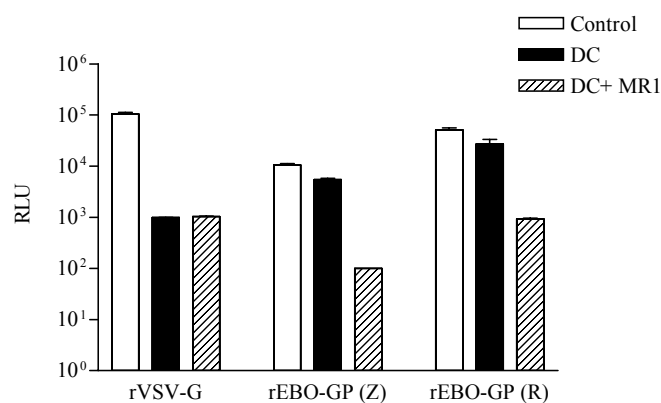


Figura 43.

Las células dendríticas pueden transmitir retrovirus rEBO-GP a través de la lectina DC-SIGN.

La adición del anticuerpo específico MR1 durante la incubación de células dendríticas con las partículas pseudotipadas, inhibe de manera selectiva la infección de células HeLa debida a retrovirus rEBO-GP, mientras que la infección por retrovirus rVSV-G no se afecta en presencia del anticuerpo MR1.

8 Papel de la glicosilación de la glicoproteína del virus Ébola en la interacción con la lectina DC-SIGN.

8.1 Inhibición de la unión entre rEBO-GP y células DC-SIGN positivas por Manano

Para analizar la importancia de los residuos glicosilados de la envuelta del virus Ébola y su implicación en la infección mediada por la lectina DC-SIGN, se estudió el efecto del compuesto Manano A) en la capacidad de unión de DC-SIGN a GP1-Fc y B) en la infección de rEBO-GP en células J-DC-SIGN.

Células Jurkat-DC-SIGN se incubaron con la proteína quimérica GP1-Fc en presencia o no de Manano (50µg/mL). Mediante análisis por citometría (Fig 44-A) se observa una inhibición total de la unión de células J-DC-SIGN a GP1-Fc con una concentración de manano de 50µg/mL.

Para analizar el efecto del Manano en la infección de rEBO-GP mediada por DC-SIGN, se incubaron células Jurkat-DC-SIGN con retrovirus rVSV-G ó rEBO-GP en presencia o no (control) de cantidades crecientes de Manano (25 y 50µg/mL) y al cabo de 48 horas se midió el nivel de infección celular mediante la producción de luciferasa.

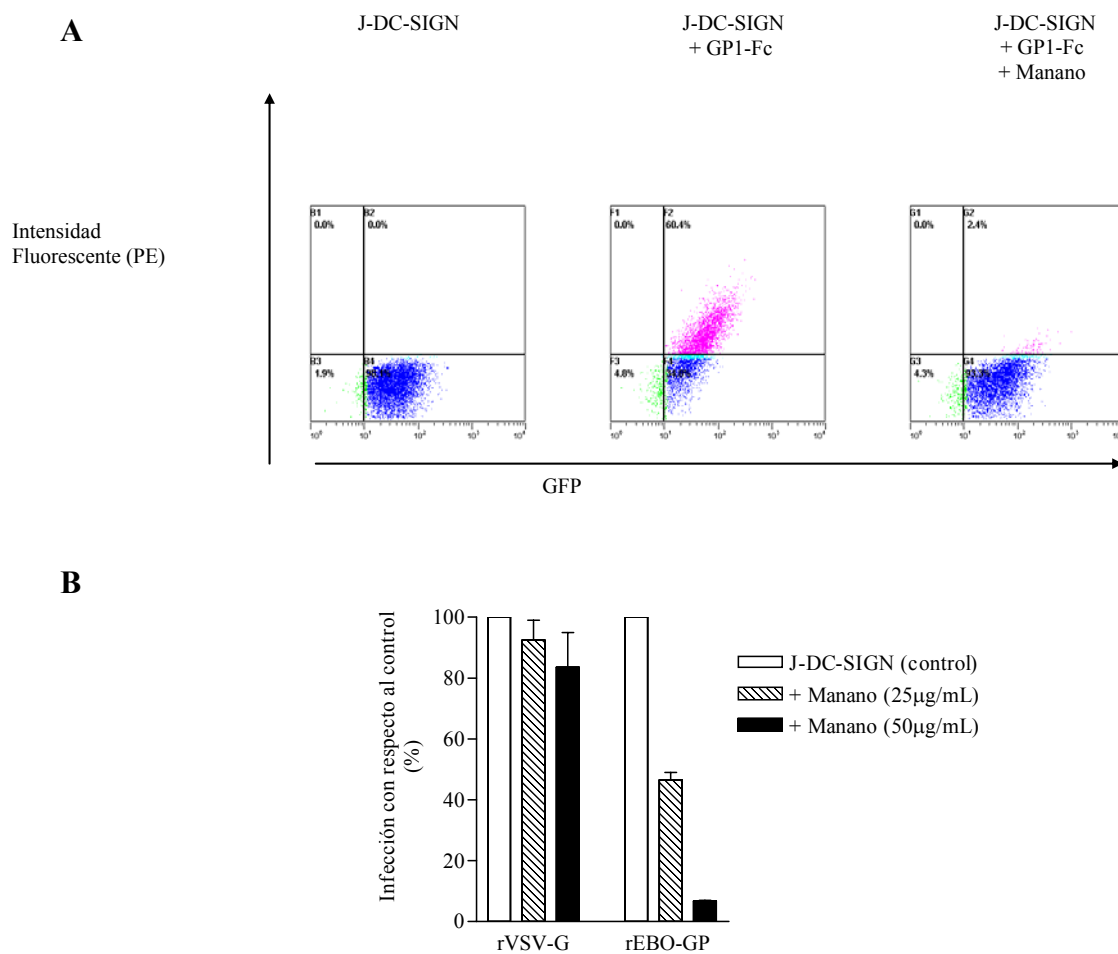


Figura 44.

A-La unión de la glicoproteína del virus Ébola (GP1-Fc) a DC-SIGN se inhibe con Manano

B-El Manano inhibe la infección de rEBO-GP vía DC-SIGN

Como se observa en la Figura 44-B, la adición de Manano afecta de manera específica los niveles de infección de retrovirus rEBO-GP en células J-DC-SIGN; con un descenso en los niveles de infección de un 50% en presencia de 25 µg/mL de Manano y una reducción de más del 90% con 50 µg/mL de Manano.

8.2 Los residuos N-glicosilados son responsables de la interacción de rEBO-GP a DC-SIGN.

El uso de compuestos como el Manano que inhiben la unión e infección de partículas retrovirales rEBO-GP a través de la lectina DC-SIGN, es una manera indirecta de analizar la importancia de los residuos glicosilados de la envuelta del virus Ébola con la lectina DC-SIGN.

Por este motivo, se eliminó mediante digestión enzimática los residuos N-glicosilados presentes en la glicoproteína del virus Ébola y se estudió entonces la capacidad de infección de estos retrovirus recombinantes en diferentes células.

Alicuotas iguales de rEBO-GP se trataron o no con el enzima Endoglicosidasa-H (endoH) durante 30 minutos a 37°C y posteriormente se añadieron a células HeLa y Jurkat-DC-SIGN.

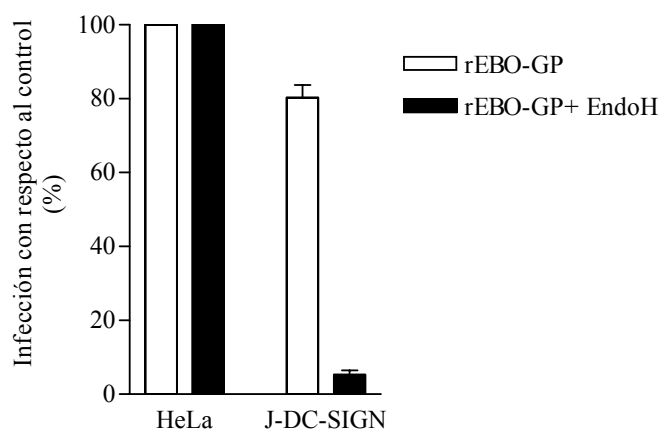


Figura 45.

Inhibición específica de la infección de rEBO-GP tratados con endoglicosidasaH en células J-DC-SIGN

El tratamiento de las partículas retrovirales rEBO-GP con endoglicosidasaH disminuye en más de un 90% la infección en la línea Jurkat-DC-SIGN, sólo permisiva a la entrada de rEBO-GP cuando expresa la lectina. Sin embargo, este mismo tratamiento de los retrovirus rEBO-GP con la enzima endoglicosidasa-H no afecta la capacidad de infección en la línea celular HeLa (Fig 45).

8.3 Contribución de diferentes residuos N-glicosilados en la infección de rEBO-GP mediada por DC-SIGN.

Para analizar la contribución individual de algunos residuos potenciales de N-glicosilación de la glicoproteína del virus Ébola y su implicación en la capacidad infectiva a través de la lectina DC-SIGN; se utilizaron distintas mutantes cedidas por el Dr. A. Sánchez (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta).

En concreto, la mayoría de estas mutaciones consisten en una sustitución del aminoácido Asparragina (N) por Aspartato (D); N204D , N257D , N277D , N296D , N563D y N618D.

Otra de las mutantes presenta la sustitución N223Y.

Por último la mutante: (Δ 309-489) tiene delecionada la mayor parte de la región mucina (donde además de existir 8 posibles residuos de N-glicosilación están también presentes la mayoría de los residuos O-glicosilados).

Después de producir retrovirus recombinantes con cada una de estas envueltas mutadas, se comparó la capacidad infectiva de cada mutante en la línea Jurkat-DC-SIGN con respecto a la envuelta nativa del virus Ébola. La cantidad de partículas infectivas empleada en este ensayo está estandarizada en base a los niveles de infección de cada mutante en células HeLa.

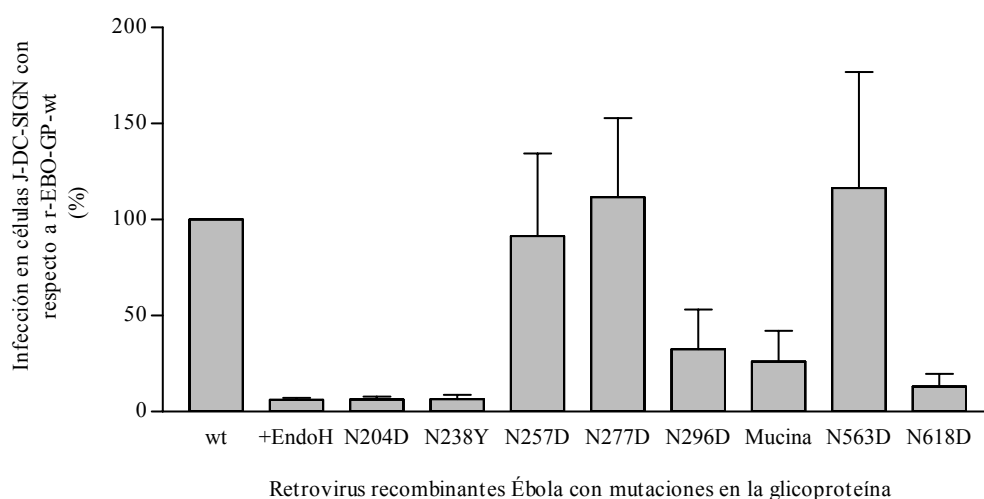


Figura 46.

Infección de células J-DC-SIGN con retrovirus rEBO-GP nativa y mutantes.

Como se puede observar en la Fig 46, no todos los residuos N-glicosilados contribuyen por igual a infección de los retrovirus rEBO-GP en las células J-DC-SIGN.

Únicamente 3 Asparraginas: N204, N238 y N618 parecen ser claves en la infección, pues su sustitución de manera independiente genera valores de infección por debajo del 10% con respecto a la envuelta natural y este efecto es similar al obtenido con la enzima endoglicosidasaH, donde se perderían todos los residuos de N-glicosilación (Fig 46).

Un efecto menos llamativo se obtiene sustituyendo el residuo N296 y la mutante de la región mucina ($\Delta 309-489$) pues la capacidad infectiva de estas envueltas sólo disminuye un 50% con respecto al control (Fig 46).

9 Una construcción de manosas multivalente: BH30-Man, inhibe la interacción de rEBO-GP con DC-SIGN.

La descripción de DC-SIGN como mediador en la infección de rEBO-GP y la implicación de los residuos de manosa de la envuelta vírica en esa interacción, permite diseñar moléculas que de manera específica impidan la unión de rEBO-GP a la lectina DC-SIGN.

En este apartado se muestra la actividad inhibitoria de un compuesto: BH30-Man, derivado del dendrímero Boltorn (BHTM) frente a la infección de rEBO-GP mediada por DC-SIGN.

Células Jurkat-DC-SIGN se incubaron de manera independiente con retrovirus rVSV-G ó rEBO-GP en presencia de concentraciones crecientes del compuesto BH30-Linker ó BH30-Man y al cabo de 48 horas se midió la producción de luciferasa en estas células.

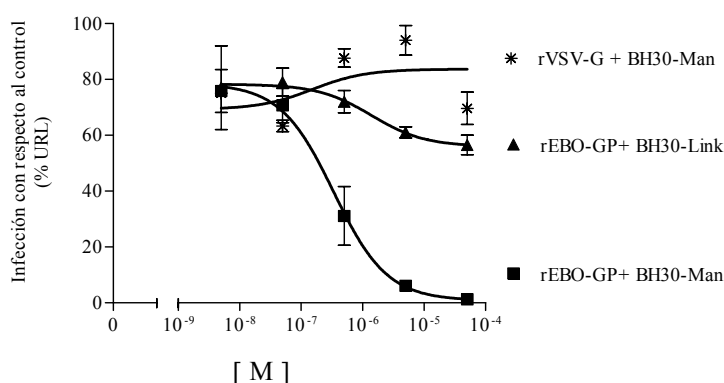


Figura 47.

BH30-Man impide la infección de rEBO-GP mediada por DC-SIGN.

Jurkat-DC-SIGN se incubaron con rVSV y rEBO-GP en presencia de los dendrímeros BH30-Linker y BH30-Man. Al cabo de 48 horas se midió la producción de luciferasa.

Los niveles de infección están calculados con respecto a los valores de luciferasa de células infectadas en ausencia de compuesto.

Como se observa en la figura 47, la infección de partículas retrovirales rEBO-GP es inhibida de manera dosis dependiente por BH30-Man, con un valor de IC_{50} de 340nM . Esta inhibición de los retrovirus rEBO-GP es siempre mucho menor cuando se emplea el compuesto BH30-Linker (IC_{50} de 60 μ M), que carece de manosas terminales.

Sin embargo, la infección de rEBO-GP en células HeLa no se ve afectada cuando se añade BH30-Man, lo cual indica que BH30-Man sólo actúa bloqueando la lectina DC-SIGN.

Por otro lado, los niveles de infección del retrovirus rVSV-G en presencia de BH30-Man son similares al control (sin el compuesto BH) aún empleando la concentración máxima (10 μ M).

9.1 BH30-Man se une de manera específica a las células dendríticas y compite con GP1 en su unión a DC-SIGN.

La especificidad del compuesto BH30-Man, se estudió comparando la capacidad de unión de este compuesto a las células dendríticas, con respecto al compuesto control (BH30-Link).

Células dendríticas derivadas de monocitos se incubaron con una concentración 3 μ M del compuesto fluorescente BH30-Link-FITC (control) ó BH30-Man-FITC y tras lavar las células, se analizó por citometría de flujo el porcentaje e intensidad de la señal.

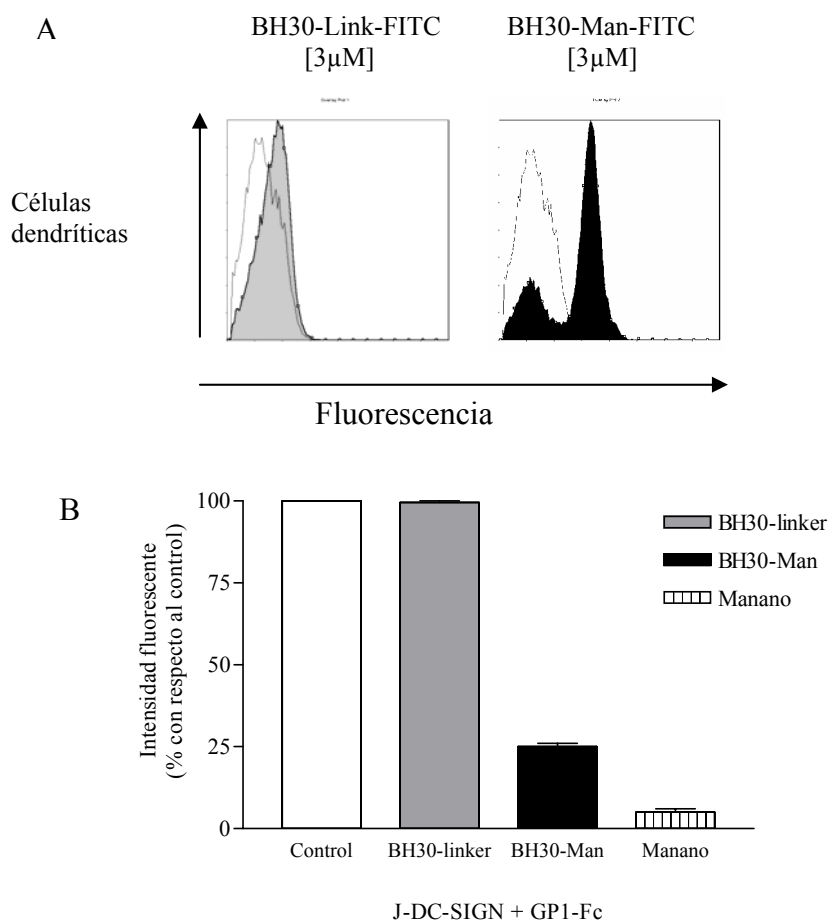


Figura 48.

A- BH-30Man-FITC se une de manera específica a las células dendríticas.

B- BH-30 Man compete con la glicoproteína del virus Ébola en su unión a DC-SIGN.

Como se observa en la gráfica 48-A, únicamente BH30-Man-FITC se une a las células dendríticas, observándose un 75% de células fluorescentes con una intensidad media de 60, frente a un 5% con el compuesto BH30-Link-FITC (IMF= 22).

Para confirmar que BH30-Man se une a DC-SIGN de manera específica, se analizó el grado de competición de este compuesto en la unión de GP1-Fc con células DC-SIGN positivas (Fig.48-B).

Jurkat-DC-SIGN se incubaron de manera independiente con la proteína quimérica GP1-Fc en presencia o no (control) de los compuestos BH30-linker y BH30-Man durante 30 minutos a 4°C para evitar la internalización.

Tras lavar las células para eliminar restos de proteínas no unidas y añadir el segundo anticuerpo conjugado (antiFc-PE), se analizó por citometría la intensidad de la señal.

Utilizando la misma concentración de cada compuesto (25µg/mL), únicamente BH30-Man y el Manano son capaces de bloquear la unión de GP1-Fc a las células DC-SIGN positivas.

Mientras el efecto de BH30-Link sobre la unión de GP1-Fc a las células DC-SIGN positivas es prácticamente nulo, BH30-Man reduce hasta un 75% la intensidad fluorescente en comparación con el control.

9.2 BH30-Man bloquea la infección en “trans” de rEBO-GP mediada por DC-SIGN

Una vez comprobada la capacidad del dendrímero BH30-Man de competir con retrovirus rEBO-GP en la unión a células DC-SIGN positivas; se exploró también el efecto de BH30-Man en la función de DC-SIGN como trans-receptor.

Para este propósito, se incubaron de manera independiente células K562 y K562-DC-SIGN durante 1 hora en rotación con r-EBO-GP, en presencia o no (control) del glicodendrímero BH30-Man y del anticuerpo MR1 (anti DC-SIGN).

Al cabo de este tiempo, se lavaron las células para eliminar restos de partículas víricas no unidas y se co-cultivan sobre una monocapa de células HeLa.

Tras 48 horas, se midió el grado de infección en las células HeLa a través de la producción de luciferasa.

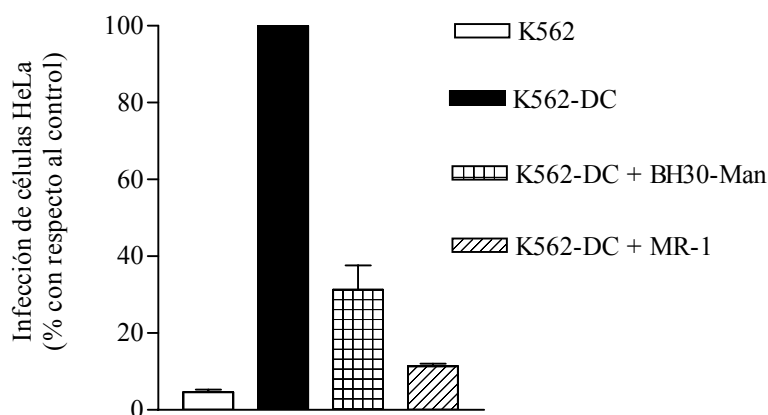


Figura 49.

BH30-Man bloquea la infección en “trans” mediada por DC-SIGN

Como se observa en la figura 49, únicamente las células que expresan DC-SIGN tienen capacidad de transmitir los rEBO-GP e infectar las células HeLa.

Esta capacidad de infección en “trans”, puede inhibirse con el compuesto BH30-Man, ya que sólo se detecta un 30% de infección en las células HeLa comparado con el control.

De manera similar, el anticuerpo monoclonal MR1 es capaz de inhibir hasta un 80% la capacidad de transmisión de rEBO-GP mediante células DC-SIGN positivas.

10 Estudio de la inhibición de la infección de rEBO-GP por Cianovirina-N

Cianovirina-N (CV-N) es una lectina aislada originalmente de la cianobacteria *Nostoc ellipsosporum* que presenta alta afinidad por estructuras de azúcares presentes en la envuelta del virus VIH^{157,158}.

En base a la homología de la envuelta de VIH y los filovirus, decidimos estudiar la actividad de CV-N frente a la infección de rEBO-GP.

Para analizar si CV-N puede bloquear la infección de rEBO-GP en células HeLa y células DC-SIGN positivas, se incubaron las partículas de rEBO-GP con cantidades crecientes de CV-N durante 20 minutos a temperatura ambiente y al cabo de este tiempo se añadió la mezcla a cada línea celular.

Inhibición de la infección de rEBO-GP por CV-N:

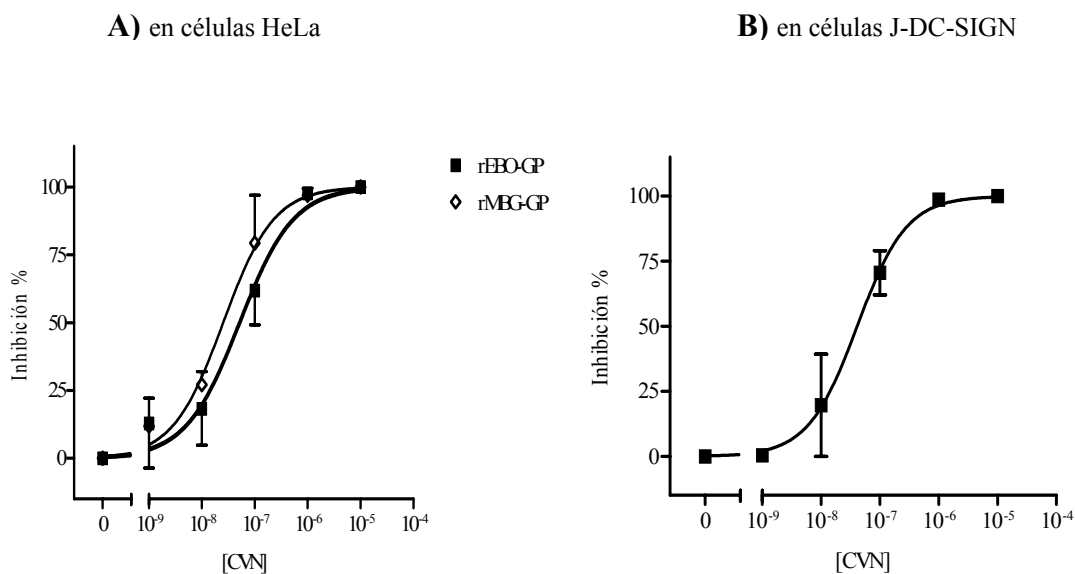


Figura 50.

Inhibición de Cianovirina-N en la infección de rEBO-GP en células HeLa (A) y J-DC-SIGN (B)

Células HeLa (A) y Jurkat-DC-SIGN (B) se infectaron con rEBO-GP previamente incubados con CV-N y al cabo de 48 horas se midió la producción de luciferasa por las células.

Los niveles de infección en presencia del inhibidor CV-N se calcularon con respecto a la infección basal sin dicho compuesto y representados en %.

La figura 50-A muestra como CV-N de manera dosis dependiente, es capaz de inhibir la entrada tanto de los retrovirus recombinantes Ébola como Marburg en células HeLa, con valores de $IC_{50}=60\text{nM}$ para rEBO-GP y una $IC_{50}= 30\text{nM}$ en el caso de rMBG-GP. Además, CV-N también puede bloquear la infección de rEBO-GP mediado por DC-SIGN, con un valor de IC_{50} de 65nM.

Según estos resultados, CV-N sería capaz de reconocer no sólo envueltas de VIH, sino que además puede reaccionar con las envueltas de los filovirus, tanto Ébola como Marburg.

DISCUSIÓN

La técnica del pseudotipado viral ofrece la posibilidad de generar en el laboratorio partículas víricas semejantes al virus natural en cuanto a su composición externa, pero defectivos en su capacidad replicativa una vez que se encuentran en el interior de las células a las que infectan.

Este hecho permite hacer un análisis rápido de la función que cumple la glicoproteína viral y facilita el estudio de los mecanismos que utiliza el virus para infectar las células, sin necesidad de emplear el virus natural.

Por estas características, esta técnica ha sido ampliamente utilizada^{103,159,160}.

Para realizar la parte experimental que se muestra en esta tesis, se ha utilizado la técnica del pseudotipado viral y se han producido retrovirus recombinantes con envuelta de filovirus.

Empleando el vector lentiviral basado en VIH (pNL4.3lucR^{-E}) y otro plásmido que codifica la glicoproteína viral (p1012-EBO-GP) ó (p1012-MBG-GP), se consiguen títulos de 10⁵ partículas/ml para el caso de los retrovirus recombinantes con envuelta de virus Ébola (rEBO-GP) y unas 10⁶ partículas/ml para el caso de los retrovirus recombinantes con envuelta de virus Marburg (rMBG-GP)

La producción de retrovirus rEBO-GP y rMBG-GP es menor que la obtenida con la glicoproteína del virus de la Estomatitis Vesicular (rVSV-G) o el virus Anfotrópico murino (rA-MLV); probablemente debido a la citotoxicidad de las glicoproteínas de los filovirus, en especial la glicoproteína del virus Ébola.

Varios autores han descrito cómo la expresión *per se* de la glicoproteína transmembrana del virus Ébola, contribuye de manera decisiva a la destrucción celular característica de la infección^{105,58,92} por lo que la generación de partículas retrovirales con envuelta de virus Ébola se ve desfavorecida.

La causa de esta citotoxicidad parece deberse al alto número de glicosilaciones de tipo “high mannose” que presenta la glicoproteína del virus Ébola, que supone un gasto de la maquinaria celular dedicada a la glicosilación^{85,86,70,87}.

Según los trabajos de Jeffers y col. , la zona de la glicoproteína más implicada en esta toxicidad celular puede ser la región mucina (aminoácidos 277 a 501), ya que la expresión de una mutante defectiva en esta región, reduce los efectos citopáticos⁵⁸ y aumenta por 74 el número de partículas víricas recombinantes generadas con respecto a la glicoproteína nativa⁹¹.

Además, la expresión de la glicoproteína en la membrana celular parece afectar a otras moléculas de superficie, en especial a las integrinas de tipo β , con lo que la morfología de la célula se ve alterada¹⁰⁶.

A pesar de la relativa facilidad y seguridad con la que se producen retrovirus recombinantes con envuelta de filovirus, existen algunas limitaciones en esta técnica.

Una de estas limitaciones está relacionada con la morfología que presentan los retrovirus rEBO-GP y rMBG-GP. Mientras los filovirus son alargados, con formas parecidas a bastones o hebras, los retrovirus rEBO-GP y rMBG-GP son esféricos debido a que están constituidos con proteínas del virus VIH que característicamente adquiere esa disposición.

Para producir partículas semejantes al virus vivo (“virus like particles” VLP), es necesario co-expresar la proteína VP40 (matriz) junto con la glicoproteína de la envuelta viral⁷⁷.

Además, los retrovirus recombinantes con envuelta de filovirus carecen de otras proteínas naturales que, aunque no sean necesarias para la entrada del virus en la célula son importantes para completar su ciclo de infección: (tráfico intracelular, replicación del virus, ensamblaje, etc.), por tanto los experimentos con pseudotipos virales están limitados al análisis de la entrada viral.

Al analizar el rango de infección de los retrovirus recombinantes con envuelta de virus Ébola frente a una serie de líneas celulares, se observa que únicamente las células 293T, HeLa y HOS son susceptibles de infección, mientras que ninguna de las líneas linfocitarias: Jurkat, U937 o eritroleucémica:K562 son capaces de internalizar estos retrovirus.

Este resultado contrasta con el tropismo de otros retrovirus como el rVSV-G o el

rA-MLV, los cuales son capaces de infectar todas las líneas celulares antes descritas. Por tanto, esta diferencia parece indicar que las células linfoides carecen o bien de receptores o de algún mecanismo que medie la entrada de los filovirus.

La incapacidad del virus Ébola de infectar células linfocitarias ya había sido descrita por otros investigadores mediante el empleo de pseudotipos virales^{103,159,160} y sirvió de base para iniciar la búsqueda de posibles moléculas receptoras en las células susceptibles.

La identificación de los receptores celulares de los virus, es un aspecto clave para entender la patogénesis y poder aplicar estrategias terapéuticas.

Entre las moléculas propuestas como mediadoras de la infección del virus Ébola, destacan las integrinas (en especial las del grupo β), el receptor de asialoglicoproteína y el receptor alfa del Folato. Sin embargo, con ninguna de ellas se ha demostrado de manera clara su implicación en la infección.

En el caso de las integrinas, el empleo de anticuerpos específicos frente a estas moléculas, no evita la entrada de retrovirus recombinantes Ébola¹⁰⁶.

El receptor de asialoglicoproteína parece actuar sobre todo en células de hígado facilitando la entrada de virus Marburg, pero existen células que no expresan esta molécula y que igualmente son permisibles a la infección.

Más recientemente se ha descrito al receptor alfa del Folato como un cofactor que media la entrada tanto del virus Ébola como Marburg¹¹² sin embargo, no todas las células permisibles a la infección expresan esta molécula, y por otro lado, existen células que aunque expresan el receptor del folato se infectan de manera independiente a esta molécula⁹³.

Además, la expresión del receptor alfa del folato en líneas linfocitarias no permite la infección de retrovirus recombinantes Ébola.

Por tanto, es necesaria la búsqueda de nuevas moléculas celulares que estén implicadas en el proceso de infección y diseminación del virus Ébola.

DC-SIGN, es una lectina de tipo C, que se expresa en células dendríticas y que fue originalmente descubierta como una proteína de membrana que presentaba un alto grado de afinidad por la glicoproteína gp120^{127,126}; mayor incluso que el receptor CD4. Además, parece que DC-SIGN puede jugar un papel muy importante durante la diseminación del virus VIH, facilitando la infección desde las zonas de contagio hasta los nódulos linfáticos¹²⁵.

El descubrimiento de esta nueva lectina, despertó el interés de diferentes investigadores que abordaron la posibilidad de que esta molécula reconozca otros patógenos.

En base a las similitudes que presentan las glicoproteínas del virus VIH y Ébola, esta tesis, pretende analizar la relación entre el virus Ébola y las lectinas de tipo C: DC/L-SIGN.

Con este fin, se inició el estudio explorando la capacidad de unión de estas lectinas a la envuelta del virus Ébola.

Empleando una proteína quimérica que expresa la porción extracelular de la glicoproteína del virus Ébola (GP1) fusionada a la fracción constante de la inmunoglobulina G humana: GP1-Fc, se comparó la capacidad de unión de la línea parental Jurkat (J) y J-DC-SIGN con las proteínas quiméricas GP1-Fc y gp120-Fc.

Mediante citometría de flujo y utilizando un segundo anticuerpo antiFc conjugado con ficoeritrina (PE), únicamente se observó señal positiva fluorescente (PE) en las células Jurkat -DC-SIGN y no en las células parentales (Jurkat).

Además, la interacción entre DC-SIGN y la glicoproteína del virus Ébola, se puede bloquear de manera específica empleando anticuerpos monoclonales anti DC-SIGN como α 526 y MR1 (Figura 33)

De manera similar a lo que se observa con DC-SIGN, la expresión de la lectina homóloga L-SIGN en células no permisivas a la infección de retrovirus rEBO-GP (Jurkat-L-SIGN), es suficiente para permitir la unión de la envuelta del virus Ébola a estas células.

Debido a que en este modelo celular, la única diferencia entre la línea parental y las células DC/L-SIGN positivas, radica en la expresión de la lectina; se puede afirmar que DC/L-SIGN es la única molécula que media la unión entre la glicoproteína del virus Ébola y las células, por tanto, se puede considerar a las lectinas DC/L-SIGN como moléculas de membrana con afinidad por el virus Ébola.

Como se muestra en estos resultados, las lectinas DC-SIGN no sólo son capaces de reaccionar con la envuelta del VIH (gp120), sino que además presentan un alto grado de afinidad por la glicoproteína del virus Ébola (GP1).

Otros estudios han demostrado que DC-SIGN también es capaz de unirse a diversos patógenos distintos del VIH y virus Ébola. Así por ejemplo, transfectantes que expresan DC-SIGN, se unen de manera específica a ciertas especies de *Leishmania*^{146,147}; *Mycobacterium tuberculosis*¹⁵⁰; *Citomegalovirus*¹⁶¹; virus de la Hepatitis C¹⁴⁵; levadura *Candida albicans*¹⁵¹; virus Dengue^{148,149}.

También se ha detectado capacidad de unión a la bacteria *Helicobacter pylori*, y al parásito *Schistosoma mansoni*¹⁵².

Todos estos datos, hacen suponer que la lectina DC-SIGN, además de ser importante en la activación de los linfocitos T, también desempeña un papel fundamental en el proceso de reconocimiento de patógenos, y como parte de las células dendríticas, su actuación repercutirá en la respuesta inmune.

Para analizar el papel de las lectinas DC/L-SIGN en la infección del virus Ébola, se expresó DC-SIGN de manera transitoria en células susceptibles 293T, observándose un incremento en los niveles de infección de 100 veces con respecto a las células que no expresaban la lectina. De igual manera, la expresión de la lectina L-SIGN, aumenta por un factor de 60 la internalización de retrovirus rEBO-GP.

Este aumento considerable en los niveles de infección parece indicar que la lectina contribuye de manera positiva a la entrada de retrovirus rEBO-GP en estas células, posiblemente porque la lectina incrementa las zonas de contacto entre las partículas virales Ébola y la célula, facilitando su posterior infección.

Esta idea se apoya en el hecho de que el aumento en los niveles de infección, sólo se detecta con envueltas virales que presentan afinidad por la lectina DC-SIGN.

En el caso del retrovirus rVSV-G, los niveles de infección son similares tanto si la célula expresa o no la lectina, probablemente porque esta envuelta viral no se une a DC-SIGN y por tanto la internalización de estos virus no depende de la presencia de la lectina.

Por otro lado, el aumento de infección de los retrovirus Ébola en células 293T sólo ocurre cuando se expresa la lectina natural y no una mutante (DC-SIGN_{V351G}) que presenta un cambio puntual en la zona de reconocimiento a carbohidratos (CRD). Mediante experimentos de citometría de flujo, se observa que la lectina mutante (DC-SIGN_{V351G}) pierde más de un 70% de afinidad por las glicoproteínas gp120-Fc y GP1-Fc, y en consecuencia su eficacia en la infección de retrovirus Ébola se ve drásticamente disminuída con respecto a la lectina natural.

DC-SIGN_{V351G} fué cedida por el doctor Geijtenbeek y col. quienes ya habían descrito la especificidad en la interacción de esta lectina con diferentes ligandos¹³⁹. En concreto, la mutación V351G hace que la lectina pierda afinidad por gp120, pero no por ICAM-3 (otro ligando presente en los linfocitos T).

La descripción de la pérdida de afinidad de DC-SIGN_{V351G} por el virus Ébola, ayuda a caracterizar las particularidades de la interacción entre esta lectina y sus ligandos y esto puede resultar importante a la hora de diseñar inhibidores específicos.

Los resultados mostrados hasta ahora, no permiten discriminar si la lectina actúa únicamente como molécula de unión a este virus o si puede actuar como un receptor, ya que la expresión de DC-SIGN se realizó en células permisivas a la infección de rEBO-GP.

Por este motivo, se escogió una línea linfocitaria no susceptible de infección por virus Ébola, (Jurkat), se expresó de manera estable las lectinas DC-SIGN y L-SIGN y se analizó la capacidad de infección de retrovirus rEBO-GP en ellas.

Mientras las células parentales Jurkat no se infectan con retrovirus rEBO-GP (200 URL), las células Jurkat-DC/L-SIGN presentan valores de luciferasa de más de 10⁵ URL tras infectarlas con rEBO-GP, indicando que la expresión tanto de DC-SIGN como L-SIGN permiten la entrada de este retrovirus recombinante.

Este resultado indica que las lectinas DC/L-SIGN no sólo tienen afinidad por la envuelta del Ébola, sino que además son suficientes para mediar la infección de retrovirus recombinantes Ébola en células no susceptibles.

El efecto de DC-SIGN sobre la capacidad de infección de los retrovirus rEBO-GP parece ser específico, pues la presencia de estas lectinas en las células no afecta los niveles de infección de otros retrovirus recombinantes como el rVSV-G o rA-MLV.

Además, el empleo de varios anticuerpos monoclonales anti DC-SIGN (MR1 y α 526) bloquean de manera específica la interacción del virus con la lectina y reducen a nivel basal la infección de los retrovirus rEBO-GP.

Todos estos datos apuntan a la utilización de las lectinas DC/L-SIGN como única vía de entrada de rEBO-GP en este modelo celular, ya que este virus no es capaz de infectar las líneas linfocitarias a menos que éstas expresen la lectina DC/L-SIGN; por tanto, DC/L-SIGN no sólo se comportarían como moléculas con afinidad, sino que podrían actuar como receptores para el virus Ébola.

A diferencia de lo observado con el virus Ébola, DC-SIGN no media directamente la infección del virus VIH, pues es necesaria la presencia tanto de CD4 como los correceptores R5/X4^{125,162} para la fusión y entrada del VIH. Aunque existe una gran afinidad entre DC-SIGN y la glicoproteína gp120, esta lectina actuaría únicamente como molécula de unión al virus, facilitando la posterior entrada del VIH.

Para demostrar que las lectinas DC/L-SIGN pueden actuar como receptores de virus Ébola y que por tanto, regulan la internalización de estas partículas virales en nuestro modelo celular, se analizaron las secuencias que controlan el tráfico de estas lectinas.

La región citoplásmica de DC-SIGN contiene las secuencias doble leucina: L₁₄-L₁₅ y tirosina:YKSL, que se piensa están implicadas en la internalización y reciclaje de esta lectina. En el caso de DC-SIGN, se ha descrito que el cambio de los aminoácidos leucina L₁₄ y L₁₅ por Alanina A₁₄ A₁₅, reduce considerablemente la internalización tanto de la lectina como de los ligandos^{163,164}.

L-SIGN, a diferencia de su homóloga, únicamente posee la secuencia dileucina L₁₄-L₁₅, y por tanto, el análisis de la función de esta región resulta más sencillo.

Basándonos en esta homología de secuencias, se construyó una mutante de L-SIGN que contiene los aminoácidos A₁₄ A₁₅ en sustitución de las leucinas L₁₄-L₁₅.

Esta lectina mutante, se expresó en células Jurkat (Jurkat-L-SIGN_{AA}) y se estudió la implicación de esta mutación en la capacidad de infección de los retrovirus Ébola.

Como se muestra en la figura 38, la expresión de la lectina mutante L-SIGN_{AA} en células Jurkat, es similar o incluso mayor que la lectina natural. Además, L-SIGN_{AA} presenta la misma capacidad de unión a las proteínas gp120-Fc y GP1-Fc que la lectina natural; por tanto, esta mutación no afecta la función de reconocimiento y unión de la lectina por los ligandos.

Sin embargo, los niveles de infección de las células Jurkat-L-SIGN_{AA} por retrovirus recombinantes Ébola es un 90% menor comparado con células Jurkat-L-SIGN.

Por otro lado, el efecto que se observa al emplear la lectina mutada (L-SIGN_{AA}) y los retrovirus Ébola, es específico, ya que los niveles de infección de otros retrovirus como el rVSV-G permanecen invariables tanto si las células expresan la lectina natural o la mutante.

Estos resultados demuestran que la lectina L-SIGN es necesaria para permitir la infección de los retrovirus Ébola, ya que en este modelo celular, L-SIGN es la única molécula que media la entrada de los retrovirus Ébola.

Por tanto, todo parece indicar que L-SIGN se comporta como un receptor para los retrovirus rEBO-GP ya que el proceso de reconocimiento y unión de L-SIGN al virus Ébola así como la posterior internalización de estas partículas, está gobernada por la misma molécula, sin que medie ningún otro factor celular.

Además, al comparar la dinámica de internalización de ambas lectinas mediada por un anticuerpo específico anti DC/L-SIGN, se observa un porcentaje mayor de lectina mutada en la superficie celular frente a la lectina natural (figura 39).

Este dato indicaría que la internalización de la lectina L-SIGN_{AA} es mucho más lenta, debido probablemente a la ausencia de los residuos dileucina que estarían afectando la movilidad de la lectina.

Por tanto, la presencia de la secuencia dileucina en el tallo citoplasmático de DC/L-SIGN es necesaria para la propia internalización de la lectina, así como para los ligandos que reconoce esta molécula.

Ya que la mutación de determinadas secuencias que están implicadas en el reciclaje de la lectina DC/L-SIGN, afecta de manera importante la internalización de retrovirus Ébola, se puede afirmar que estas lectinas podrían comportarse como un receptor para el virus Ébola.

Trabajos recientes “in vitro”, demuestran que el virus Ébola es capaz de infectar células dendríticas derivadas de monocitos y además, puede replicarse de manera activa⁴¹.

La expresión de las lectinas DC-SIGN y L-SIGN está limitada a las células dendríticas^{165, 166, 167} y a células endoteliales sinusoides de hígado humano respectivamente¹³¹.

Sin embargo, distintos estudios demuestran que el virus Ébola puede infectar un amplio rango de células, sobre todo en estadios finales de la infección^{26, 42, 36, 46, 168, 169}.

Por tanto, aunque el presente trabajo hace incapié en la implicación de las lectinas DC/L-SIGN como mediadores de la infección del virus Ébola, deben existir otros receptores que faciliten la entrada del virus en diferentes células.

A pesar del reducido número de células humanas que presentan estas lectinas, la función de las células dendríticas es sumamente importante, sobre todo en la capacidad de respuesta inmune frente a patógenos, pues son células profesionales presentadoras de antígenos.

En este sentido, se ha sugerido que DC-SIGN podría jugar un papel muy importante durante la transmisión del VIH, pues participaría en la diseminación del VIH desde las zonas de contagio (zonas mucosas) hasta los nódulos linfáticos, donde se replica de manera activa^{164, 170}.

Esta hipótesis implica que las células dendríticas, deberían ser capaces de retener las partículas de VIH el tiempo suficiente hasta migrar a los órganos linfoides, sin que los virus pierdan su capacidad infectiva¹⁷¹ y presentar allí los virus a los linfocitos T.

Este mecanismo de “trans” infección desde las células dendríticas a células susceptibles, se ha atribuido fundamentalmente a la lectina DC-SIGN¹²⁵.

Para estudiar la capacidad de DC-SIGN de actuar como trans receptor de virus Ébola, se incubaron células linfocitarias parentales o DC-SIGN positivas con retrovirus recombinantes en rotación y tras lavar las muestras para eliminar restos de virus no unidos a las células, se co-cultivaron con células HeLa.

Al cabo de 48 horas se retiraron las células linfocitarias y se midió los niveles de luciferasa en las HeLa.

Como se muestra en la figura 41, únicamente las células que expresan DC-SIGN (Jurkat-DC-SIGN, K562-DC-SIGN y Namalwa-DC-SIGN) son capaces de transmitir los retrovirus recombinantes Ébola a células susceptibles HeLa.

Por tanto, esta lectina, al igual que con el VIH, podría facilitar la trans infección del virus Ébola y contribuir a la diseminación rápida de éste.

La eficacia en la transmisión de las partículas virales con envuelta de virus Ébola desde las células DC-SIGN positivas a las células susceptibles, varía según la línea celular utilizada. Así por ejemplo, las células Jurkat-DC-SIGN transmiten hasta 7 veces más retrovirus rEBO-GP que las células parentales, mientras que las células K562-DC-SIGN ó Namalwa-DC-SIGN promueven la infección de células susceptibles por un factor de 20 y 30 respectivamente. Esta diferencia en la eficacia de transmisión entre las distintas líneas celulares, puede deberse al nivel de expresión de la lectina. En base a los datos de citometría y valores de infección, las células Jurkat-DC-SIGN tendrían un número menor de moléculas DC-SIGN en membrana que las células K562-DC-SIGN ó Namalwa-DC-SIGN.

Estos resultados con líneas celulares se han confirmado utilizando células dendríticas generadas en laboratorio a partir de monocitos, siendo este fenómeno susceptible de bloqueo al utilizar anticuerpos monoclonales anti DC-SIGN, de manera que todo parece indicar que la célula dendrítica es capaz de unir retrovirus rEBO-GP a través de la lectina DC-SIGN y transmitirlos a células susceptibles.

Por tanto, parece que la lectina DC-SIGN puede funcionar no sólo como vía de internalización del virus Ébola, sino que además puede transmitir este virus a otras células permisivas¹⁷².

Los mecanismos que hacen posible la “trans” infección mediada por DC-SIGN, han sido estudiados sobre todo en relación al virus VIH, empleando líneas DC-SIGN positivas. Experimentos “in vitro”, han demostrado que esta lectina es capaz de mediar la internalización rápida de los virus VIH hacia un compartimento ácido, donde el virus VIH mantiene la integridad estructural y conserva la capacidad de infectar células linfocitarias. La internalización del virus VIH mediada por DC-SIGN, parece ser un requisito necesario para que se de este fenómeno de “trans” infección, como lo demuestra el uso de proteasas (tripsina) tras incubar células dendríticas con el virus¹⁶⁴.

Aunque en modelos celulares DC-SIGN es responsable de mediar la infección en “trans” del VIH, la relevancia de esta lectina en células dendríticas parece ser menor. Así por ejemplo, el uso de anticuerpos monoclonales anti DC-SIGN o manano, que bloquean eficazmente la transmisión del virus en líneas DC-SIGN+, es menos potente en CD primarias¹⁷³.

Además, las CD de macaco que expresan una lectina homóloga a DC-SIGN, son capaces de transmitir lentivirus de primates prescindiendo de esta lectina¹⁷⁴.

Por tanto, aunque DC-SIGN juega un importante papel en la captura y transmisión del VIH desde las células dendríticas a los linfocitos, pueden existir otras moléculas que contribuyan a este fenómeno.

Recientemente, empleando un modelo más fisiológico, se ha demostrado la participación de DC-SIGN en la transmisión del virus VIH, durante la migración de las células dendríticas desde la mucosa genital femenina hasta los linfocitos T¹⁴³.

De confirmarse en experimentos animales la importancia de la lectina DC-SIGN en la diseminación del VIH, sería esta molécula un punto estratégico para contener la infección.

Para el caso del virus Ébola, haría falta caracterizar los mecanismos celulares implicados en la “trans” infección por este virus; conocer si la partícula debe ser internalizada como es el caso del VIH y el tráfico intracelular de ésta.

La identificación de la lectina DC-SIGN y su implicación en la infección por el virus VIH, hizo que muchos investigadores se interesaran en caracterizar la base de la especificidad de esta lectina por sus ligandos¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

Gracias a estudios de cristalografía, se pudo determinar el tipo de azúcares que reconoce DC-SIGN, encontrando que los residuos de manosa que forman parte de estructuras glicosiladas denominadas “high mannose” son las más afines a la lectina. Estas estructuras glicosiladas son poco frecuentes en moléculas de origen humano, pero habituales en patógenos como virus, bacterias y parásitos unicelulares¹⁷⁸.

La especificidad de DC-SIGN por azúcares “high mannose” hizo sospechar que otros patógenos que presentan en su estructura este tipo de residuos glicosilados, podían ser potenciales ligandos de la lectina DC-SIGN.

La glicoproteína del VIH: gp120, posee unos 30 residuos potenciales de N-glicosilación, mientras que la glicoproteína del virus Ébola presenta 18. Este dato sugiere que el componente glicosídico de la envuelta vírica del Ébola puede ser importante para mediar la unión del virus a las lectinas DC/L-SIGN.

Para estudiar el papel de la glicosilación de la envuelta del virus Ébola en la interacción con la lectina DC-SIGN, se analizó el efecto del manano en la infección de células DC-SIGN positivas, encontrando que este compuesto bloquea tanto la unión como la infección de los retrovirus rEBO-GP mediada por DC-SIGN (figura 44).

Estos datos indican que la interacción entre la glicoproteína del virus Ébola y DC-SIGN es carbohidrato dependiente; de manera similar a lo que se ha observado entre la glicoproteína del VIH (gp120) y DC-SIGN¹⁷⁹.

El empleo de manano es una manera indirecta de analizar la implicación de los residuos glicosilados de la glicoproteína viral; por eso, para caracterizar mejor cuáles son las estructuras glicosiladas que median la unión a DC-SIGN, se trataron los retrovirus rEBO-GP con la enzima endoglucanasa H, que elimina residuos N-glicosilados de las proteínas, fundamentalmente los de tipo “high mannose”.

El tratamiento de los retrovirus rEBO-GP con EndoH, disminuye en un 90% la capacidad infectiva de estas partículas en células DC-SIGN positivas, pero no en células HeLa.

Estos resultados indican que la ausencia de residuos N-glicosilados en la glicoproteína del virus Ébola afecta de manera específica la interacción de esta proteína viral con la lectina DC-SIGN. Por tanto, la unión entre el virus Ébola y DC-SIGN depende fundamentalmente de las estructuras N-glicosiladas de la envuelta de este virus.

La diferencia que se observa en los mecanismos de reconocimiento del virus Ébola y diferentes células, puede ser de utilidad a la hora de diseñar inhibidores específicos para evitar la infección de determinadas células.

Para conocer que residuos glicosilados de la envuelta del virus Ébola participan directamente en la unión a DC-SIGN, se comparó la capacidad de infección en células DC-SIGN positivas de retrovirus generados con la glicoproteína nativa frente a retrovirus mutantes que carecen de determinados residuos de Asparragina (N) necesarios para la adición de residuos N-glicosilados.

Como se muestra en la figura 46, únicamente 3 residuos glicosilados situados en las Asparraginas: N204, N238 y N618 parecen ser claves en la unión entre los retrovirus recombinantes Ébola y DC-SIGN, pues su sustitución de manera independiente genera valores de infección por debajo del 10% con respecto a la envuelta natural, siendo este efecto similar al obtenido con la enzima endoH.

Los residuos N204 y N238 están localizados en la porción extracelular de la glicoproteína (GP1), mientras que N618 está ubicado cerca de la membrana lipídica en la subunidad transmembrana de la envuelta (GP2).

Utilizando la mutante N296 y la mutante de la región mucina (Δ 309-489), los niveles de infección de células DC-SIGN positivas descienden al 50% con respecto a la envuelta natural, por tanto podríamos decir que tanto los residuos O-glicosilados como N-glicosilados de la región mucina son menos importantes en la infección de rEBO-GP a través de la lectina DC-SIGN.

Hasta el momento no existen compuestos profilácticos ni terapéuticos disponibles para utilizarlos en caso de un brote de fiebre hemorrágica por virus Ébola⁵³, aunque desde hace unos cuantos años se está realizando un esfuerzo para desarrollar una vacuna efectiva contra este virus^{57,56,59,60,180}.

El diseño de estos inhibidores, suele ser posterior al conocimiento del ciclo replicativo del virus, una vez identificadas las dianas de posible intervención terapéutica. Uno de los puntos de intervención podría ser la infección celular, para lo cual es necesario conocer las bases moleculares del reconocimiento entre el virus y los receptores celulares. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha identificado ningún compuesto que interfiera en el proceso de entrada del virus Ébola en las células.

En este trabajo de tesis, se analiza la capacidad inhibitoria de dos compuestos diferentes: BH-30Man y Cianovirina-N, frente a la infección por rEBO-GP. Ambas moléculas reducen significativamente la infección empleando cantidades nanomolares, aunque el modo de acción de cada una sea distinta. BH-30Man, es reconocida por la lectina DC-SIGN y en consecuencia compite con la glicoproteína viral; mientras que Cianovirina-N, reconoce estructuras glicosiladas en la envuelta del virus Ébola e impide su posterior infección.

El compuesto de origen sintético BH-30Man, está basado en el dendrímero Boltorn (BHTM) al que se pueden añadir mediante reacción química diferentes radicales en los extremos de la molécula.

Para este estudio, hemos empleado una variante de BH, diseñada y producida por el Dr. Javier Rojo (CSIC, Sevilla) que contiene 32 manosas terminales unidas a al dendrímero por un espaciador de ácido succínico(BH-30Man), (figura 26).

BH30-Man es capaz de inhibir de manera dosis dependiente la infección de retrovirus rEBO-GP en células DC-SIGN positivas, con un valor de IC₅₀ de 340 nM; mientras que la misma molécula sin manosas (BH30-Link), muestra una IC₅₀ de 60µM cuando se emplean retrovirus rEBO-GP (figura 47).

La actividad inhibitoria de este dendrímtero (BH30-Man) afecta en exclusiva a los pseudotipos Ébola, ya que otras envueltas virales como el retrovirus rVSV-G, no disminuyen su grado de infección si se añade el compuesto.

Sin embargo, la infección de rEBO-GP en células HeLa no se ve afectada cuando se añade BH30-Man, lo cual indica que BH30-Man sólo actúa bloqueando la lectina DC-SIGN.

Además, se comprueba que BH30-Man compite de manera efectiva con la glicoproteína del virus Ébola en su unión a la lectina DC-SIGN, bloqueando la interacción entre el virus Ébola y DC-SIGN (figura 48-B).

Todos estos datos indican que la actividad del dendrímtero BH30-Man es específica, pues es el único compuesto que se observa por citometría unido a células dendríticas (figura 48-A); impide la entrada de rEBO-GP a través de DC-SIGN, siendo esta inhibición dependiente de los residuos de manosa.

Por otro lado, se ha utilizado este mismo compuesto (BH30-Man) en experimentos de trans infección, comprobando que el dendrímtero es capaz de inhibir la infección de células susceptibles mediada por células DC-SIGN positivas (figura 49).

La baja concentración (rango nanomolar) que se requiere para inhibir la infección de rEBO-GP y la ausencia de toxicidad de este compuesto, representa una ventaja a la hora de emplearlo como estrategia terapéutica.

En conclusión, podemos decir que el dendrímtero BH30-Man por su capacidad de bloquear de manera específica el receptor DC-SIGN podría ser un buen candidato a emplearse en estrategias terapéuticas ya que inhibe la infección de rEBO-GP en células que expresan DC-SIGN y además impediría la diseminación del virus a otras células susceptibles¹⁸¹.

Otro ejemplo interesante de aplicación biológica de esta clase de dendrímeros, es el que se refiere al compuesto PAMAM, conjugado con residuos de ácido siálico. Estos residuos de ácido siálico, son capaces de interactuar con la hemaglutinina, la glicoproteína del virus Influenza A. De esta manera, este compuesto, evita la adhesión del virus a las células susceptibles e inhibe la infección tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*¹⁸².

Otra estrategia para inhibir la entrada de los virus en las células, puede consistir en la utilización de moléculas que se unan a la superficie viral e impidan la interacción con los receptores celulares.

Este es el caso de la lectina de origen natural Cianovirina-N (CV-N), que actúa bloqueando la infección del VIH mediante su unión a la glicoproteína de la envuelta viral (gp120)¹⁸³.

CV-N, es una proteína de 11kDa, aislada originalmente de extractos acuosos de una especie de cianobacteria: *Nostoc ellipsosporum*, que presenta actividad frente al virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)¹⁸⁴.

En concreto parece que el mecanismo de interacción entre CV-N y gp120 depende de la unión a residuos de tipo "high-mannose" presentes en la proteína gp120, específicamente oligomanosa 8 (Man-8) y oligomanosa 9 (Man-9) terminales^{157,185,186,158}.

Basándonos en la similitud entre la glicoproteína del virus Ébola y el VIH en cuanto a su composición glicosídica, se estudió la actividad de CV-N frente a la infección del virus Ébola.

Para probar esta hipótesis, se realizaron experimentos de infección en células susceptibles (HeLa) y células DC-SIGN positivas (Jurkat-DC-SIGN), empleando retrovirus con envuelta de virus Ébola (rEBO-GP) incubados previamente con cantidades crecientes de CV-N.

Como se muestra en la figura 50-A, Cianovirina-N impide la entrada de retrovirus rEBO-GP y también de retrovirus con envuelta de virus Marburg en células HeLa, con valores de IC₅₀ de 60nM, e IC₅₀=30nM respectivamente.

Por otro lado, Cianovirina-N es capaz de inhibir la infección de rEBO-GP en células DC-SIGN positivas, con un valor de $IC_{50}=65nM$. Este dato, sugiere que CV-N podría bloquear las regiones de interacción de la glicoproteína viral con la lectina DC-SIGN, impidiendo la infección del virus a través de este receptor.

Nuestros resultados¹⁸⁷, están en concordancia con lo observado previamente por la Dr. Barrientos y col. (National Center for Infectious Diseases, CDC, Atlanta, Georgia) quien demostró no sólo la afinidad de esta proteína por la glicoproteína del virus natural, sino también la utilidad de ésta como inhibidor de la infección en modelos animales¹⁸⁸.

La capacidad antiviral de CV-N también se ha estudiado frente a otros virus distintos del VIH y Ébola¹⁸⁹.

Así por ejemplo, los enterovirus y rinovirus no son inhibidos por esta molécula (las cepas testadas no tienen residuos de “high mannose” en su composición); ni tampoco los adenovirus, virus vaccinia, citomegalovirus y virus de la leucemia murina.

Un segundo grupo de virus, muestran una ligera inhibición (aprox. $1\mu g/mL$) frente a la CV-N. En este grupo se incluyen : herpesvirus, flavivirus, virus Measles, parainfluenza y EBV.

Además, se ha demostrado que ciertas cepas de virus influenza, son inhibidas por la CV-N con valores de EC_{50} entre 0.004 y $0.5 \mu g/mL$. Entre ellas existen cepas tanto de laboratorio como de muestras clínicas y algunas de ellas son resistentes a neuraminidasas. Sin embargo, algunas cepas de laboratorio como son la A/PR/8/34 (H1N1) y la NWS/33 (H1N1) son insensibles a la CV-N¹⁸⁹.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las lectinas de tipo C: DC-SIGN y L-SIGN presentan alta afinidad por la glicoproteína de envuelta del virus Ébola.
2. La base del reconocimiento entre DC-SIGN y la glicoproteína del virus Ébola se debe al elevado número de residuos N- glicosilados en la envuelta de este virus.
3. Esta afinidad, favorece la infección por el virus Ébola en un sistema de células permisivas que expresan estas lectinas.
4. Las lectinas DC/L-SIGN podrían actuar como receptores celulares para el virus Ébola, ya que son suficientes para mediar la entrada de partículas pseudotipadas con envuelta de este virus en células no susceptibles.
5. DC-SIGN en células dendríticas y otras poblaciones celulares es capaz de transmitir partículas pseudotipadas con envuelta de virus Ébola desde una célula DC-SIGN positiva a otra célula susceptible.
6. Esta función de transreceptor favorece la eficacia de la infección de células susceptibles, por lo que DC-SIGN podría ser una molécula clave en los primeros pasos de infección y diseminación del virus.

7. La caracterización de los mecanismos y estructuras implicadas en la entrada de virus permite diseñar estrategias terapéuticas frente a nuevas dianas.
8. El dendrímero BH30-Man bloquea de manera específica la interacción entre DC-SIGN y partículas pseudotipadas con la envuelta del virus Ébola.
9. La lectina Cianovirina N (CV-N) interacciona con residuos glicosilados de la envuelta del virus Ébola e inhibe la infección de éste.
10. Por su actividad específica a bajas concentraciones y su mecanismo de acción CV- N y BH-30-SucMan serían buenos candidatos para emplearse, solos o de forma combinada, en diferentes modelos de infección por virus Ébola.

APÉNDICE

ABREVIATURAS

μl	Microlitro
3TC	Lamivudina
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ARV	Retrovirus asociado a SIDA
AZT	Zidovudina
bp	Pares de bases
CA	Proteína de la cápside
CMV	Citomegalovirus
CRF	Formas circulantes recombinantes
d4T	Estavudina
DMEM	Medio de Dubelcco modificado por Eagles
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Desoxinucleósidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EIA	Enzaimmunoanálisis
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HAART	Terapia antirretroviral altamente activa
HCMV IE	Proteína inmediatamente precoz del citomegalovirus humano
HTLV	Virus de la leucemia de células T humanas
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IC ₉₀	Concentración inhibitoria 90
IN	Integrasa
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
LAV	Virus asociado a linfadenopatía
LTR	Secuencias terminales repetidas largas
M	Molar
MA	Proteína de la matriz
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NC	Proteína de la nucleocápside
NF-κB	Factor nuclear kappa B
nM	Nanomolar
NNRTI	Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos
NRTI	Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos o nucleótidos
ORF	Marco de lectura
PBS	Tampón fosfato salino
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Inhibidores de la proteasa
PR	Proteasa
RNasa H	Ribonucleasa H
RRE	Elemento de respuesta a Rev
RT	Transcriptasa inversa
RTI	Inhibidores de la transcriptasa inversa
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SU	Glicoproteína de superficie
TFP	Proteína de cambio del marco de lectura
TM	Glicoproteína transmembrana
U	Unidades
UI	Unidades infectivas
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
WB	<i>Western blot</i>

AMINOÁCIDOS Y SUS SÍMBOLOS

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteina
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutámico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparragina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. **Sanchez, A., C. J. Peters, P. Rollin, T. Ksiazek, and F. A. Murphy.** 2004. Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. New York: Lippincott-Raven, 2001:1161-1176.
2. **Klenk, H. D., W. Slenczka, and H. Feldman.** 1999. Marburg and Ebola viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **235**:1-217.
3. **Peters, C. J. and J. W. LeDuc.** 1999. An introduction to Ebola: the virus and the disease. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:ix-xvi.
4. **Beer, B., R. Kurth, and A. Bukreyev.** 1999. Characteristics of Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. *Naturwissenschaften* **86**:8-17.
5. **Sanchez, A., M. P. Kiley, H. D. Klenk, and H. Feldmann.** 1992. Sequence analysis of the Marburg virus nucleoprotein gene: comparison to Ebola virus and other non-segmented negative-strand RNA viruses. *J Gen Virol* **73 (Pt 2)**:347-357.
6. **Sanchez, A., M. P. Kiley, B. P. Holloway, and D. D. Auperin.** 1993. Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus. *Virus Res* **29**:215-240.
7. **Suzuki, Y. and T. Gojobori.** 1997. The origin and evolution of Ebola and Marburg viruses. *Mol Biol Evol* **14**:800-806.
8. **Bukreyev, A. A., V. E. Volchkov, V. M. Blinov, S. A. Dryga, and S. V. Netesov.** 1995. The complete nucleotide sequence of the Popp (1967) strain of Marburg virus: a comparison with the Musoke (1980) strain. *Archives of Virology* **140**:1589-1600.
9. 1978. Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. Report of a WHO/International Study Team. *Bull World Health Organ* **56**:247-270.

10. **Tomori, O., J. Bertolli, P. E. Rollin, Y. Fleerackers, Y. Guimard, A. De Roo, H. Feldmann, F. Burt, R. Swanepoel, S. Killian, A. S. Khan, K. Tshioko, M. Bwaka, R. Ndambe, C. J. Peters, and T. G. Ksiazek.** 1999. Serologic survey among hospital and health center workers during the Ebola hemorrhagic fever outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S98-101.
11. **Busico, K. M., K. L. Marshall, T. G. Ksiazek, T. H. Roels, Y. Fleerackers, H. Feldmann, A. S. Khan, and C. J. Peters.** 1999. Prevalence of IgG antibodies to Ebola virus in individuals during an Ebola outbreak, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S102-S107.
12. **Rowe, A. K., J. Bertolli, A. S. Khan, R. Mukunu, J. J. Muyembe-Tamfum, D. Bressler, A. J. Williams, C. J. Peters, L. Rodriguez, H. Feldmann, S. T. Nichol, P. E. Rollin, and T. G. Ksiazek.** 1999. Clinical, virologic, and immunologic follow-up of convalescent Ebola hemorrhagic fever patients and their household contacts, Kikwit, Democratic Republic of the Congo. Commission de Lutte contre les Epidemies a Kikwit. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S28-S35.
13. **Volchkov, V., V. Volchkova, C. Eckel, H. D. Klenk, M. Bouloy, B. LeGueno, and H. Feldmann.** 1997. Emergence of subtype Zaire Ebola virus in Gabon. *Virology* **232**:139-144.
14. 2003. Outbreak(s) of Ebola haemorrhagic fever in the Republic of the Congo. *Wkly Epidemiol Rec* **78**:285-289.
15. **Formenty, P., C. Boesch, M. Wyers, C. Steiner, F. Donati, F. Dind, F. Walker, and B. Le Gueno.** 1999. Ebola virus outbreak among wild chimpanzees living in a rain forest of Cote d'Ivoire. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S120-S126.
16. **Mwanatambwe, M., N. Yamada, S. Arai, M. Shimizu-Suganuma, K. Shichinohe, and G. Asano.** 2001. Ebola Hemorrhagic Fever (EHF): Mechanism of Transmission and Pathogenicity. *J Nippon Med Sch* **68 (5)**:370-375.

17. **Rollin, P. E., R. J. Williams, D. S. Bressler, S. Pearson, M. Cottingham, G. Pucak, A. Sanchez, S. G. Trappier, R. L. Peters, P. W. Greer, S. Zaki, T. Demarcus, K. Hendricks, M. Kelley, D. Simpson, T. W. Geisbert, P. B. Jahrling, C. J. Peters, and T. G. Ksiazek.** 1999. Ebola (subtype Reston) virus among quarantined nonhuman primates recently imported from the Philippines to the United States. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S108-S114.
18. 1996. Ebola-Reston virus infection among quarantined nonhuman primates--Texas, 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **45**:314-316.
19. 1992. Viral haemorrhagic fever in imported monkeys. *Wkly Epidemiol Rec* **67**:142-143.
20. **Leirs, H., J. N. Mills, J. W. Krebs, J. E. Childs, D. Akaibe, N. Woollen, G. Ludwig, C. J. Peters, and T. G. Ksiazek.** 1999. Search for the Ebola virus reservoir in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: reflections on a vertebrate collection. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S155-S163.
21. **Ksiazek, T. G.** 1991. Laboratory diagnosis of filovirus infections in nonhuman primates. *Lab Anim* **20**:34-46.
22. **Breman, J. G., K. M. Johnson, G. van der Groen, C. B. Robbins, M. V. Szczeniowski, K. Ruti, P. A. Webb, F. Meier, and D. L. Heymann.** 1999. A search for Ebola virus in animals in the Democratic Republic of the Congo and Cameroon: ecologic, virologic, and serologic surveys, 1979- 1980. Ebola Virus Study Teams. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S139-S147.
23. **Siddhartha Mahanty and Mike Bray.** 2004. Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers. *Lancet* **4**:487-498.
24. **Miranda, M. E., T. G. Ksiazek, T. J. Retuya, A. S. Khan, A. Sanchez, C. F. Fulhorst, P. E. Rollin, A. B. Calaor, D. L. Manalo, M. C. Roces, M. M. Dayrit, and C. J. Peters.** 1999. Epidemiology of Ebola (subtype Reston) virus in the Philippines, 1996. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S115-S119.

-
25. **Roels, T. H., A. S. Bloom, J. Buffington, G. L. Muhungu, K. W. Mac, A. S. Khan, R. Ndambi, D. L. Noah, H. R. Rolka, C. J. Peters, and T. G. Ksiazek.** 1999. Ebola hemorrhagic fever, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995: risk factors for patients without a reported exposure. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S92-S97.
 26. **Johnson, E., N. Jaax, J. White, and P. Jahrling.** 1995. Lethal experimental infections of rhesus monkeys by aerosolized Ebola virus. *Int.J Exp Pathol.* **76**:227-236.
 27. **Ndambi, R., P. Akamituna, M. J. Bonnet, A. M. Tukadila, J. J. Muyembe-Tamfum, and R. Colebunders.** 1999. Epidemiologic and clinical aspects of the Ebola virus epidemic in Mosango, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S8-10.
 28. **Dowell, S. F.** 1996. Ebola hemorrhagic fever: why were children spared? *Pediatr Infect Dis J* **15**:189-191.
 29. **Dowell, S. F., R. Mukunu, T. G. Ksiazek, A. S. Khan, P. E. Rollin, and C. J. Peters.** 1999. Transmission of Ebola hemorrhagic fever: a study of risk factors in family members, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. Commission de Lutte contre les Epidemies a Kikwit. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S87-S91.
 30. **Monath, T. P.** 1999. Ecology of Marburg and Ebola viruses: speculations and directions for future research. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S127-S138.
 31. **Bwaka, M. A., M. J. Bonnet, P. Calain, R. Colebunders, A. De Roo, Y. Guimard, K. R. Katwika, K. Kibadi, M. A. Kipasa, K. J. Kuvula, B. B. Mapanda, M. Massamba, K. D. Mupapa, J. J. Muyembe-Tamfum, E. Ndaberey, C. J. Peters, P. E. Rollin, and E. Van den Enden.** 1999. Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S1-S7.

32. **Towner, J., P. E. Rollin, and D. Bausch.** 2004. Rapid diagnosis of Ebola hemorrhagic fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome. *J. Virol* **78**:4330-4341.
33. **Kibadi, K., K. Mupapa, K. Kuvula, M. Massamba, D. Ndaberey, J. J. Muyembe-Tamfum, M. A. Bwaka, A. De Roo, and R. Colebunders.** 1999. Late ophthalmologic manifestations in survivors of the 1995 Ebola virus epidemic in Kikwit, Democratic Republic of the Congo. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S13-S14.
34. **Mupapa, K., W. Mukundu, M. A. Bwaka, M. Kipasa, A. De Roo, K. Kuvula, K. Kibadi, M. Massamba, D. Ndaberey, R. Colebunders, and J. J. Muyembe-Tamfum.** 1999. Ebola hemorrhagic fever and pregnancy. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S11-S12.
35. **Colebunders, R. and M. Borchert.** 2000. Ebola haemorrhagic fever-a review. *J Infect* **40**:16-20.
36. **Baize, S., E. M. Leroy, M. C. Georges-Courbot, M. Capron, J. Lansoud-Soukate, P. Debre, S. P. Fisher-Hoch, J. B. McCormick, and A. J. Georges.** 1999. Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. *Nat Med* **5**:423-426.
37. **Wyers, M., P. Formenty, Y. Cherel, L. Guigand, B. Fernandez, C. Boesch, and B. Le Guenzo.** 1999. Histopathological and immunohistochemical studies of lesions associated with Ebola virus in a naturally infected chimpanzee. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S54-S59.
38. **Geisbert, T. W., H. A. Young, P. B. Jahrling, K. J. Davis, E. Kagan, and L. E. Hensley.** 2003. Mechanisms underlying coagulation abnormalities in Ebola hemorrhagic fever: overexpression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event. *J. Infect. Dis.* **188**:1618-1629.
39. **Bray, M., K. Davis, T. Geisbert, C. Schmaljohn, and J. Huggins.** 1999. A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola hemorrhagic fever. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S248-S258.

-
40. **Connolly, B. M., K. E. Steele, K. J. Davis, T. W. Geisbert, W. M. Kell, N. K. Jaax, and P. B. Jahrling.** 1999. Pathogenesis of experimental Ebola virus infection in guinea pigs. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S203-S217.
 41. **Bosio, C. M., M. J. Aman, C. Grogan, R. Hogan, G. Ruthel, D. Negley, M. Mohamadzadeh, S. Bavari, and A. Schmaljohn.** 2003. Ebola and Marburg viruses replicate in monocyte-derived dendritic cells without inducing the production of cytokines and full maturation. *JID* **188**:1630-1638.
 42. **Schnittler, H. J. and H. Feldmann.** 1998. Marburg and Ebola hemorrhagic fevers: does the primary course of infection depend on the accessibility of organ-specific macrophages? *Clin Infect Dis* **27**:404-406.
 43. **Geisbert, T. W., Young H.A., and P. B. Jahrling.** 2003. Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in primate models: evidence that hemorrhage is not a direct effect of virus-induced cytolysis of endothelial cells. *Am.J.Pathol* **163**:2371-2382.
 44. **Geisbert, T. W., L. E. Hensley, and T. Larsen.** 2003. Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection. *Am.J.Pathol.* **163**:2347-2370.
 45. **Stroher, U., E. West, H. Bugany, H. D. Klenk, H. J. Schnittler, and H. Feldmann.** 2001. Infection and activation of Monocytes by Marburg and Ebola Viruses. *J.Virol.* **75**:11025-11033.
 46. **Feldmann, H., H. Bugany, F. Mahner, H. D. Klenk, D. Drenckhahn, and H. J. Schnittler.** 1996. Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *J Virol* **70**:2208-2214.
 47. **Kerstiens, B. and F. Matthys.** 1999. Interventions to control virus transmission during an outbreak of Ebola hemorrhagic fever: experience from Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S263-S267.

48. **Lloyd, E. S., S. R. Zaki, P. E. Rollin, K. Tshioko, M. A. Bwaka, T. G. Ksiazek, P. Calain, W. J. Shieh, M. K. Konde, E. Verchueren, H. N. Perry, L. Manguindula, J. Kabwau, R. Ndambi, and C. J. Peters.** 1999. Long-term disease surveillance in Bandundu region, Democratic Republic of the Congo: a model for early detection and prevention of Ebola hemorrhagic fever. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S274-S280.
49. **Muyembe-Tamfum, J. J., M. Kipasa, C. Kiyungu, and R. Colebunders.** 1999. Ebola outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: discovery and control measures. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S259-S262.
50. **Jahrling, P. B., T. W. Geisbert, J. B. Geisbert, J. R. Swearingen, M. Bray, N. K. Jaax, J. W. Huggins, J. W. LeDuc, and C. J. Peters.** 1999. Evaluation of immune globulin and recombinant interferon-alpha2b for treatment of experimental Ebola virus infections. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S224-S234.
51. **Kudoyarova-Zubavichene, N. M., N. N. Sergeyev, A. A. Chepurnov, and S. V. Netesov.** 1999. Preparation and use of hyperimmune serum for prophylaxis and therapy of Ebola virus infections. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S218-S223.
52. **Parren, P. W., T. W. Geisbert, T. Maruyama, P. B. Jahrling, and D. R. Burton.** 2002. Pre- and postexposure prophylaxis of Ebola virus infection in an animal model by passive transfer of a neutralizing human antibody. *J Virol* **76**:6408-6412.
53. **Bray, M. and J. Paragas.** 2002. Experimental therapy of filovirus infections. *Antiviral Res* **54**:1-17.
54. **Leroy, E. M., S. Baize, and V. E. Volchkov.** 2000. Human asymptomatic Ebola infection and strong inflammatory response. *Lancet* **355**:2210-2215.
55. **Leroy, E. M., S. Baize, P. Debre, J. Lansoud-Soukate, and E. Mavoungou.** 2001. Early immune responses accompanying human asymptomatic Ebola infections. *Clin.exp.Immunol.* **124**:453-460.
56. **Xu, L., A. Sanchez, Z. Yang, S. R. Zaki, E. G. Nabel, S. T. Nichol, and G. J. Nabel.** 1998. Immunization for Ebola virus infection. *Nat Med* **4**:37-42.

-
57. **Vanderzanden, L., M. Bray, D. Fuller, T. Roberts, D. Custer, K. Spik, P. Jahrling, J. Huggins, A. Schmaljohn, and C. Schmaljohn.** 1998. DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge. *Virology* **246**:134-144.
58. **Yang, Z. Y., H. J. Duckers, N. J. Sullivan, A. Sanchez, E. G. Nabel, and G. J. Nabel.** 2000. Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury. *Nat.Med* **6**:886-889.
59. **Sullivan, N. J., A. Sanchez, P. E. Rollin, Z. Y. Yang, and G. J. Nabel.** 2000. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* **408**:605-609.
60. **Sullivan, N., Z. Y. Yang, and G. N. Nabel.** 2003. Ebola virus pathogenesis: implications for vaccines and therapies. *Journal of Virology* **77**:9733-9737.
61. **Rollin, P. E., T. G. Ksiazek, P. B. Jahrling, M. Haines, and C. J. Peters.** 1990. Detection of Ebola-like viruses by immunofluorescence [letter]. *Lancet* **336**:1591.
62. **Ksiazek, T. G., P. E. Rollin, P. B. Jahrling, E. Johnson, D. W. Dalgard, and C. J. Peters.** 1992. Enzyme immunosorbent assay for Ebola virus antigens in tissues of infected primates. *J Clin Microbiol* **30**:947-950.
63. **Ksiazek, T. G., P. E. Rollin, A. J. Williams, D. S. Bressler, M. L. Martin, R. Swanepoel, F. J. Burt, P. A. Leman, A. S. Khan, A. K. Rowe, R. Mukunu, A. Sanchez, and C. J. Peters.** 1999. Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S177-S187.
64. **Ksiazek, T. G., C. P. West, P. E. Rollin, P. B. Jahrling, and C. J. Peters.** 1999. ELISA for the detection of antibodies to Ebola viruses. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S192-S198.

-
65. **Meissner, F., T. Maruyama, M. Frentsch, A. J. Hessel, L. L. Rodriguez, T. W. Geisbert, P. B. Jahrling, D. R. Burton, and P. W. Parren.** 2002. Detection of antibodies against the four subtypes of ebola virus in sera from any species using a novel antibody-phage indicator assay. *Virology* **300**:236-243.
 66. **Volchkov, V. E., V. A. Volchkova, A. A. Chepurinov, V. M. Blinov, O. Dolnik, S. V. Netesov, and H. Feldmann.** 1999. Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. *J Gen Virol* **80 (Pt 2)**:355-362.
 67. **Feldmann, H. and M. P. Kiley.** 1999. Classification, structure and replication of filoviruses. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **235**:1-21.
 68. **Basler, C. F., X. Wang, E. Muhlberger, V. Volchkov, J. Paragas, H.-D. Klenk, A. Garcia-Sastre, and P. Palese.** 2000. The Ebola virus VP35 protein functions as a type 1 IFN antagonist. *Proc.Natl.Acad.Sci* **97**:12289-12294.
 69. **Will, C., E. Mühlberger, D. Linder, W. Slenczka, H.-D. Klenk, and H. Feldmann.** 1993. Marburg virus gene 4 encodes the virion membrane protein, a type I transmembrane glycoprotein. *Virology* **67**:1203-1210.
 70. **Volchkov, V. E., S. Becker, V. A. Volchkova, V. A. Ternovoj, A. N. Kotov, S. V. Netesov, and H. D. Klenk.** 1995. GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases. *Virology* **214**:421-430.
 71. **Groseth, A., U. Ströher, S. Theriault, and H. Feldmann.** 2002. Molecular characterization of an isolate from the 1989/90 epizootic of Ebola virus Reston among macaques imported into the United States. *Virus Research*.
 72. **Muhlberger, E., M. Weik, V. E. Volchkov, H. D. Klenk, and S. Becker.** 1999. Comparison of the transcription and replication strategies of marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems. *J Virol* **73**:2333-2342.

73. **Sanchez, A. and M. P. Kiley.** 1987. Identification and analysis of Ebola virus messenger RNA. *Virology* **157**:414-420.
74. **Weik, M., J. Modrof, H.-D. Klenk, S. Becker, and E. Mühlberber.** 2002. Ebola virus VP30-mediated transcription is regulated by RNA secondary structure formation. *Journal of Virology* **76**:8532-8539.
75. **Huang, Y., L. Xu, Y. Sun, and G. J. Nabel.** 2002. The assembly of Ebola virus nucleocapsid requires virion-associated proteins 35 and 24 and posttranslational modification of nucleoprotein. *Molecular Cell* **10**:307-316.
76. **Timmins, J., G. Scianimanico, G. Schoehn, and W. Weissenhorn.** 2001. Vesicular release of Ebola virus matrix protein VP40. *Virology* **283**:1-6.
77. **Bavari, S., C. M. Bosio, E. Wiegand, G. Ruthel, A. B. Will, T. W. Geisbert, M. Hevey, C. Schmaljohn, A. Schmaljohn, and M. J. Aman.** 2002. Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of ebola and marburg viruses. *J Exp.Med* **195**:593-602.
78. **Martin-Serrano, J., T. Zang, P. D. Bieniasz, and J. Luban.** 2001. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress
HIV-1 and Ebola virus: The getaway driver nabbed. *Nat.Med* **7**:1313-1319.
79. **Harty, R. N., M. E. Brown, G. Wang, J. Huibregtse, and F. P. Hayes.** 2000. A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding. *Proc.Natl.Acad.Sci* **97**:13871-13876.
80. **Garrus, J. E.** 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**:55-65.
81. **Patnaik, A., V. Chau, and J. W. Wills.** 2000. Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**:13069-13074.
82. **Elliott, L. H., M. P. Kiley, and J. B. McCormick.** 1985. Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology* **147**:169-176.

-
83. **Volchkov, V. E., V. M. Blinov, and S. V. Netesov.** 1992. The envelope glycoprotein of Ebola virus contains an immunosuppressive- like domain similar to oncogenic retroviruses. *FEBS Lett* **305**:181-184.
 84. **Volchkov, V. E., H. Feldmann, V. A. Volchkova, and H. D. Klenk.** 1998. Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:5762-5767.
 85. **Feldmann, H., V. E. Volchkov, V. A. Volchkova, U. Stroher, and H. D. Klenk.** 2001. Biosynthesis and role of filoviral glycoproteins. *Journal of General Virology* **82**:2839-2848.
 86. **Sanchez, A., Z. Y. Yang, L. Xu, G. J. Nabel, T. Crews, and C. J. Peters.** 1998. Biochemical analysis of the secreted and virion glycoproteins of Ebola virus. *J Virol* **72**:6442-6447.
 87. **Ito, H., S. Watanabe, A. Takada, and Y. Kawaoka.** 2001. Ebola virus glycoprotein: proteolytic processing, acylation, cell tropism, and detection of neutralizing antibodies. *Journal of Virology* **75**:1576-1580.
 88. **Neumann, G., M. A. Whitt, and Y. Kawaoka.** 2002. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned? *Journal of General Virology* **83**:2635-2662.
 89. **Neumann, G., H. Feldmann, S. Watanabe, I. Lukashevich, and Y. Kawaoka.** 2002. Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. *Journal of Virology* **76**:406-410.
 90. **Wool-Lewis, R. J. and P. Bates .** 1999. Endoproteolytic processing of the ebola virus envelope glycoprotein: cleavage is not required for function. *J Virol* **73**:1419-1426.
 91. **Jeffers, S. A., D. A. Sanders, and A. Sanchez.** 2002. Covalent modifications of the ebola virus glycoprotein. *J Virol* **76**:12463-12472.

-
92. **Simmons, G., R. J. Wool-Lewis, F. Baribaud, R. C. Netter, and P. Bates.** 2002. Ebola Virus Glycoproteins Induce Global Surface Protein Down-Modulation and Loss of Cell Adherence. *J Virol* **76**:2518-2528.
 93. **Sinn, P. L., M. A. Hickey, P. D. Staber, D. E. Dylla, S. A. Jeffers, B. L. Davidson, D. A. Sanders, and P. B. McCray, Jr.** 2003. Lentivirus vectors pseudotyped with filoviral envelope glycoproteins transduce airway epithelia from the apical surface independently of folate receptor alpha. *J Virol* **77**:5902-5910.
 94. **Ito, H., S. Watanabe, A. Sanchez, M. A. Whitt, and Y. Kawaoka.** 1999. Mutational Analysis of the Putative Fusion Domain of Ebola Virus Glycoprotein. *Journal of Virology* **73**:8907-8912.
 95. **Malashkevich, V. N., B. J. Schneider, M. L. McNally, M. A. Milhollen, J. X. Pang, and P. S. Kim.** 1999. Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9- # resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:2662-2667.
 96. **Weissenhorn, W., A. Carfi, K. H. Lee, J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1998. Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain. *Mol Cell* **2**:605-616.
 97. **Fass, D., S. C. Harrison, and P. S. Kim.** 1996. Retrovirus envelope domain at 1.7 angstrom resolution. *Nat.Struct.Biol.* **3**:465-469.
 98. **Weissenhorn, W., L. J. Calder, S. A. Wharton, J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1998. The central structural feature of the membrane fusion protein subunit from the Ebola virus glycoprotein is a long triple-stranded coiled coil. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:6032-6036.
 99. **Bullough, P. A., F. M. Hughson, J. J. Skehel, and D. Wiley.** 1994. *Nature* **371**:37-43.
 100. **Chan, D. C. and P. S. Kim.** 1998. HIV entry and its inhibition. *Cell* **93 (5)**:681-684.

101. **Yang, Z., R. Delgado, L. Xu, R. F. Todd, E. G. Nabel, A. Sanchez, and G. J. Nabel.** 1998. Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoproteins. *Science* **279**:1034-1037.
102. **Takada, A., C. Robison, H. Goto, A. Sanchez, K. G. Murti, M. A. Whitt, and Y. Kawaoka.** 1997. A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:14764-14769.
103. **Wool-Lewis, R. J. and P. Bates.** 1998. Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *J Virol* **72**:3155-3160.
104. **Chan, S. Y., R. F. Speck, M. C. Ma, and M. A. Goldsmith.** 2000. Distinct mechanisms of entry by envelope glycoproteins of Marburg and Ebola (Zaire) viruses. *J Virol* . **74**:4933-4937.
105. **Chan, S. Y., M. C. Ma, and M. A. Goldsmith.** 2000. Differential induction of cellular detachment by envelope glycoproteins of Marburg and Ebola (Zaire) viruses. *Journal of General Virology* **81**:2155-2159.
106. **Takada, A., S. Watanabe, H. Ito, K. Okazaki, H. Kida, and Y. Kawaoka.** 2000. Downregulation of B1 integrins by Ebola virus glycoprotein: implication for virus entry. *Virology* **278**:20-26.
107. **Volchkov, V. E., V. A. Volchkova, E. Mühlberger, L. V. Kolesnikova, M. Weik, O. Dolnik, and H. D. Klenk.** 2001. Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science* **291**:1965-1969.
108. **Maruyama, T., M. J. Buchmeier, P. W. Parren, D. R. Burton, Z. y. Yang, R. Delgado, L. Xu, R. F. Todd, E. G. Nabel, A. Sanchez, and Nabel.** 1998. Ebola Virus, Neutrophils, and Antibody Specificity. *Science* **282**:843a.

-
109. **Villinger, F., P. E. Rollin, S. S. Brar, N. F. Chikkala, J. Winter, J. B. Sundstrom, S. R. Zaki, R. Swanepoel, A. A. Ansari, and C. J. Peters.** 1999. Markedly elevated levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-alpha, interleukin (IL)-2, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha associated with fatal Ebola virus infection. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S188-S191.
110. **Sanchez, A., S. G. Trappier, B. W. Mahy, C. J. Peters, and S. T. Nichol.** 1996. The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:3602-3607.
111. **Volchkov, V. E., V. A. Volchkova, W. Slenczka, H. D. Klenk, and H. Feldmann.** 1998. Release of viral glycoproteins during Ebola virus infection. *Virology* **245**:110-119.
112. **Chan, S. Y., C. J. Empig, F. J. Welte, R. F. Speck, A. Schmaljohn, J. F. Kreisberg, and M. A. Goldsmith.** 2001. Folate receptor-alpha is a cofactor for cellular entry by Marburg and Ebola viruses. *Cell* **106**:117-126.
113. **Empig, C. J. and M. A. Goldsmith.** 2002. Association of the caveola vesicular system with cellular entry by Filoviruses. *Journal of Virology* **76**:5266-5270.
114. **Simmons, G., A. J. Rennekamp, N. Chai, L. H. Vandenberghe, J. L. Riley, and P. Bates.** 2003. Folate Receptor Alpha and Caveolae are not Required for Ebola Virus Glycoprotein-Mediated Viral Infection. *Journal of Virology* **77**:13433-13438.
115. **Gallaher, W. R.** 1996. Similar structural models of the transmembrane proteins of Ebola and avian sarcoma viruses. *Cell* **85**:477-478.
116. **Brown, D. A. and E. London.** 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **14**:111-136.
117. **Simons, K. and D. Toomre.** 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat.Rev.* **1**:31-39.

118. **Pickl, W. F., F. X. Pimentel-Muinos, and B. Seed.** 2001. Lipid Rafts and Pseudotyping. *J.Virol.* **75**:7175-7183.
119. **Anderson, R. G. W.** 1998. The caveolae membrane system. *Annu.Rev.Biochem* **67**:199-225.
120. **Parton, R. G., B. Joggerst, and K. Simons.** 1994. Regulated internalization of caveolae. *J.Cell Biol.* **127**:1199-1215.
121. **Calvo, M., F. Tebar, C. Lopez-Iglesias, and C. Enrich.** 2001. Morphologic and functional characterization of caveolae in rat liver hepatocytes. *Hepatology* **33**:1259-1269.
122. **Mayor, S., K. G. Rothberg, and F. R. Maxfield.** 1994. Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking. *Science* **264**:1948-1951.
123. **Rothberg, K. G., J. E. Henser, W. C. Donzell, Y. S. Ying, J. R. Glenney, and R. G. Anderson.** 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**:673-682.
124. **Hailstones, D., L. S. Sleer, R. G. Parton, and K. K. Stanley.** 1998. Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *J.Lipid Res.* **39**:369-379.
125. **Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk.** 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**:587-597.
126. **Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk, and C. G. Figdor.** 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* **100**:575-585.

-
127. **Curtis, B. M., S. Scharnowske, and A. J. Watson.** 1992. Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**:8356-8360.
128. **Geijtenbeek, T. B., G. C. van Duijnhoven, S. J. van Vliet, E. Krieger, G. Vriend, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk.** 2002. Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for ICAM-3 and HIV-1. *J Biol.Chem.* ..
129. **Feinberg, H., D. A. Mitchell, K. Drickamer, and W. I. Weis.** 2001. Structural Basis for Selective Recognition of Oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* **294**:2163-2166.
130. **Soilleux, E. J., R. Barten, and J. Trowsdale.** 2000. DC-SIGN; a related gene, DC-SIGNR; and CD23 form a cluster on 19p13. *J Immunol.* **165**:2937-2942.
131. **Bashirova, A. A., T. B. H. Geijtenbeek, G. C. F. van Duijnhoven, S. J. van Vliet, J. B. G. Eilering, M. P. Martin, L. Wu, T. D. Martin, N. Viebig, P. A. Knolle, V. N. KewalRamani, Y. van Kooyk, and M. Carrington.** 2001. A Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule 3-grabbing Nonintegrin (DC-SIGN)-related Protein Is Highly Expressed on Human Liver Sinusoidal Endothelial Cells and Promotes HIV-1 Infection. *J Exp Med* **193**:671-678.
132. **Guo, Y., H. Feinberg, E. Conroy, D. A. Mitchell, R. Alvarez, O. Blixt, M. E. Taylor, W. I. Weis, and K. Drickamer.** 2004. Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nature Structural and Molecular Biology*1-8.
133. **Montoya, M. C., D. Sancho, G. Bonello, Y. Collette, C. Langlet, He H.T., P. Aparicio, A. Alcover, D. Olive, and F. Sanchez-Madrid.** 2002. Role of ICAM-3 in the initial interaction of T lymphocytes and APCs. *Nat.Immunol* **3**:159-168.

-
134. **Geijtenbeek, T. B., D. J. Krooshoop, D. A. Bleijs, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, V. Grabovsky, R. Alon, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk.** 2000. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat.Immunol.* **1**:353-357.
135. **Geijtenbeek, T. B. and Y. van Kooyk.** 2003. Pathogens target DC-SIGN to influence their fate. *APMIS* **111**:698-714.
136. **Engering, A., T. B. H. Geijtenbeek, S. J. van Vliet, M. Wijers, E. van Liempt, N. Demaurex, A. Lanzavecchia, J. Fransen, C. G. Figdor, V. Piguet, and Y. van Kooyk.** 2002. The Dendritic Cell-Specific Adhesion Receptor DC-SIGN Internalizes Antigen for Presentation to T Cells. *The Journal of Immunology* **168**:2118-2126.
137. **Pohlmann, S., F. Baribaud, B. Lee, G. J. Leslie, M. D. Sanchez, K. Hiebenthal-Millow, J. Munch, F. Kirchhoff, and R. W. Doms.** 2001. DC-SIGN Interactions with Human Immunodeficiency Virus Type 1 and 2 and Simian Immunodeficiency Virus. *J.Virol.* **75**:4664-4672.
138. **Pope, M., M. G. H. Betjes, N. Romani, H. Hirmand, P. U. Cameron, L. Hoffman, S. Gezelter, G. Schuler, and R. M. Steinman.** 1994. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* **78**:389-398.
139. **Geijtenbeek, T. B., G. C. van Duijnhoven, S. J. van Vliet, E. Krieger, G. Vriend, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk.** 2002. Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *J Biol.Chem.* **277**:11314-11320.
140. **McDonald, D., L. Wu, S. M. Bohks, V. N. KewalRamani, D. Unutmaz, and T. J. Hope.** 2003. Recruitment of HIV and Its Receptors to Dendritic Cell-T Cell Junctions. *Science* **300**:1295.
141. **Turville, S. G., J. J. Santos, I. Frank, P. U. Cameron, M. Wilkinson, M. Miranda, and J. Able.** 2004. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* **103**:2170-2179.

-
142. **Gummuluru, S., M. Rogel, L. Stamatatos, and M. Emerman.** 2003. Binding of human immunodeficiency virus type 1 to immature dendritic cells can occur independently of DC-SIGN and mannose binding C-type lectin receptors via a cholesterol-dependent pathway. *J.Virol* **77**:12865-12874.
143. **Qinxue, H., I. Frank, V. Williams, J. Santos, P. Watts, G. E. Griffin, J. P. Moore, M. Pope, and R. J. Shattock.** 2004. Blockade of attachment and fusion receptors inhibits HIV-1 infection of human cervical tissue. *J.Exp.Med.*
144. **Halary, F., A. Amara, H. Lortat-Jacob, M. Messerle, T. Delaunay, C. Houles, F. Fieschi, F. Arenzana-Seisdedos, J. F. Moreau, and J. Dechanet-Merville.** 2002. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity.* **17**:653-664.
145. **Pohlmann, S., J. Zhang, F. Baribaud, Z. Chen, G. J. Leslie, G. Lin, A. Granelli-Piperno, R. W. Doms.** 2003. Hepatitis C Virus Glycoproteins Interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* **77**:4070-4080.
146. **Colmenares, M., A. Puig-Kroger, O. M. Pello, A. L. Corbi, and L. Rivas.** 2002. Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania amastigotes*. *J Biol.Chem.* **277**:36766-36769.
147. **Appelmelk, B. J., D. Van, I, S. J. van Vliet, C. M. Vandenbroucke-Grauls, T. B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk .** 2003. Cutting Edge: Carbohydrate Profiling Identifies New Pathogens That Interact with Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin on Dendritic Cells. *J Immunol* **170**:1635-1639.
148. **Navarro-Sanchez, E., R. Altmeyer, A. Amara, O. Schwartz, F. Fieschi, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and P. Despres.** 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* **4(7)**:723-728.

149. **Tassaneetrithep, B., T. H. Burgess, A. Granelli-Piperno, C. Trumfheller, J. Finke, W. Sun, M. A. Eller, K. Pattanapanyasat, S. Sarasombath, D. L. Birx, R. M. Steinman, S. Schlesinger, and M. A. Marovich.** 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J.Exp.Med* **197 (7):**823-829.
150. **Geijtenbeek, T. B., S. J. van Vliet, E. A. Koppel, M. Sanchez-Hernandez, C. M. Vandenbroucke-Grauls, B. Appelmelk, and Y. van Kooyk.** 2003. Mycobacteria Target DC-SIGN to Suppress Dendritic Cell Function. *J Exp.Med* **197:**7-17.
151. **Cambi, A.** 2003. The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* **33:**532-538.
152. **Van, D., I, S. J. van Vliet, N. A. Kwame, R. D. Cummings, C. M. Bank, B. Appelmelk, T. B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk.** 2003. The dendritic cell specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for *Schistosoma mansoni* egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis-x. *Glycobiology* **13:**102-110.
153. **Nyormoi, O., G. Klein, A. Adams, and L. Dombos.** 1973. Sensitivity to EBV superinfection and IUdR inducibility of hybrid cells formed between a sensitive and a relatively resistant Burkitt lymphome cell line. *Int.J.Cancer* **12 (2):**396-408.
154. **Hass, R., M. Hirano, S. Kharbanda, E. Rubin, G. Meinhardt, and D. Knfe.** 1993. Resistance to phorbol ester-induced differentiation of a U-937 myeloid leukemia cell variant with a signaling defect upstream to Raf-1 kinase. *Cell Growth Differ* **4 (8):**657-663.
155. **Scherer, W. F., J. T. Syverton, and G. O. Gey.** 1953. *J.Exp.Med* **97:**695.
156. **Landau, N. L. and D. R. Littman.** 1992. *J.Virol.* **66:**5110.
157. **Dey, B., D. L. Lerner, P. Lusso, M. R. Boyd, J. H. Elder, and E. A. Berger.** 2000. Multiple antiviral activities of cyanovirin-N: blocking of human immunodeficiency virus type I gp120 interaction with CD4 and coreceptor and inhibition of diverse enveloped viruses. *J.Virol* **74:**4562-4569.

-
158. **Botos, I., B. R. O'Keefe, S. R. Shenoy, L. K. Cartner, D. M. Ratner, P. H. Seeberger, M. R. Boyd, and A. Wlodawer.** 2002. Structures of the complexes of a potent anti-HIV protein cyanovirin-N and high mannose oligosaccharides. *J Biol.Chem.* **277** :34336-34342.
159. **Sinn, P. L., M. A. Hickey, P. D. Staber, D. E. Dylla, S. A. Jeffers, B. L. Davidson, D. A. Sanders, and P. B. McCray, Jr.** 2003. Lentivirus vectors pseudotyped with filoviral envelope glycoproteins transduce airway epithelia from the apical surface independently of folate receptor alpha. *J Virol* **77**:5902-5910.
160. **Kobinger, G. P., D. J. Weiner, Q. C. Yu, and J. M. Wilson.** 2001. Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo. *Nat.Biotechnol.* **19**:225-230.
161. **Zhu, H., Y. Shen, and T. Shenk.** 1995. Human Citomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *Journal of Virology* **69**:7960-7970.
162. **Lee, B., G. Leslie, E. Soilleux, U. O'Doherty, S. Baik, E. Levroney, K. Flummerfelt, W. Swiggard, N. Coleman, M. Malim, and R. W. Doms.** 2001. cis Expression of DC-SIGN Allows for More Efficient Entry of Human and Simian Immunodeficiency Viruses via CD4 and a Coreceptor. *J.Virol.* **75**:12028-12038.
163. **Engering, A., T. B. Geijtenbeek, S. J. van Vliet, M. Wijers, E. van Liempt, N. Demaurex, A. Lanzavecchia, J. Fransen, C. G. Figdor, V. Piguet, and Y. van Kooyk.** 2002. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol.* **168**:2118-2126.
164. **Kwon, D. S., G. Gregorio, N. Bitton, W. A. Hendrickson, and D. R. Littman.** 2002. DC-SIGN-Mediated Internalization of HIV Is Required for Trans-Enhancement of T Cell Infection. *Immunity.* **16**:135-144.
165. **Soilleux, E. J., L. S. Morris, G. Leslie, J. Chehimi, Q. Luo, E. Levroney, J. Trowsdale, L. J. Montaner, R. W. Doms, D. Weissman, N. Coleman, and B. Lee.** 2002. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J Leukoc.Biol.* **71**:445-457.

-
166. **Jameson, B., F. Baribaud, S. Pohlmann, D. Ghavimi, F. Mortari, R. W. Doms, and A. Iwasaki.** 2002. Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *J Virol* **76**:1866-1875.
167. **Soilleux, E. J. and N. Coleman.** 2001. Langerhans cells and the cells of Langerhans cell histiocytosis do not express DC-SIGN. *Blood* **98**:1987-1988.
168. **Schnittler, H. J., F. Mahner, D. Drenckhahn, H. D. Klenk, and H. Feldmann.** 1993. Replication of Marburg virus in human endothelial cells. A possible mechanism for the development of viral hemorrhagic disease. *J Clin Invest* **91**:1301-1309.
169. **Ströher, U., E. West, H. Bugany, H. D. Klenk, H. J. Schnittler, and M. Fellous.** 2001. Infection and activation of monocytes by Marburg and Ebola viruses. *J Virol* **75**:11025-11033.
170. **Geijtenbeek, T. B., G. Koopman, G. C. van Duijnhoven, S. J. van Vliet, A. C. van Schijndel, A. Engering, J. L. Heeney, and Y. van Kooyk.** 2001. Rhesus macaque and chimpanzee DC-SIGN act as HIV/SIV gp120 trans-receptors, similar to human DC-SIGN. *Immunol Lett.* **79**:101-107.
171. **Geijtenbeek, T. B., A. Engering, and Y. van Kooyk.** 2002. DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. *J Leukoc.Biol.* **71**:921-931.
172. **Alvarez, C. P., F. Lasala, J. Carrillo, O. Muniz, A. L. Corbi, and R. Delgado.** 2002. C-Type Lectins DC-SIGN and L-SIGN Mediate Cellular Entry by Ebola Virus in cis and in trans. *J Virol* **76**:6841-6844.
173. **Baribaud, F., S. Pohlmann, G. Leslie, F. Mortari, and R. W. Doms.** 2002. Quantitative expression and virus transmission analysis of DC-SIGN on monocyte-derived dendritic cells. *J Virol* **76**:9135-9142.

-
174. **Wu, L., A. A. Bashirova, T. D. Martin, L. Villamide, E. Mehlhop, A. O. Chertov, D. Unutmaz, M. Pope, M. Carrington, and V. N. KewalRamani.** 2002. Rhesus macaque dendritic cells efficiently transmit primate lentiviruses independently of DC-SIGN. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**:1568-1573.
175. **Pohlmann, S., F. Baribaud, and R. W. Doms.** 2001. DC-SIGN and DC-SIGNR: helping hands for HIV. *Trends Immunol* **22**:643-646.
176. **Turville, S. G., J. Arthos, K. M. Donald, G. Lynch, H. Naif, G. Clark, D. Hart, and A. L. Cunningham.** 2001. HIV gp120 receptors on human dendritic cells. *Blood* **98**:2482-2488.
177. **Figdor, C. G., Y. van Kooyk, and G. J. Adema.** 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat.Immunol.* **2**:77-84.
178. **Mitchell, D. A., A. J. Fadden, and K. Drickamer.** 2001. A Novel Mechanism of Carbohydrate Recognition by the C-type Lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. SUBUNIT ORGANIZATION AND BINDING TO MULTIVALENT LIGANDS. *J Biol Chem* **276**:28939-28945.
179. **Hong, P. W., K. B. Flummerfelt, A. de Parseval, K. Gurney, J. H. Elder, and B. Lee.** 2002. Human immunodeficiency virus envelope (gp120) binding to DC-SIGN and primary dendritic cells is carbohydrate dependent but does not involve 2G12 or cyanovirin binding sites: implications for structural analyses of gp120-DC-SIGN binding. *J Virol* **76**:12855-12865.
180. **Wilson, J. A., M. Hevey, R. Bakken, S. Guest, M. Bray, A. L. Schmaljohn, and M. K. Hart.** 2000. Epitopes involved in antibody-mediated protection from Ebola virus. *Science* **287**:1664-1666.
181. **Lasala, F., E. Arce, J. R. Otero, J. Rojo, and R. Delgado.** 2003. Mannosyl Glycodendritic Structure Inhibits DC-SIGN-Mediated Ebola Virus Infection in cis and in trans. *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**:3970-3972.
182. **Landers, J. J., Z. Cao, I. Lee, L. T. Piehler, P. P. Myc, A. Myc, T. Hamouda, A. T. Galecki, and J. R. Baker, Jr.** 2002. Prevention of influenza pneumonitis by sialic Acid-conjugated dendritic polymers. *J Infect.Dis.* **186**:1222-1230.

-
183. **Bewley, C. A., K. R. Gustafson, M. R. Boyd, D. G. Covell, A. Bax, G. M. Clore, and A. M. Gronenborn.** 1998. Solution structure of cyanovirin-N, a potent HIV-inactivating protein. *Nat.Struct.Biol.* **5**:571-578.
184. **Boyd, M. R., K. R. Gustafson, J. B. McMahon, R. H. Shoemaker, B. R. O'Keefe, T. Mori, R. J. Gulakowski, L. Wu, M. I. Rivera, C. M. Laurencot, M. J. Currens, J. H. Cardellina, R. W. Buckheit, Jr., P. L. Nara, L. K. Pannell, R. C. Sowder, and L. E. Henderson.** 1997. Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. *Antimicrob.Agents Chemother.* **41**:1521-1530.
185. **Mori, T. and M. R. Boyd.** 2001. Cyanovirin-N, a potent human immunodeficiency virus-inactivating protein, blocks both CD4-dependent and CD4-independent binding of soluble gp120 (sgp120) to target cells, inhibits sCD4-induced binding of sgp120 to cell-associated CXCR4, and dissociates bound sgp120 from target cells. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**:664-672.
186. **Barrientos, L. G., J. M. Louis, J. Hung, T. H. Smith, B. R. O'Keefe, R. S. Gardella, T. Mori, M. R. Boyd, and A. M. Gronenborn.** 2002. Design and initial characterization of a circular permuted variant of the potent HIV-inactivating protein cyanovirin-N. *Proteins* **46**:153-160.
187. **Barrientos, L. G., F. Lasala, J. R. Otero, A. Sanchez, and R. Delgado.** 2004. In Vitro Evaluation of Cyanovirin-N Antiviral Activity, by Use of Lentiviral Vectors Pseudotyped with Filovirus Envelope Glycoproteins. *JID* **189**:1440-1443.
188. **Barrientos, L. G., B. R. O'Keefe, M. Bray, A. Sanchez, A. M. Gronenborn, and M. R. Boyd.** 2003. Cyanovirin-N binds to the viral surface glycoprotein, GP1,2 and inhibits infectivity of Ebola virus. *Antiviral Research* **1767**:1-10.
189. **O'Keefe, B. R., D. F. Smee, J. A. Turpin, C. J. Saucedo, K. R. Gustafson, T. Mori, D. Blakeslee, R. Buckheit, and M. R. Boyd.** 2003. Potent Anti-Influenza Activity of Cyanovirin-N and Interactions with Viral Hemagglutinin. *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**:2518-2525.