



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Interacciones tripartitas en la regulación de la función
génica del virus respiratorio sincicial: antiterminador
transcripcional M₂₋₁, fosfoproteína P y ARN**

Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la Universidad de
Buenos Aires en el área: Ciencias Biológicas.

Mic. Ivana Gisele Molina

Director de tesis: Dr. Gonzalo de Prat Gay

Consejero de estudios: Dr. Pablo Cerdán

Lugar de trabajo: Laboratorio de Estructura-Función e Ingeniería en
Proteínas. Fundación Instituto Leloir e IIBBA-CONICET, Buenos Aires,
Argentina.

Buenos Aires, 2018

Título: "Interacciones tripartitas en la regulación de la función génica del Virus Respiratorio Sincicial: antiterminador transcripcional M₂₋₁, fosfoproteína P y ARN".

RESUMEN: El virus respiratorio sincicial humano (RSV) es la principal causa de infecciones virales pediátricas del tracto respiratorio inferior y de hospitalización infantil. Este virus pertenece al orden Mononegavirales, familia *Pneumoviridae*. Su genoma consiste en una molécula de ARN simple cadena, de polaridad negativa, no segmentado de 15 kb que se encuentra encapsulado por la proteína de la nucleocápside *N*. La replicación y transcripción del genoma de RSV son llevadas a cabo por el complejo ARN polimerasa, conformado por la ARN polimerasa *L*, la fosfoproteína *P* que actúa como andamiaje para el ensamblado del complejo y *M₂₋₁* un antiterminador transcripcional. *M₂₋₁* es una proteína de unión a ARN homotetramérica, que contiene un motivo de unión a Zn⁺², mejora la procesividad transcripcional y es exclusivo de pneumovirus. *P* es una proteína extendida que consiste en un dominio de tetramerización de cuatro hélices flanqueadas por un dominio N-terminal intrínsecamente desordenado y un dominio C-terminal parcialmente ordenado y se sabe que forma un complejo no globular con *M₂₋₁* en proporción 1:1. En este trabajo de tesis, se realizó el estudio de los determinantes termodinámicos y cinéticos que definen la reacción de interacción entre la proteína *M₂₋₁* con ARN sintéticos y con fragmentos de *P* diseccionando de esta manera la región mínima de unión con el antiterminador.

M₂₋₁ se une a dos moléculas de ARN de 13 nucleótidos o más por tetrámero, desestabilizando la estructura secundaria del ARN al unirse. El análisis cuantitativo fino muestra una cooperatividad positiva, indicativa de una asimetría conformacional en el tetrámero. Es una asociación bimolecular rápida seguida de reordenamientos lentos correspondientes a un mecanismo de ajuste inducido, lo cual podría proporcionar una descripción secuencial de los eventos temporales de la cooperatividad.

En segunda instancia mapeamos el sitio de interacción de *P* con *M₂₋₁* en la región amino-terminal (*P_{NTET}*), presentando una estequiometría 1:1 y una constante de afinidad en el orden nanomolar similar a la observada para la proteína entera. Vimos una ganancia en el contenido α -hélice global del complejo *M₂₋₁:P_{NTET}*, sugiriendo la existencia de un reordenamiento de la estructura secundaria de *P*. Dadas las transiciones conformacionales de *P* abordamos el análisis de la base termodinámica de esta interacción. Vimos que existe una compensación entrópica/entálpica en un rango de temperatura donde el complejo de replicación se ensambla y desensambla.

Por último, pudimos cristalizar la región de *M₂₋₁* que une ARN y *P*, y por experimentos de dicroísmo circular observamos que posee un despliegue cooperativo de dos estados y es un dominio compacto e independiente del resto de la molécula.

La caracterización biofísica, bioquímica y estructural de estas proteínas esenciales para el ciclo biológico de RSV constituye uno de los puntos de partida para el desarrollo de compuestos antivirales y vacunas. Estos resultados nos ayudan a comprender mejor los mecanismos de replicación de los pneumovirus, lo cual puede ser extrapolado también a virus emparentados.

Palabras claves: Virus respiratorio sincicial humano, *M₂₋₁*, ARN, fosfoproteína *P*, cooperatividad, cristalografía de proteínas, proteínas intrínsecamente desordenadas, interacción.

Title: "Tripartite interactions in the gene function regulation of the Respiratory Syncytial Virus: M₂₋₁ transcriptional antiterminator, phosphoprotein P and RNA".

SUMMARY: Human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) is the main cause of pediatric lower respiratory tract viral infections and of childhood hospitalization. This virus belongs to the order Mononegavirales, family *Pneumoviridae*. Its genome consists of a 15 kb non-segmented negative polarity single stranded RNA molecule that is encapsulated by the nucleocapsid *N* protein. RSV replication and transcription genome is carried out by the RNA polymerase complex, conformed by the RNA polymerase *L*, the phosphoprotein *P* that acts as scaffold for the assembly of the complex and the M₂₋₁ a transcriptional antiterminator. M₂₋₁ is a homotetrameric RNA binding protein, which contains a Zn⁺² binding motif, improves transcriptional processivity and is unique to pneumovirus. *P* is an extended protein consisting of a tetramerization domain of four helices flanked by an intrinsically disordered N-terminal domain and a partially ordered C-terminal domain. It is known by previous reports that *P* forms a non-globular complex with M₂₋₁ with a 1:1 ratio.

In this thesis, we study the thermodynamic and chemical determinants that define the binding of M₂₋₁ protein with synthetic RNA and M₂₋₁ with *P* fragments dissecting in this way the minimum binding region with the anti-terminator.

M₂₋₁ binds two molecules of 13 nucleotides or more per tetramer, destabilizing the secondary structure of the RNA upon binding. The fine quantitative analysis shows a positive cooperativity, indicating a conformational asymmetry in the tetramer. It is a rapid bimolecular association followed by slow rearrangements corresponding to an induced adjustment mechanism, which can provide a sequential description of the temporary events of the cooperative.

Furthermore, we mapped the interaction site of *P* with M₂₋₁ in the amino-terminal region (*P*_{NTET}), presenting a 1:1 stoichiometry and an affinity constant in the nanomolar order similar for the whole protein. We saw a gain in the global α -helix content of the M₂₋₁:*P*_{NTET} complex, suggesting the existence of a rearrangement of the *P* secondary structure. Given the conformational transitions of *P* we address the analysis of the thermodynamic basis of this interaction. We observed that there is an entropic/enthalpic compensation in a temperature range where the replication complex is assembled and disassembled.

Finally, we were able to crystallize the region of M₂₋₁ that binds RNA and *P*, and by circular dichroism experiments we could determine that it has a cooperative unfolding of two states and is a compact domain and independent of the rest of the molecule.

The biophysical, biochemical and structural characterization of these essential proteins for the biological RSV cycle is a starting point for the development of antiviral compounds and vaccines. These results help us to understand the mechanisms of replication of pneumoviruses, which can also be extrapolated to related viruses.

Key words: Human respiratory syncytial virus, M₂₋₁, RNA, phosphoprotein *P*, cooperativity, crystallography of proteins, intrinsically disordered proteins, interaction.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle en primer lugar a Gonzalo por haberme dado la oportunidad de hacer mi doctorado en su laboratorio. Por haber confiado en mí, por alentarme siempre a seguir adelante, permitirme plantear mis ideas y trabajar con libertad.

A mis compañeros del 209, gracias a todos por enseñarme tantas cosas y ayudarme cuando lo necesité, me llevo hermosas anécdotas y lo mejor de cada uno, a Gabi, Sil, Marian, Marianito, Seba, Damián, Leo, Juli y Lucho. También quiero agradecerles a los que ya no están por los momentos lindos compartidos, Marikena, Lu, Nico y Gabin.

A Juli por ser tan buena compañera y amiga. Gracias por los mates dulces.

A Seba por leer mi tesis y ayudarme con las correcciones.

A Damián por las clases de termodinámica que me ayudaron en la escritura de la tesis.

A Henning y María, por recibirme en Alemania con mucho amor, en su casa con sus hijos y permitirme trabajar con ellos como una más de su laboratorio.

A los miembros de mi comité de seguimiento de tesis, Nora López, Cristina Marino y Leopoldo Gebhard, gracias por la buena onda y los consejos.

A mi consejero de estudios Pablo Cerdán por la buena predisposición siempre.

A todo el personal de Leloir que facilitan nuestro trabajo día a día, Lili, Moni, Diego, Sole, administración, mantenimiento.

A mis compañeros de Leloir por la ayuda, los consejos, las charlas de aliento y la buena onda siempre en los pasillos.

A mis amigas de Leloir, por las mejores meriendas y charlas, Marie, Elvi (mi compañera de escritura), Julia, Sofi, Ine, Gabin, Carol y Sole.

A Marie por estar ahí conmigo siempre pero siempre. Por una amistad eterna.

A Gabin por acompañarme en mis primeros pasos, por enseñarme tantas cosas, por seguir discutiendo resultados fuera del horario laboral y con diferencia horaria. Gracias por estar presente siempre.

A mis amigas del CUI, por tantos momentos hermosos, Mel, Meli, Lu, Iza, Cami, Flor y Flora.

A mis amigas de la facu, siempre en mi corazón.

A Jime, Cami y Marine mis amigas de la vida.

A Pilar y Bochín por los domingos de almuerzos en familia. Pilar gracias por acompañarme desde el primer viaje a Buenos Aires. Bochín gracias por alentarme a seguir este camino y mostrarme tu pasión por la ciencia.

A la familia Duenk por los hermosos momentos juntos.

A la familia de mi novio (Titina, Mario, Male, Juli, Marianito y Mati), mi segunda familia, gracias por acompañarme siempre y por todo el amor.

A José, Mariela y familia por tanto cariño y por ser incondicionales.

A mi familia, GRACIAS, por tanto, los amo. A mi madrina, mis primos Cris, Leti y Enzo, a sus parejas Clau, Robert y Gabi, a mis niñas Romi, Juli y Fer, y a mi bello ahijado Camilo, que vino a este mundo para llenar de amor y felicidad nuestras vidas.

A mis abuelos, a mi padrino y a Sete por guiarme desde donde estén.

A mi papá por apoyarme y alentarme, y no menos importante, por esperarme siempre con un asadito cuando voy a Villa Dolores a visitarlos.

A mi mamá, tan incondicional, gracias por apoyarme en cada paso de mi vida y protegerme aun a la distancia. Sos mi guía.

A Manu, mi compañero de vida. Gracias por amarme y cuidarme tanto. Sos todo para mí.

PRODUCCION CIENTIFICA

Los resultados presentados en esta tesis se encuentran publicados en los siguientes artículos:

- *Cooperative RNA Recognition by a Viral Transcription Antiterminator.*

Molina IG, Esperante SA, Marino-Buslje C, Chemes LB, de Prat-Gay G. *J Mol Biol.* 2018 Mar 16;430(6):777-792. doi: 10.1016/j.jmb.2018.01.018. Epub 2018 Feb 4.
PMID: 29414675.

- *Structure and stability of the Human respiratory syncytial virus M2-1 RNA-binding core domain reveals a compact and cooperative folding unit.*

Molina IG, Josts I, Almeida Hernandez Y, Esperante S, Salgueiro M, Garcia Alai MM, de Prat-Gay G, Tidow H. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 2018 Jan 1;74(Pt 1):23-30. doi: 10.1107/S2053230X17017381. Epub 2017 Dec 15.
PMID: 29372904

Durante el desarrollo de esta tesis, también se publicó el siguiente artículo en colaboración con otro proyecto del laboratorio:

- *Intrinsic Disorder to Order Transitions in the Scaffold Phosphoprotein P from the Respiratory Syncytial Virus RNA Polymerase Complex.*

Noval MG, Esperante SA, **Molina IG**, Chemes LB, Prat-Gay G. *Biochemistry.* 2016 Mar 15;55(10):1441-54. doi: 10.1021/acs.biochem.5b01332. Epub 2016 Mar 4.
PMID: 26901160

ABREVIATURAS

ΔC_p : cambio de la capacidad calorífica
 ΔG : cambio de energía libre de Gibbs
 ΔH : cambio de entalpía
 ΔS : cambio de entropía
2BME: 2 beta-mercapto-etanol
6-FAM: 6-carboxifluoresceína
A, T, C, G, U: bases nitrogenadas adenina, timina, citosina, guanina y uracilo
aa: aminoácido
AI: ajuste inducido
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
BSA: seroalbúmina bovina
C-terminal: Extremo carboxilo terminal
CD: Dicroísmo Circular, por sus siglas en inglés
DO: Densidad óptica
DTT: 1,4-Dithiothreitol
EDTA: ácido tetra-acético etilendiamina
EMSA: electrophoretic mobility shift assay (ensayo de cambio en la corrida electroforética)
FI: Fuerza iónica
FITC: isotiocianato de fluoresceína
Gdm.Cl: Cloruro de Guanidinio
GE: fin de gen, por sus siglas en inglés "gene end"
GS: inicio de gen, por sus siglas en inglés "gene start"
IB: cuerpos de inclusión, por sus siglas en inglés
IBAGs: gránulos asociados a cuerpos de inclusión, por sus siglas en inglés
IDP: Proteína intrínsecamente desordenada, por sus siglas en inglés
IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
ITC: calorimetría de titulación isotérmica
 K_D : constante de disociación
m: cooperatividad del proceso de desnaturalización
MALDI-TOF: desorción/ionización láser asistida por matriz
Mer: la longitud de un oligonucleótido generalmente se denota con "-mer" (del griego *meros*, "parte")
MRW: Elipticidad molar
MW: Peso molecular, por sus siglas en inglés
N-terminal: Extremo amino terminal.
nm: nanómetros
nM: nanomolar
ORF: Marco abierto de lectura, por sus siglas en inglés
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
PDB: base de datos de estructuras de proteínas
pI: punto isoeléctrico
PMSF: fenilmetilsulfonil-fluoruro
RBD: dominio de unión a ARN, por sus siglas en inglés.
RCP: complejo ARN polimerasa, por sus siglas en inglés
RdRp: ARN polimerasa ARN dependiente, por sus siglas en inglés
RMN: Resonancia magnética nuclear, por sus siglas en inglés
RNP: ribonucleoproteína
rpm: revoluciones por minuto
RS: Radio hidrodinámico
RSV: Virus respiratorio sincicial, por sus siglas en inglés
SC: cadena simple
SDS: Dodecilsulfato de sodio
SEC: cromatografía de exclusión molecular
TD: dominio de tetramerización, por sus siglas en inglés
Tris: tris (hidroximetil) amino metano
UA: Unidades arbitrarias
UV: ultra violeta
VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana
ZBD: dominio de unión a zinc, por sus siglas en inglés
 ϵ_{280} : nm coeficiente de extinción molar
 μM : micromolar

INDICE

ABREVIATURAS	7
INTRODUCCION	10
Virus Respiratorio Sincicial humano (RSV): generalidades	12
Clasificación filogenética	13
Estructura del genoma y proteínas virales	14
Complejo polimerasa	16
Ciclo de vida del virus	17
Transcripción y replicación de ARN	18
El antiterminador viral M_{2-1}	21
<i>Función de M_{2-1} en la transcripción</i>	21
<i>Estructura</i>	22
<i>Fosforilación</i>	24
<i>Otras funciones de M_{2-1}</i>	24
<i>Proteínas relacionadas: M_{2-1} HMPV y VP30 Ebola</i>	25
La fosfoproteína P	26
Interacción M_{2-1}:ARN	27
Interacción M_{2-1}:P	28
Determinación de la estructura de proteínas por cristalografía de rayos x	29
<i>Purificación de la proteína a cristalizar</i>	30
<i>Cristalización</i>	30
<i>Difracción del cristal</i>	32
<i>Resolución de la estructura</i>	32
<i>Refinamiento de los datos</i>	33
OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS	34
MATERIALES Y METODOS	36
EXPRESION Y PURIFICACION DE PROTEINAS	38
<i>M_{2-1} de longitud completa</i>	38
<i>M_{2-1} core</i>	38
<i>P y fragmentos de P</i>	38
CONTROL DE CALIDAD Y CUANTIFICACION DE LAS PROTEINAS UTILIZADAS	38
<i>Determinación de la concentración de proteínas</i>	39
OLIGONUCLEOTIDOS SINTETICOS MARCADOS Y SIN MARCAR	40
MARCACION DE P Y LOS FRAGMENTOS P_{NTET}, P_{TETC} Y P_N CON ISOTIOCIANATO DE FLUORESCINA (FITC)	40
GELES SDS PAGE, REACTIVOS Y DROGAS	41
ENSAYO DE CAMBIO EN LA CORRIDA ELECTROFORETICA (EMSA)	42
<i>Gel de poliacrilamida</i>	42
<i>Gel de agarosa</i>	42
<i>Análisis densitométrico de EMSA</i>	42
ESTEQUIOMETRIA DE UNION	43
EXPERIMENTOS DE DICROISMO CIRCULAR	43
<i>Estudios de interacción</i>	44
<i>Desnaturalización térmica</i>	44
MEDIDAS DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	44
<i>Medidas de titulación de equilibrio</i>	45
<i>Medidas cinéticas</i>	45
<i>Experimentos de competición</i>	45
PLEGADO Y ESTABILIDAD	45
ESTUDIOS CINETICOS DE ASOCIACION MEDIDOS POR STOPPED FLOW	46
ENSAYOS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR (SEC)	46
CALORIMETRIA	47
CRISTALOGRAFIA	48
<i>Cristalización y recopilación de datos</i>	48

<i>Determinación de la estructura, refinamiento y análisis</i>	48
DISPERSION DE RAYOS X DE ANGULO PEQUEÑO (SAXS)	48
ANÁLISIS Y AJUSTES DE DATOS	49
<i>Titulaciones de unión al equilibrio</i>	49
<i>Cinéticas de asociación y disociación</i>	49
<i>Modelo de ajuste inducido</i>	50
<i>Experimentos de competición</i>	51
<i>Interacciones cooperativas</i>	51
CALCULO DE LA ENERGIA LIBRE DE GIBBS (ΔG)	52
VAN'T HOFF	52
MODELO COMPLETO DE LA ESTRUCTURA DEL TETRAMERO M_{2-1}	53
CAPITULO I	54
CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y BIOFISICA DE LA INTERACCION ENTRE LA PROTEINA	
M_{2-1} Y ARN	56
INTRODUCCION	56
RESULTADOS	57
I.1. Estequiometría de la interacción M_{2-1} con ARN.	57
I.2. Análisis cuantitativo de la interacción de M_{2-1} con ARN.	59
I.3. M_{2-1} despliega la estructura del ARN después de la unión.	62
I.4. La unión del anti-terminador al ARN de 20 bases es cooperativa.	65
I.5. Bases cinéticas para la interacción cooperativa M_{2-1} :ARN.	67
I.6. Efecto de la fuerza iónica en la interacción M_{2-1} :ARN.	71
I.7. Análisis termodinámico de la unión M_{2-1} :ARN.	72
I.8. Estudio de la disociación del complejo M_{2-1} :ARN.	74
I.9. Estudio de la disociación del complejo M_{2-1} :P y M_{2-1} :P _{NTET}	76
DISCUSION I	80
CAPITULO II	86
ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE M_{2-1}, LA PROTEINA P Y SUS DOMINIOS EN EL	
EQUILIBRIO	88
INTRODUCCION	88
RESULTADOS	89
II.1. Análisis de los requerimientos estructurales de P en la interacción P: M_{2-1} por cromatografía de exclusión molecular.	89
II.2. Estudio de la interacción P: M_{2-1} por espectroscopia de fluorescencia.	93
II.3. Efecto de la fuerza iónica en la interacción M_{2-1} :P _{NTET}	97
II.4. Competencia entre P y sus fragmentos por la unión a M_{2-1}	98
II.5. Rearreglos estructurales en el complejo M_{2-1} :P.	99
II.6. Análisis termodinámico de la interacción M_{2-1} :P.	100
DISCUSION II	106
CAPITULO III	112
ESTRUCTURA Y ESTABILIDAD DEL DOMINIO DE UNION AL ARN DE M_{2-1}	114
INTRODUCCION	114
RESULTADOS	115
III.1. Cristalización y colección de datos.	115
III.2. Determinación de la estructura, refinamiento y análisis del monómero M_{2-1} core.	116
III.3. Análisis de M_{2-1} core por SAXS.	118
III.4. Plegado y estabilidad de M_{2-1} core.	120
DISCUSION III	124
CONCLUSIONES GENERALES	128
ANEXO	134
BIBLIOGRAFIA	146

INTRODUCCION

Virus Respiratorio Sincicial humano (RSV): generalidades

El virus RSV es el principal agente etiológico de infección aguda del tracto respiratorio inferior y hospitalización por enfermedad respiratoria, que provoca un colapso de los sistemas de salud pública durante los picos de infección en los países del tercer mundo (1,2). La organización mundial de la salud, estima una mortalidad anual de 160.000 individuos en todo el mundo (3). Los bebés que nacen prematuramente o aquellos con enfermedad de base, pulmonar o cardíaca o que se encuentran inmunocomprometidos tienen un mayor riesgo de sufrir enfermedad grave por RSV. También los individuos inmunosuprimidos y ancianos son un grupo de riesgo para la infección grave por este virus.

La infección por RSV se manifiesta como una epidemia estacional asociada principalmente a los meses de invierno, o temporadas de lluvia según la región. En Argentina, las temporadas epidémicas comienzan entre abril y mayo (otoño) y alcanzan su pico máximo entre junio y julio (invierno). De los 350.000 casos de bronquiolitis reportados anualmente, el 60% son de origen viral, dentro de los cuales entre el 60 y el 80% de los aislamientos son RSV positivos (4).

En base a sus diferencias antigénicas se identifican dos grupos principales de RSV: RSV-A y RSV-B, que se diferencian sobre todo en la glicoproteína G (5). Variaciones en la secuencia del gen G dan lugar a distintos subgrupos en el grupo A (GA1-GA7, SAA1, SAA2, NA1-NA4, CB-A y ON1) y en el grupo B (GB1-GB13, SAB1-4, URU1 y URU2, THB, CB-B, JAB1 y BA) (6,7). No se han demostrado diferencias clínicas ni epidemiológicas entre ambos grupos, aunque es posible que se encuentren cepas más virulentas que otras. Los subgrupos predominantes pueden cambiar de un año a otro y esto explica la posibilidad de reinfección por distintos subgrupos.

A pesar del conocimiento acumulado sobre la biología celular y molecular del RSV aún no se cuenta con vacunas ni tratamientos antivirales específicos eficientes para tratar la infección (8). Una terapia actual disponible comercialmente para prevenir y tratar la enfermedad causada por RSV consiste en un anticuerpo neutralizante denominado *Palivizumab* (Synagis) contra la proteína de fusión (F) de este virus, previniendo la entrada a la célula huésped y solo se recomienda para recién nacidos de alto riesgo, como bebés prematuros y para personas con enfermedad cardiovascular e inmunosupresión (9). Aunque este tratamiento puede reducir la probabilidad de enfermedad en bebés expuestos al virus, los altos costos comerciales y la protección a corto plazo han impedido que se convierta en una terapia ampliamente utilizada en la mayoría de los sistemas de salud pública en todo el mundo (10). Por lo tanto, se requieren con urgencia medicamentos antivirales nuevos, eficientes y asequibles, y vacunas efectivas y seguras contra el RSV.

Clasificación filogenética

RSV pertenece al orden *Mononegavirales*, los cuales constan de un genoma de ARN no segmentado, de polaridad negativa (3' a 5'). Los viriones poseen una envoltura y una nucleocápside helicoidal con una polimerasa ARN-dependiente (RdRp). Este orden incluye patógenos animales y humanos de gran importancia para la salud pública.

En el 2016 el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) decidió realizar algunas modificaciones en el orden *Mononegavirales*, entre las cuales se propuso el establecimiento de una nueva familia incorporando la actual subfamilia *Pneumovirinae* de la familia *Paramyxoviridae* como se muestra en la Figura 1 (11).

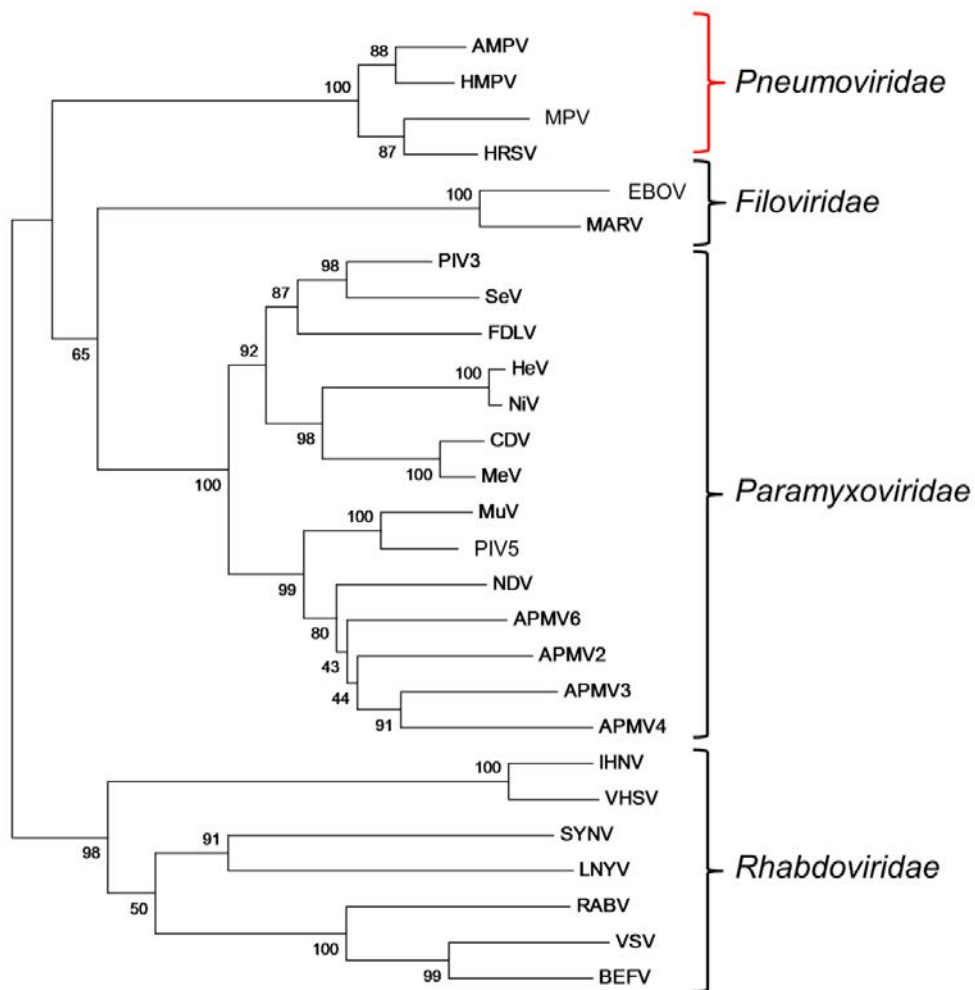


Figura 1. Árbol filogenético de la región central de 200 aminoácidos de la proteína de la polimerasa de *Mononegavirales*.

Esta propuesta se basa en la consideración de las relaciones filogenéticas entre los miembros de las subfamilias *Pneumovirinae* y *Paramyxovirinae* y otros mononegavirus, particularmente los pertenecientes a la familia *Filoviridae*. Por un lado, la presencia de un gen

M2 en los genomas de pneumovirus que codifica para dos proteínas únicas implicadas en la regulación de la síntesis de ARN del virus y, por otro lado, la diferencia en las estructuras de complejos ribonucleoproteína de los miembros de las subfamilias *Pneumovirinae* y *Paramyxovirinae*. Estas diferencias entre las dos subfamilias justifican la separación en dos nuevas familias quedando conformado el orden como se muestra en la Figura 1 (11).

La familia *Pneumoviridae* entonces, se encuentra compuesta por dos géneros: el género *Metapneumovirus* y el género *Orthopneumovirus*, en el cual se incluye al RSV. Como podemos observar, la familia *Pneumoviridae* se encuentra más cerca de la familia *Filoviridae*, dentro de la cual se encuentra el virus del Ebola que posee proteínas que comparten una similitud funcional y estructural con proteínas de RSV, una de ellas, la proteína VP30 similar a M₂₋₁ de RSV.

Estructura del genoma y proteínas virales

La longitud del ARN genómico en los *Mononegavirales* varía entre 8.900 y 19.000 nucleótidos para las diferentes familias. El número de proteínas virales codificadas también varía, de 5 a 11, pero con una estructura común 3'- N P M G L -5' (Figura 2), aunque algunos miembros, por ejemplo, RSV, codifican varias proteínas adicionales.

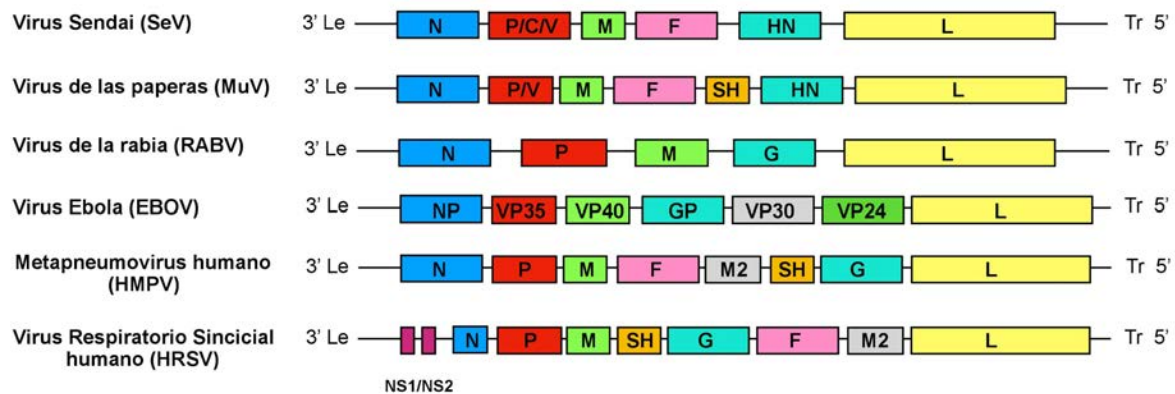


Figura 2. Organización del genoma general de *Mononegavirales*. Podemos observar la estructura común que poseen virus representantes de las distintas familias del orden, los virus Sendai y de las paperas (familia *Paramyxoviridae*), el virus de la Rabia (familia *Rhabdoviridae*), el virus Ebola (familia *Filoviridae*) y el Metapneumovirus y el virus Respiratorio Sincicial humano (familia *Pneumoviridae*).

Como mencionamos anteriormente, RSV es un virus con envoltura de membrana, con un genoma no segmentado de ARN simple cadena polaridad negativa, de 15.2 kilobases, el cual presenta en sus extremos 3' y 5' regiones no codificantes regulatorias llamadas *leader* (Le) y *tráiler* (Tr), respectivamente (12). El genoma de RSV incluye 10 genes que codifican para 11

proteínas (Figura 3), cada gen se encuentra flanqueado por dos regiones reguladoras transcripcionales, una región de inicio de gen (GS) y una región de fin de gen (GE).

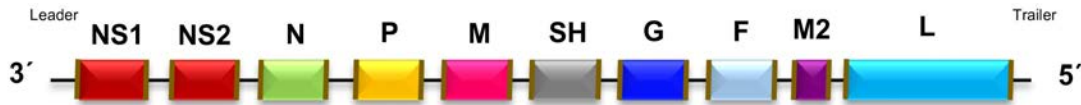


Figura 3. Organización genómica de RSV. Se indican los 10 genes que componen el genoma, así como también las regiones reguladoras leader y tráiler y las regiones GS y GE que se muestran como bordes marrones flanqueando cada gen.

De las 11 proteínas codificadas (Tabla 1), 3 están asociadas con la RNP: la nucleoproteína (N), la ARN polimerasa ARN dependiente (L) y la fosfoproteína (P). Tres proteínas están asociadas con la envoltura viral, la proteína de fusión (F), la glicoproteína de unión (G) y la proteína hidrófoba pequeña (SH). La proteína de la matriz (M) está situada debajo de la envoltura viral y juega un papel fundamental en el ensamblaje del virión. A diferencia del resto de las proteínas del virus, las proteínas NS1 y NS2 no se encuentran formando parte de la partícula viral (no estructurales), están implicadas en el bloqueo de la inmunidad innata y son exclusivas de RSV. Las dos proteínas restantes están codificadas por el gen M2 y se traducen a partir de marcos de lectura abiertos solapados en un único transcrito de ARNm de M2. La proteína M_{2-1} es un factor antiterminador de la transcripción esencial y la proteína M_{2-2} regula la síntesis del ARN viral mediando el cambio entre la transcripción y la replicación.

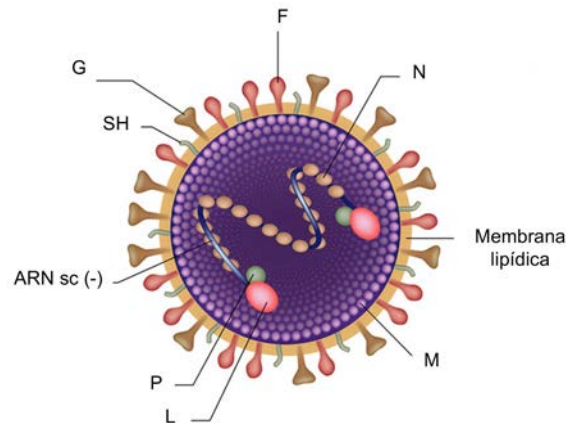


Figura 4. Esquema de la estructura propuesta para el virión de RSV. Se puede observar la distribución de las proteínas en la partícula viral.

El virión de RSV es heterogéneo en tamaño, con un diámetro de aproximadamente 150 nm en promedio y una forma que varía desde esféricos hasta casi filamentosos. Posee una nucleocápside helicoidal y simétrica, envuelta en una bicapa lipídica proveniente de la célula huésped, en la Figura 4 se puede observar la organización de las proteínas antes mencionadas en la partícula viral.

Tabla 1. Principales funciones de las proteínas del Virus Respiratorio Sincicial (3).

Posición del gen	Proteína	Función
1	NS1	Participa en el bloqueo de la vía de inducción y respuesta a interferón alfa y beta.
2	NS2	Participa en el bloqueo de la vía de inducción y respuesta a interferón alfa y beta.
3	N	Componente principal de la nucleocápside. Se encuentra íntimamente unida al ARN viral.
4	P	Cofactor de la proteína L que interactúa con la nucleocápside para localizar a L con el ARN. También interactúa con M ₂₋₁ .
5	M	Importante en la morfogénesis del virus por dirigir el ensamblado de los componentes del virión.
6	SH	Proteína de transmembrana de la envoltura que puede inhibir la señalización del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), lo que quizás ayude a RSV a evadir el sistema inmunitario.
7	G	Glicoproteína de transmembrana de la envoltura. Participa en la unión del virus a la célula.
8	F	Glicoproteína de transmembrana de la envoltura, importante para la unión y entrada del virus a la célula. Promueve la formación de sincitios.
9	M ₂₋₁	Promueve la procesividad de la transcripción actuando como un factor elongador y antiterminador.
9	M ₂₋₂	Regulador de la transcripción viral, media el cambio de la transcripción a la replicación del ARN
10	L	ARN polimerasa ARN dependiente que replica/transcribe el genoma viral.

Complejo polimerasa

El complejo ARN polimerasa (RPC) es esencial para la replicación y la transcripción del genoma de los virus del orden *Mononegavirales* durante la infección (13). El RPC de RSV se encuentra conformado por 4 proteínas: la proteína de la nucleocápside N, la polimerasa viral L, la fosfoproteína P y el antiterminador viral M₂₋₁ (12) cuyas funciones fueron detalladas previamente. Dada a la función central que cumple el RPC en el ciclo de vida del virus, este constituye un blanco atractivo para el desarrollo de antivirales específicos (14). Para el desarrollo de antivirales basados en la interferencia de sitios de interacción entre los distintos componentes del complejo se requiere información estructural y bioquímica detallada acerca de las proteínas que lo componen y cómo interactúan entre sí. Hasta la fecha se han determinado solo las estructuras del decámero N (15) y de la proteína M₂₋₁ (16). No se cuenta con información estructural de la proteína L, debido a su gran tamaño y complejidad, ni de la proteína P, probablemente por su carácter de proteína intrínsecamente desordenada.

Ciclo de vida del virus

RSV se une a la superficie de células ciliadas del epitelio respiratorio a través de la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática celular (Figura 5). La inserción y entrada del virus están mediadas por las glicoproteínas de la envoltura G y F, sin una contribución conocida de la proteína SH. En el citoplasma, el genoma se transcribe en ARNm individuales para cada proteína, M_{2-1} tiene un rol clave en la transcripción secuencial de todos los genes ya que, le permite a la polimerasa atravesar regiones intergénicas actuando como un factor de procesividad y antiterminador de la transcripción.

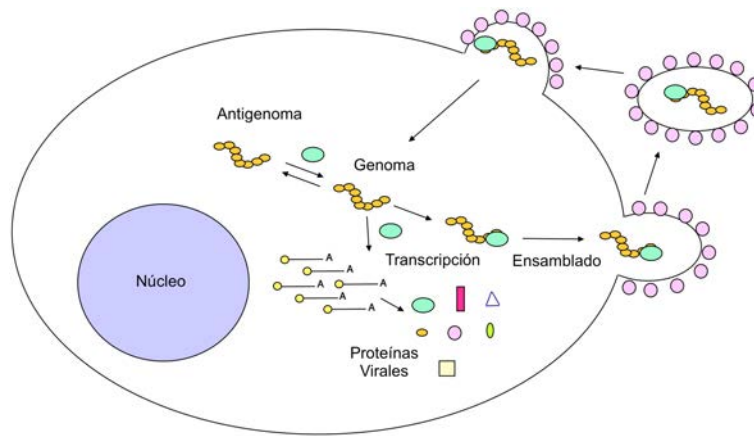


Figura 5. Ciclo de vida del RSV. El virus se fusiona a la superficie celular e ingresa al citoplasma. El genoma se transcribe a ARNm individuales para cada proteína y a un ARN antígenómico a partir del cual se producirán los genomas de la progenie viral. La replicación ocurre también en el citoplasma. El ensamblado da origen a la partícula viral, la cual es liberada en forma de brotes.

Cuando los productos génicos y M_{2-1} se acumulan hasta cierto nivel, el complejo polimerasa deja de transcribir y replica el ARN de sentido negativo, llevando a la producción de una copia positiva de ARN complementaria (antígenoma), los cuales servirán como molde para formar ARN de sentido negativo de la progenie viral. Los nuevos ARN genómicos, se unen a la proteína N y junto a L y P forman nucleocápsides que se asocian a las proteínas M, generando viriones maduros. Estos viriones atraviesan por gemación la membrana plasmática de la célula hospedadora formando nuevos virus (17,18). La expresión de la proteína F en la membrana plasmática de células infectadas (como las células ciliadas del epitelio respiratorio) lleva a la fusión de membranas contiguas, lo que produce la formación de sincicios característicos (de ahí el nombre del virus) que llevan a la muerte celular (12,17).

Transcripción y replicación de ARN

La expresión génica de RSV comienza con la entrada del genoma ARN de sentido negativo el cual sirve como molde para producir de forma secuencial transcritos de ARNm en un proceso conocido como transcripción primaria. Este proceso es mediado por la polimerasa residente, llevada a la célula infectada con el genoma viral de entrada. Estos transcritos se traducen posteriormente en proteínas estructurales que son necesarias para las siguientes rondas de síntesis de ARN y para el ensamblaje de la progenie viral, o son proteínas no estructurales que modifican el entorno de la célula hospedadora y facilitan la multiplicación del virus. Luego, el ARN viral se replica para formar copias de sentido positivo del mismo, conocidas como antigenomas (Figura 6), el extremo 3' del antigenoma contiene la región tráiler complementaria (TrC), la cual le señala a la polimerasa donde iniciar y realizar la síntesis de ARN genómico.

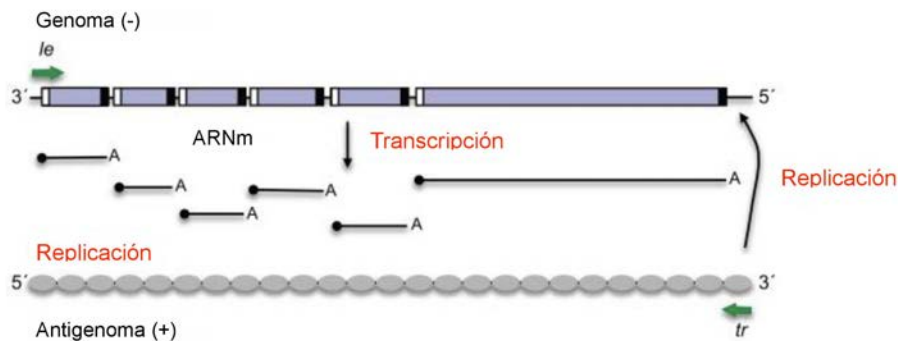


Figura 6. Representación esquemática del genoma, antigenoma y ARNm de RSV. Los genes se observan de color lila y los GS y GE en blanco y negro, respectivamente. El genoma actúa como molde para la síntesis de ARNm y antigenoma de polaridad positiva. A su vez, el antigenoma se muestra cubierto con óvalos grises, que representan la proteína N, para indicar que se encuentra encapsidado, actúa como molde para la síntesis de ARN genómico de la progenie viral (19).

El cambio de la actividad de la polimerasa de una transcriptasa a una replicasa aún no se ha resuelto (20) pero se han propuestos algunos modelos que se muestran más adelante en esta sección. Los promotores para ambas actividades se ubican dentro de los 44 nucleótidos iniciales del extremo 3' del genoma (región Le), pero los sitios de inicio son diferentes; la replicación comienza en la posición 1, mientras que la transcripción se inicia en la posición 3 (21) (Figura 7). Posteriormente, la polimerasa de transcripción se mueve de manera secuencial a lo largo del molde en dirección 3' a 5' y reconoce y responde a las señales GS y GE (señales que actúan en *cis*) que flanquean a cada uno de los genes de RSV como mostramos anteriormente. Estas secuencias conservadas señalan el inicio y la terminación de un ARNm que es modificado en el extremo 5' (*capping*) y poliadenilado en el 3' (cola de poli A) por el complejo polimerasa de RSV (22). Por el contrario, la polimerasa con actividad replicasa ignora

estas señales GS y GE para sintetizar una copia complementaria completa del genoma. La replicación requiere la presencia de las proteínas N, P y L, mientras que la transcripción requiere N, P, L y también M_{2-1} (23–25). En ausencia de M_{2-1} , la abundancia de productos de transcripción de longitud completa se reduce, lo que sugiere que la proteína L requiere de M_{2-1} , especialmente durante la transcripción de genes largos (26).

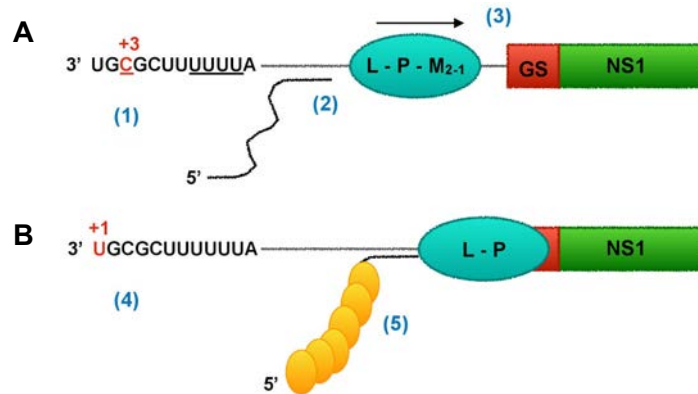


Figura 7. Modelo para transcripción y replicación del ARN. **A)** Transcripción: el complejo polimerasa transcripcionalmente competente (proteínas azules, L, P y M_{2-1}) ingresa al genoma en el extremo 3' del molde y se une a los nucleótidos 3 a 12. La síntesis de ARN se inicia en la posición +3 (1). Después de la síntesis de aproximadamente 25 nucleótidos, la polimerasa alcanza un punto de control y aborta la síntesis del ARN leader (2). La polimerasa ahora está lista para escanear el molde y localizar el primer GS en la posición +45 (rojo) y reiniciar la síntesis del ARN (3). **B)** La replicación del ARN se produce si la polimerasa inicia en la posición +1 (4) y el ARN se encapsula concurrentemente con proteína N (anaranjado) antes del punto de control de ~25 nucleótidos (5).

La transcripción de RSV posee un gradiente polar en el que la transcripción disminuye a lo largo del orden de genes (Figura 6) es decir, los ARNm más abundantes son para las proteínas NS1 y NS2, esto es típico de *Mononegavirales* y ocurre porque algunas de las polimerasas de transcripción se liberan del genoma al atravesar las uniones intergénicas. La expresión del ARNm L, el último gen en el orden, se reduce aún más por un efecto no identificado que parece ser post-transcripcional, posiblemente la estabilidad del ARNm (27). La proteína M_{2-1} como se introdujo anteriormente, permite que la RdRp llegue al final de cada unidad transcripcional (24), influye en la capacidad de la polimerasa para terminar la transcripción en los GE, lo que conduce a una síntesis aumentada de ARNm policistrónicos que abarcan dos o más unidades transcripcionales (28). No se ha resuelto si la actividad de la polimerasa y anti-terminación de M_{2-1} están relacionadas, es posible que se observe una mayor capacidad de procesamiento de la polimerasa cuando M_{2-1} evita que la misma termine en los GE (27).

Este mecanismo de transcripción descrito es compartido por otras familias pertenecientes al orden *Mononegavirales* cuya organización estructural fue mostrada previamente: la familia *Filoviridae*, a la que pertenece el virus Ébola, la familia *Paramyxoviridae*

donde encontramos al virus del Sarampión, Paperas, entre otros y la familia *Rhabdoviridae* donde se localiza al virus de la estomatitis vesicular (VSV).

Fueron propuestos dos modelos de como la transcripción y la replicación se diferencian basados en estudios con virus de las familias *Pneumoviridae*, *Paramyxoviridae* y *Rhabdoviridae*:

- El modelo 1 sugiere que la transcripción y la replicación se inician exactamente de la misma manera, frente al primer nucleótido del promotor Le. Un solo conjunto de polimerasas puede iniciar ambos procesos. El RPC inicia la síntesis de ARN y transcribe la región Le. Durante la transcripción la lectura de esta secuencia concluirá y el ARN producto se liberará, permitiéndole a la polimerasa reiniciar la síntesis de ARN en el primer GS. Durante la replicación, el ARN líder se encapsula simultáneamente, por lo que la síntesis continúa a lo largo de toda la longitud del genoma. Se cree que la presencia o ausencia de suficiente proteína N soluble es el "interruptor" entre los dos modos.
- El modelo 2 propone que hay dos configuraciones del RPC, una configuración con actividad transcriptasa compuesta por L, P y M₂₋₁ y otra con actividad replicasa que consiste en L y P (29–31). De acuerdo con este modelo, el modo replicasa inicia en el extremo 3' del genoma, mientras que el modo transcriptasa inicia en el primer GS y luego procede a sintetizar ARNm encapsulados y poliadenilados.

Luego se propuso un modelo universal que intenta unir los dos modelos descritos anteriormente, el mismo postula que se requieren las proteínas N y P para la iniciación de la síntesis de ARN en la posición 1 del molde, para ayudar a la iniciación desde el extremo 3' del genoma. Cuando N y P están presentes en un nivel bajo, la polimerasa sintetiza un ARN *leader*, pero como este no se encuentra encapsulado, la polimerasa aborta la síntesis de ARN y reinicia la síntesis de ARNm en el primer GS. A niveles altos de N y P, la transcripción del *leader* se encapsula y se produce un cambio de transcripción a replicación (30). Estudios posteriores con VSV y RSV demostraron que la polimerasa puede iniciar en el nucleótido 1 del molde independientemente de N y P (31,32).

Posteriormente se observó que los primeros 13 nucleótidos de la región *leader* son suficientes para determinar la iniciación de la síntesis de ARN, lo que indica que esta región contiene el promotor central, el cual es capaz de reclutar polimerasas (transcriptasa y replicasa) y que la síntesis de ARN se inicia en los sitios 1 y 3 siendo el 3 dominante (21). Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente en el 2015 Noton y Fearnls detallaron este mecanismo en el cual la polimerasa interactúa con los nucleótidos 3 a 11 de la región *leader*. El promotor central posiciona la polimerasa e inicia la síntesis de ARN en la posición 3, pero no puede entrar

en un modo de elongación estable y libera un ARN abortivo, esto le permite a la polimerasa romper los contactos con el promotor. Ahora la polimerasa puede escanear el molde y localizar el primer GS (Figura 7.A). Luego, cuando la polimerasa inicia la síntesis del antígenoma en la posición 1, el ARN naciente que se sintetiza contiene elementos que actúan en *cis* que señalan el inicio de la encapsidación, iniciando de este modo la replicación del ARN (19) (Figura 7.B).

El antiterminador viral M₂₋₁

Los alineamientos de secuencias muestran que M₂₋₁ tiene un 92% de identidad de aminoácidos entre los subgrupos A y B de RSV (33), lo que la convierte en una de las proteínas más altamente conservadas de RSV, pero con 36% de identidad con M₂₋₁ de metapneumovirus (HMPV), que pertenece a la misma familia *Pneumoviridae* (Figura 1 y 2).

Inicialmente el producto proteico del gen M2 de RSV se predijo que codificaba para un polipéptido básico pequeño de 22,15 kDa. En los primeros experimentos de desensamblado del virión descubrieron que se co-purificaba con la envoltura junto a la proteína de la matriz y por ello se denominó “proteína asociada a la envoltura 22K”, luego “proteína 1 similar a la matriz” o M₂₋₁ (34) y se propuso que era una proteína estructural de membrana.

Las primeras indicaciones de que M₂₋₁ estaba realmente involucrada en la síntesis de ARN viral, provino de experimentos de genética reversa, el cual recapitula la transcripción y la replicación viral, utilizando plásmidos de soporte que codifican las proteínas virales requeridas para estos procesos, lo que da como resultado la amplificación del minigenoma y la expresión de sus proteínas codificadas (23). Se descubrió que los plásmidos de soporte que expresan las proteínas L, N y P son necesarios y suficientes para la replicación, pero en la transcripción se formaban especies de ARN que terminaban prematuramente y se observó que el rescate de viriones de RSV viables requería la presencia de M₂₋₁ (24). Sin embargo, la omisión de esta proteína del sistema de minigenoma no redujo el número de eventos de iniciación de la transcripción (25). En consecuencia, se la denominó factor de elongación transcripcional o de antiterminación, requerido para la transcripción de ARN mensajero viral completo y eficiente, pero no para la replicación o iniciación de la transcripción.

Función de M₂₋₁ en la transcripción

Como hemos presentado previamente, la proteína M₂₋₁ promueve la transcripción secuencial a través de dos manifestaciones distintas de su capacidad antiterminadora: la prevención de la terminación intragénica prematura y la lectura a través de señales GE.

Las polimerasas eucariotas y procariotas han desarrollado mecanismos para aumentar su procesividad, lo que reduce la probabilidad de 'caída' prematura de la polimerasa del templado: la ARN polimerasa DNA dependiente II, responsable de la síntesis de todos los ARNm en eucariotas emplea una compleja gama de cofactores que le permiten una elongación estable, y un conjunto igualmente complejo de proteínas para regular sus actividades de terminación (35); la ARN polimerasa de *E. coli* impide la terminación prematura de sus ARN ribosómicos al unirse a factores antiterminadores (36). La antiterminación intragénica por M_{2-1} es el mecanismo de RSV para mejorar la procesividad de la polimerasa.

El segundo aspecto de la antiterminación de M_{2-1} es la lectura a través de señales GE y de este modo el RPC continúa transcribiendo la región intergénica y el gen río abajo (28). No se conoce cómo M_{2-1} previene la terminación intra o intergénica, pero se supone que de alguna manera permite que el complejo polimerasa evite las señales desestabilizadoras que actúan en *cis* dentro del genoma (26). La eficacia de la terminación de la transcripción está regulada no por el reconocimiento de los GE por la polimerasa, sino por M_{2-1} . Los eventos ocurridos en las uniones *leader*-NS1 y NS1-NS2, las dos primeras uniones en el genoma del RSV, parecen ser diferentes de otras regiones intergénicas; la transcripción parece ser independiente de M_{2-1} , ya que se ha observado una síntesis significativa de ARNm NS1 y NS2 en ausencia de M_{2-1} (26). Sin embargo, se desconoce si la transcripción en estas uniones es realmente independiente del antiterminador en el contexto de la infección viral.

No obstante, los mecanismos por los cuales M_{2-1} evita que la polimerasa termine la transcripción de manera prematura aún no se han descifrado. Existen al menos tres escenarios propuestos. (a) M_{2-1} podría unirse al ARNm naciente para facilitar la elongación de la transcripción, tal vez evitando que el ARNm vuelva a hibridar con el ARN genómico, o formando estructuras secundarias que puedan desestabilizar el complejo de transcripción. (b) El efecto potenciador de la procesividad de la polimerasa por M_{2-1} podría deberse a un aumento de la afinidad de la enzima por el molde de ARN genómico en una secuencia no específica. (c) M_{2-1} podría reconocer secuencias GE en el ARNm naciente o en el molde y evitar la liberación del complejo polimerasa, favoreciendo la reiniciación de la transcripción en las secuencias GS río abajo (37).

Estructura

M_{2-1} es una proteína básica de 194 aminoácidos que existe como un tetrámero estable en solución con una alta afinidad ($K_D = 10^{-38} M^3$) sensible al pH del entorno (38,39). Se ha determinado una estructura cristalina del tetrámero M_{2-1} (16) (Figura 8.A) y una estructura de RMN del monómero de M_{2-1} (residuos 58-177) (37). Cada protómero del tetrámero de M_{2-1}

consta de tres regiones distintas unidas por secuencias flexibles no estructuradas (Figura 8.B y Figura 9), estas son: el motivo de unión a zinc (ZBD: residuos 7-25), una hélice de tetramerización (residuos 32-49) y el dominio *core* (residuos 69-172) (16). La conexión de la hélice de tetramerización y el dominio *core* es un *linker* flexible (residuos 52-67) que está poco resuelto en la estructura cristalina, y que incluye dos aminoácidos que pueden fosforilarse (S58 y S61), los cuales son importantes para la función de M_{2-1} .

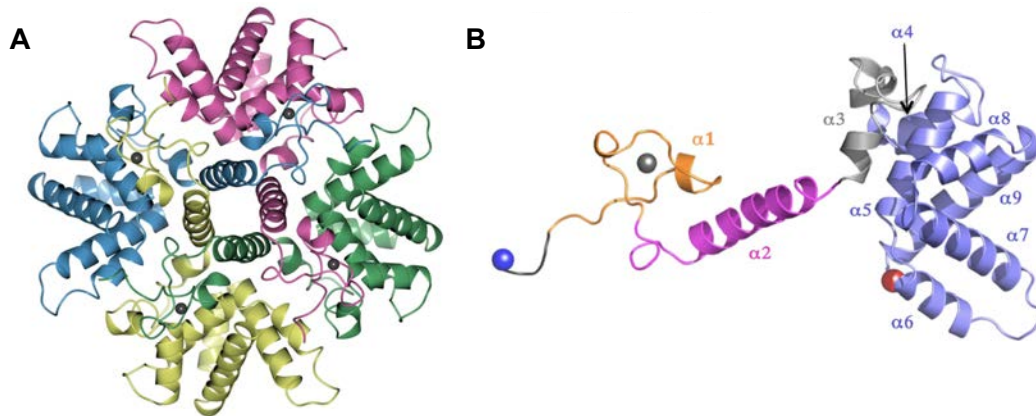


Figura 8. Estructura cristalina de M_{2-1} de RSV. (A) Se muestra el tetrámero M_{2-1} con sus monómeros resaltados en diferentes colores. (B) Se puede observar el monómero M_{2-1} con sus regiones denotadas con diferentes colores: motivo de unión a zinc (anaranjado); hélice de tetramerización (magenta); dominio *core* (azul); dominio desestructurado (gris) y extremos N y C terminal como esferas azules y rojas respectivamente. También se encuentran numeradas las distintas hélices (16).

La tetramerización de M_{2-1} es conducida principalmente mediante una α hélice de tetramerización central y se estabiliza mediante contactos entre el motivo de unión a zinc y el *core* de un monómero adyacente (16). Los últimos 20 residuos del C-terminal no pudieron ser resueltos por lo que se asume que son desestructurados. La molécula consta de nueve α hélices (Figura 8 y Figura 9). Cada monómero de M_{2-1} interactúa con otros protómeros formando un tetrámero altamente estable, aumentando significativamente el área de superficie oculta en el tetrámero y, en consecuencia, aumentando su estabilidad prevista.

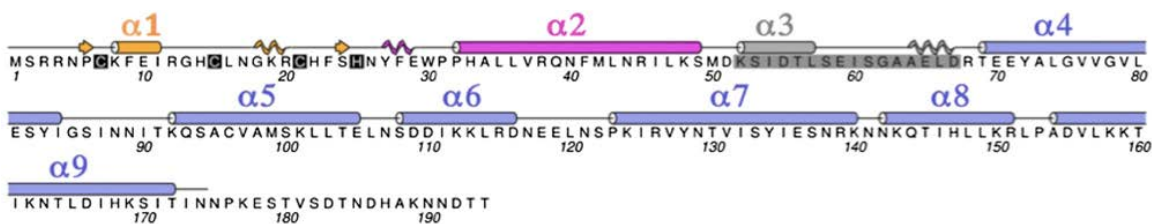


Figura 9. Secuencia y estructura secundaria de M_{2-1} . Las α hélices se muestran como cilindros. Los residuos de coordinación de zinc se resaltan en negro. Los residuos en la región *linker* flexible con densidad parcial se resaltan en gris.

El motivo de unión a zinc es esencial para la antiterminación de la transcripción por M_{2-1} (39–41) y se requiere la coordinación de 1 átomo de zinc por monómero para el plegado correcto y la estabilidad de M_{2-1} . La eliminación del átomo de zinc causa la disociación en una especie monomérica “apo” M_{2-1} cuya estructura secundaria y estabilidad son indistinguibles de las del tetrámero (39).

Fosforilación

M_{2-1} requiere de fosforilación para cumplir su función antiterminadora de manera eficiente, mutaciones de serina a alanina son perjudiciales para la transcripción en el sistema de minigenoma (40). Sin embargo, esta pérdida de la función antiterminadora no se debe a la prevención de la unión del ARN, al igual que no parece afectar la interacción con la proteína P (42). Los sitios de fosforilación han sido identificados por separado como Thr56 y Ser58 (43), y Ser58 y Ser61 (40).

En un trabajo reciente se describió que M_{2-1} requiere de una transición cíclica de fosforilación/desfosforilación para una transcripción eficiente, según se describe, la proteína P interactúa con una fosfatasa celular (PP1), cuando no están unidas PP1 fosforila a M_{2-1} y de esta manera se dirige a los cuerpos de inclusión celulares donde cumple su función antiterminadora, luego es desfosforilada cuando se forma el complejo P:PP1 y M_{2-1} se une a los ARNm que se concentran en sub-compartimentos (IBAGs), posiblemente protegiéndolos de la degradación y jugando un papel en la traducción. Luego M_{2-1} es fosforilada para comenzar el ciclo nuevamente (44).

Otras funciones de M_{2-1}

Tras la entrada en las células, muchos virus de cadena negativa no segmentados inducen la formación de estructuras citoplasmáticas densas que contienen componentes virales las cuales pueden ser definidas como fábricas virales; en células infectadas por RSV, se conocen como cuerpos de inclusión (IB) (45). Estructuras funcionalmente análogas han sido identificadas en otros virus incluyendo rabdovirus y filovirus (46–48) tal como se describió previamente, comparten el mecanismo de transcripción viral con RSV. A través de diferentes técnicas microscópicas, se ha demostrado que los IB de RSV representan los sitios de síntesis de ARN viral activo (49), donde tienen lugar la transcripción y la replicación. Los IB tienen una organización compleja, en su interior se concentran todos los componentes del RCP y a su vez, poseen una subestructura esférica llamada “gránulo asociado al cuerpo de inclusión” (IBAG), estas son estructuras dinámicas que contienen ARNm recién sintetizados junto con M_{2-1} pero no las otras proteínas del RCP (44). No se encontró que fueran traduccionalmente activos, lo

que sugiere que pueden representar un compartimento de acumulación transitoria donde los ARNm recién sintetizados asociados con M_{2-1} se almacenan antes de la traducción en el citosol. La fuerte asociación establecida entre M_{2-1} y ARN viral naciente en IBAGs puede reflejar una función post-transcripcional de M_{2-1} , que consiste en el transporte y acumulación de ARNm virales recién sintetizados.

Proteínas relacionadas: M_{2-1} HMPV y VP30 Ebola

M_{2-1} del HMPV comparte una homología de secuencia del 38% con M_{2-1} de RSV como se mencionó anteriormente, ambos pertenecientes a la familia *Pneumoviridae* (50). M_{2-1} HMPV también es tetramérica con una organización de dominio muy similar a la de M_{2-1} RSV. Fue explorada la plasticidad estructural en M_{2-1} HMPV por simulaciones de dinámica molecular y mediciones de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS), y observaron que esta proteína puede adoptar conformaciones abiertas y cerradas en solución, con un intercambio dinámico entre los dos estados, con el dominio de oligomerización como la parte más rígida de la estructura; esta flexibilidad conformacional le permitiría interactuar con fragmentos de ARN, cuya unión estabiliza el estado cerrado del tetrámero (50).

M_{2-1} HMPV también fue cristalizada en presencia de adenosina monofosfato (AMP) y un fragmento de ADN de cinco nucleótidos y la ubicación de estas moléculas se correspondía con el sitio de unión a ARN determinado para M_{2-1} de RSV a partir de estudios por RMN y mutagénesis (20).

El virus del Ébola, un filovirus del orden *Mononegavirales*, codifica una proteína llamada VP30, que se describe como una nucleoproteína menor ya que forma parte del complejo viral ribonucleoprotéico. La proteína VP30 comparte muchas características estructurales y funcionales con M_{2-1} de RSV: es predominantemente básica, con grupos de residuos arginina y lisina que pueden unirse al ARN; posee el mismo motivo de unión a zinc Cys₃-His₁ como se observa en color amarillo en la Figura 10 y el sitio de unión a ARN en color cian; es fosforilada, lo cual juega un papel fundamental en la regulación de su función; y actúa como un regulador transcripcional que no es necesario para la replicación (51).

Si bien M_{2-1} y VP30 comparten varias de sus funciones, existen algunas diferencias, ya que VP30 forma hexámeros en solución, se une directamente a la proteína L y se sugiere que participa en la transcripción a nivel de iniciación, una función que se ha descartado para el M_{2-1} de RSV. Las dos proteínas tienen solo un 9% de conservación de secuencia, pero una estructura cristalina de rayos X del dominio C-terminal de VP30 (53) reveló similitudes con la disposición helicoidal del dominio *core* de M_{2-1} (residuos 58-177) (37).

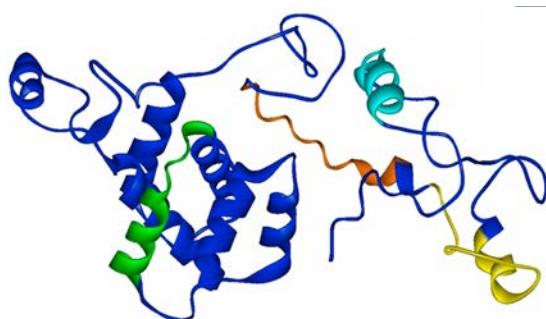


Figura 10. Estructura modelada de la proteína VP30 de Ebola. Se muestran sus regiones con diferentes colores. En anaranjado, el dominio de oligomerización, en verde el sitio de interacción NP, en amarillo el motivo de unión a zinc y en cian el dominio de unión a ARN (52).

Esto ha llevado a pensar en la similitud funcional debida a la identidad estructural, lo que puede dar como resultado un mecanismo común de regulación transcripcional para M_{2-1} de RSV y VP30 de Ebola, además de haber sido reclasificadas recientemente encontrándose ahora más cercanas las familias *Pneumoviridae* y *Filoviridae* en el árbol filogenético debido a su similitud funcional y estructural (11) (Figura 1).

La fosfoproteína P

La proteína P de 241 aminoácidos juega un rol esencial para la transcripción y replicación de RSV, ya que media las interacciones entre los componentes del complejo polimerasa (13). La proteína N encapsida ARN viral formando un complejo N-ARN que, junto con L y P forman el complejo de replicación viral. Se cree que la proteína P es responsable del reclutamiento de la polimerasa en el molde N-ARN mediante interacciones directas con N y L y ayuda a la translocación del RPC a lo largo de la nucleocápside helicoidal, mecanismo común compartido por miembros de las familias *Paramyxoviridae* y *Pneumoviridae* (54–57). Además, P actúa como chaperona de N naciente, que es secuestrada en forma de complejo NP libre de ARN (N_0), lo cual evita la polimerización de la N y la encapsidación no específica de los ARN de la célula huésped (58,59). La fosfoproteína también se une a la proteína M_{2-1} mediante la interacción de la misma con el resto de los componentes de complejo (38,42,44,60). Muchas de las actividades de P descritas anteriormente parecen estar afectadas por la fosforilación/desfosforilación dinámica de diversas serinas y treoninas con diferentes tasas de recambio (61,62).

P existe como un homotetrámero en solución, esto fue propuesto a partir de experimentos de *cross-linking* (63,64) y equilibrio de sedimentación (65), también se observó por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) una elución mayor a la esperada por su peso

molecular, como consecuencia de su forma elongada (60), pero hasta el momento no se ha reportado una estructura cristalográfica ni por RMN, posiblemente debido a su elevada flexibilidad. Las fosfoproteínas de las familias *Paramyxoviridae*, *Pneumoviridae* y *Rhabdoviridae* presentan una organización modular conservada, formadas por un dominio de tetramerización central, que se encuentra flanqueado por dominios predichos intrínsecamente desordenados (63,66) (Figura 11), no obstante, no existe similitud de secuencia entre las proteínas P de las familias *Paramyxoviridae* y *Pneumoviridae*. El dominio de oligomerización, ya sea por estructuras cristalográficas o modelado, comprende principalmente α hélices (58,67).

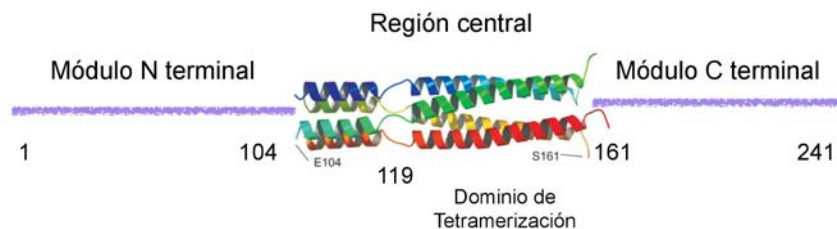


Figura 11. Representación esquemática de la proteína P de RSV. Se indican las 3 regiones principales, la región central y los extremos N y C terminal predichos a partir de experimentos de proteólisis, predictores de desorden y similitud con otros virus de las familias *Paramyxoviridae* y *Pneumoviridae*.

El dominio central de P RSV ha sido mapeado mediante experimentos de proteólisis limitada, identificando un dominio central resistente a tripsina (residuos 104-106), el cual a su vez contiene el dominio de tetramerización (residuos 119-160) (63) (Figura 11). El modelo tridimensional de esta región central fue construido basándose en la estructura atómica disponible del mismo dominio de P del virus Sendai (SeV) (65) y confirmado luego con la estructura cristalográfica del dominio central de P del HMPV (residuos 169–194) como se expresó previamente perteneciente a la misma familia de RSV (68,69); aunque la longitud de la secuencia P HMPV es mayor que la de P RSV por 53 residuos y la identidad de la secuencia global es solo del 28%, la conservación es considerablemente mayor en la región estructurada central de la proteína, lo que sugiere dominios de tetramerización similares. Análisis bioinformáticos realizados sobre la secuencia de P de pneumovirus permitieron definir la región central con una estructura del tipo *coiled-coil* y los módulos terminales: N (residuos 1-103) y C (residuos 161-241), predichos mediante el uso de distintos algoritmos como intrínsecamente desordenados (63) (Figura 11) altamente sensibles a proteólisis in vitro.

Interacción M₂₋₁:ARN

El análisis del potencial electrostático en M₂₋₁ reveló que su superficie está saturada por residuos cargados positivamente que forman cuatro regiones prominentes en el tetrámero

(Figura 12) (16). La hélice de tetramerización está unida al dominio *core* por una región flexible (37), donde se encuentran dos residuos de serina fosforilables que afectan la actividad antiterminadora (16). Los residuos implicados en la unión al ARN han sido identificados previamente mediante mutagénesis y ensayos de unión de ARN, se mostró que los residuos cargados positivamente dentro de la superficie del *core* (K92, K150, R151 y K159) y los residuos de arginina N-terminal (R3 y R4) participan en la unión del ARN.

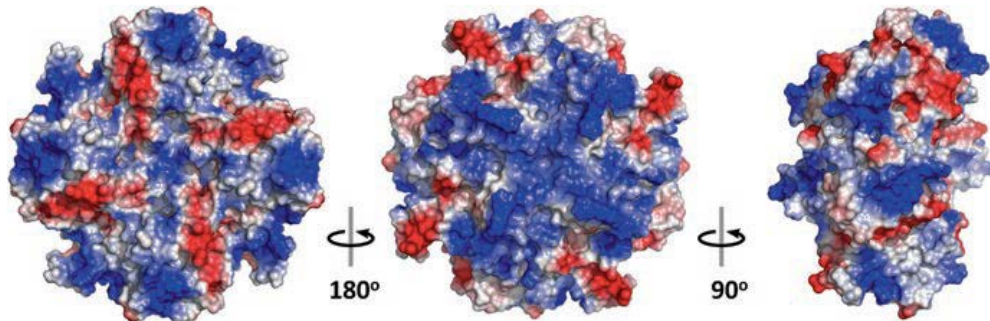


Figura 12. Representación superficial del potencial electrostático. Se observan 3 perspectivas del potencial electrostático en la superficie de M_{2-1} de RSV revelando superficies cargadas positivamente (16).

Con el fin de caracterizar ligandos potenciales de ARN, y así proporcionar información adicional con respecto al mecanismo de la función de M_{2-1} , se realizaron estudios cuantitativos de unión a ARN usando anisotropía de fluorescencia con diferentes secuencias de ARN. Estos incluyeron polirribonucleótidos de A, C, G y U, como así también ARN que representan diversas secuencias GE de RSV de polaridad positiva y negativa. La mayor afinidad de unión se determinó para el polirribonucleótido poli (A) ($K_D = 19.1$ nM), y la comparación de las especificidades de unión de las secuencias GE indicaron que las secuencias de polaridad positiva exhibían afinidades consistentemente más altas que las negativas (16). Se ha demostrado que la proteína M_{2-1} es capaz de unirse a secuencias de ARN líder de RSV (43) y a diferentes secuencias GS y GE con afinidades variables, pero no se ha identificado una clara especificidad de secuencia nucleotídica .

Interacción M_{2-1} :P

Como se expresó previamente, durante la infección viral M_{2-1} se localiza en cuerpos de inclusión citoplasmáticos junto a las proteínas P, N y L, donde ocurren la transcripción viral y la replicación (70,71). Una unión específica M_{2-1} : P es necesaria para la transcripción dependiente de M_{2-1} , la cual no depende del estado de fosforilación de los miembros del complejo (42).

Nuestro laboratorio ha descrito previamente esta interacción como una interacción de alta afinidad entre los tetrámeros P y M_{2-1} , con una estequiometría de unión 1:1 (60); se cree que la unión a P puede determinar la incorporación de M_{2-1} en el RPC. Previamente han sido propuestos los residuos requeridos para esta interacción en M_{2-1} (residuos 53 a 177) donde pueden unirse el ARN y P de manera competitiva (41), esto tiene sentido ya que ambas moléculas (P y ARN) se encuentran cargadas negativamente y pueden estar compitiendo por el mismo sitio donde se puede observar la presencia de grupos de aminoácidos cargados positivamente (16). Estos sitios parecen estar solapados, P necesita de las α -hélices 6, 5 y 4 de M_{2-1} , mientras que el ARN requiere las α -hélices 6, 5 y 2 para unirse al antiterminador (37).

Un trabajo reciente demostró cuales eran los residuos más importantes para la interacción M_{2-1} :P en la proteína P, observaron que la región que abarca los residuos 93 a 110 son esenciales para la unión (44), también demostraron que P recluta a M_{2-1} a los cuerpos de inclusión citoplasmáticos donde ocurre la síntesis de ARN y que a su vez el ARN naciente y M_{2-1} se ubican en IBAGs en los cuerpos de inclusión como se mostró previamente, donde los demás componentes del RPC están ausentes.

Determinación de la estructura de proteínas por cristalografía de rayos x

La cristalografía de rayos X de alta resolución es una técnica para explorar estructuras macromoleculares y representa aproximadamente el 90% de todas las estructuras depositadas en el *Protein Data Bank* (PDB). De este modo podemos conocer como es la estructura átomo por átomo de una proteína y estudiar cómo interactúan entre sí o con otras moléculas y sus cambios conformacionales. Para esto se requiere aplicar el fenómeno físico de difracción, el cual ocurre únicamente si la separación entre los objetos difractantes es del mismo orden que la longitud de onda de la radiación electromagnética utilizada. Como el objetivo es determinar las posiciones atómicas (1-2 Å), se debe trabajar con radiación electromagnética de esa longitud de onda, la cual corresponde a los llamados rayos X del espectro electromagnético. Al difractar una única molécula no se puede obtener una buena señal, entonces para ello se utiliza una matriz tridimensional de moléculas ordenadas llamada cristal, el cual nos permite magnificar esta señal.

El proceso de determinación de la estructura de una molécula por cristalografía de rayos x requiere una serie de pasos hasta llegar a la estructura final (Figura 13).



Figura 13. Diagrama del proceso de determinación de la estructura de una proteína por cristalografía de rayos x.

Purificación de la proteína a cristalizar

El objetivo principal de este paso es obtener la proteína con el mayor grado de pureza posible, en general igual o mayor a un 95% de pureza. Para ello se siguen los pasos de purificación y una vez finalizada, la muestra necesita ser evaluada para determinar su aptitud. Los criterios que se evalúan son la pureza, homogeneidad, estabilidad, solubilidad, correcto plegamiento, que se trate de una muestra monodispersa, sin agregados, y que mantenga su actividad. Si la muestra falla en uno o más de los criterios, será necesario volver a revisar los protocolos de expresión y purificación. Antes de comenzar los ensayos, la muestra necesita ser concentrada hasta unos 10 mg/ml aproximadamente y transferida a una solución con la menor fuerza iónica y capacidad buffer posible que mantenga su estabilidad.

Cristalización

Una vez que se obtiene la proteína con alta pureza, comienza el experimento de cristalografía de rayos X con la cristalización. La obtención de cristales bien ordenados y de alta calidad es el cuello de botella de la cristalografía de rayos X para obtener una estructura. Para crecer los cristales, una solución de proteína y precipitante debe ser llevada hasta sobresaturación, más allá de la concentración donde la proteína es soluble (línea de solubilidad), pero sin llegar al punto de precipitación (agregación). La concentración de precipitante cambia la posición de la línea de solubilidad a una concentración de proteína dada, se puede observar la relación entre la concentración de proteína y precipitante (Figura 14), la cual varía según la proteína estudiada.

Cuando ocurre la nucleación espontánea (agregación ordenada) se reduce la concentración de la proteína y se mueve la fase a la zona metaestable, donde puede producirse un crecimiento cristalino sostenido. Los cristales continuarán creciendo en la zona metaestable hasta que la proteína se agote.

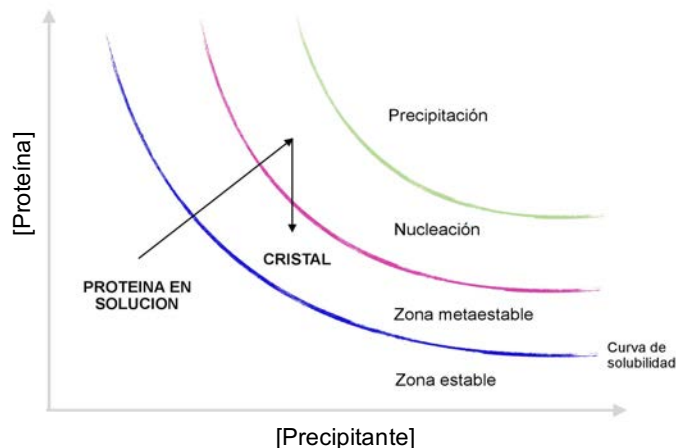


Figura 14. Diagrama de solubilidad de una proteína en función de la concentración de precipitante. Se indican con las flechas negras los cambios observados en un experimento de cristalización de una proteína.

El método más común para el crecimiento de cristales es la difusión de vapor: la evaporación del agua de una gota que contiene proteína y solución precipitante cuando se acerca al equilibrio con el reservorio que contiene también solución precipitante (igualación de potenciales químicos del agua en la gota y el reservorio), concentra proteínas hasta el punto de nucleación y de este modo se produce el crecimiento de cristales. Las soluciones de cristalización contienen típicamente combinaciones de precipitantes (polialcoholes orgánicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG)), sales, aditivos (detergentes, iones metálicos, agentes reductores) y buffers. Las gotas de cristalización pueden estar en plataformas sobre un reservorio (gota sentada) o suspendidas debajo de un cubreobjetos sobre un reservorio (gota colgante) y selladas. Los cristales pueden tardar horas, semanas o meses en crecer, pero en promedio demoran entre 3 y 7 días. La manipulación de estos cristales es con pequeños bucles, en los que el cristal se suspende en sus aguas madres. Para reducir el daño por radiación inducida por los rayos X, los cristales se enfrían en nitrógeno líquido. Esto puede hacerse directamente o en presencia de un crioprotector (DMSO, PEG), el cual evita que se formen cristales de hielo, lo que puede provocar una difracción anómala.

Los cristales de proteínas están hechos de unidades repetitivas idénticas, organizadas periódicamente, que crean una red tridimensional de interacción débil entre moléculas de proteínas y solventes. La unidad mínima de volumen que puede describir la red cristalina se denomina celda unitaria la cual se divide además en unidades asimétricas. En términos de un cristal de proteína, la unidad asimétrica contiene el objeto más pequeño que puede repetirse para formar todo el cristal y la celda unidad describe como se relacionan simétricamente múltiples unidades asimétricas para que formen un bloque que pueda describir el cristal

completo. La relación entre las unidades asimétricas y la celda unitaria está determinada por el grupo espacial del cristal, este define todas las operaciones de simetría necesarias para describir el cristal en términos de la unidad asimétrica. Conocer el grupo espacial correcto para un cristal es esencial para indexar correctamente los datos de difracción.

Difracción del cristal

Una vez que tenemos la proteína cristalizada hay que incidirla con rayos X. Estos se pueden generar de diferentes maneras, una de ellas es a partir de un sincrotrón que produce una radiación electromagnética generada por partículas cargadas (electrones) que se mueven según una trayectoria curva a alta velocidad en un campo magnético. Para la colección criogénica de datos, una corriente de nitrógeno gaseoso mantiene el cristal a 100 K durante todo el experimento, luego, los rayos X se disparan al cristal de la proteína, algunos atraviesan el mismo y el resto se disemina en diferentes direcciones. Esta dispersión de rayos X también se conoce como "difracción de rayos X". Tal dispersión se produce por la interacción de los campos eléctricos y magnéticos de la radiación con los electrones en los átomos del cristal, produciendo el patrón de difracción, lo cual se registra en el detector. Lo ideal sería que el cristal difracte al menos a 3 Å de resolución.

Resolución de la estructura

El propósito de los experimentos cristalográficos no es obtener el patrón de difracción, sino el valor de la función de distribución electrónica $\rho(x, y, z)$, lo que permite determinar la posición de los átomos y la estructura tridimensional de la molécula cristalina.

No existe una relación formal entre las fases y las amplitudes registradas en el experimento de difracción de rayos X, excepto a través de la estructura molecular, que se desconoce. Esto se conoce como el "Problema de las Fases". Si ya existen las coordenadas de una proteína similar se puede tratar de resolver la estructura mediante Reemplazo Molecular (el cual fue el utilizado en esta Tesis). Éste consiste en tomar un modelo conocido homólogo a la estructura problema, girarlo y trasladarlo al nuevo sistema cristalino hasta lograr una buena coincidencia con los datos experimentales. En caso de tener éxito, se podrán extraer las amplitudes y fases de esta solución previa y luego combinarlas con los datos nuevos para producir un mapa de densidad electrónica. Esto se logra utilizando una síntesis de Fourier. El problema de las fases también se puede resolver mediante Reemplazo isomorfo y Dispersión anómala.

Refinamiento de los datos

Una vez que se tiene un modelo preliminar puede refinarse contra los datos experimentales. De este modo se mejoran las fases lo cual se traduce en mapas más claros y por lo tanto en mejores modelos. Se usan dos técnicas matemáticas para ajustar los parámetros del modelo durante el refinamiento: los *mínimos cuadrados* y la *máxima verosimilitud*. Durante el refinamiento, se modifica reiterativamente el modelo hasta obtener convergencia en los datos estadísticos del refinamiento, siendo el más utilizado el factor R. Esta es una medida de similitud entre el modelo planteado y los datos experimentales, a menor R mejor es el modelo. El modelo final se deposita en el PDB como un archivo “PDB” para facilitar el acceso al mismo.

OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS

La falta de información bioquímica, biofísica y estructural es una barrera importante para la comprensión de cómo funciona y como se ensambla el complejo polimerasa del Virus Respiratorio Sincicial humano. La naturaleza esencial de la proteína M_{2-1} para el ciclo de vida del virus justifica la investigación continua de su función, una de ellas es la unión a ARN, pero se desconoce si esta es una interacción específica, si es así, en qué secuencia o estructura secundaria se basa esta especificidad y cuál es el propósito de esta interacción.

También se sabe que la fosfoproteína P además de ser cofactor de la polimerasa viral, actúa como andamio en el ensamblado del complejo polimerasa, por lo tanto, M_{2-1} necesita interactuar con P para cumplir su función durante la transcripción viral. Es esencial realizar una caracterización biofísica y estructural de cada una de las proteínas que forman parte del complejo polimerasa de RSV, conocer la relación estructura-función, caracterizar las interacciones que se dan a nivel proteína-proteína y proteína-ARN dentro del complejo, lo cual constituye uno de los puntos de partida para el desarrollo de antivirales y vacunas.

Por lo tanto, en este proyecto de tesis nos propusimos estudiar la capacidad de unión de la proteína M_{2-1} de RSV a ARN y a la proteína P combinando diferentes técnicas biofísicas, los cuales nos permitirán ampliar los conocimientos acerca de la función de M_{2-1} y una comprensión más detallada de las interacciones que se dan a nivel del complejo polimerasa.

MATERIALES Y METODOS

EXPRESION Y PURIFICACION DE PROTEINAS

M₂₋₁ de longitud completa

Para la expresión y purificación de M₂₋₁ se utilizó un protocolo puesto a punto en nuestro laboratorio previamente por el Dr. Esperante (39). Brevemente, la proteína M₂₋₁ de la cepa A de RSV se expresó en células C41 (DE3) transformadas con el plásmido pRSET-A M₂₋₁ y crecidas en medio de caldo *Terrific Broth*. La inducción se realizó con 0.3 mM de IPTG a una DO_{600nm} de 0.6. La proteína soluble se precipitó con 40% de sulfato de amonio y se sometió a una columna de afinidad catiónica Heparin Ceramic HyperD y a una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en una columna de filtración en gel Superdex 200 (GE Healthcare).

M₂₋₁ core

M₂₋₁ de longitud completa se sometió a proteólisis limitada con la enzima quimotripsina de páncreas bovino (Sigma-Aldrich) en buffer 50 mM Tris.HCl (pH 8), 2 mM CaCl₂ durante 90 minutos a 28 °C en una relación 1:60 (proteína:quimotripsina p/p); la reacción se detuvo mediante la adición de 1 mM de PMSF para obtener un producto de digestión identificado por MALDI-TOF MS (Bruker, Daltonics, Billerica, MA) cuya secuencia corresponde a un fragmento de M₂₋₁ desde Ala73 a Tyr194 (122 aminoácidos). La filtración molecular del producto de digestión se realizó en una columna SEC (Superdex 75) en buffer 20 mM Tris.HCl (pH 7,0), NaCl 200 mM.

La pureza de M₂₋₁ core se evaluó mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas MALDI-TOF. El análisis de MALDI y RP-HPLC revelaron una muestra homogénea correspondiente al fragmento 72-194 de M₂₋₁ de longitud completa. La muestra se concentró en Amicon (Milipore) hasta una concentración aproximada de 100 µM. El dicroísmo circular (CD) y SEC confirmaron la estructura secundaria y el estado monomérico del dominio M₂₋₁ core respectivamente.

P y fragmentos de P

Para la expresión y purificación de P y sus fragmentos se utilizaron los protocolos puestos a punto en nuestro laboratorio previamente por el Dr. Esperante y la Dra. Noval (72,73).

CONTROL DE CALIDAD Y CUANTIFICACION DE LAS PROTEINAS UTILIZADAS

La pureza de las distintas proteínas y fragmentos fueron determinadas por SDS-PAGE y por SEC. Para todos los experimentos se trabajó con muestras con pureza superior al 95%. Los pesos moleculares de las distintas proteínas fueron verificados por MALDI-TOF. El correcto

plegamiento y el estado de oligomerización de cada una de las especies estudiadas fueron evaluados por CD en UV lejano y mediante corridas de filtración molecular.

La filtración SEC se realizó en un analizador Superdex S200 o S75 analítica que se calibraron con diferentes proteínas globulares estándar y el volumen muerto (V_0) y el volumen total (V_t) se determinaron corriendo dextrano azul y acetona, respectivamente.

Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de la concentración de las proteínas M_{2-1} , M_{2-1} core y P se realizó por absorptividad de residuos aromáticos a 280 nm y por el método de Bradford. Para los fragmentos de P estas técnicas no resultaron confiables debido a que no presentan Trp, poseen un contenido variable de Tyr (0-4) y muestran distinto contenido de desorden. La técnica más confiable para determinar su concentración fue medir la absorptividad del enlace peptídico a 220 nm.

- Absorbancia de residuos aromáticos a 280 nm: Se determinó la concentración de proteína espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de absorción molar de los aminoácidos tirosina y triptófano calculados según(74):

$$A_{280} (M^{-1} \text{ cm}^{-1}) = 5,5 \#W + 1,49 \#Y [1]$$

donde #W y #Y son el número de residuos de Trp y Tyr, respectivamente.

Coefficientes de extinción molar (ϵ_{280}): $13200 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (M_{2-1}), $4470 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (M_{2-1} core) y $5960 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (P).

- Método de Bradford: Se determinó la concentración de proteína utilizando una curva patrón de seroalbúmina bovina (BSA) (Invitrogen®) en el rango 0-10 $\mu\text{g/ml}$. Se midió la absorbancia a 595 nm de las muestras patrón (800 μL) luego del agregado del reactivo de Bradford (200 μL) (Biorad®). La curva de calibración se realizó por duplicado y las absorbancias de las muestras incógnitas por triplicado, las cuales fueron utilizados para estimar la concentración de proteína interpolando en la curva patrón.

- Absorbancia del enlace peptídico a 220 nm: originariamente la técnica consiste en realizar curvas de calibración de absorción a 220 nm en función del número de enlaces peptídicos utilizando la proteína E7 como patrón en condiciones de pH ácido (puesta a punto previamente en el laboratorio). Debido a que algunos fragmentos de P agregan a pH ácido, la técnica fue adaptada a pH neutro. Se midió la absorbancia de las muestras incógnita por triplicado en

solución acuosa a pH neutro e incubadas durante 15 minutos. La concentración fue estimada por interpolación en la curva patrón.

OLIGONUCLEOTIDOS SINTETICOS MARCADOS Y SIN MARCAR

Las secuencias de los oligonucleótidos simple cadena utilizados en la presente tesis consisten por un lado en una secuencia modelo que posee repeticiones del pentámero AGUUG que corresponde a una secuencia del virus dengue no relacionada con RSV; por otro lado, seleccionamos una secuencia de ARN relacionada con el RSV que corresponde a la región final de gen del gen SH (polaridad positiva). Para ambos casos se utilizaron diferentes longitudes de los mismos.

Los ARN sin marcar fueron químicamente sintetizados y purificados por Integrated DNA Technologies (IDT). Los ARN marcados con 6-carboxifluoresceína (6-FAM) en su extremo 5' desalados y purificados por RP-HPLC. Tanto los ARN marcados como sin marcar se cuantificaron espectrofotométricamente utilizando los correspondientes coeficientes de extinción molar (ϵ_{260}) para proporcionar una medida precisa de la concentración. Las secuencias de ARN fueron las siguientes (los ARN sin marcar carecen del 5' 6-FAM):

10-mer: 5'- /6-FAM/AGUUGAGUUG-3'

15-mer: 5'- /6-FAM/AGUUGAGUUGAGUUG-3'

20-mer: 5'- /6-FAM/AGUUGAGUUGAGUUGAGUUG-3'

RSV 13-mer: 5'- /6-FAM/AGUAAUUUAAAA-3'

RSV 20-mer: 5'- /6-FAM/AUAAAGUAGUAAUUUAAAA-3'

MARCACION DE P Y LOS FRAGMENTOS P_{N_{TET}}, P_{TETC} Y P_N CON ISOTIOCIANATO DE FLUORESCINA (FITC)

FITC es una molécula de fluoresceína derivatizada con un grupo isotiocianato (-N=C=S). Este derivado es reactivo frente a nucleófilos del tipo amina (-NH₂) y sulfidrilo (-SH) y presenta mayor afinidad por los grupos (-NH₂) del extremo amino terminal de las proteínas, frente a los (-NH₂) presentes en los aminoácidos básicos Lys y Arg. Sin embargo, la marcación con FITC del extremo amino de proteínas con muchos residuos básicos puede resultar muy compleja. En particular, la proteína P y sus distintos fragmentos presentan un elevado contenido de residuos básicos, haciendo muy desafiante la marcación única. Se realizó un análisis de las condiciones que permitiesen obtener proteínas-FITC marcadas únicamente en el extremo N-terminal. En

primer lugar, se decidió trabajar en buffer 100 mM carbonato de sodio (pH 7.0) para favorecer la marcación hacia el N-terminal ($pK_a \sim 8.0$), ya que los pK_a 's teóricos de Arg y Lys son 12.5 y 10.8, respectivamente. Se realizaron pruebas analíticas de marcación seguidas en geles SDS-PAGE 15 % para P_N y SDS-PAGE 12.5 % para P y el resto de los fragmentos, siguiendo la absorbancia y la fluorescencia del FITC en las distintas condiciones ensayadas. La masa de proteínas que permitió seguir la marcación tanto en geles teñidos con azul de coomassie, como por detección de la fluorescencia del FITC fue 3.5 μg para P entera y 5 μg para los fragmentos. Se realizaron incubaciones a tiempos largos 12 horas. Luego se ensayaron distintas relaciones molares FITC/proteína, y se evaluó la mejor condición en gel. La hipermarcación con FITC genera un retardo en la banda de la proteína, por lo tanto, se eligieron aquellas condiciones que dieron marca, pero que no generaban retardo de la banda.

Todas las muestras fueron marcadas en una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína, en 100 mM buffer carbonato de sodio pH 7.0, durante toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad. Las relaciones molares que se usaron para cada marcación fueron $P_{NTET}:\text{FITC}$ (2:1), $P_{TETC}:\text{FITC}$ (4:1), $P_N:\text{FITC}$ (3:1) y $P:\text{FITC}$ (8:1). Las reacciones se detuvieron agregando a la solución 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) y las muestras con FITC fueron pasadas por columnas de desalado PD-10 (GE-Healthcare®) para eliminar todo el FITC libre. Las muestras fueron cuantificadas por absorbancia utilizando el coeficiente de extinción molar del FITC ($75.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y por estimación de la elipticidad molar obtenida por CD.

Nota: previo a proceder a la marcación con FITC, las proteínas fueron dializadas contra buffer 20 mM fosfato de sodio (pH 7.5), 50 mM NaCl, durante una noche para eliminar todo el posible remanente de buffer Tris-HCl que pudiera quedar en la solución.

GELES SDS PAGE, REACTIVOS Y DROGAS

Todos los SDS-PAGE fueron realizados según el método de Laemmli. Previo a la siembra de las muestras en el gel, éstas fueron tratadas con buffer 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 0,02% Azul de Bromofenol, 25% v/v glicerol, 0.2 M DTT. Las proteínas fueron detectadas al teñir los geles con una solución *Coomassie Blue*.

Los buffers utilizados para la purificación de proteínas y ensayos biofísicos (espectroscopía de fluorescencia, de absorbancia y dicroísmo circular, ITC) fueron preparados en el laboratorio el mismo día del experimento y filtrados con filtros de 0.22-0.45 μM . Se utilizaron drogas de alta pureza provenientes de Invitrogen®, Bio-Rad®, USB®, Amresco® y Sigma Aldrich®.

ENSAYO DE CAMBIO EN LA CORRIDA ELECTROFORETICA (EMSA)

Gel de poliacrilamida

Se prepararon geles nativos con poliacrilamida al 4% (29:1, acrilamida/bis-acrilamida), 5% de glicerol, 0,5X buffer Tris-glicina (pH 9). Se realizó una pre-corrída del gel antes de cargar las muestras durante 30 minutos a 60 voltios. La reacción de unión se preparó en 0.02 M hepes (pH 7.4), 0.08 M NaCl, 5% de glicerol y ARN marcado con 6-FAM a la concentración final deseada, la mezcla se dividió en 10 tubos y se agregaron concentraciones crecientes de la proteína M_{2-1} dejando un tubo con ARN solo. Las muestras se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de complejo. La corrida electroforética se realizó a 40 voltios durante 20 minutos para permitir la entrada de las muestras al gel, seguido de 60 voltios durante 1 hora. Todos los experimentos se realizaron en el buffer de corrida 1X Tris-Glicina a 20 °C. La fluorescencia del ARN se detectó en un Storm Imager 840 (Molecular Dynamics Storm® 840). Los experimentos se realizaron a concentraciones de ARN total que variaron entre 200 nM y 4 μ M. En los casos en que la concentración de ARN era superior a 200 nM, se utilizó una concentración de ARN de 6-FAM 200 nM y se añadió ARN no marcado hasta la concentración final de ARN deseada. 200 nM fue la concentración de sonda (ARN 6-FAM) más baja que produjo una señal detectable en el equipo Storm antes mencionado.

Gel de agarosa

Para la unión de M_{2-1} con P y sus fragmentos (marcados con FITC) y los experimentos de disociación se realizaron geles nativos de agarosa al 0.8%, preparados con 400 mgr de agarosa disuelta en buffer TBE 0.5X (Tris-borato-EDTA), el cual también se utilizó como buffer de corrida. La reacción de unión se preparó en buffer 0.02 M fosfato (pH 7.4), 0.2 M NaCl, 0.01 M de DTT, 10% de glicerol y agua mq con 3 μ M de la sonda (FITC-P o FITC- P_{NTET}). La mezcla se dividió en 8 tubos y se agregaron concentraciones crecientes de M_{2-1} (0.5-12 μ M), las mismas se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de complejo. El tubo número 9 se utilizó para observar a M_{2-1} sola en el buffer de unión y el numero 10 para colocar un control de corrida coloreado (*loading buffer*). La corrida electroforética se realizó a 90 voltios hasta que el *loading buffer* llegó al final del gel. La fluorescencia del FITC se detectó en un fotodocumentador de geles con transiluminador UV.

Análisis densitométrico de EMSA

La imagen digital del gel EMSA se utilizó para cuantificar la fracción de ARN 6-FAM o FITC libre, utilizando la herramienta ImageJ 1.48V. A diferencia de los experimentos de EMSA que usan oligonucleótidos marcados radiactivamente, el uso de estas sondas impidió una

estimación precisa de la fracción de especies unidas frente a la libre mediante densitometría, debido al fuerte *quenching* de la fluorescencia de la sonda tras la unión. Por lo tanto, estimamos el porcentaje de especies de sonda libre. Se determinaron los límites de la primera banda de sonda libre (primer tubo que no contiene proteína fría) y se utilizaron como guía para seleccionar el resto de las bandas. El programa genera un valor que corresponde a la intensidad de la señal dentro del área seleccionada. Los valores obtenidos al aumentar las concentraciones de proteína sin marcar se normalizaron al valor de intensidad de la primera banda (que corresponde al 100% de la sonda libre) y se expresaron como el porcentaje de sonda no unida la cual se graficó en función de la relación molar de M₂₋₁:ARN o M₂₋₁:P para determinar la estequiometría de unión o en función de la concentración de M₂₋₁ para estimar la constante de disociación (K_D).

ESTEQUIOMETRIA DE UNION

La estequiometría de unión se determinó a partir de las titulaciones realizadas en condiciones estequiométricas, mediante la extrapolación de dos ajustes lineales de los valores inicial y final evaluados.

EXPERIMENTOS DE DICROISMO CIRCULAR

Las mediciones en el UV lejano y cercano se llevaron a cabo en un espectropolarímetro Jasco J810 usando un controlador de temperatura externo Peltier. Los espectros se registraron entre 200-260 nm (CD UV-lejano) y 260-350 (CD UV-cercano) con una sensibilidad estándar, una velocidad de 100 nm/min, un tiempo de respuesta de 2 segundos y un ancho de banda de 4 nm. Todos los espectros fueron un promedio de al menos seis escaneos. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 0.1 y 0.2 cm de paso óptico.

De ser necesario los datos crudos fueron convertidos a elepticidad molar media por residuo (MRW) según la siguiente ecuación:

$$[\theta]_{\text{MWR}} = \frac{\text{deg}}{(\# \text{bounds} \cdot [c] \cdot 10000 \cdot L)} \quad [1]$$

Donde deg es la señal medida (grados), L es el paso óptico de la cubeta (cm), [c] es la concentración de proteínas y # se corresponde con el número de enlaces peptídicos de la proteína (número de residuos -1).

Estudios de interacción

M₂₋₁ y *ARN*. Utilizamos 5 µM de muestra (proteína, ARN o complejos proteína:ARN). Todos los experimentos se realizaron en buffer 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M NaCl, 1 mM DTT a 5, 20 u 80 °C. Los experimentos cinéticos se realizaron siguiendo la señal de la elipticidad a 270 nm después de añadir 10 µM de *M₂₋₁* manualmente (tiempo muerto 5 segundos) en una cubeta que contenía 10 µM de ARN 20 nt hasta alcanzar la saturación.

M₂₋₁ y *P*. Utilizamos 7 µM de muestra (*M₂₋₁*, *P* o fragmentos o complejos *M₂₋₁:P*). Todos los experimentos se realizaron en buffer 20 mM fosfato de sodio (pH 7.4), 0.3 M NaCl a 20 °C.

Desnaturalización térmica

Para las determinaciones de estabilidad térmica, se aplicó una rampa de temperatura de 5 a 80 °C y de 80 a 5 °C, a una velocidad de barrido de 5 °C/min. Se registró el cambio de señal a una longitud de onda fija.

MEDIDAS DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Los espectros de emisión de fluorescencia y la anisotropía de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro Jasco FP-6500 usando una longitud de onda de excitación de 495 nm. El espectro de emisión se registró de 505 a 600 nm. Para las mediciones de anisotropía de fluorescencia, los componentes de emisión paralelos y perpendiculares se midieron en formato L por excitación a 495 nm y emisión a 520 nm. La anisotropía se midió cinco veces usando factores G individuales y un tiempo de medición de 3 s. Para ambas señales, los anchos de banda de excitación y emisión se ajustaron a 3 o 5 nm dependiendo de la concentración de la sonda (6-FAM o FITC) utilizado. La anisotropía (*r*) se calculó según (75):

$$r = \frac{(I_{vv} - G^* I_{vh})}{I_{vv} + 2G^* I_{vh}} \quad [2]$$

donde *I* es la intensidad de fluorescencia, *v* y *h* se refieren a vertical y horizontal, el primero de excitación y luego de emisión, y el factor de corrección *G* está definido como:

$$G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}} \quad [3]$$

Medidas de titulación de equilibrio

Se añadieron cantidades crecientes de proteína (M_{2-1} o M_{2-1} core) a una cubeta que contenía una cantidad fija de la sonda (6-FAM-ARN 10, 15 o 20mer o P y sus fragmentos marcados con FITC) y se incubaron durante 5 min a 20 °C para asegurar medidas de estado estacionario. El volumen agregado alcanzó menos del 10% del volumen total en cada ensayo, por lo tanto, se puede suponer que la concentración de la sonda se ha mantenido constante a lo largo de la titulación.

Medidas cinéticas

Las cinéticas de asociación se midieron mediante mezclado manual usando un espectrofluorímetro Jasco FP-6500. Los cambios en la anisotropía de fluorescencia y la emisión de fluorescencia a 520 nm se midieron después de la adición de M_{2-1} a una cubeta que contiene una concentración fija de la sonda.

Experimentos de competición

En primera instancia se formó un complejo estequiométrico tras la adición de M_{2-1} a una cubeta que contiene una concentración fija de la sonda (ARN o P). Una vez estabilizada la señal se procedió en segundo lugar, al agregado de un exceso molar de una molécula competidora sin marcar (ARN o P). La formación y la ruptura del complejo fue seguida por la señal de fluorescencia o de anisotropía de la especie fluoresceinada.

PLEGADO Y ESTABILIDAD

Los experimentos de desnaturalización química al equilibrio se realizaron incubando 5 μ M de proteína con concentraciones crecientes de cloruro de guanidinio (Gdm.Cl) en buffer 20 Mm Tris-HCl (pH 7), 0.2 M NaCl. Las muestras se incubaron durante 16 horas a 20 °C antes de las mediciones. Los espectros de CD se registraron en un espectropolarímetro Jasco 815. Los datos de CD se ajustaron a un modelo de dos estados (Nativo-Desplegado) y los parámetros termodinámicos se determinaron a partir del ajuste no lineal, utilizando la siguiente ecuación (76):

$$y = \frac{\left[S_n + S_u \exp \left(\frac{-\Delta G^{H2O} + mx}{RT} \right) \right]}{1 + \exp \left(\frac{-\Delta G^{H2O} + mx}{RT} \right)} \quad [4]$$

Donde y es la señal espectroscópica, S_n y S_u representan las señales espectroscópicas de proteína plegada y desplegada respectivamente. ΔG y m representan el cambio de energía libre entre el estado plegado y desplegado, y la pendiente de esa transición. x es la concentración de desnaturante, T es la temperatura en Kelvin y R es la constante universal de los gases $1.987 \text{ cal}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$. La espectroscopia de fluorescencia se llevó a cabo excitando a 275 nm y se detectó la emisión a 310 nm, correspondiente a la fluorescencia de la tirosina, la misma se graficó en función de la concentración de desnaturante. Todas las mediciones fueron realizadas a 20 °C.

ESTUDIOS CINÉTICOS DE ASOCIACION MEDIDOS POR STOPPED FLOW

Stopped flow es un dispositivo de mezcla rápida utilizado para estudiar la cinética química de las reacciones rápidas en solución. Las soluciones se fuerzan primero desde jeringas a una cámara de mezcla. Después de unos pocos milisegundos, la celda de observación se llena con un pistón conectado a un interruptor de detección que activa el dispositivo de medición y el flujo se detiene repentinamente. El tiempo muerto habitual es de 1-2 milisegundos.

La cinética de interacción entre M_{2-1} y ARN se midió utilizando un aparato de *stopped-flow* Applied Photophysics SX18.MV (Leatherhead, Reino Unido).

Todas las concentraciones reportadas corresponden a aquellas resultantes de mezcla de volúmenes iguales de ambas jeringas. Las reacciones fueron monitoreadas siguiendo la fluorescencia de 6-FAM, excitando a 495 nm. Cada medición reportada corresponde al promedio de entre cinco y diez colecciones de 1000 puntos cada una. En todos los casos la temperatura se mantuvo constante a 25 °C utilizando un baño térmico.

Todas las curvas fueron procesadas y ajustadas con el programa Origin 8.0 (OriginLab Corporation).

ENSAYOS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR (SEC)

Los experimentos de interacción entre M_{2-1} y los fragmentos de P por SEC fueron realizados en una columna Superdex S200 HR 10/300 (24 ml) (GE Helthcare), equilibrada en buffer 20 mM fosfato (pH 7.4), 0.2 M NaCl. Las muestras fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. La corrida fue realizada en un equipo de FPLC monitoreando la longitud de onda a 220 nm. Se evaluaron los perfiles cromatográficos de M_{2-1} y los fragmentos de P en concentraciones de 5 μM y 4 μM respectivamente y la mezcla 1:1 de M_{2-1} con los distintos

fragmentos para evaluar si había unión.

Para la titulación del fragmento P_{NTET} con M_{2-1} se utilizó una concentración fija de M_{2-1} (5 μM) aumentando la concentración de P_{NTET} en cada ejecución de la siguiente manera: 0, 1, 2, 3 y 4 μM de P_{NTET} . La formación del complejo fue evidenciada mediante la disminución de la absorbancia a 220 nm del pico M_{2-1} libre.

Los estándares de peso molecular utilizados para la calibración de la columna corresponden a las proteínas globulares: Tiroglobulina (660 kDa), Ferritina (440 kDa), Catalasa (232 kDa), BSA (67 kDa), MBP (45 kDa), Ribonucleasa A (13.4 kDa). El volumen muerto (V_0) y el volumen total (V_T) fueron determinados inyectando el polímero Azul Dextrano y acetona respectivamente. Todas las muestras fueron centrifugadas a 13.000 rpm antes de ser introducidas en las columnas. Todas las corridas fueron realizadas a temperatura ambiente. A partir de los volúmenes de elución (V_e) de cada especie, se calculó el coeficiente de partición de las muestras en la columna como $K_{av}=(V_e-V_0) / (V_T-V_0)$.

CALORIMETRIA

Los experimentos de calorimetría fueron realizados en un calorímetro VP-ITC, Microcal Inc. Este instrumento consiste en dos celdas idénticas insertas en un compartimiento isotérmico, las cuales son mantenidas en equilibrio térmico ($\Delta T=0$) a lo largo del experimento. Una de las celdas se llena con buffer (celda de referencia) y la otra con el componente de la unión que se desea titular (celda de muestreo) equilibrada con el mismo buffer de la celda de referencia. Cuando el segundo componente de la unión es adicionado gradualmente a la celda de la muestra se produce un cambio entálpico. El principio del experimento es medir la energía calórica por unidad de tiempo ($\mu\text{cal/segundo}$) que debe ser aplicada a la celda de la muestra para mantener en cero la diferencia de temperatura entre ambas celdas. Realizando el ajuste de los datos obtenidos de la titulación se pueden obtener los valores de la constante de asociación (K_A), la estequiometría de unión (n), la entalpía (ΔH) y la entropía (ΔS).

En nuestros experimentos las muestras de M_{2-1} y P fueron dializadas intensivamente en tripas de diálisis de MCWO de 12 kDa en el buffer 20 mM fosfato (pH 7.4), 0.2 M NaCl, 5 mM β -mercaptoetanol. Luego de la diálisis las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 5 minutos, sometidas a vacío durante 5 minutos (ThermoVac Inc.) y cuantificadas. La celda de referencia del calorímetro fue cargada con buffer y la celda de reacción fue cargada con 1.8 ml de M_{2-1} a una concentración final de 40 μM y el inyector automático con 300 μl de ligando (P) a una concentración final de 400 μM . Las inyecciones de P a la muestra de M_{2-1} en la celda se realizaron en forma automática titulando con 10 μl y manteniendo la rotación de la jeringa en

290 rpm. Los experimentos fueron realizados a 15, 20, 25, 30 y 35 °C.

Los ajustes de los datos obtenidos fueron llevados a cabo mediante el programa AFFINIMETER (<https://www.affinimeter.com>).

CRISTALOGRAFIA

Cristalización y recopilación de datos

Las condiciones iniciales de cristalización de M₂₋₁ core se determinaron utilizando la técnica de difusión de vapor en gota sentada usando un *screening* de cristalización de alto rendimiento. Las condiciones más prometedoras se optimizaron mezclando 1 µL de solución de M₂₋₁ core (11 mg/mL) con 1 µL de solución del reservorio y equilibrando contra la solución del reservorio que consistía en la condición 1 (2.1 M dl-ácido málico (pH 7)) o la condición 2 (2,4 M malonato de sodio (pH 7)) (ambos del *screening* JCSG plus) a 293 K. Los cristales se montaron y se enfriaron rápidamente en nitrógeno líquido con crio-protección (adición de glicerol al 20% a la solución de cristalización). Los datos de difracción se colectaron con un límite de resolución de 1.8-2.0 Å y con un intervalo de 0.1 ° para ambas formas cristalinas. Todos los conjuntos de datos se procesaron con XDS (77) y se unieron con AIMLESS (78).

Determinación de la estructura, refinamiento y análisis

Las estructuras se resolvieron mediante reemplazo molecular con el programa *Phaser* (79) utilizando la entrada de PDB 4c3b (16) como modelo de búsqueda. Las subsiguientes rondas de construcción manual se realizaron con el programa *Coot* (80) y el refinamiento se logró usando *phenix.refine* (81). Los modelos fueron validados usando *MolProbity* (82) y todas las figuras fueron preparadas usando *PyMOL* (83).

DISPERSION DE RAYOS X DE ANGULO PEQUEÑO (SAXS)

SAXS es una técnica que permite determinar las distribuciones de tamaño de las nanopartículas, resolver el tamaño y la forma de las macromoléculas (monodispersas), determinar los tamaños de poro, las distancias características de los materiales parcialmente ordenados y mucho más. Esto se logra mediante el análisis del comportamiento de dispersión elástica de los rayos X cuando viajan a través del material, registrando su dispersión en pequeños ángulos (típicamente 0.1 - 10 °).

Los datos de SAXS fueron recogidos siguiendo los procedimientos estándares. Se realizó una recolección repetitiva de datos de la misma muestra y no se detectó daño por radiación. Se prepararon muestras en solución de M₂₋₁ core (residuos Ala73 - Tyr194) a una concentración

entre 4.5 – 9.0 mg/mL en buffer 20 mM Tris-HCl (pH 7), 0.3 M NaCl. Todos los datos de SAXS se analizaron utilizando el paquete *ATSAS* (84). Los datos crudos fueron procesados con el programa *PRIMUS* (85). El radio de giro (R_g) se evaluó usando la aproximación de Guinier [$I(s) = I(0)\exp(-s^2R_g^2/3)$ para $sR_g < 1.3$] y también de toda la curva de dispersión con *GNOM* (86); este último también proporcionó la función de distribución de distancia $p(r)$ y la dimensión máxima D_{max} . Las masas de los solutos se evaluaron mediante la comparación de la intensidad de dispersión directa con la de una solución de referencia BSA (66 kDa). Los modelos SAXS de baja resolución se obtuvieron utilizando el programa *ab initio simulated-annealing* (SA) *DAMMIF* (87), que genera modelos que consisten en átomos ficticios para ajustarse a los datos experimentales.

ANÁLISIS Y AJUSTES DE DATOS

El procesamiento y el ajuste de los datos fue realizado utilizando el programa Profit (Quantum Soft, Uetikon am See, Switzerland) para obtener los parámetros y sus desviaciones estándar.

Titulaciones de unión al equilibrio

Para los complejos con estequiometría 1:1, la constante de disociación (K_D) del complejo se calculó ajustando la curva de anisotropía de fluorescencia (r) en función de la concentración del ligando a la siguiente ecuación correspondiente a un modelo de asociación 1:1:

$$r = r_{free} + \frac{\Delta r_{int}}{2} \left((x + [Sonda] + K_D) - \left((x + [Sonda] + K_D)^2 - 4[Sonda]x \right)^{0.5} \right) \quad [5]$$

donde x representa la concentración total variable de la proteína (M_{2-1} o M_{2-1} core), $[Sonda]$ es la concentración de la sonda, en nuestro caso ARN 6-FAM o P o sus fragmentos marcados con FITC. Δr_{int} es la diferencia en la anisotropía de fluorescencia intrínseca entre las fracciones libres y los complejos, r_{free} es la anisotropía de fluorescencia de la fracción libre y K_D es la constante de disociación del complejo.

Cinéticas de asociación y disociación

Para el complejo M_{2-1} :ARN la asociación fue detectada por fluorímetro. El cambio en la señal de anisotropía de fluorescencia se ajustó a la siguiente ecuación monoexponencial para obtener la constante de velocidad observada, para cada concentración de M_{2-1} evaluada (10-300 nM):

$$\Delta r = A \cdot e^{k \cdot t} + c \cdot t \quad [6]$$

donde A es la amplitud y k_{obs} es la constante de velocidad observada. La deriva de la señal se tuvo en cuenta por un término lineal dependiente del tiempo (c).

El cambio en la señal de fluorescencia 6-FAM se ajustó a una ecuación doble exponencial, para obtener las dos constantes de velocidad observadas, k_{obs1} y k_{obs2} y sus respectivas amplitudes:

$$\Delta F = A_1 \cdot e^{k_1 \cdot t} + A_2 \cdot e^{k_2 \cdot t} + c \cdot t \quad [7]$$

donde A_1 y A_2 son las amplitudes y k_{obs1} y k_{obs2} son las constantes de velocidad observadas. La deriva de la señal se tuvo en cuenta por un término lineal dependiente del tiempo (c).

Las cinéticas de disociación se midieron desplazando el complejo estequiométrico con un exceso de 20 veces del desplazante sin marcar. De ser posible los datos se ajustaron a una función exponencial doble obteniéndose los valores de las constantes observadas de disociación:

$$F(t) = F_0 + A_1 \cdot e^{k_1 \cdot t} + A_2 \cdot e^{k_2 \cdot t} \quad [8]$$

donde A_1 y A_2 son las amplitudes, F_0 es el valor inicial de fluorescencia o de anisotropía de fluorescencia. k_{obs1} y k_{obs2} son las constantes de disociación de cada fase.

Modelo de ajuste inducido

En los experimentos de cinética de asociación, la dependencia de la constante de velocidad observada con la concentración de M_{2-1} se ajustó a un modelo de ajuste inducido previamente descrito (88):

$$k_{obs} = k_{-1} + k_1 \cdot \left(\frac{[M_{2-1}]}{[M_{2-1}] + K_{D2}} \right) \quad [9]$$

donde k_{obs} es la constante de velocidad de asociación observada para cada concentración de M_{2-1} , k_1 y k_{-1} son las constantes de velocidad directa e inversa para la reacción de rearreglo posterior a la unión, y K_{D2} es la constante de disociación al equilibrio para la reacción de asociación bimolecular.

Experimentos de competición

Para los experimentos de competición, se utilizó una ecuación derivada previamente (89), la cual toma en cuenta la presencia de dos equilibrios entre la unión a M_{2-1} de las especies fluoresceinada (L1) y no fluoresceinada(L2):



Se utilizó un algoritmo recursivo para ajustar los valores de intensidad de fluorescencia o anisotropía en función de la concentración de ligando no fluoresceinado (L2). La fórmula de ajuste utilizada fue:

$$F^{(i+1)} = F_0 + \frac{(F_S - F_0) * [M_{2-1}]_0}{[M_{2-1}]_0 + \frac{[L_1]_0 * (F_S - F_i)}{(F_S - F_0)} + K_{D1} + \frac{[L_2]_0}{\frac{(F_i - F_0)}{(F_S - F_i)} + \frac{K_{D2}}{K_{D1}}} \quad [11]$$

Donde $[M_{2-1}]_0$ y $[L_1]_0$ son las concentraciones de M_{2-1} y de la sonda del complejo inicial, y K_{D1} es conocida y es la constante de disociación del complejo M_{2-1} /sonda. F_s y F_0 son las fluorescencias de la sonda en complejo con M_{2-1} y libre respectivamente y F_i es la fluorescencia medida en un punto i de la curva. Este algoritmo recursivo fue iterado hasta que se cumplió la condición:

$$\frac{(F^{(i+1)} - F^i)}{F^i} \leq 0.001 \quad [12]$$

Por lo tanto, de estos ajustes se pudo conocer el valor de la constante de disociación del complejo M_{2-1} /especie no fluoresceinada, es decir K_{D2} .

Interacciones cooperativas

En primer lugar, evaluamos la cooperatividad mediante la inspección visual de las curvas de titulación, las cuales mostraron un comportamiento sigmoideo. La transformación del eje x en escala logarítmica permitió la evaluación del número de unidades logarítmicas requeridas para la transición de 0.1 a 0.9 fracción de saturación (*characteristic free-ligand span*) (90). Proporciona una caracterización clara de la calidad de la isoterma de unión y de la complejidad subyacente del mecanismo de unión. Si la isoterma presenta 2 unidades log, la unión es no cooperativa, si presenta más de 2 unidades log, hay cooperatividad negativa y si curva muestra menos de 2 unidades log entonces estamos en presencia de cooperatividad positiva.

En segundo lugar, usamos la fórmula de Hill para evaluar la cooperatividad (91):

$$\theta = \frac{[M_{2-1}]^{n_H}}{[M_{2-1}]^{n_H} + [K_D]^{n_H}} \quad [13]$$

Donde θ es el grado de saturación, $[M_{2-1}]$ es la concentración de ligando libre, K_D es la constante de disociación aparente, y n_H es el coeficiente de Hill. A partir de la transformación lineal de la ecuación de Hill, es posible estimar el coeficiente de Hill n_H a partir de la pendiente de la gráfica lineal del $\log \vartheta$ en función de $\log [M_{2-1}]$, y la constante de unión aparente a partir de la ordenada.

$$\log \frac{\theta}{1 - \theta} = n_H \cdot \log[M_{2-1}] - n_H \cdot \log K_D \quad [14]$$

CALCULO DE LA ENERGIA LIBRE DE GIBBS (ΔG)

Para el cálculo del ΔG a partir de los valores obtenidos para las constantes de disociación al equilibrio se utilizó la siguiente ecuación:

$$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln(KD^{-1}) \quad [15]$$

VAN'T HOFF

La ecuación de Van't Hoff relaciona la variación de la K_A con la entalpía (ΔH) de la interacción mediante la siguiente fórmula:

$$\ln (K_A) = (-\Delta H / R) (1 / T) + \Delta S / R \quad [16]$$

Donde R es la constante ideal de los gases ($1.987 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$). Los datos fueron graficados según la forma de Van't Hoff ($\ln (K_A)$ vs $1/T$) y analizados utilizando el programa Profit.

Luego el ΔC_p corresponde al cambio de entalpía de la interacción en función de la temperatura y se calculó según la siguiente ecuación:

$$\Delta C_p = \left[\frac{d\Delta H}{dT} \right] \quad [17]$$

A partir de los valores de ΔH obtenidos por calorimetría, se construyó un gráfico de ΔH en función de la temperatura. Los datos fueron ajustados a un modelo lineal cuya pendiente representa el ΔC_p expresado en $\text{kcal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$.

MODELO COMPLETO DE LA ESTRUCTURA DEL TETRAMERO M_{2-1}

Aunque se conoce la estructura del complejo cuaternario M_{2-1} (PDB ID: 4C3B) [10], tres de las cuatro cadenas carecen de residuos. Construimos un modelo del complejo cuaternario completo basado en la cadena completa (pdb cadena F) con *Chimera* (92) con el fin de obtener una vista realista de la superficie y mapear los residuos que interactúan con el ARN en el complejo.

CAPITULO I

CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y BIOFISICA DE LA INTERACCION ENTRE LA PROTEINA M₂₋₁ Y ARN

INTRODUCCION

Como se describió en la introducción general, la proteína M₂₋₁ es esencial para la transcripción viral, previniendo la terminación prematura de la síntesis de ARNm largos al actuar como un antiterminador y aumentando la síntesis de ARNm de lectura directa actuando como factor elongador de la transcripción viral (26,27). Un trabajo previo sobre la actividad de M₂₋₁ mostró que: i) la síntesis de ARNs largos se vió afectada de forma mayor que la de ARN cortos, ii) el aumento de la procesividad varió enormemente para las diferentes uniones intergénicas, iii) la síntesis de los dos primeros genes (NS1 y NS2, únicos para el RSV) fue independiente de la presencia de M₂₋₁, mientras que todos los genes posteriores eran altamente dependientes (26).

Los residuos de M₂₋₁ implicados en la unión al ARN han sido identificados previamente mediante mutagénesis y ensayos de unión a ARN (16), se mostró que los residuos cargados positivamente dentro de la superficie del *core* (K92, K150, R151 y K159) y los residuos de arginina del N-terminal (R3 y R4) que se encuentran más distantes del *core* participan en la unión al ARN (Figura I.1).

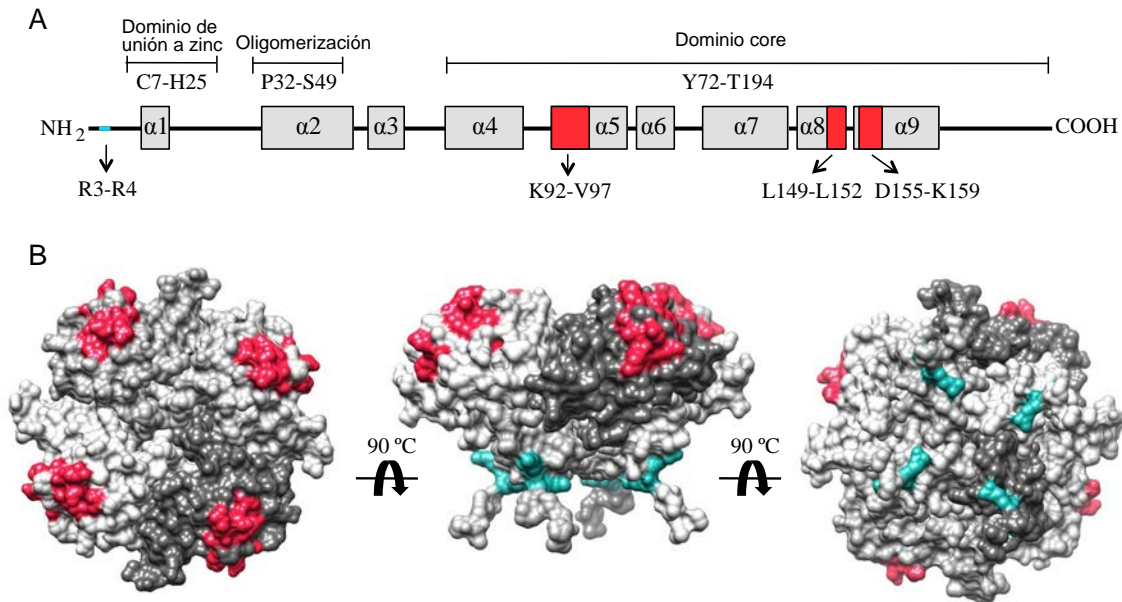


Figura I.1. Representación esquemática de los módulos de M₂₋₁ de RSV y residuos de unión a ARN. (A) Representación esquemática de M₂₋₁. Los residuos correspondientes al motivo de unión a zinc, a la región de oligomerización y al dominio *core* obtenido mediante digestión con quimotripsina, se indican arriba del gráfico. Las alfa hélices y los residuos de unión a ARN informados están indicados debajo del gráfico y coloreados en cian (16) y rojo (37). (B) Representación de superficie de la estructura del tetrámero M₂₋₁ (AP: 4C3D completado como se explica en materiales y métodos) se muestra una vista inferior (izquierda), vista lateral (centro) y vista superior N-terminal (derecha). Residuos de unión a ARN: K92-V97, L149-L152 y D155-K159 están resaltados en rojo y R3-R4 en cian. Se puede diferenciar un protómero coloreado en gris oscuro.

Con frecuencia los mecanismos de antiterminación implican la interacción de proteínas reguladoras con estructuras de ARN, lo que conduce a la desestabilización de las señales de terminación. Si bien estos mecanismos se han estudiado intensamente en sistemas procariotas (93,94), se conoce mucho menos sobre antiterminación en genes eucarióticos y virales (95). Se ha demostrado que la proteína M_{2-1} de RSV es capaz de unirse a las secuencias de ARN líder (43) y a diferentes secuencias GS y GE con afinidades variables y preferencia por secuencias ricas en A (adenina) (16) así como por ARN largos, pero sin un conocimiento claro de la especificidad de secuencia (43). Se propuso que M_{2-1} actúa durante la transcripción, reconociendo y uniéndose a secuencias GE de ARNm, previniendo la terminación prematura (16,37). Sin embargo, no se encontró una correlación clara entre la afinidad de unión para secuencias GE y las sensibilidades conocidas de cada gen a la actividad antiterminadora de M_{2-1} , y no se ha identificado ninguna especificidad de secuencia de nucleótidos única.

A pesar de la actividad biológica descrita (26,96) y estructuras de M_{2-1} (16,50), todavía se desconoce el mecanismo bioquímico que explica la actividad antiterminadora o mejora de la procesividad de M_{2-1} . En el presente capítulo nos propusimos disectar los eventos bioquímicos iniciales subyacentes al reconocimiento de ARN por M_{2-1} . Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la estequiometría de unión y la constante de afinidad del complejo M_{2-1} con los distintos ARN.
- Analizar la especificidad de unión de M_{2-1} por el ARN.
- Estudiar los determinantes cinéticos y termodinámicos que definen la reacción.
- Determinar la existencia de cambios conformacionales en uno o ambos componentes de la unión.
- Determinar la influencia de la fuerza iónica en la formación del complejo M_{2-1} :ARN.
- Analizar la competencia entre ARN y la proteína P por la unión a M_{2-1} .

RESULTADOS

1.1. Estequiometría de la interacción M_{2-1} con ARN.

Un paso esencial para definir un mecanismo de unión es la determinación de la estequiometría de unión. Comenzamos analizando la interacción física del tetrámero M_{2-1} con los ARN marcados con 6-FAM por EMSA. Debido a que se usaron ARN marcados fluorescentemente, el *quenching* podría limitar la detección del complejo M_{2-1} :ARN, por lo tanto, la cuantificación se realizó de la sonda de ARN libre (ver materiales y métodos). Debido a que en un trabajo previo se había mostrado que M_{2-1} es capaz de unir varios ARN de diferentes

secuencias (16), seleccionamos una secuencia modelo no relacionada a RSV, que consiste en repeticiones del pentámero AGUUG denominadas ARN 10mer, 15mer y 20mer. Al titular el ARN 10mer (AGUUGAGUUG) con el tetrámero M_{2-1} , se observó un gran retraso de la especie unida con una estequiometría clara de 1:4 tetrámero M_{2-1} :ARN, equivalente a 4 ARN por tetrámero M_{2-1} (Figura I.2.A). Este resultado es consistente con la existencia de 4 protómeros con un sitio de unión cada uno. Al analizar el ARN 20mer (AGUUGAGUUGAGUUGAGUUG) se encontró que dos moléculas se unieron al tetrámero M_{2-1} , equivalente a una estequiometría 1:2 (tetrámero M_{2-1} : ARN) (Figura I.2.D).

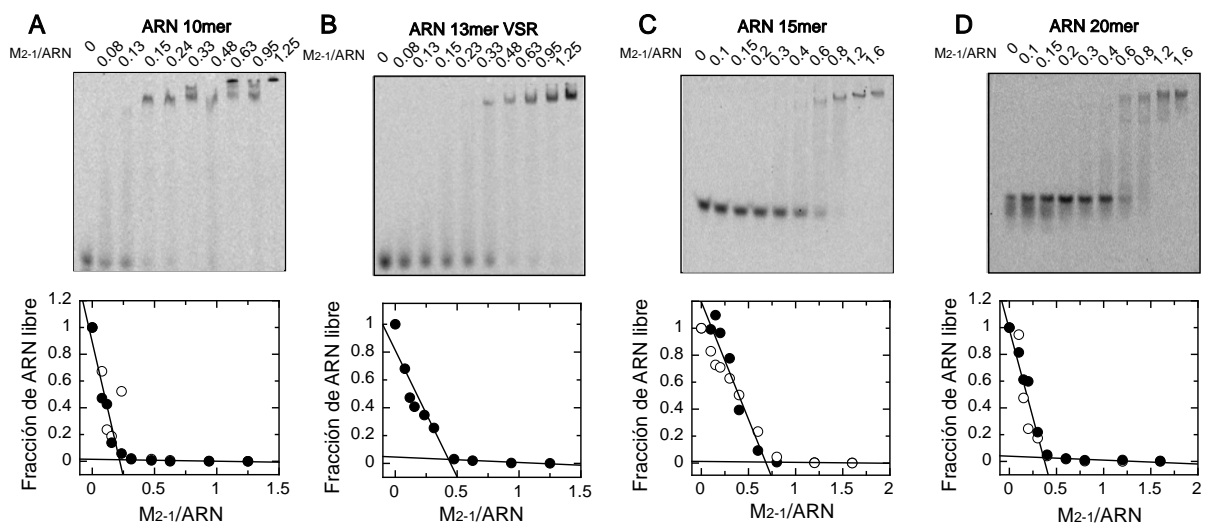


Figura I.2. Estequiometría de unión del tetrámero M_{2-1} con ARN determinada por el ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA). Panel superior: electroforesis en gel nativo de acrilamida de complejos. (A) Se incubó una concentración fija de 4 μ M de ARN 6-FAM 10mer o 200 nM de ARN 6-FAM 13, 15 o 20mer (B-C-D) durante 20 minutos a temperatura ambiente con cantidades crecientes de M_{2-1} hasta un exceso de 1,25 a 5 molar. Panel inferior: la estequiometría para cada interacción probada se determinó mediante densitometría de las bandas del ARN libre. Los gráficos representan la fracción de ARN libre en función de la relación molar tetrámero M_{2-1} :ARN. Los experimentos se realizaron por duplicado (círculos llenos y vacíos).

Para establecer la longitud mínima que permitía un modo de enlace 1:2, se estudió también la unión del ARN 15mer (AGUUGAGUUGAGUUG), y de manera similar al ARN 20mer, se observó una asociación 1:2 tetrámero M_{2-1} :ARN 15mer (Figura I.2.C).

Para evaluar el mecanismo de interacción de M_{2-1} con las secuencias reguladoras de gen de RSV, se investigó la asociación del tetrámero M_{2-1} con una secuencia de ARN relacionada correspondiente a la región de fin de gen SH (SH-GE RSV) (polaridad positiva). Con el fin de evaluar los efectos de la longitud en esta interacción, se utilizó una secuencia de ARN 13mer (ARN 13mer RSV) previamente testada en otro trabajo (16) (Figura I.2.B), así como también se utilizó un ARN 20mer más largo (ARN 20mer RSV) (Figura Anexo 1), que abarca secuencias adyacentes adicionales de la misma región reguladora de genes.

El dominio *core* de M_{2-1} consiste en un fragmento monomérico de 13.6 KDa que contiene el sitio de unión de ARN principal (Figura I.1.A) (37). M_{2-1} core se une a ambos ARNs 10mer y 20mer con una estequiometría de unión 1:1 (Figura I.3), sugiriendo fuertemente que la estequiometría de unión del ARN 20mer al tetrámero surge del ARN que está en contacto con dos sitios de unión a ARN de monómeros adyacentes.

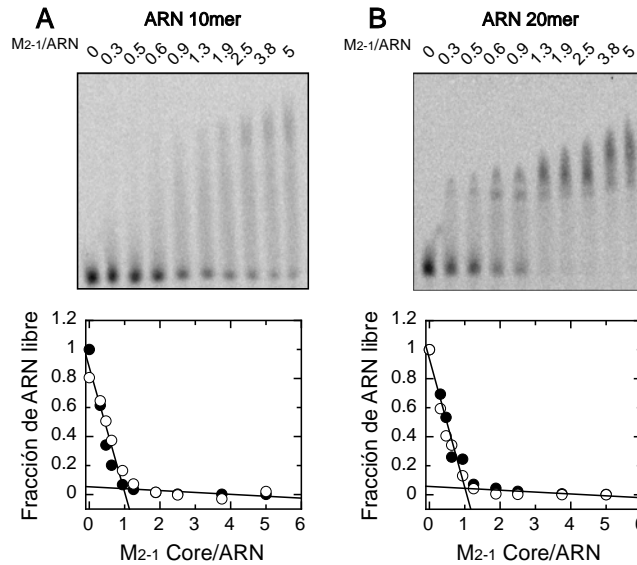


Figura I.3. Estequiometría de unión del monómero M_{2-1} core con ARN determinada por EMSA. Panel superior: electroforesis en gel nativo de acrilamida del complejo M_{2-1} core con ARN. Se incubó una concentración fija de ARN 6-FAM 10mer (A) o 20mer (B) 6 μ M y 4 μ M respectivamente a temperatura ambiente con cantidades crecientes de M_{2-1} core hasta un exceso molar de 5 veces. Panel inferior: la estequiometría para cada interacción probada se determinó mediante densitometría de las bandas de ARN libre. Los gráficos representan la fracción de ARN libre en función de la relación molar monómero M_{2-1} core:ARN. Los experimentos se realizaron por duplicado (círculos llenos y abiertos).

Los ARN más cortos requirieron concentraciones de sonda 6-FAM ARN más altas (2 a 4 μ M para ARN 10mer en comparación con 200 nM para ARN 20mer) para alcanzar la saturación en los experimentos de EMSA, indicando que la formación del complejo 1:2 del tetrámero M_{2-1} con el ARN 20mer condujo a una unión de mayor afinidad entre el ARN y M_{2-1} . De manera similar, la unión 1:1 de ARN 10 o 20mer a M_{2-1} core requirió concentraciones mucho más altas, indicando afinidades significativamente más bajas.

I.2. Análisis cuantitativo de la interacción de M_{2-1} con ARN.

Como un enfoque complementario, se realizaron estudios en solución de la formación del complejo M_{2-1} :ARN mediante titulaciones al equilibrio usando diferentes concentraciones fijas de ARN marcados con 6-FAM, y monitoreando los cambios de fluorescencia o anisotropía de fluorescencia a concentraciones crecientes de M_{2-1} . La unión del tetrámero M_{2-1} al ARN 20mer relacionado como no relacionado a RSV produjo una disminución significativa en la

fluorescencia de la sonda (ARN 6-FAM) debido al *quenching* del fluoróforo (Figura I.4.A y Figura I.4.C) y ambos ARN mostraron saturación a una estequiometría 1:2 (tetrámero M_{2-1} :ARN) para concentraciones de 20 nM o superiores de ARN 20mer, que confirman la estequiometría determinada por los experimentos de EMSA. Las titulaciones a concentraciones subestequiométricas de ARN revelaron cambios en las transiciones de unión en función de la longitud del ARN, con transiciones que ocurren a concentraciones más bajas de M_{2-1} para ARN más largos, revelando un gradiente de afinidades relativas para la asociación al tetrámero M_{2-1} , donde el ARN 20mer muestra la mayor afinidad (Figura I.4.B).

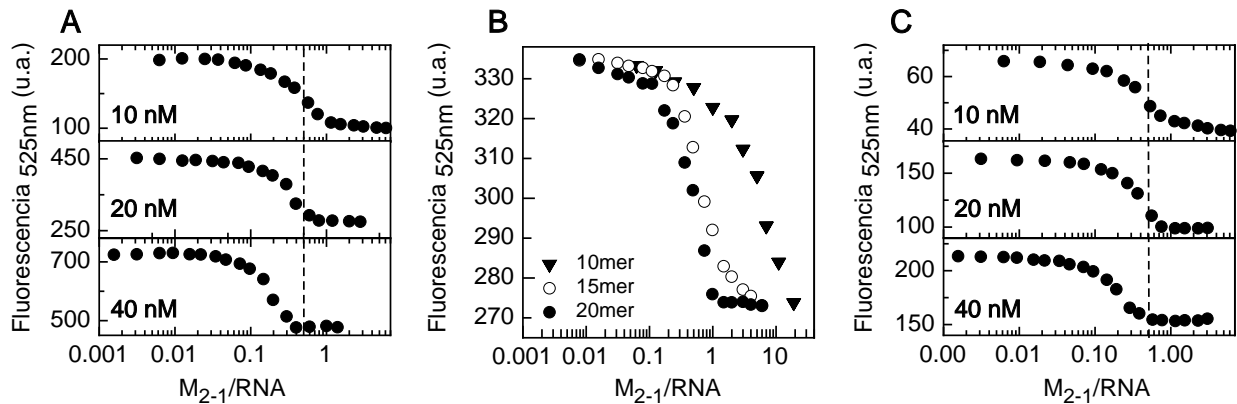


Figura I.4. Titulación al equilibrio de la unión del tetrámero M_{2-1} con ARN. (A) Titulación seguida por fluorescencia a 525 nm de 10, 20 y 40 nM ARN 6-FAM 20mer con concentraciones crecientes de M_{2-1} . La intensidad de fluorescencia a 525 nm se representa en función de la relación molar del tetrámero M_{2-1} : ARN. La titulación estequiométrica a una relación de 1:2 (M_{2-1} tetrámero: ARN) se observa a medida que aumenta la concentración de la sonda. (B) Titulación seguida por fluorescencia de ARN 10mer (triángulos rellenos), 15mer (círculos vacíos) y 20mer (círculos rellenos) con el tetrámero M_{2-1} . Se usaron concentraciones fijas de 50 nM (ARN 10mer) o 25 nM (ARN 15mer y 20mer). (C) Titulación seguida por fluorescencia de 10, 20 y 40 nM ARN 6-FAM 20mer RSV con cantidades crecientes de M_{2-1} . La intensidad de fluorescencia a 525 nm se representa en función de la relación molar M_{2-1} :ARN.

Experimentos realizados con el ARN 15mer también confirmaron una estequiometría de unión 1:2 tetrámero M_{2-1} :ARN (Figura I.5).

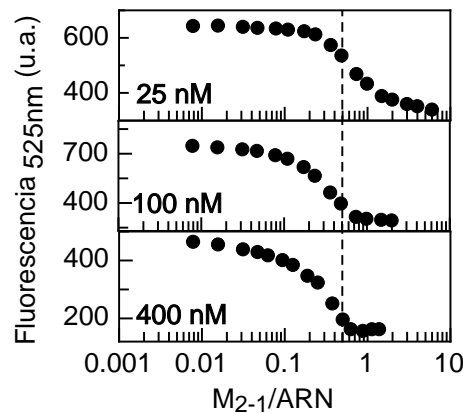


Figura I.5. Titulación al equilibrio de la interacción del tetrámero M_{2-1} con ARN 15mer. Análisis de la interacción de M_{2-1} con ARN 6-FAM 15mer seguido por fluorescencia. Titulación al equilibrio de 25, 100 y 400 nM de ARN con cantidades crecientes del tetrámero M_{2-1} .

A continuación, se investigaron los complejos donde se unió una molécula de ARN por monómero de M_{2-1} (equivalente a una estequiometría 1:1 para M_{2-1} core y una estequiometría 1:4 para la unión del tetrámero M_{2-1} al ARN 10mer). Se combinaron titulaciones de fluorescencia y EMSA a diferentes concentraciones de ARN para estimar la constante de disociación al equilibrio para cada interacción (Tabla 1, Figura I.6. y Tabla Anexo 1), donde el promedio de varias curvas de unión permitió la determinación de las constantes de disociación. Contrario a lo que se observó para la unión del tetrámero M_{2-1} a ARNs 10, 15 y 20mer (Figura 3), la unión de ARN a M_{2-1} core produce pequeños cambios en la intensidad de fluorescencia y la mejor relación señal/ruido para la interacción del ARN 20mer con el M_{2-1} core se obtiene siguiendo la anisotropía de fluorescencia (Figura I.6.A).

Se observó que los valores de K_D recuperados de la combinación de técnicas electroforéticas y espectroscópicas fueron similares (Figura I.6. y Tabla Anexo 1). La asociación de ARNs 10 y 20mer con el monómero de M_{2-1} mostraron valores de constante de disociación promedio comparables (10mer $K_D = 236 \pm 232$ nM y 20mer $K_D = 239 \pm 110$ nM, Tabla 1). A partir de este resultado se puede concluir que el ARN 10mer satura la unión al sitio primario localizado en el dominio *core* de M_{2-1} , sin interacciones adicionales significativas contribuidas por ARNs de mayor longitud. Además, estos valores de K_D coinciden con el valor de K_D obtenido para el tetrámero M_{2-1} que se une al ARN 10mer ($K_D = 286 \pm 170$ nM, Tabla 1), lo que indica que el ARN se une de un modo similar a un sitio mínimo e independiente, tanto si el sitio de unión de ARN está dentro del contexto del tetrámero M_{2-1} como del monómero M_{2-1} core.

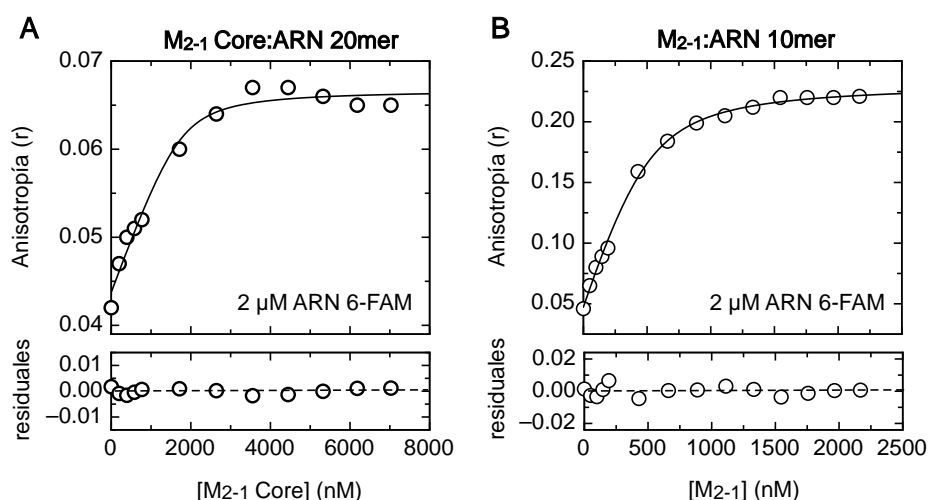


Figura I.6. Titulación de ARN marcado con 6-FAM con M_{2-1} y M_{2-1} core seguida por anisotropía de fluorescencia. (A) Titulación de 1770 nM de ARN 20mer con concentraciones crecientes de M_{2-1} core. Los datos fueron ajustados a un modelo de unión 1:1 (ver materiales y métodos). **(B)** Titulación de 2 μ M de ARN 10mer con concentraciones crecientes del tetrámero M_{2-1} . Los datos fueron ajustados a un modelo de unión 1:1 (ver materiales y métodos). La concentración de tetrámero M_{2-1} se expresó en unidades monoméricas.

Se evaluó la unión de M_{2-1} a ARNs específicos del RSV para los cuales se confirmó por fluorescencia la estequiometría de unión 1:2 (tetrámero M_{2-1} :ARN) (Figura I.4.C). Las secuencias de ARN no relacionadas (Figuras I.4.A y B) y las secuencias de SH-GE RSV (Figura I.4.C), mostraron transiciones que ocurren a concentraciones más bajas de M_{2-1} para ARNs 20mer, sugiriendo una mayor afinidad por ARN más largos. En ambos casos, dos moléculas de ARN se unieron por tetrámero, donde la longitud mínima, al menos para la secuencia del RSV, ahora se redujo a 13 nucleótidos, pero la longitud óptima fue de 20 nucleótidos.

Tabla I.1. Unión del monómero M_{2-1} core y del tetrámero M_{2-1} con ARN.

Especies de M_{2-1}	ARN	Esteq ^a EMSA	Esteq ^b Fluo	Esteq ^c CD	K_D (nM) ^d	Señal Ajustada	n_H
ARN NO RELACIONADO							
M_{2-1} core	10	1:1	ND	SS	236±232	EMSA ^e	ND
M_{2-1} core	20	1:1	1:1	SC	239±110	r/EMSA	ND
M_{2-1} tetrámero	10	1:4	1:4	SS	286±171	r/EMSA	ND
M_{2-1} tetrámero	15	1:2	1:2	SS	ND	ND	ND
M_{2-1} tetrámero	20	1:2	1:2	1:2	14±6 ^f	F	1.7±0.5 ^f
ARN RELACIONADO							
M_{2-1} tetrámero	13	1:2	ND	1:2	ND	ND	ND
M_{2-1} tetrámero	20	1:2	1:2	1:2	16±5 ^f	F	1.8±0.7 ^f

ND: no determinado; SS: sin señal en ARN; SC: sin cambio en el ARN luego de la unión. r: anisotropía. F: fluorescencia.

^a La estequiometría fue determinada por EMSA realizado en condiciones saturantes (4µM 6-FAM ARN). Datos de dos o más experimentos independientes.

^b La estequiometría fue determinada por titulaciones al equilibrio con 6-FAM ARN en condiciones saturantes (cc > 1 µM). Datos de tres o más experimentos independientes.

^c La estequiometría fue determinada por titulaciones medidas por CD de ARN (5 µM) con M_{2-1} . Datos de un experimento.

^d Datos de dos a siete experimentos independientes.

^e La calidad de ajuste para los datos de fluorescencia/anisotropía fue pobre debido a la oligomerización o agregación de la muestra y, por lo tanto, se excluyó de la K_D informada.

^f Se obtuvieron valores de K_D aparentes y n_H a partir de la ecuación de Hill (ver Materiales y Métodos). Los datos representan valores promedio de 6 a 7 experimentos a diferentes concentraciones (ANEXO Tabla 2).

I.3. M_{2-1} despliega la estructura del ARN después de la unión.

Se evaluó si la formación del complejo M_{2-1} :ARN implicaba cambios conformacionales en uno o ambos miembros de la unión utilizando dicroísmo circular. En primer lugar, se observó la región de CD UV lejano, donde la mayor parte de la contribución corresponde a la cadena principal de la proteína, comparando el complejo M_{2-1} :ARN 20mer con la suma aritmética de cada componente individual (M_{2-1} y ARN), ambos espectros de CD se superponen, lo cual indica que el contenido de la estructura secundaria global de M_{2-1} no muestra cambios significativos en la formación del complejo (Figura I.7.A). A continuación, se evaluó la región CD UV cercano,

donde se esperaba que la mayor contribución de señal fuera del ARN. Aquí, se observó que el ARN 20mer tiene una fuerte señal positiva con un máximo centrado alrededor de 270 nm (Figura I.7.B). El tetrámero M_{2-1} carecía de señal en este rango de longitud de onda, por lo tanto, la señal correspondía a la molécula de ARN sola (Figura I.7.B). Esta señal se debe probablemente al apilamiento o al emparejamiento de bases o a ambos, y no se observó para los ARN más cortos (10mer y 15mer) (Figura I.7.B). Esta estructura se desestabilizó al aumentar la temperatura y se desplegó con poca cooperatividad (Figura I.9.B y C), indicando que no corresponde a una estructura compacta o estable, similar a una horquilla y en su lugar sugiere la presencia de un grado significativo de estructura plegada basada en la interacción hidrofóbica de las bases.

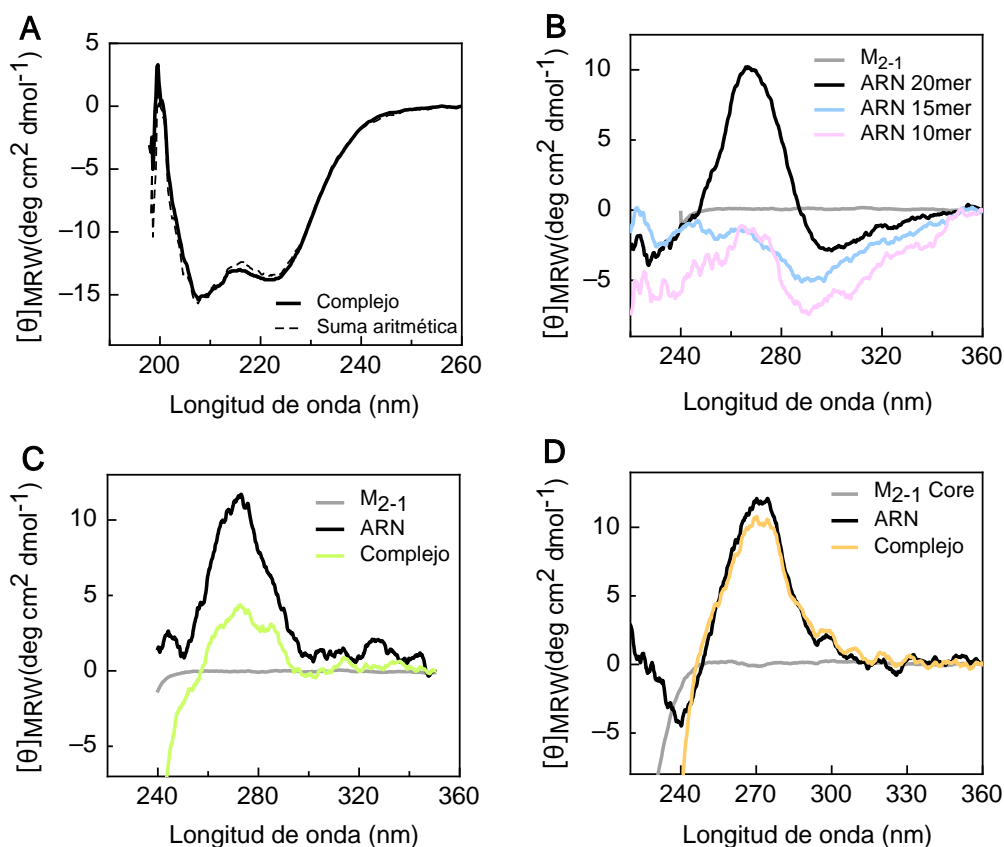


Figura I.7. Estudio de la interacción M_{2-1} :ARN 20mer seguida por dicroísmo circular. (A) Espectro de CD UV lejano del complejo M_{2-1} :ARN 20mer (5 μ M de cada componente, línea continua) y espectro de la suma aritmética de 5 μ M de M_{2-1} y 5 μ M de ARN 20mer (línea de puntos). (B) Espectro CD UV cercano de 5 μ M tetrámero M_{2-1} (línea gris), 5 μ M ARN 20mer (línea negra), 5 μ M ARN 15mer (línea celeste) y 5 μ M ARN 10mer (línea lila). (C) Espectro CD UV cercano de 5 μ M tetrámero M_{2-1} (línea gris), 5 μ M ARN 20mer (línea negra) y 5 μ M del complejo tetrámero M_{2-1} :ARN 20mer (línea verde). (D) Espectro de CD UV cercano de 5 μ M de M_{2-1} core (línea gris), ARN 20mer 5 μ M (línea negra) y 5 μ M del complejo M_{2-1} core:ARN 20mer (línea anaranjada). Todas las mediciones se realizaron a 20 $^{\circ}$ C.

Consideramos el hecho de que esta estructura podría verse afectada por la unión al antiterminador M_{2-1} . De hecho, la adición de una concentración saturante del tetrámero M_{2-1} a

una cubeta conteniendo ARN 20mer mostró una disminución de la elipticidad a 270 nm hasta los valores basales, indicando que la estructura del ARN se desplegaba tras la formación del complejo (Figura I.7.C). Valiéndonos de este cambio observado, se realizó una titulación con concentraciones crecientes de M_{2-1} y se pudo ver la disminución gradual de la señal del ARN con una estequiometría de unión 1:2, confirmando mediante un tercer método independiente que dos moléculas de ARN 20mer se unen a un tetrámero M_{2-1} (Figura I.8).

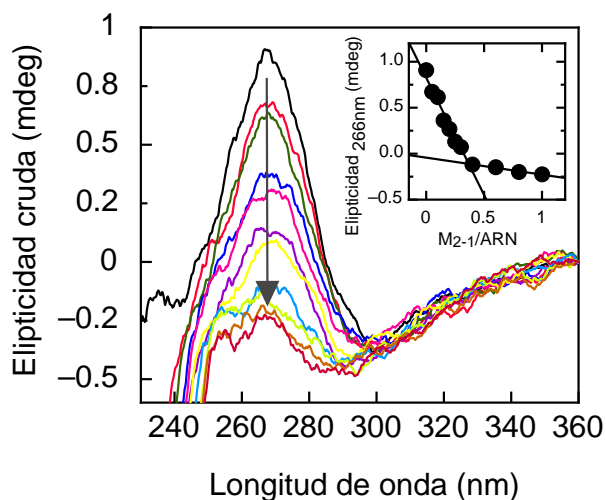


Figura I.8. Cambios inducidos en la estructura del ARN seguido por dicroísmo circular. Titulación para la formación del complejo M_{2-1} :ARN 20mer seguido de dicroísmo circular. Se midió el espectro de CD UV cercano de $5 \mu\text{M}$ de ARN 20mer incubados con cantidades crecientes de tetrámero M_{2-1} hasta $10 \mu\text{M}$. Recuadro: Cambios en la señal de elipticidad molar para del ARN 20mer seguida a 270 nm en función de la relación molar tetrámero M_{2-1} :ARN.

Contrario a lo observado para el tetrámero M_{2-1} , el monómero M_{2-1} core no fue capaz de desestabilizar la estructura del ARN 20mer (Figura I.7.D). El experimento se llevó a cabo con $5 \mu\text{M}$, y dado que se determinó que la constante de disociación era de $239 \pm 110 \text{ nM}$ (Tabla 1), la concentración de proteína fue de hecho 20 veces superior a la K_D , asegurando la saturación completa de la unión. Esto nos llevó a concluir que M_{2-1} core se une al ARN 20mer, pero no puede desplegarlo, sugiriendo fuertemente un modo de unión diferente.

Se observó un comportamiento similar de unión del tetrámero con el ARN 20mer relacionado para las secuencias análogas de ARN 13 y 20mer RSV, de hecho, la elipticidad molar del ARN 20mer RSV fue mucho más pronunciada que el ARN 20mer no relacionado, lo que sugiere un mayor grado de estructura o estabilidad (Figura I.9.A). Además, las desnaturalizaciones térmicas mostraron que el desplegado del ARN 20mer RSV era cooperativo y más estable que el ARN 20mer no relacionado, por una diferencia de $23 \text{ }^\circ\text{C}$ en la T_m aparente (Figura I.9.C). Las titulaciones al equilibrio con el tetrámero M_{2-1} produjeron una disminución de la señal a 270 nm para ambos ARN de RSV 13mer y 20mer (Figura I.9.D), confirmando la estequiometría de unión 1:2 tetrámero M_{2-1} :ARN observada para el ARN 20mer

no relacionado (Figura I.8, recuadro). El desplegado del ARN por M_{2-1} fue rápido y se produjo dentro del tiempo muerto de mezclado (10 segundos) del experimento (no se muestra).

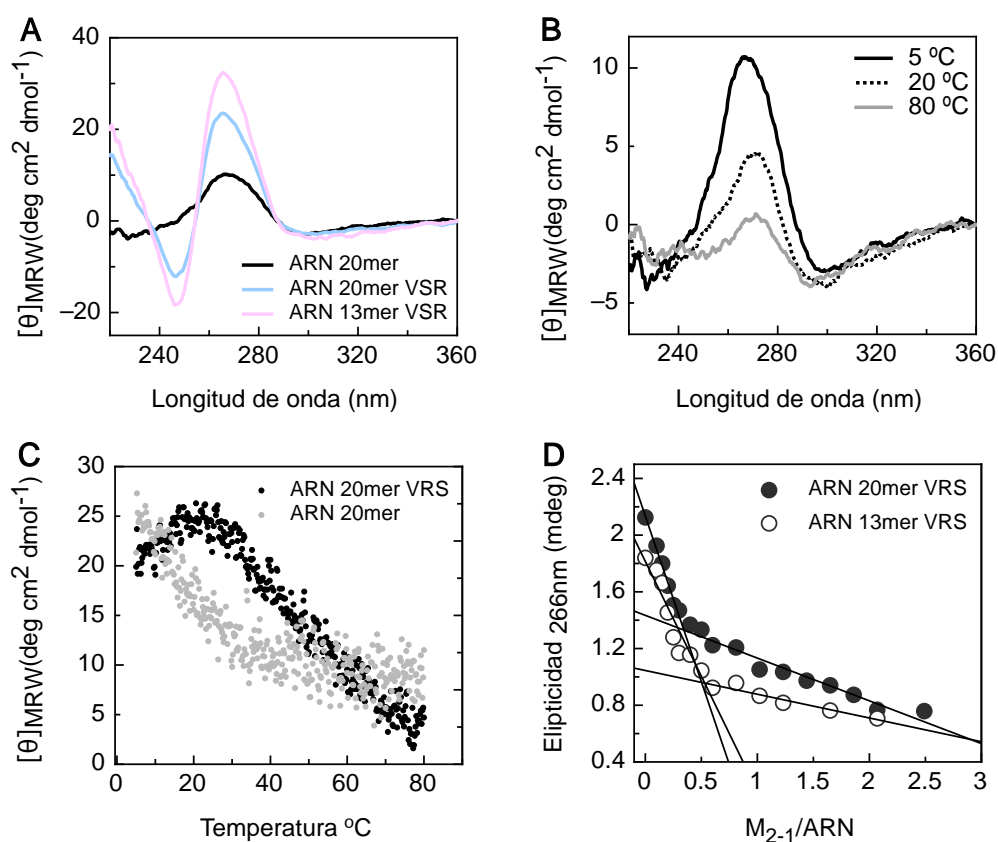


Figura I.9. Estructura del ARN e interacción M_{2-1} :ARN RSV seguida por dicroísmo circular. (A) Espectro CD UV cercano de 5 μ M: ARN 20mer (línea negra), ARN 20mer RSV (línea celeste) y ARN 13mer RSV (línea lila). (B) Dependencia de la estructura terciaria del ARN con la temperatura. Espectro de CD UV cercano de 5 μ M de ARN 20mer a 5°C (línea continua negra), 20°C (línea punteada) y 80°C (línea continua gris). (C) Desnaturalización térmica de 5 μ M: ARN 20mer RSV (puntos negros) y ARN 20mer no relacionado (puntos grises), de 5°C a 80°C seguidos a 270 nm. (D) Titulación de ARN 13mer RSV y ARN 20mer RSV con cantidades crecientes de tetrámero M_{2-1} seguido por dicroísmo circular. Los cambios en la señal de elipticidad molar del ARN se siguieron a 270 nm en función de la relación molar del tetrámero M_{2-1} :ARN.

1.4. La unión del anti-terminador al ARN de 20 bases es cooperativa.

Con el fin de investigar la interacción de los ARN más largos de 20mer con M_{2-1} , se realizaron titulaciones en concentraciones sub-estequiométricas, donde es posible estimar las afinidades de unión. Como puede observarse, la unión es sub-estequiométrica por debajo de una concentración de 40 nM 6-FAM ARN 20mer relacionado y no relacionado (Figura I.4. A y C). Una inspección detallada de los datos de unión crudos y normalizados para las interacciones de M_{2-1} con ARN 20mer relacionado y no relacionado revelaron una forma sigmoidea de las curvas de unión a concentraciones sub-estequiométricas con un aumento pronunciado en la fracción del ligando unido tras la adición de M_{2-1} , inicialmente indicativo de cooperatividad (Figura I.11, recuadro). El comportamiento distintivo sigmoideo puede

observarse en condiciones de equilibrio de unión en concentraciones de ARN que varían de 10 a 40 nM para ambos ligandos de ARN relacionado y no relacionado (Figura Anexo 2).

Una aproximación para evaluar la cooperatividad es cuantificar las unidades logarítmicas de ligando requeridas para producir una transición de fracciones unidas de 0.1 a 0.9 (90). Para ello, se graficaron los valores de fluorescencia normalizada para cada concentración de sonda (6-FAM ARN 20mer) en función de la concentración de ligando con el eje x logarítmico. Mientras que las interacciones no cooperativas usualmente abarcan 2 unidades logarítmicas de concentración de ligando, la cooperatividad negativa se caracteriza por transiciones menos profundas que abarcan más de 2 unidades logarítmicas y la cooperatividad positiva mediante transiciones más nítidas que abarcan menos de 2 unidades logarítmicas. Para nuestros datos, todas las isotermas de unión tetrámero M_{2-1} :ARN 20mer (relacionado y no relacionado), mostraron transiciones que abarcaban menos de dos unidades logarítmicas de concentración de proteína, lo que sugiere un comportamiento de cooperatividad positiva (Figura I.10, Figura Anexo 2).

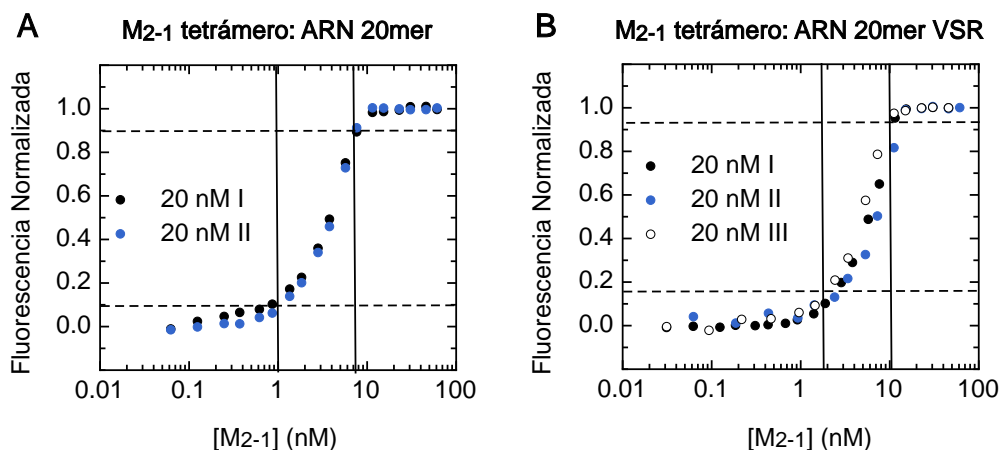


Figura I.10. Análisis de la interacción del tetrámero M_{2-1} con ARN relacionado y no relacionado en escala logarítmica. Se realizaron titulaciones al equilibrio de ARN no relacionados (A) y relacionados (B) con concentraciones crecientes de M_{2-1} . Se muestra en el gráfico la fluorescencia normalizada con el eje x en escala logarítmica. El número de unidades logarítmicas requeridas para la transición de saturación de 0.1 a 0.9 está marcado por barras verticales.

De acuerdo con los indicios de cooperatividad, la adaptación de los datos a la ecuación de Hill para todas las concentraciones de proteína evaluadas tanto aplicando la fórmula para el ajuste de los datos como a partir de la linealización de los mismos (Figura I.11 y Figuras Anexo 3 y 4) permitieron determinar el coeficiente de Hill (n_H) y la constante de unión aparente (K_{Dapp}) para todas las curvas de unión. Por ambas metodologías se obtuvieron valores similares, al igual que para las distintas concentraciones de ARN ensayadas (ver materiales y métodos y Tabla Anexo 2). Para los ARN 20mer (relacionados y no relacionados) se obtuvieron ajustes

reproducibles a diferentes concentraciones de ARN, con valores promedio de $n_H = 1.7 \pm 0.5$ para ARN no relacionados y $n_H = 1.8 \pm 0.7$ para ARN relacionados, lo que confirma la cooperatividad positiva (Tabla 1 y Tabla Anexo 2). Las constantes de unión aparente promedio recuperadas fueron $K_{Dapp} = 14 \pm 6$ nM para ARN no relacionados y $K_{Dapp} = 16 \pm 5$ nM para ARN relacionados, revelando un aumento de 15 veces sobre los valores de K_D característicos de las interacciones de sitio único observadas con el monómero M_{2-1} core y las interacciones no cooperativas del tetrámero M_{2-1} con el ARN 10mer (Tabla 1).

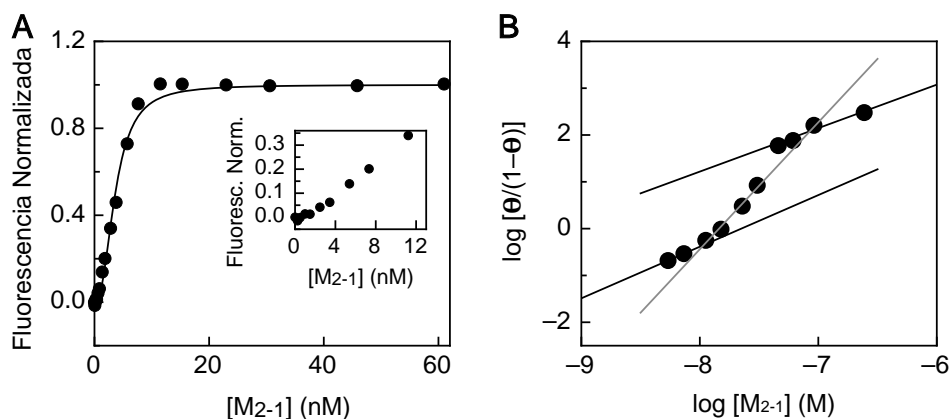


Figura I.11. Asociación cooperativa de ARNs relacionados y no relacionados al tetrámero M_{2-1} . **A)** Titulación al equilibrio de ARN 20mer marcado con 6-FAM con el tetrámero M_{2-1} . Una forma sigmoideal es claramente reconocible en las curvas de unión. Se muestra un ajuste a la ecuación de Hill (ver materiales y métodos) para obtener el n_H y la K_{Dapp} . Recuadro: detalle del primer segmento de la curva donde se observa la forma sigmoideal. **B)** Transformación lineal de los datos mostrados en el panel A (ver materiales y métodos) usados para estimar el coeficiente de Hill.

Estos resultados junto con las estequiometrias de unión determinadas previamente, sugieren que la unión a dos sitios adyacentes dentro del tetrámero M_{2-1} conduce a la cooperatividad observada y determina la alta afinidad. Como nuestros experimentos se realizaron con un monómero M_{2-1} core que carece de la región N-terminal, no podemos descartar que el aumento observado en la afinidad de unión también se deba en parte a las interacciones adicionales del ARN con la región N-terminal previamente mostradas que contribuyen a la asociación del ARN (R3 y R4) (16), pero es probable que esta contribución energética sea menor en comparación con la del sitio principal de unión al ARN del dominio core.

1.5. Bases cinéticas para la interacción cooperativa M_{2-1} :ARN.

Los estudios cinéticos de las interacciones proteína-proteína permiten disectar el mecanismo de asociación, incluyendo la caracterización de las especies intermediarias formadas y su energía, y los estados de transición de la ruta de asociación (97,98). Para

dilucidar las diferentes etapas implicadas en la asociación cooperativa M_{2-1} :ARN, realizamos el análisis en estado no estacionario de las reacciones de unión y disociación. Los experimentos se realizaron en condiciones de pseudo-primer orden, es decir, manteniendo la concentración de uno de los reactivos al menos cinco veces por encima del otro. Se utilizó una concentración fija de 6-FAM ARN 20mer (5 nM) y se adicionaron distintas concentraciones de M_{2-1} . La formación del complejo M_{2-1} :ARN produjo un aumento en la señal de anisotropía de fluorescencia y una disminución en la intensidad de fluorescencia (Figuras I.12.A y B).

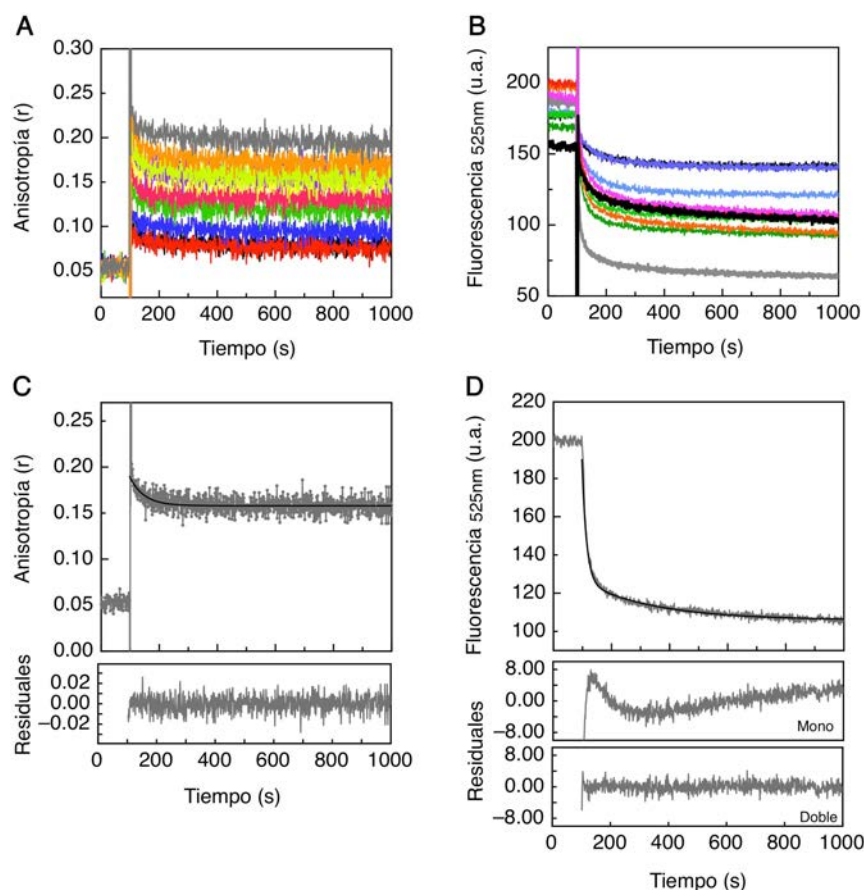


Figura I.12. Cinética de asociación del tetrámero M_{2-1} con ARN seguida por anisotropía de fluorescencia e intensidad de fluorescencia a 525 nm. Diferentes concentraciones de tetrámero M_{2-1} fueron agregadas (10, 19, 25, 38, 50, 75, 100, 150, 200 y 300 nM) mezclando manualmente (tiempo muerto 8 segundos) en una cubeta que contenía 5 nM de 6-FAM ARN 20mer después de 100 segundos de medición de la línea de base. La interacción fue seguida en el tiempo por anisotropía de fluorescencia (A) y el cambio de la intensidad de fluorescencia a 525 nm (B). La señal de anisotropía se ajustó a una ecuación monoexponencial (ver materiales y métodos) (C) y la señal de fluorescencia se ajustó a una ecuación monoexponencial (línea continua negra) o a una ecuación biexponencial (D). Los paneles inferiores muestran los residuales del ajuste de cada curva.

A una concentración de 100 nM de M_{2-1} , se produjo un cambio importante en la señal de anisotropía dentro del tiempo muerto de mezcla (8 segundos), seguido de un decaimiento lento que se ajustó mejor a un proceso monoexponencial con una $k_{obs} = 0.020 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$ (Figura I.12.C y I.13.C). Se observó un comportamiento similar para todas las concentraciones de M_{2-1}

probadas, lo que indica la presencia de una fase rápida (*“burst phase”*) para estas condiciones experimentales, que corresponde a la reacción de asociación bimolecular rápida. La fase de decaimiento lento siempre fue monoexponencial (Figura Anexo 5) y no mostró dependencia de la concentración de M_{2-1} (Figura I.13.B).

La señal de intensidad de fluorescencia disminuyó tras la unión, sin fase rápida detectable (Figura I.12.B, I.13.D y Figura Anexo 5). Para todas las concentraciones de M_{2-1} ensayadas, el proceso fue mejor descrito mediante dos fases observadas (Figura I.12.D y Figura Anexo 6). La amplitud de la fase más rápida ($k_{obs2} = 0.097 \pm 0.004 \text{ s}^{-1}$) aumentó a medida que aumentaron las concentraciones de M_{2-1} (Figura I.13.A). En cambio, la amplitud de la fase más lenta ($k_{obs1} = 0.011 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$) se hizo más pequeña a medida que aumentaron las concentraciones de M_{2-1} (Figura I.13.A) y la constante de velocidad no mostró dependencia de la concentración de M_{2-1} (Figura I.13.B), con un valor similar a la obtenida por anisotropía.

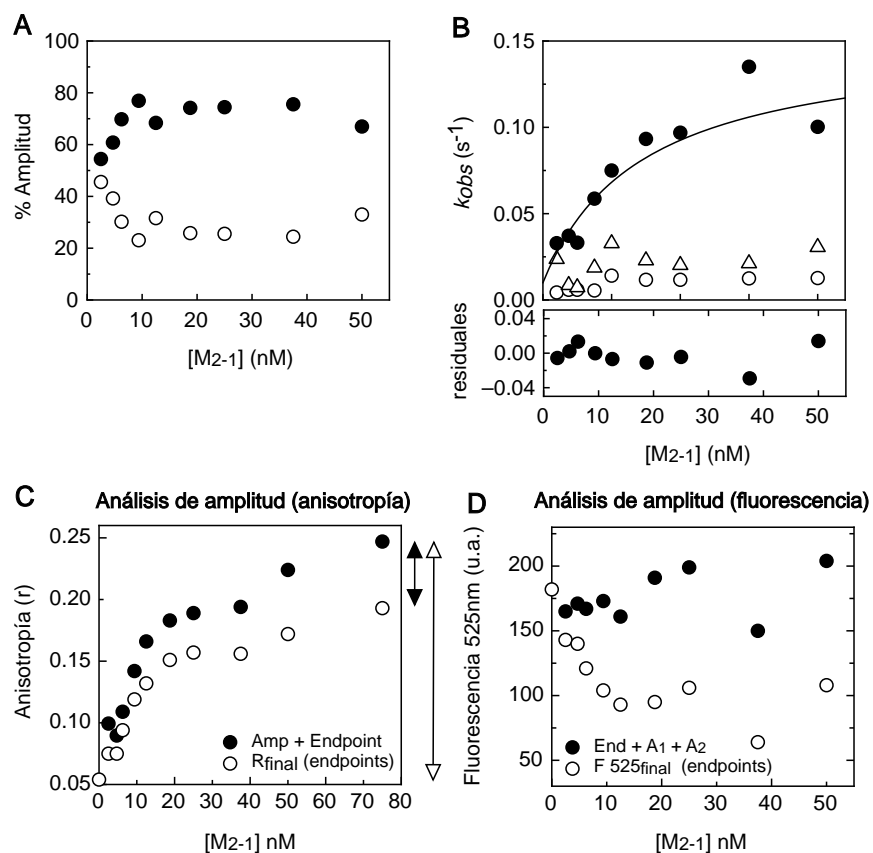


Figura I.13. Estudio de las fases cinéticas de asociación. (A) Estudio de las amplitudes de las fases de asociación lenta (círculos vacíos) y rápida (círculos llenos) obtenidas a partir de los datos de intensidad de fluorescencia en función de la concentración de M_{2-1} después de la unión de M_{2-1} :ARN. La concentración de ARN 20mer marcado con 6-FAM fue de 5 nM. (B) Dependencia de la constante de velocidad observada con la concentración de M_{2-1} y ajuste a un modelo de ajuste inducido (ver materiales y métodos). Fase rápida de intensidad de fluorescencia (círculos llenos), fase lenta de intensidad de fluorescencia (círculos claros). (C-D) Gráfico de la señal final (amplitudes + puntos finales) (círculos rellenos) versus el valor del punto final al equilibrio (círculos abiertos) en función de la concentración de M_{2-1} seguido por anisotropía (C) o fluorescencia a 525 nm (D).

Estos resultados en conjunto, sugieren que al menos dos procesos más lentos se asociaron a la formación del complejo M_{2-1} :ARN. Para los complejos de baja afinidad M_{2-1} core:ARN 20mer y tetrámero M_{2-1} :ARN 10mer, no fueron observadas fases lentas acompañando la unión. Esto sugiere que las fases más lentas corresponden a reordenamientos conformacionales que siguen inmediatamente luego de la unión y constituyen una comprobación de la cooperatividad observada. A continuación, se aplicó un modelo cuantitativo para evaluar esta reorganización conformacional. Se ha demostrado que bajo condiciones de equilibrio rápido para una asociación bimolecular, es decir, cuando el evento de unión ocurre a una velocidad mayor que el cambio conformacional, un aumento en el valor de la constante de velocidad observada hiperbólicamente en función de la concentración de ligando es indicativo de una reacción de ajuste inducido (*induced fit*) (88). Con el fin de determinar el mecanismo involucrado en la formación del complejo M_{2-1} :ARN se analizaron las K_{obs} obtenidas en los experimentos cinéticos de asociación. Mientras que la fase más lenta de asociación no mostró dependencia de la concentración de la proteína M_{2-1} , la constante de velocidad observada para la fase más rápida aumentó claramente a medida que se incrementó la concentración de M_{2-1} (Figura I.13.B), lo que apoya la existencia de un proceso de ajuste inducido. El ajuste de los datos a este modelo (88) (ver material y métodos, Ec. [9]) arrojó las constantes de velocidad para la reacción, una constante de asociación $k_1 = 0.16 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ y una constante de disociación al equilibrio de $k_{-1} = 89 \pm 6 \text{ nM}$ (Figura I.13.B). La ausencia de cambios globales en la estructura secundaria en M_{2-1} tras la formación del complejo (Figura I.7.A), indica que esta reorganización conformacional corresponde a un cambio sutil que no se detecta en los experimentos de CD, como se observa a menudo en los procesos cooperativos o alostéricos.

Para confirmar lo observado se realizaron experimentos siguiendo la intensidad de fluorescencia en el tiempo, medido en un equipo de flujo detenido o *stopped-flow*, el cual permite medir reacciones rápidas en solución con un tiempo muerto de 1-2 milisegundos. Los experimentos se realizaron en condiciones de pseudo-primer orden, las curvas de asociación fueron realizadas a una concentración fija de 100 nM 6-FAM ARN 20mer, variando la concentración de M_{2-1} entre 0.5 y 4 μM . Se observó una disminución de la fluorescencia al producirse la formación del complejo, con una excelente relación señal/ruido.

Las curvas fueron ajustadas a una función exponencial triple, indicando la presencia de dos fases o más y obteniéndose las constantes observadas para cada fase las cuales se graficaron en función de la concentración de M_{2-1} (Figura I.14.A). Se observó que, para una de las fases la k_{obs} aumentó a medida que aumentaba la concentración de M_{2-1} (I.14.B), y a partir de la regresión lineal de la misma se pudieron obtener los valores de k_{on} a partir de la pendiente ($1.2 \times 10^{-8} \pm 1.1 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y de k_{off} a partir de la ordenada ($1.4 \times 10^{-8} \pm 2.5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$) del

complejo M_{2-1} :ARN ($R^2=0.98$) (Ecuación [I.1]); de este modo confirmamos lo observado previamente por fluorímetro.

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{off}} + k_{\text{on}} \cdot [L] \quad [\text{I.1}]$$

La presencia de más de una fase cinética indica que el mecanismo de asociación entre M_{2-1} y el ARN 20mer no sigue una ruta de dos estados, sugiriendo la presencia de al menos un intermediario poblado (99).

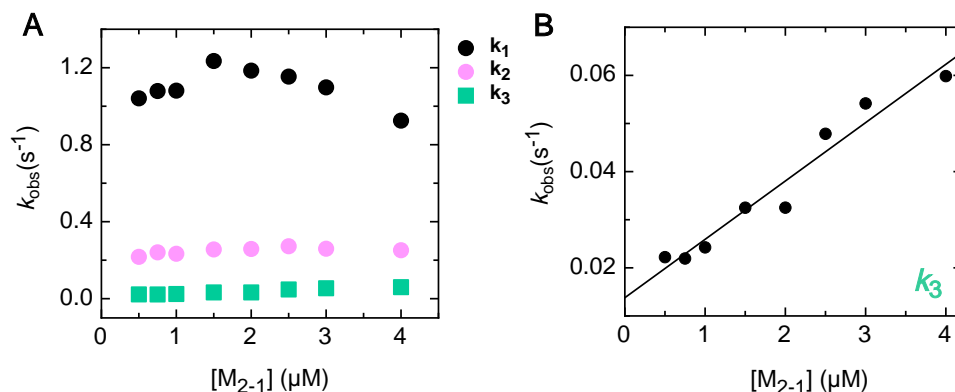


Figura I.14. Cinética de asociación del tetrámero M_{2-1} con ARN seguida por Stopped Flow. Concentraciones crecientes de M_{2-1} (0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 4 μM) fueron adicionadas a una cubeta conteniendo una concentración fija de ARN 6-FAM 20mer (100 nM). La interacción fue seguida en el tiempo por fluorescencia a 520 nm. Los datos se ajustaron a una función tri-exponencial para obtener los valores de las constantes cinéticas observadas para cada concentración de M_{2-1} **(A)**. **(B)** Fase dependiente de la concentración de M_{2-1} (k_3). Por regresión lineal se obtuvieron los valores de k_{on} (pendiente) y k_{off} (ordenada).

1.6. Efecto de la fuerza iónica en la interacción M_{2-1} :ARN.

Basándose en el hecho de que M_{2-1} posee una extensa superficie electrostática positiva, lo cual es consistente con el alto pI (9.13) y que la superficie de unión a ARN estaría poblada con residuos que favorecerían las interacciones electrostáticas con la cadena principal de fosfato de ARN (cargada negativamente) (16), en esta sección se estudió el componente electrostático de la interacción M_{2-1} :ARN.

Dado que las superficies de las proteínas son generalmente polares, tal vez no sea sorprendente que las interfaces sean también polares y que la formación de complejo dé como resultado la utilización de un número significativo de residuos cargados y polares. Las interacciones electrostáticas son todas las interacciones coulómbicas que se establecen entre grupos cargados, grupos polares o grupos polarizables Sheinerman (100); las mismas pueden debilitarse al aumentar la fuerza iónica del medio aumentando la concentración de alguna sal en la solución (101). A alta fuerza iónica se produce una disminución de la constante dieléctrica del medio que atenúa los potenciales electrostáticos, debilitando las interacciones de tipo electrostático. Para analizar el componente electrostático de la interacción M_{2-1} :ARN

determinamos la constante de disociación del complejo utilizando el mismo buffer pero variando la concentración de NaCl entre 100 mM y 500 mM y de este modo ver si es perturbada por la modificación de la fuerza iónica del medio. El cálculo de la constante de disociación se realizó utilizando la misma metodología que en las titulaciones al equilibrio realizadas anteriormente en el presente capítulo para uniones cooperativas.

En la Figura I.15 se muestra la dependencia de la K_D para el complejo M_{2-1} :ARN 20mer en función de la concentración de NaCl expresada en logaritmo. Puede observarse que la K_D prácticamente no fue perturbada en el rango de concentración de sal entre 100-200 mM (Tabla I.2), pero a partir de 250 mM la señal de fluorescencia se vuelve anómala incluso en las distintas repeticiones realizadas de las mismas, imposibilitándonos el ajuste de las curvas para obtener un valor de K_D . Estos resultados sugieren que la formación del complejo estaría fuertemente influenciada por la cantidad de sal presente en el medio a partir de un cierto valor de concentración, por lo tanto, existen fuerzas electrostáticas que pueden estar mediando la interacción de M_{2-1} con ARN.

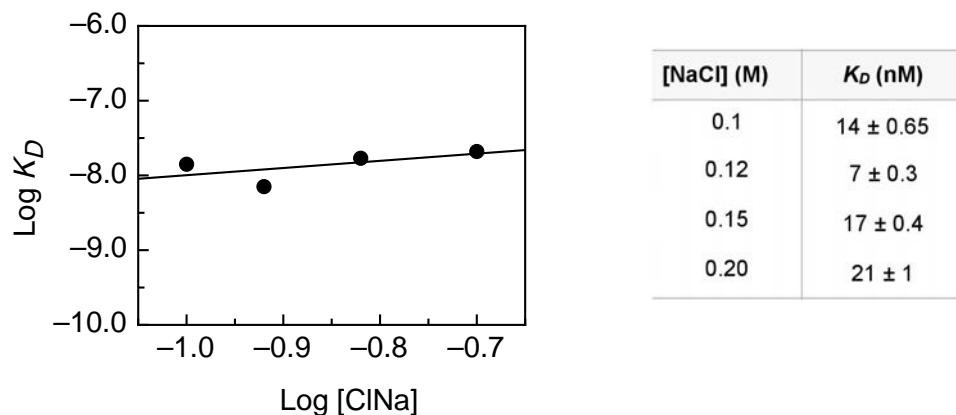


Figura I.15. y Tabla I.2. Dependencia de la afinidad en función de la fuerza iónica. La constante de afinidad fue medida al equilibrio en el mismo buffer conteniendo diferentes concentraciones de NaCl (100-500 mM).

I.7. Análisis termodinámico de la unión M_{2-1} :ARN.

Para una comprensión más integrada de los procesos dinámicos que subyacen a la unión M_{2-1} :ARN, se requiere un análisis termodinámico de las interacciones además del cinético. Existen dos formas principales de medir los parámetros termodinámicos, una ella es a través de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) que mide el calor directo liberado o absorbido en la interacción, pero la cantidad necesaria de ARN para realizar estas medidas es alta y de alta pureza, algo que excede el presupuesto del laboratorio. Otra manera de determinar los parámetros termodinámicos ha sido propuesta por el químico holandés J. H. Van't Hoff en 1884. Esta ecuación proporciona información sobre la dependencia de la

constante de equilibrio con la temperatura. La ecuación de Van't Hoff puede derivarse de la ecuación de Gibbs-Helmholtz, que muestra la dependencia de la temperatura de la energía libre de Gibbs como,

$$\Delta G = -RT \ln K_A \quad [1.2]$$

(donde T es la temperatura en Kelvin = 298.15 K y R es la constante de los gases ideales ($R = 1.987207 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$)). Debido a que el ΔG está relacionado con el cambio en entalpía (ΔH) y entropía (ΔS) a partir de la ecuación,

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad [1.3]$$

puede reordenarse a,

$$\ln (K_A) = (-\Delta H / R) (1 / T) + \Delta S / R \quad [1.4]$$

que es la forma integrada de la ecuación de Van't Hoff, la cual es válida cuando ΔH y ΔS no dependen de la temperatura. La ecuación [1.4] representa una relación lineal entre $\ln (K_A)$ y $1/T$ con pendiente = $-\Delta H/R$ y una intersección con el eje $y = \Delta S/R$, por lo tanto, es posible calcular ΔH y ΔS . Para una reacción endotérmica, la pendiente es negativa y, a medida que la temperatura aumenta, la constante de equilibrio aumenta ($-\Delta H/R < 0$). Para una reacción exotérmica, la pendiente es positiva y, a medida que aumenta la temperatura, la constante de equilibrio disminuye ($-\Delta H/R > 0$). Si el ΔH y ΔS varían con la temperatura la pendiente de la recta variará, la no linealidad indica que los dos reactivos tienen diferentes capacidades caloríficas. ΔH , es un parámetro termodinámico fundamental que describe la cantidad de calor liberado o absorbido en el curso de la reacción y el ΔS representa el estado más probable de todas las posibilidades estadísticas del sistema, se considera importante para determinar si una reacción tendrá lugar o no, basándose en el principio de que un sistema menos ordenado es más probable estadísticamente que un sistema más ordenado.

En esta sección, calculamos los valores de K_A a partir de los valores de la K_D^{-1} obtenidos a través de titulaciones al equilibrio como se explicó anteriormente, a diferentes temperaturas entre 15 - 30 °C (288.15 - 303.15 K). Luego graficamos el logaritmo natural de K_A versus $1/T$ (K^{-1}) (Figura I.16). A partir de la pendiente obtuvimos el valor de ΔH ($-7.8 \pm 0.35 \text{ kcal/mol}$) y a partir de la ordenada obtuvimos el valor de ΔS ($0.01 \pm 0.001 \text{ kcal/K}$). Es decir, la reacción es exotérmica, entálpicamente dirigida y entrópicamente favorable ($\Delta H < 0$ y $\Delta S > 0$).

A partir de la ecuación [1.3] realizamos el cálculo del ΔG , obteniendo un valor de -10.8 kcal/mol , lo que nos indicaría que la reacción ocurre espontáneamente en sentido directo para formar más productos, en nuestro caso el complejo $M_{2-1}:\text{ARN}$.

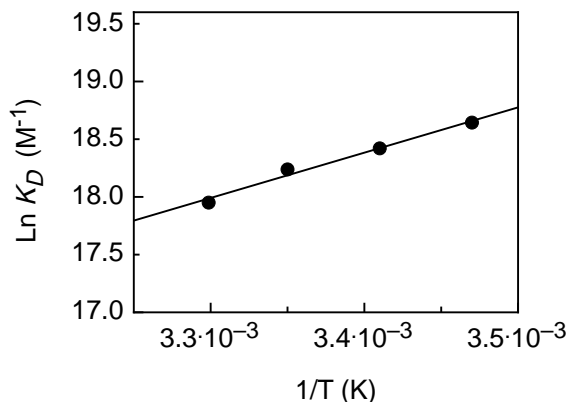


Figura I.16. Gráfico de Van't Hoff para la unión M₂₋₁:ARN. El gráfico se construyó aplicando logaritmo natural de la constante de afinidad obtenida a diferentes temperaturas (15, 20, 25 y 30 °C) versus 1/T en Kelvin. La regresión lineal nos permite obtener los parámetros termodinámicos, ΔH (pendiente) y ΔS (ordenada).

I.8. Estudio de la disociación del complejo M₂₋₁:ARN.

Como un análisis complementario de las interacciones estudiadas en este capítulo, abordamos el estudio cinético de la reacción de disociación del complejo M₂₋₁:ARN a través de experimentos de desplazamiento del ARN utilizando oligonucleótidos sin marcar de dos longitudes y afinidades distintas por M₂₋₁ y la proteína P. Como se describió previamente en la introducción, M₂₋₁ posee una región donde P y ARN se unen de manera competitiva ya que estos sitios se encuentran parcialmente solapados (41). El experimento se realizó formando un complejo estequiométrico 6-FAM ARN 20mer con M₂₋₁ (100 nM) (Figura I.17.A), el agregado de M₂₋₁ a la cubeta que contiene ARN marcado produce una disminución de la señal de fluorescencia a 525 nm (Figura I.17.A) y una vez estabilizada la misma se agregó un exceso molar (10 μM) de ARN 20mer (Figura I.17.B), ARN 15mer (Figura I.17.C) o la proteína P (Figura I.17.D); el desplazamiento se hace visible por el aumento de la señal de fluorescencia del ARN marcado que es desplazado del complejo con M₂₋₁.

Cuando el reactivo desplazante fue el ARN se observó que la disociación ocurría dentro del tiempo muerto de mezcla (8 segundos) y que la reacción de unión era reversible con un alto porcentaje de recuperación de señal para el caso del ARN 20mer, en cambio con ARN 15mer se requirió un exceso molar mayor (>20 veces, no se muestra). Esto sugiere fuertemente que la especie de ARN 20mer establece contactos adicionales en el tetrámero M₂₋₁ que no pueden ser desplazados por las moléculas de ARN 15mer, lo cual concuerda también con la mayor afinidad observada para las especies de 20mer en experimentos al equilibrio frente a oligonucleótidos de 15mer o menos. En la disociación con la proteína P, se observa que la reacción de unión es reversible con un alto porcentaje de recuperación de la señal de fluorescencia, pero con una cinética más lenta (Figura I.17.D).

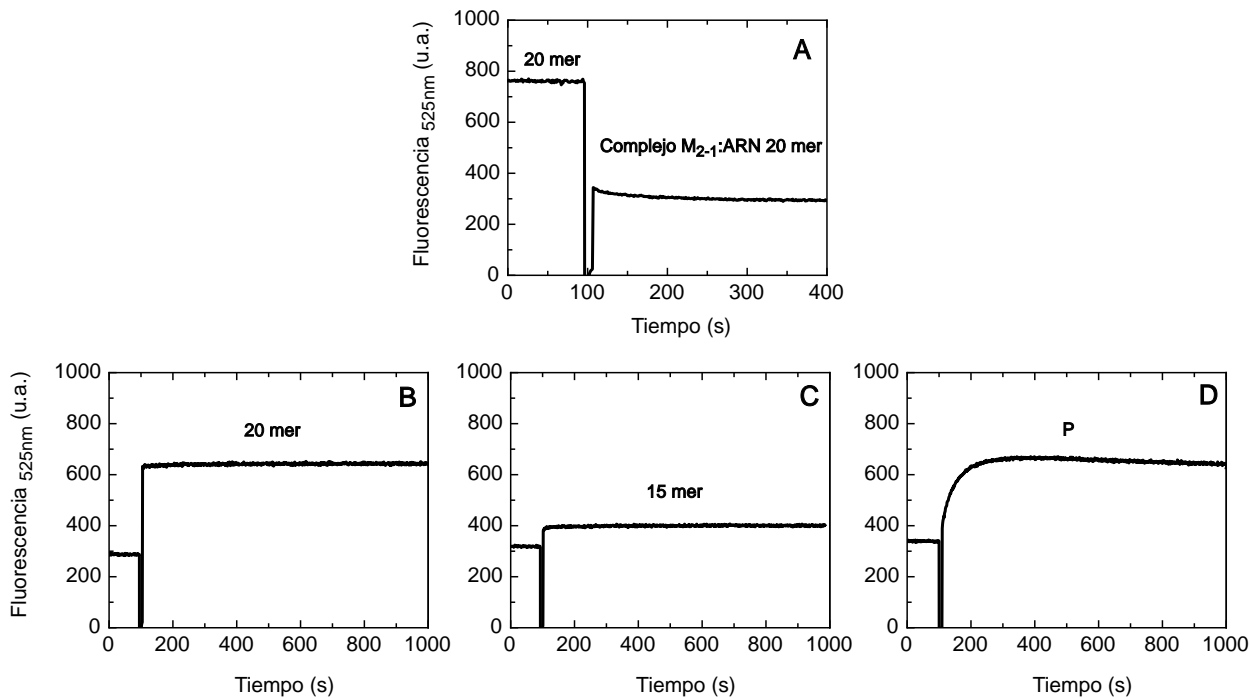


Figura I.17. Complejo M₂₋₁:ARN. Competencia entre ARN y P por la unión a M₂₋₁. La señal del ARN 6-FAM 20mer (100 nM) fue seguida por fluorescencia a 525 nm. Se agregó una concentración saturante de M₂₋₁ a la cubeta para permitir la asociación (A). Luego de la estabilización de la señal se indujo la disociación del complejo mediante la adición de un exceso (10 μM) de la especie disociante sin marcar, ARN 20mer (B), ARN 15mer (C) y P (D).

Los datos fueron ajustados correctamente a una función exponencial doble (Figura I.18) tomando como tiempo cero el tiempo de agregado del exceso molar de P. Estos resultados indican que el proceso de disociación ocurre en dos o más etapas cinéticas; un escenario posible que explique este proceso podría ser que, el ARN está siendo desplazado de manera secuencial del complejo con M₂₋₁, es decir primero es desplazado uno de los ARN y luego el siguiente con distinta velocidad, lo que concuerda también con la formación del complejo de M₂₋₁ con ARN 20mer, el cual ocurre en dos etapas o más e incluye un rearrreglo conformacional.

Del ajuste de los datos de la curva de disociación se calcularon los valores de las constantes cinéticas del proceso, cuyos valores fueron de $k_1 = 0.029 \pm 0.0006 \text{ s}^{-1}$ (34 segundos) y $k_2 = 0.0065 \pm 0.00005 \text{ s}^{-1}$ (154 segundos), las velocidades observadas de la reacción hacen posible visualizar el evento de disociación en fluorímetro, a diferencia de lo que ocurre con el ARN cuando actúa como desplazante.

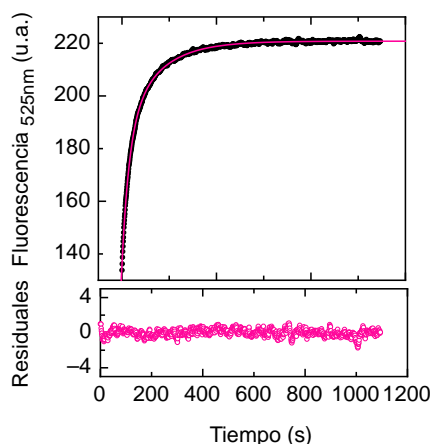


Figura I.18. Ajuste de la cinética de disociación del ARN del complejo con M_{2-1} por P. La disociación mostrada en la figura I.17.D fue ajustada a una ecuación exponencial doble para obtener las constantes cinéticas de salida del ARN del complejo con M_{2-1} .

I.9. Estudio de la disociación del complejo $M_{2-1}:P$ y $M_{2-1}:P_{NTET}$.

La reacción de disociación del complejo $M_{2-1}:P$ se evaluó a través de experimentos de desplazamiento con ARN 20mer y la proteína P siguiendo la metodología detallada anteriormente, en este caso se siguió la señal de anisotropía de fluorescencia de P marcada con FITC ya que se obtuvo una mejor relación señal/ruido. Se investigó la cinética de disociación del complejo $M_{2-1}:FITC-P$ formando un complejo estequiométrico (100 nM) del mismo (Figura I.19.A), lo cual produce un aumento en la señal de anisotropía de fluorescencia y una vez estabilizada la misma, se agregó un exceso molar (10 μ M) de P (Figura I.19.B) o ARN 20mer (Figura I.19.C) ambos sin marcación; el desplazamiento de P del complejo es visualizado por una disminución en la señal de anisotropía.

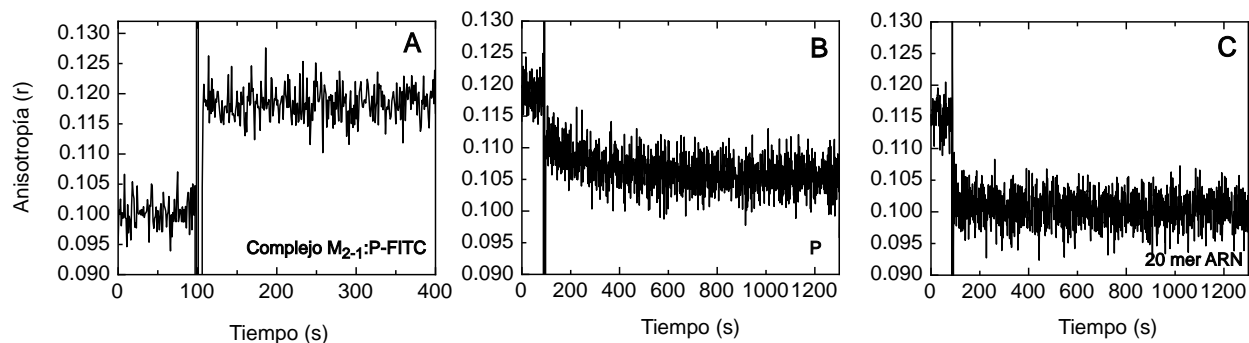


Figura I.19. Complejo $M_{2-1}:P$. Competencia entre ARN y P por la unión a M_{2-1} . La señal de P marcado con FITC (100 nM) fue seguida por anisotropía de fluorescencia. Se agregó una concentración saturante de M_{2-1} a la cubeta para permitir la asociación (A). Luego de la estabilización de la señal se indujo la disociación del complejo mediante la adición de un exceso (10 μ M) del disociante frío, P (B) y ARN 20mer (C).

Si bien el cambio de señal observado no es muy amplio, se logró ver que la disociación o la mayor parte de ella ocurría dentro del tiempo muerto de mezcla (8 segundos) y que la

reacción de unión es reversible con un alto porcentaje de recuperación de señal tanto para la disociación con ARN como con P.

Para realizar un análisis específico, se decidió utilizar un fragmento de la proteína P (P_{NTET}) (ver Figura Anexo 7) que incluye la región previamente descrita a la que se une M_{2-1} (73,102). Se llevó a cabo el mismo experimento explicado anteriormente para la proteína P completa, formando un complejo estequiométrico FITC- P_{NTET} : M_{2-1} (100 nM) (Figura I.20.A) y una vez estabilizada la señal de anisotropía de fluorescencia se agregó un exceso molar (10 μ M) de ARN 20mer (Figura I.20.B), ARN 15mer (Figura I.20.C) o la proteína P completa (Figura I.20.D). Se produjo desplazamiento de P_{NTET} del complejo con M_{2-1} y se observó que la disociación ocurría dentro del tiempo muerto de mezcla (8 segundos) y que la reacción de unión es reversible con un alto porcentaje de recuperación de señal para la disociación con ARN 20mer y con P (96% y 100% respectivamente), en cambio para al ARN 15mer la recuperación fue menor (42%), sugiriendo una clara diferencia de afinidad entre los complejos.

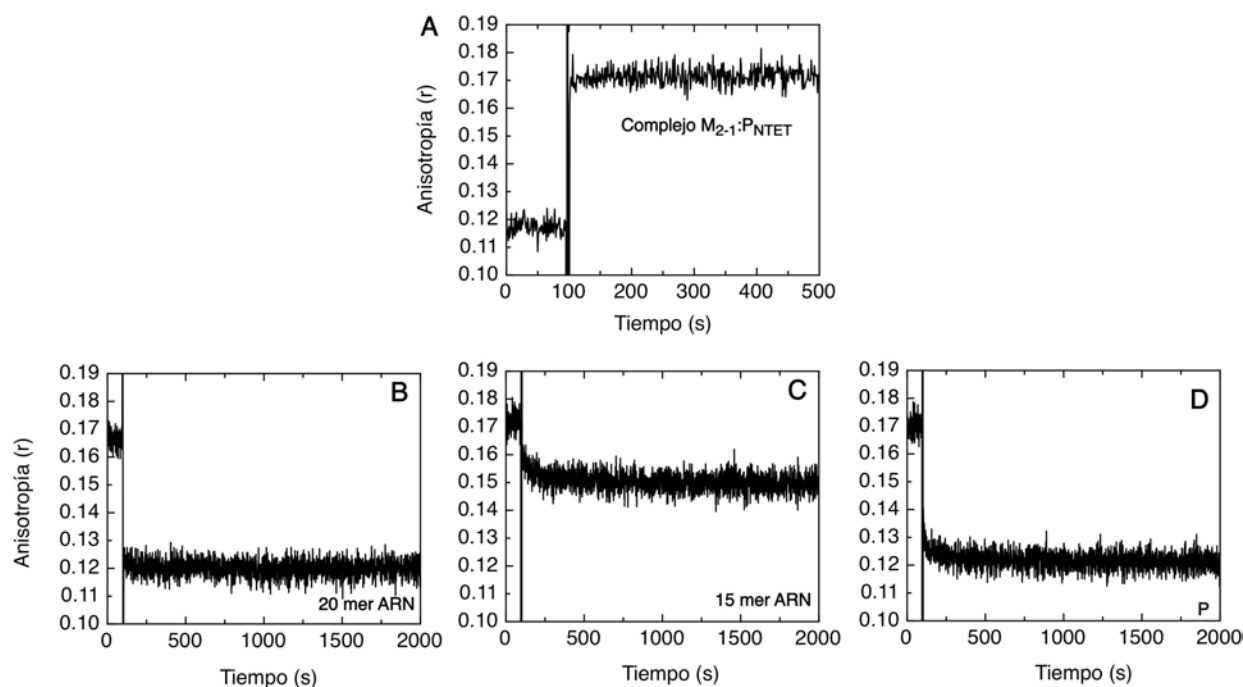


Figura I.20. Complejo M_{2-1} : P_{NTET} . Competencia entre ARN y P por la unión a M_{2-1} . La señal de P_{NTET} marcado con FITC (100 nM) fue seguida por anisotropía de fluorescencia. Se agregó una concentración saturante de M_{2-1} a la cubeta para permitir la asociación (A). Luego de la estabilización de la señal se indujo la disociación del complejo mediante la adición de un exceso (10 μ M) del disociante frío, ARN 20mer (B), ARN 15mer (C) y P (D).

Como un análisis complementario se decidió realizar el estudio físico de la disociación de P_{NTET} del complejo con M_{2-1} por ARN. Para ello se realizaron experimentos de cambio de movilidad electroforética (EMSA) en geles de agarosa. En primer lugar, se evaluó la asociación con la proteína M_{2-1} , se utilizó una concentración fija del fragmento P_{NTET} marcado con FITC (3

μM) y se agregaron concentraciones crecientes de M_{2-1} (0.5 - 12 μM), se incubaron unos minutos y se realizó la corrida del gel (ver materiales y métodos). El gel se reveló y se observó la formación de complejo $\text{M}_{2-1}:\text{P}_{\text{NTET}}$ (Figura I.21.A). Luego, se decidió evaluar el desplazamiento con ARN, para ello se utilizó un exceso creciente de ARN 20mer sin marcar (0.5 - 20x). Se observó que con un exceso de 10x se obtenía una recuperación de la banda de P_{NTET} sola, casi en un 100% (Figura I.21.B), con lo cual se puede confirmar por otra técnica la capacidad desplazante del ARN.

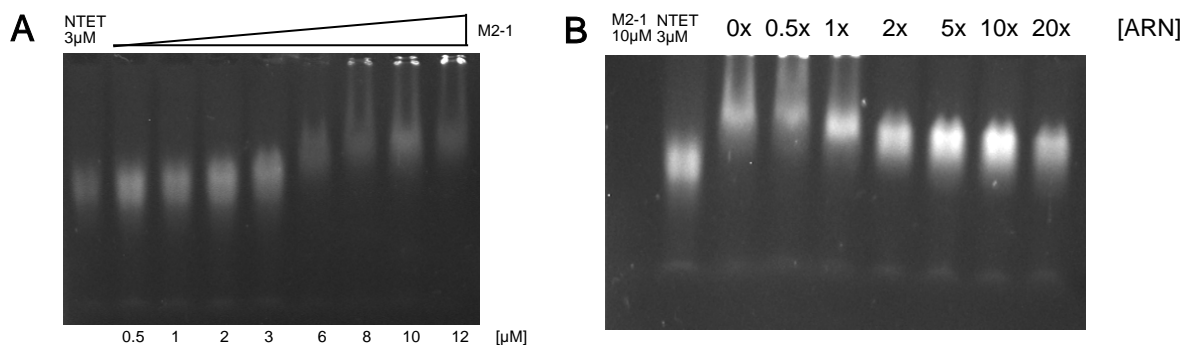


Figura I.21. Complejo $\text{M}_{2-1}:\text{P}_{\text{NTET}}$. Competencia entre ARN y P_{NTET} por la unión a M_{2-1} evaluado por EMSA. (A) Asociación de P_{NTET} con M_{2-1} . A una concentración fija de P_{NTET} (3 μM) marcado con FITC se le adicionaron concentraciones crecientes de M_{2-1} (0.5-12 μM) y se observó el cambio de movilidad electroforética. **(B)** Disociación del complejo $\text{P}_{\text{NTET}}:\text{M}_{2-1}$ con ARN. Se utilizaron cantidades crecientes de ARN hasta un exceso 20x para evaluar la capacidad de disociación.

Para poder cuantificar estos desplazamientos que cinéticamente ocurren en el tiempo muerto de mezcla del fluorímetro sería útil realizar estos experimentos utilizando “stopped flow” cuyo tiempo muerto se encuentra entre 1-2 milisegundos, de esta manera se podría conocer con mayor detalle el proceso de salida de P o P_{NTET} del complejo con M_{2-1} .

DISCUSION I

Un mecanismo bien descrito de antiterminación en virus eucarióticos es el de la regulación de la transcripción del VIH (95). En este caso, la pausa en el promotor proximal en la región líder del virus detiene la transcripción por la ARN polimerasa II, permitiendo la formación de la horquilla TAR en el ARNm naciente y un complejo represor con la proteína de unión a ARN NELF. El factor antitaminador viral Tat recluta factores de elongación, permitiendo la disrupción de complejos represores y reiniciando la transcripción de genes víricos (103). Un fenómeno conservado en genes procarióticos, eucarióticos y virales es la interacción de proteínas antiterminadoras con secuencias o elementos estructurales de ARN (36). Estas proteínas pueden unirse al ARN e interrumpir la formación de estructuras de ARN, a través de una unión que puede ser específica de la secuencia, como en el caso del regulador del operón hut, HutP (104) o inespecífico, como en la respuesta global a la temperatura de las proteínas de choque frío (*cold shock proteins*) (105).

El mecanismo por el cual la maquinaria de transcripción reconoce las señales GS y GE aún no ha sido esclarecido. Los GE de RSV tienen una longitud de 12-13 nucleótidos, poliadenilación directa y terminación de la transcripción. Sin embargo, se desconoce si la unión de factores a estas secuencias reguladoras enlentece o detiene la elongación (106,107) para activar la poliadenilación y la liberación del ARNm naciente. Los GE contienen tres regiones: un pentanucleótido conservado (3'-UCAAU-5') seguido de una secuencia rica en AU de 3-4 nucleótidos no conservada y un tracto final poli-U de 4-5 nucleótidos (Figura I.22).

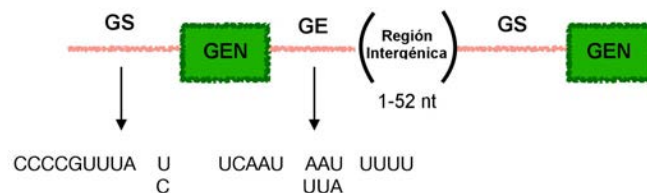


Figura I.22. Esquema general de la organización y estructura de las señales de transcripción GS y GE en el genoma de RSV. Se observa la región GS y GE flanqueando cada gen con sus respectivas secuencias. A su vez, cada gen se encuentra separado del otro a través de una región intergénica de longitud variable.

Se propuso que M_{2-1} se une a GE con especificidad de secuencia, permitiendo que el complejo transcriptasa evite esta señal funcional y genere transcritos de lectura directa (16). Se demostró que M_{2-1} aumenta los niveles de transcripción de lectura directa en todas las uniones de genes en diferentes grados, pero la falta de correlación entre la fuerza de la unión de M_{2-1} a diferentes regiones de GE y la eficiencia de la antiterminación (27,108), apoya la hipótesis de que M_{2-1} se une potencialmente a varios sitios en el genoma o antigenoma de ARN más allá de las secuencias GE.

En trabajos previos se propusieron diferentes alternativas para sitios de unión a ARN, incluyendo la región líder (43), ARNm virales y secuencias de ARN ricas en A, pero también se cuestionó la ausencia de especificidad de secuencia para M_{2-1} de RSV (16) y la proteína VP30 de Ebola homóloga (109). Un estudio anterior probó GEs de 13mer de una selección de genes, suponiendo que estos eran posibles sitios de unión de ARN específicos para M_{2-1} del RSV (16). A pesar de la alta conservación de secuencia inherente a estos GE, las afinidades difirieron de 5 a 15 veces para GE de sentido positivo y de sentido negativo en comparación con el GE del gen SH tomado como referencia (46 nM). Además, la mayor afinidad fue descrita para una porción de poli-A, lo que llevó a los autores a proponer que M_{2-1} se une al ARNm viral co-transcripcionalmente y preferentemente en secuencias 3' ricas en A, en consonancia con los fragmentos ricos en U encontrados en GE del genoma viral. Nuestros resultados con ARN 20mer relacionados y no relacionados al genoma de RSV ($K_D = 14-16$ nM) poseen afinidades idénticas a las del fragmento poli-A ($K_D = 19$ nM) (16), lo que es notable teniendo en cuenta que los experimentos se llevaron a cabo por diferentes grupos de trabajo. Estos resultados apoyan la hipótesis de que M_{2-1} es capaz de unir secuencias GE, pero también otras regiones ricas en A en el genoma o ARNm subgenómicos con afinidad comparable, dejando abierta la cuestión con respecto al grado de especificidad de las interacciones M_{2-1} /ARN. En este escenario, M_{2-1} podría asociarse a múltiples sitios además de los GE, alterando las estructuras locales de ARN y facilitando la elongación. Entre los *Mononegavirales*, la proteína VP30 demostró tener similitudes funcionales (110) y estructurales (53) con la proteína M_{2-1} , ya que se une al ARN, actuando como factor antiterminador o de procesividad. Curiosamente, una investigación reciente de la unión de VP30 a un gran número de sustratos de ARN también concluyó que la especificidad de unión era bastante laxa, similar a lo que se ha observado para M_{2-1} previamente (109) y en esta tesis. En cualquier caso, sitios de unión de ARN exclusivos para M_{2-1} RSV, M_{2-1} HMPV o VP30 no se han establecido fehacientemente.

Basados en estudios cristalográficos del tetrámero M_{2-1} HMPV unido a ADN y AMP (50), Leyrat y col. propusieron que la molécula de ARN puede interactuar simultáneamente con la región N-terminal de unión a zinc y el dominio core C-terminal. La existencia de dos sitios de unión de ARN también se vio respaldada por el hecho de que hay una mayor afinidad por el ARN poli-A 13mer comparado con el 8mer (K_D 20 nM versus 3.4 μ M) (16). Análisis mutacionales sugirieron que los residuos R3 y R4 N-terminales participan en la unión a ARN. Sin embargo, el doble mutante R3A/R4A reveló un modesto cambio de 2 veces en su K_D en relación con M_{2-1} RSV salvaje (16). Esto sugiere que el aumento de 15 veces la afinidad que observamos para los ARN 20mer que se unen al tetrámero M_{2-1} se origina principalmente en la tetramerización que acerca dos dominios *core*, permitiendo que los ARN más largos puenteen dos sitios de

unión de ARN adyacentes, y que la contribución a la afinidad de unión general de las interacciones adicionales con R3/R4 sea menor. Otro ejemplo relacionado es la proteína Nab2, que contiene motivos de zinc CCCH en tándem que reconocen las secuencias de ARN poli-A y la longitud de la molécula de ARN también influye en la afinidad de unión del ARN. La estructura de Nab2 en complejo con ARN mostró que tres motivos de zinc CCCH formaban una única unidad estructural ordenada que contacta con ocho A consecutivas aumentando la afinidad de unión de 16 μM de un ARN poli-A 6mer a 100 nM de un ARN poli-A 15mer (111).

En esta tesis hemos demostrado que la disposición cuaternaria de M_{2-1} que conduce a sitios de unión de ARN contiguos es un determinante para la unión de ARN. Mientras que el monómero de M_{2-1} (M_{2-1} core) siempre se une al ARN con una estequiometría 1:1 (M_{2-1} :ARN), por lo que el modo de unión del ARN al tetrámero depende de la longitud del ARN. Mientras que los ARN cortos tienen un modo de unión 1:4 (4 ARN por tetrámero M_{2-1}) y no muestran cooperatividad, los ARN más largos establecen una estequiometría de unión 1:2 (2 ARN por tetrámero M_{2-1}), donde la disposición que implica que cada molécula de ARN conecta dos sitios de unión equivalentes de monómeros adyacentes es la más probable. La cooperatividad positiva se observa exclusivamente en la interacción 1:2, que mejora la afinidad de unión más de 15 veces, lo que conduce a la formación de un complejo de afinidad nanomolar baja. Las secuencias de ARN utilizadas en este trabajo se definieron en base a un análisis de conservación de secuencia previo en los GE. Sin embargo, la naturaleza exacta de los sitios de M_{2-1} específicos, si es que estos existen, no se ha definido, ni en secuencia ni en extensión. En un escenario donde M_{2-1} se encuentra estrechamente asociada con la polimerasa, las dos cadenas de ARN unidas por el tetrámero M_{2-1} podrían representar el ARN molde y el ARN transcripto. Alternativamente, M_{2-1} podría actuar como un antiterminador al evitar la formación de estructuras secundarias del ARN al unir dos regiones diferentes de una única cadena de ARN más larga.

Es importante destacar que la asociación bimolecular de ARN 20mer relacionado y no relacionado con el tetrámero M_{2-1} se acompaña de un rápido reordenamiento conformacional ($t_{1/2} < 4$ s) de la molécula de ARN. Tras la asociación bimolecular, se producen reordenamientos sutiles del complejo M_{2-1} :ARN a través de un mecanismo de ajuste inducido con un $t_{1/2}$ de 100 s, dando lugar al complejo final estable.

En cuanto al comportamiento cooperativo se pueden destacar varias afirmaciones vinculadas. En primer lugar, M_{2-1} tiene la capacidad de desplegar la estructura del ARN, muy probablemente debido a la interrupción de las interacciones hidrofóbicas de apilamiento de bases, como se describió previamente para las interacciones de ribonucleoproteínas dentro de los componentes de la maquinaria de *splicing* (112). Las estructuras formadas por estos ARN

20mer no son del tipo horquilla altamente estable, a menudo observadas en sitios reguladores de la transcripción viral basados en el apareamiento de bases intracatenaria. Proponemos que se trata de una estructura localmente estable que resulta del apilamiento de bases a modo de colapso hidrofóbico. Este pre-equilibrio entre ARN estructurado y desplegado es muy rápido, concomitante con la colisión inicial con la proteína que probablemente selecciona la especie desplegada.

Los reordenamientos conformacionales sutiles, pero funcionalmente determinantes en el complejo corresponden a la proteína y son consistentes con un mecanismo de ajuste inducido, apoyado por una prueba cinética cuantitativa (88). Mientras que en el caso de M_{2-1} la evidencia de CD indica que no hay cambios importantes en la estructura secundaria luego de la unión, los movimientos de bisagra pueden reubicar los dominios de unión a ARN, como se muestra para la proteína M_{2-1} HMPV, donde la transición de una conformación "abierta" a "cerrada" se observa en la asociación del ARN (50). Nuestros resultados resaltan la importancia de la unión multi-sitio y de las transiciones conformacionales alostéricas en el reconocimiento del ARN, como los que tienen lugar en proteínas multidominio de diferentes disposiciones (113,114). El motivo de unión a zinc juega un papel clave en el cambio entre alternativas estructurales, ya que la eliminación del zinc revela una apertura gradual de los protómeros disminuyendo el número de contactos entre los dominios (115). En M_{2-1} , los dominios que poseen los sitios de unión a ARN están estrechamente conectados por la naturaleza homotetramérica de la proteína, donde la unión de manera débil de un primer tramo del ARN aumenta la concentración efectiva dando como resultado un gran aumento en la afinidad, debido a un componente entrópico favorable. Este también parece ser el caso de la proteína VP30 de Ebola funcionalmente relacionada, que implica una disposición hexamérica y muestra una longitud óptima de 40 bases para la unión (109). VP30 se une a una región terminal 3' del genoma, con una K_D aparente de $0.35 \mu\text{M}$ (116). Curiosamente, las mutaciones que destruyen la capacidad de formar homohexámeros o alterar el dominio de unión a zinc, deterioran la unión al ARN y la activación transcripcional (110). Se probó un gran número de secuencias y longitudes de ARN, pero los cambios de afinidad fueron moderados (0.3 a $1.0 \mu\text{M}$, que corresponde a las diferencias en las energías de unión de menos de $0.7 \text{ kcal mol}^{-1}$) (109). Esto respalda además que dicha actividad antiterminadora encontrada hasta ahora solo en pneumovirus y filovirus puede no requerir sitios únicos de unión específica de alta afinidad.

Parece probable que la unión del ARN a M_{2-1} se oriente electrostáticamente más que por el reconocimiento de una secuencia específica, como mostramos en este trabajo donde por un lado vimos afinidades iguales o mayores que las observadas para los fragmentos de poli-A y una fuerte influencia de la fuerza iónica del medio en la formación del complejo M_{2-1} :ARN, es

decir, la formación del complejo se encuentra gobernada por una interacción del tipo electrostática. La unión de dos macromoléculas flexibles (proteína y ARN) involucra una serie de cambios energéticos que definen la unión. En este trabajo fueron determinados los parámetros termodinámicos de la unión M_{2-1} :ARN y se observó que la reacción se encuentra entálpicamente dirigida con un cambio de entropía despreciable, lo que favorece aún más la formación del complejo, más allá de las superficies cargadas que podrían estar mediando esta unión.

Estudios cristalográficos, simulaciones moleculares y estudios en solución revelaron que la proteína M_{2-1} HMPV estrechamente relacionada a M_{2-1} RSV presenta una topología de plegamiento y tetramerización similar, pero una configuración asimétrica con un dominio rígido de tetramerización y dominios *core* dinámicos (16). Curiosamente, estudios por SAXS revelaron un conjunto altamente dinámico en solución, en la que cada dominio *core* en el tetrámero existe en equilibrio entre conformaciones abiertas y cerradas, y el tratamiento con EDTA aumenta la proporción de confórmers abiertos, ya que como mencionamos anteriormente el zinc ayuda a mantener la estructura tetramérica nativa. Además, se propuso que la unión del ARN favorece el estado cerrado (16). Es esperable que la proteína M_{2-1} RSV altamente homóloga muestre un comportamiento similar, pero dado que las estructuras cristalinas no pueden revelar procesos dinámicos que ocurren en solución, esta cuestión requiere mayor investigación.

Se desconoce cómo se traduce la unión del ARN a M_{2-1} en el efecto sobre la polimerasa como factor de procesividad, esto podría estar mediado por la interacción de M_{2-1} con la fosfoproteína P. Se demostró que el ARN y P compiten por la unión a M_{2-1} (41). Sus superficies de interacción en M_{2-1} se encuentran parcialmente superpuestas (Figura I.23) (16,37), respaldado por el gran volumen hidrodinámico de P observado previamente en nuestro laboratorio (72) lo que apoya aún más el desplazamiento mutuo por un impedimento estérico, dado que la presencia de uno obstaculiza la unión del otro.

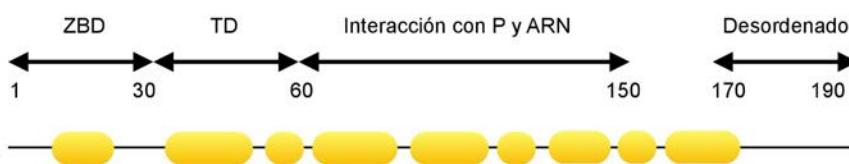


Figura I.23. Esquema de la organización de M_{2-1} . Se muestran las diferentes regiones de M_{2-1} , el motivo de unión a zinc (ZBD), el dominio de tetramerización (TD), el sitio de unión de P y ARN en el *core* o dominio central y una región C-terminal desestructurada. Abajo se muestran las α hélices que conforman a M_{2-1} , la misma adopta una conformación α helicoidal altamente estructurada en solución.

Tanto la unión de los ARN como vimos en este capítulo como la unión de P a M_{2-1} (72) son de alta afinidad, pero los desplazamientos se vieron afectados según el desplazante en

exceso utilizado. En el estudio mecanístico de la competencia entre ARN y P por la unión al antiterminador realizado en este capítulo, observamos un desplazamiento de ARN o de P del complejo con M_{2-1} total en ambos casos, pero encontramos una diferencia en la velocidad con la que se desplazaba a uno o al otro. Previamente se creía que la fosforilación de P en la treonina 108 prevenía la interacción de P con M_{2-1} (61), pero en este trabajo hemos demostrado que el ARN es capaz de desplazar a P del complejo en ausencia de fosforilación por lo cual, la unión de uno u otro a M_{2-1} tendría que ver más con las concentraciones de cada uno de los componentes presentes en el medio.

Los resultados obtenidos en este capítulo, proporcionan un primer y significativo paso para comprender la antiterminación en la familia *Pneumoviridae* y también representa uno de los pocos estudios mecanísticos de la asociación y disociación viral antiterminador-ARN. La cooperatividad se encuentra a menudo en las interacciones proteína-ARN, mostramos cómo la asociación de sitios de unión de protómeros adyacentes permite una unión de alta afinidad en ausencia de especificidad de secuencia. Se espera que otros estudios confirmen o descarten la presencia de sitios de unión específicos en el genoma o los ARNm subgenómicos de los pneumovirus y el grado de unión a otras regiones, lo que debería ser respaldado por estudios estructurales que proporcionen un nivel molecular de especificidad a través del reconocimiento específico de la base.

La pregunta abierta es cómo opera M_{2-1} en la antiterminación o aumento de la procesividad de transcripción. ¿Es a través de la estabilización del complejo polimerasa-nucleoproteína, o mediante la ruptura de estructuras de ARN que enlentecen o interrumpen el complejo?, ¿requiere un reconocimiento específico de ARN? Las direcciones futuras deben apuntar al análisis estructural de los complejos relevantes, complementados por estudios en solución y evaluación de la unión de M_{2-1} en el contexto de todos los componentes del complejo ARN polimerasa, incluidas las moléculas de ARN más largas. Esperemos que esto también se extienda a otras proteínas antiterminadoras como VP30 de Ebola.

CAPITULO II

ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE M₂₋₁, LA PROTEÍNA P Y SUS DOMINIOS EN EL EQUILIBRIO

INTRODUCCION

Como se mencionó previamente, la proteína M₂₋₁, un tetrámero globular en solución, es un factor importante de la transcripción para todos los miembros de la familia *Pneumoviridae*. Actúa como un factor elongador del complejo polimerasa, permitiendo la síntesis eficiente de ARN mensajeros por parte de la polimerasa (25) y, además, actúa como factor antiterminador de la transcripción permitiéndole a la polimerasa atravesar eficientemente las señales de terminación de la transcripción (108) y las diversas regiones intergénicas (26); recientemente se han descrito posibles nuevas funciones de M₂₋₁ como la del transporte o acompañamiento de ARNm hacia el citoplasma para su traducción (102).

La fosfoproteína P es una proteína tetramérica, que media el ensamblado del complejo polimerasa de RSV. Hasta el momento, no se cuenta con estructura cristalográfica o por RMN de sus módulos o dominios. Estudios bioinformáticos y de proteólisis limitada sugieren que P presenta una organización modular compuesta por tres regiones (63): el módulo N terminal (residuos 1-103), la región central (residuos 104-161) que incluye al dominio de tetramerización (residuos 119-161), y el módulo C terminal (residuos 161-241). Estos estudios predicen que los módulos N y C terminales serían intrínsecamente desordenados (63). Esta fosfoproteína permanece como un tetrámero por encima de 70 °C, pero muestra una transición de estructura secundaria reversible pronunciada entre 10 y 45 °C (72). Mientras que el módulo N-terminal se comporta como una estructura *random coil* tipo IDP independiente de la tetramerización, el módulo C-terminal aislado muestra una transición metaestable cooperativa y reversible, y el dominio de tetramerización lo vuelve más estructurado y estable (73).

Se ha observado que M₂₋₁ y P co-localizan en cuerpos de inclusión (71) asociados a la síntesis del ARN viral (117). En el 2003 *Mason et.al.* identificó de manera cualitativa la existencia de un potencial sitio de interacción en la región comprendida entre los residuos 100-120, identificando particularmente a los residuos L101, Y102 y I109 como residuos claves para la interacción con M₂₋₁ (42). Recientemente se mostraron los residuos de P críticos para esta interacción con M₂₋₁ (93-110) y demostraron que son necesarios para el reclutamiento del antiterminador a inclusiones citoplásmicas, donde se concentran proteínas del complejo polimerasa y se produce la síntesis de ARN viral (102).

Por otra parte, en nuestro laboratorio se comprobó que esta interacción en solución involucra la formación de un complejo con una K_D de 8 nM y una estequiometría de interacción 1:1, comprendiendo un tetrámero de M₂₋₁ por cada tetrámero de P (72). El análisis del comportamiento hidrodinámico del complejo y de la modulación de estructura secundaria

durante la interacción demostraron la existencia de compactación con ganancia de α -hélice en alguno ó en los dos componentes del complejo durante la interacción (72). Debido a que M_{2-1} presenta un comportamiento hidrodinámico típico de una proteína globular en solución (39,41), hipotetizamos que la mayor parte del cambio conformacional asociado a la compactación durante la interacción está dada en P, probablemente asociada a alguno de sus dos módulos desordenados. Frente a estos antecedentes propusimos la hipótesis de que los cambios estructurales y la compactación que se observa en P durante la interacción con M_{2-1} están centrados en los dos ó alguno de los dos módulos desordenados de P. El Objetivo general de esta sección es identificar los determinantes estructurales, biofísicos y termodinámicos asociados a la interacción entre las proteínas P y M_{2-1} .

Nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Identificar los determinantes estructurales mínimos de P involucrados en la interacción con M_{2-1} a través de cromatografía de exclusión molecular.
- Analizar la interacción de los fragmentos por métodos de espectroscopia de fluorescencia, con el fin de evaluar la estequiometría y constantes de afinidad.
- Determinar la influencia de la fuerza iónica en la interacción.
- Estudiar los cambios estructurales asociados a la interacción.
- Realizar el estudio termodinámico de la interacción por calorimetría de titulación isotérmica.

RESULTADOS

II.1. Análisis de los requerimientos estructurales de P en la interacción P: M_{2-1} por cromatografía de exclusión molecular.

Con la finalidad de identificar que módulos de P se encuentran involucrados en la unión con M_{2-1} nos propusimos estudiar dicha interacción mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) para evaluar la formación de los complejos, así como también obtener información del comportamiento hidrodinámico de cada una de las especies involucradas. Para ello utilizamos la proteína P y sus fragmentos, generados previamente en el laboratorio (73) (Figura Anexo 7), P_N , P_{NTET} y P_{TETC} .

Cada experimento consistió en evaluar el perfil de exclusión molecular de las distintas muestras aisladas o formando complejo, los mismos fueron realizados a temperatura ambiente en buffer 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl. Para cada par de proteínas (M_{2-1} y fragmento de P a evaluar) se determinaron los volúmenes de elución (V_e) correspondientes, y luego se evaluó la interacción realizando mezclas de 5 μ M M_{2-1} y 4 μ M fragmento de P. Como control

positivo evaluamos la formación del complejo $M_{2-1}:P$ (Figura III.3.3-A) donde se puede observar que los picos correspondientes a las corridas individuales de cada fragmento eluyen en posiciones definidas $V_e \sim 10$ ml para P (línea negra) y $V_e \sim 15$ ml para M_{2-1} (línea celeste).

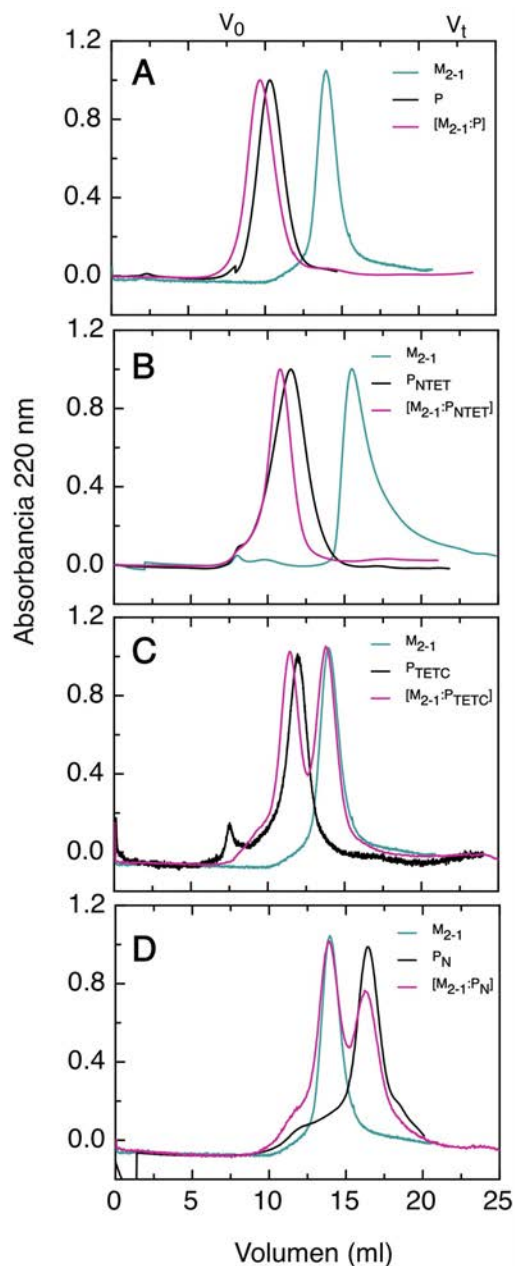


Figura II.1. Análisis de la interacción entre M_{2-1} y los distintos fragmentos de P por SEC. Cada panel representa un experimento individual donde se evaluaron los perfiles cromatográficos de $5 \mu\text{M}$ de M_{2-1} (A-D) (línea celeste); $4 \mu\text{M}$ P (A), P_{NTET} (B), P_{TETC} (C) o P_{N} (D) (línea negra) y la mezcla 1:1 de los distintos fragmentos con M_{2-1} (A-D) (línea violeta). En el panel superior se indican las posiciones del V_0 y V_t de la columna. Los complejos fueron incubados 1 hora previo a la corrida.

Al evaluar la interacción de M_{2-1} con los distintos fragmentos P_{NTET} , P_{TETC} y P_{N} , el único fragmento que presenta interacción con M_{2-1} es P_{NTET} (Figura II.1.B), donde nuevamente se

puede observar la aparición de un pico homogéneo con un $V_e \sim 11$ ml y la desaparición del pico de M_{2-1} ($V_e \sim 15$ ml) (Figura II.1.B, línea celeste). Los perfiles cromatográficos de las mezclas de M_{2-1} con P_{TETC} ó P_N presentan las bandas individuales de cada uno de los fragmentos (Figura II.1.C y D, líneas violetas) evidenciando bajo estas condiciones experimentales ausencia de interacción y que el principal determinante de la interacción con M_{2-1} se encuentra en la región P_{NTET} . Para evaluar si la interacción entre M_{2-1} y P_{NTET} presenta una estequiometría de interacción similar a la observada para P (estequiometría 1:1) (72), se estudiaron distintos complejos formados con $5 \mu\text{M}$ M_{2-1} y concentraciones crecientes de P_{NTET} (0 a $4 \mu\text{M}$) por SEC (Figura II.2). Debido a que el V_e del complejo $P_{NTET}:M_{2-1}$ y el V_e de P_{NTET} son indistinguibles, se evaluó la desaparición del pico correspondiente a M_{2-1} ($V_e \sim 15$ ml) mediante la determinación de la absorbancia a 220 nm al aumentar la relación molar $[P_{NTET}:M_{2-1}]$ (Figura II.2). De la regresión lineal se observa que la especie M_{2-1} libre desaparece a una relación molar $[P_{NTET}:M_{2-1}]$ de 1, lo cual concuerda con la estequiometría propuesta para la proteína entera (Figura II.2, recuadro).

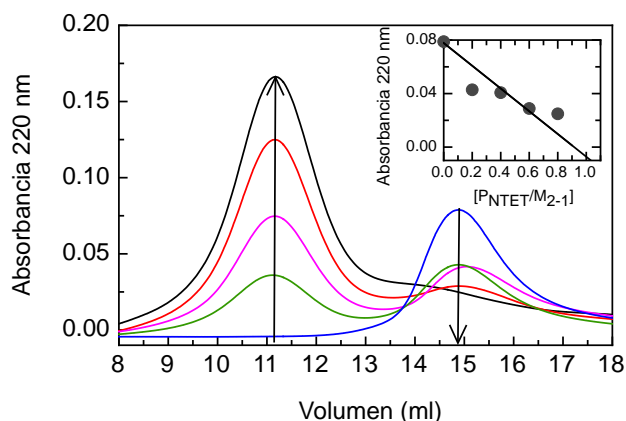


Figura II.2. Análisis de la estequiometría de interacción entre M_{2-1} y P_{NTET} por SEC. Se realizaron corridas utilizando una concentración fija de M_{2-1} ($5 \mu\text{M}$) con la cual, se formaron complejos con concentraciones crecientes de P_{NTET} (0, 1, 2, 3 y $4 \mu\text{M}$). La formación del complejo fue evidenciada por la disminución del pico de M_{2-1} libre. En el recuadro se muestra la variación de la absorbancia de M_{2-1} en función de la relación molar P_{NTET}/M_{2-1} .

Como se mostró en los antecedentes, P es el componente que se compacta durante la formación del complejo con M_{2-1} . Para estudiar si dicho comportamiento también ocurre en el fragmento P_{NTET} , se calcularon los radios hidrodinámicos por SEC ($R_{S\text{ SEC}}$) para cada uno de los componentes de la interacción. Para ello se realizó una corrida de calibración con marcadores de peso molecular globulares (tiroglobulina (669kDa), ferritina (440kDa), catalasa (232kDa), BSA (67 kDa), ovoalbúmina (43kDa) y ribonucleasa A (13.7 kDa)) y se definieron las posiciones del volumen muerto (V_0) y el volumen total (V_T) utilizando el polímero azul dextrano y acetona, respectivamente. Para cada componente se determinó la constante de partición ($K_d = (V_e -$

$V_0)/(V_T-V_0))$ y se la graficó en función del logaritmo del peso molecular. Los datos fueron ajustados a una recta, de la cual se obtuvieron los parámetros que nos permitieron realizar las determinaciones de los pesos moleculares aparentes (PM_{SEC}) (Tabla II.1 y Figura II.3). Los radios hidrodinámicos (RS) fueron determinados a partir de la siguiente ecuación que relaciona el peso molecular para proteínas globulares plegadas con el RS ($\log(RS, \text{nativo}) = -0.254 + 0.37 * \log(PM)$) (118). El radio hidrodinámico promedio obtenido para M_{2-1} en estas condiciones coincide con los RS previamente descritos en literatura (3.6 ± 0.2 nm) (41). Por otra parte, los RS de P_{NTET} y del complejo $P_{NTET}:M_{2-1}$ presentan valores similares (Tabla II.1), con valores promedio de ~ 6 nm.

Tabla II.1. Valores de PM y RS obtenidos por SEC, para los componentes individuales M_{2-1} , P_{NTET} y el complejo que forman ambos.

Proteína	PM_{SEC} (KDa)	$RS_{(SEC)}$ (nm)
M_{2-1}	71 ± 3	3.4 ± 0.1
P_{NTET}	283 ± 22	5.8 ± 0.2
$P_{NTET}:M_{2-1}$	303 ± 14	6.0 ± 0.1

PM: peso molecular obtenido por SEC. RS: radio hidrodinámico obtenido por SEC.

Estos datos sugieren que durante la formación del complejo existe un reordenamiento estructural en alguno de los componentes del mismo, llevando a la formación de un complejo más compacto. Estos resultados en conjunto con los antecedentes presentados para P, nos permiten proponer que es el tetrámero extendido P_{NTET} el que adopta una conformación más compacta cuando se encuentra formando parte del complejo con M_{2-1} .

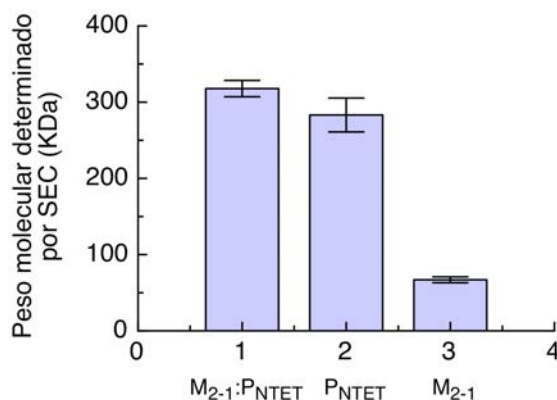


Figura II.3. Análisis comparativo de las propiedades hidrodinámicas de P_{NTET} , M_{2-1} y el complejo $P_{NTET}:M_{2-1}$. El gráfico de barras representa los valores de peso molecular estimados a partir de la corrida de filtración molecular para el complejo $P_{NTET}:M_{2-1}$ y para las proteínas individuales P_{NTET} y M_{2-1} . Las barras de error representan el desvío estándar obtenido a partir de tres repeticiones individuales de las corridas.

II.2. Estudio de la interacción $P:M_{2-1}$ por espectroscopia de fluorescencia.

Debido a la naturaleza de las medidas de SEC, las interacciones evidenciadas por este método son principalmente de alta afinidad. Esto es debido a que durante la corrida la muestra estudiada es diluida entre 5 y 10 veces al atravesar la columna. Para nuestro caso particular, dado que se trabajó en una concentración entre 4-5 μM de proteína, no se pudieron identificar interacciones con K_D mayores a 500 nM.

Para caracterizar la interacción de forma cuantitativa se desarrolló un ensayo para medir la asociación entre M_{2-1} y los distintos fragmentos de P (P_{NTET} , P_N y P_{TETC}) en solución mediante la marcación de los fragmentos de P con FITC. Se puso a punto un protocolo de marcación que garantizó la marcación simple en el amino terminal de los todos fragmentos (ver materiales y métodos). La marcación con FITC permite medir el cambio en la anisotropía de fluorescencia resultante de la interacción de los distintos fragmentos marcados con M_{2-1} . Se realizaron curvas de titulación mediante el agregado de cantidades crecientes de una solución concentrada de M_{2-1} a una cubeta conteniendo una concentración fija de fragmento de P marcado, y se determinó la anisotropía de la muestra una vez alcanzado el equilibrio de la reacción (incubación de 5 minutos entre punto y punto). En todos los casos, se observó un aumento en la anisotropía de la molécula de FITC en los complejos permitiendo seguir la curva de asociación entre las dos especies. En primer lugar, para confirmar la estequiometría 1:1 $M_{2-1}:P_{\text{NTET}}$ determinada por SEC, se realizaron curvas de asociación al equilibrio utilizando concentraciones de 100 nM y 200 nM de FITC- P_{NTET} (Figura II.4).

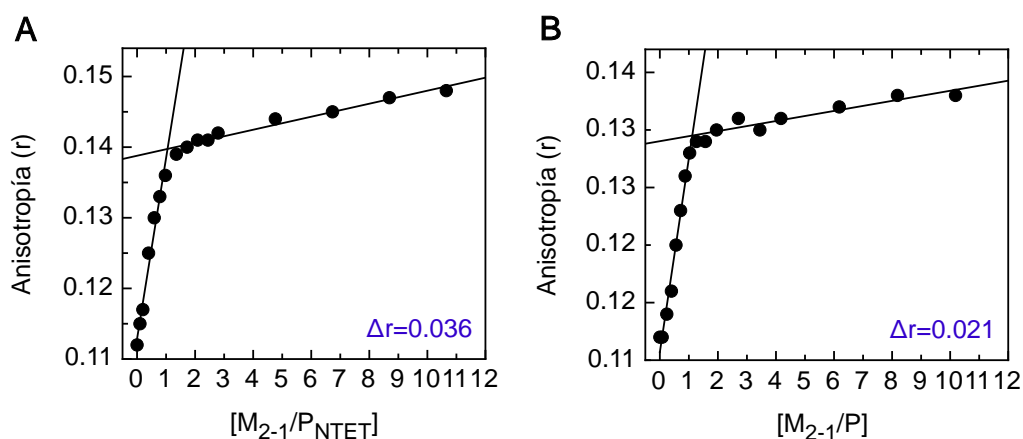


Figura II.4 Determinación de estequiometría de la unión entre M_{2-1} y P_{NTET} por anisotropía de fluorescencia. (A) Complejo $M_{2-1}:P_{\text{NTET}}$. (B) Control $M_{2-1}:P$. En la figura se indican los deltas de anisotropía totales de cada medición. Las rectas corresponden con ajustes lineales de las pendientes iniciales y finales respectivamente. Los experimentos se realizaron titulando una concentración fija de P_{NTET} o P marcado con FITC con concentraciones crecientes de M_{2-1} hasta la saturación.

En la Figura II.4.A, se muestra la curva obtenida para 100 nM FITC- P_{NTET} , donde se puede observar que la señal de anisotropía aumenta de forma lineal hasta alcanzar la

saturación. La estequiometría de interacción la se determinó como el punto en donde se da el cruce de las dos rectas obtenidas a partir de la pendiente final e inicial de la asociación. Esta observación nos permite confirmar la estequiometría 1:1 evidenciada para la interacción $P_{\text{NTET}}:M_{2-1}$ en los experimentos de SEC. Como control de las condiciones experimentales se evaluó la interacción entre P y M_{2-1} utilizando 100 nM de FITC-P (Figura II.4.B).

A continuación, fueron realizadas titulaciones a concentraciones subestequiométricas de sonda y de este modo estimar los valores de K_D . Se realizaron titulaciones utilizando una concentración fija de FITC- P_{NTET} en la cubeta (10-50 nM) y se agregaron cantidades crecientes de M_{2-1} hasta lograr la saturación. Los datos fueron ajustados a una ecuación de un modelo de unión 1:1 para obtener la K_D (Figura II.5) (ver materiales y métodos); lo mismo se realizó para la proteína P que se utilizó como referencia (no se muestra).

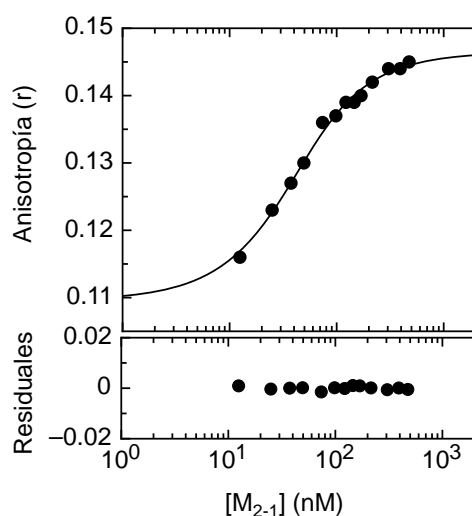


Figura II.5. Determinación de la constante de disociación al equilibrio del complejo $M_{2-1}:P_{\text{NTET}}$. Cambio en la anisotropía de fluorescencia de P_{NTET} FITC frente a la adición de concentraciones crecientes del tetrámero M_{2-1} , en condiciones sub-estequiométricas.

De esta manera se obtuvo un valor de la constante de disociación del complejo $M_{2-1}:P_{\text{NTET}}$ de 25 ± 5 nM y un ΔG correspondiente de $-10.4 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (Tabla II.2). La K_D es un poco mayor que la obtenida para la proteína completa (3.5 ± 1.4 nM) y todo indica que el componente energético mayoritario de la unión se encuentra en el fragmento P_{NTET} ya que para la proteína completa se obtuvo un ΔG de $-11.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Si bien en los experimentos de SEC no se visualizó unión entre M_{2-1} y los fragmentos P_{TETC} y P_{N} , no se descartan interacciones de baja afinidad, por lo tanto, se decidió evaluar la formación de estos complejos nuevamente por otra técnica, en este caso anisotropía de fluorescencia. Bajo las mismas condiciones que se realizaron los experimentos de interacción entre M_{2-1} y P_{NTET} , no se observó un cambio en la señal de anisotropía, por lo cual se decidió

utilizar concentraciones mayores de sonda (FITC- P_{TETC} y FITC- P_N). La unión fue evaluada con $1 \mu\text{M}$ de sonda, para el caso de P_N no se visualizó un cambio significativo en la señal al agregar concentraciones crecientes de M_{2-1} (Figura II.6.B), pero para el caso de P_{TETC} , si bien se observó un cambio de señal, la misma no saturó incluso a altas concentraciones del titulante (Figura II.6.A). Los datos de la titulación de P_{TETC} con M_{2-1} fueron ajustados a una ecuación para un modelo 1:1 pudiendo estimarse un valor de $K_D > 10 \mu\text{M}$, significativamente mayor al valor obtenido para P_{NTET} . Con un ΔG aproximado de $-6.8 \text{ kcal.mol}^{-1}$, sugiriendo algún tipo de interacción débil establecida en esta región. Todos los valores obtenidos se encuentran resumidos en la Tabla II.2.

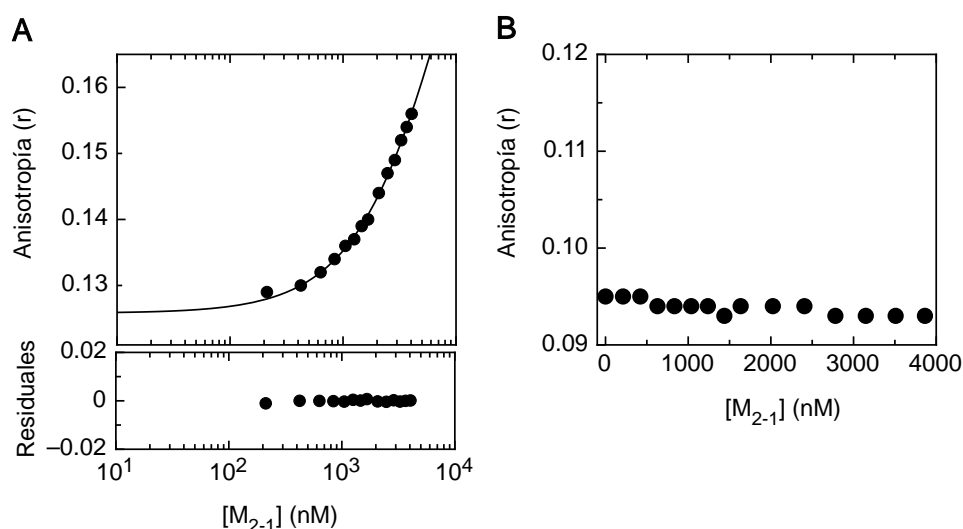


Figura II.6. Interacción de los fragmentos de P con el tetramero M_{2-1} . Titulación de $1 \mu\text{M}$ P_{TETC} FITC (A) o $1 \mu\text{M}$ P_N FITC (B) con concentraciones crecientes del tetramero M_{2-1} seguido por anisotropía de fluorescencia.

Tabla II.2. Unión de M_{2-1} con P y sus fragmentos.

Fragmento	Estado Oligomérico	Esteq	K_D	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	r_0	r_{final}	Δr
P-FITC	Tetramero	1:1	$3.5 \pm 1.4 \text{ nM}$	-11.5	0.095	0.103	0.008
P_{NTET} -FITC	Tetramero	1:1	$25 \pm 5 \text{ nM}$	-10.4	0.110	0.147	0.037
P_{TETC} -FITC	Tetramero	ND	$> 10 \mu\text{M}$	> -6.8	0.126	0.229	0.103
P_N -FITC	Monómero	ND	ND	ND	0.094	--	--

ND: no determinado. r_0 : valor de anisotropía inicial. R_{final} : valor de anisotropía final.

Existe evidencia de la unión de la proteína P al core de M_{2-1} , en el 2012 Blondot y col. determinaron que se encuentran involucradas las α hélices 4, 5 y 6 del antiterminador. Utilizando un monómero de M_{2-1} ($M2-1_{58-177}$) evaluaron la interacción con la proteína P completa, pudiendo determinar una estequiometría de unión 1:1 y una afinidad de $3 \mu\text{M}$.

Teniendo en cuenta lo detallado anteriormente, se utilizó el dominio monomérico de M_{2-1} de 121 aminoácidos generado en nuestro laboratorio, M_{2-1} core para evaluar la interacción con el fragmento P_{NTET} por anisotropía de fluorescencia y de este modo estudiar las regiones involucradas de la interacción $M_{2-1}:P$. Para ello, se realizaron titulaciones al equilibrio en condiciones disociantes, utilizando una concentración fija de FITC- P_{NTET} en la cubeta (400 nM) con el agregado de concentraciones crecientes de M_{2-1} core hasta lograr la saturación de la señal (Figura II.7.A). También se realizó una titulación de FITC-P con M_{2-1} core bajo las mismas condiciones como referencia (Figura II.7.B).

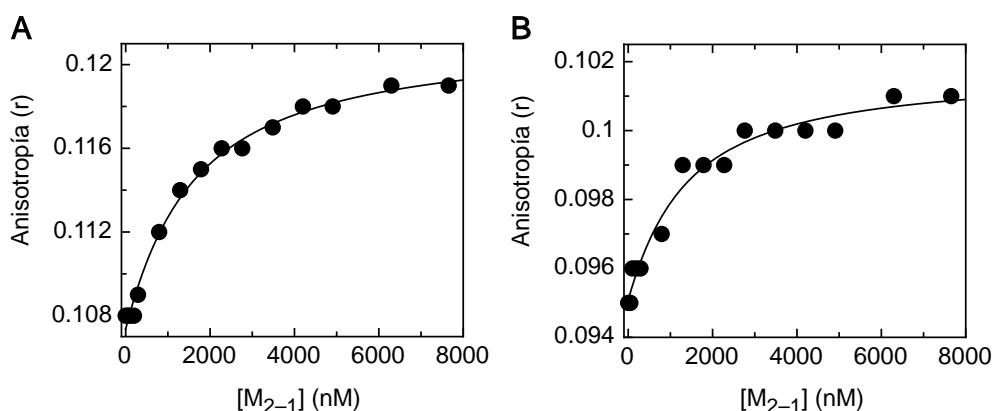


Figura II.7. Interacción de P_{NTET} con M_{2-1} core. Titulación de 400 nM P_{NTET} FITC (A) o 400 nM P FITC (B) con concentraciones crecientes del monómero M_{2-1} core seguido por anisotropía de fluorescencia.

En principio se observó que existe una alta dependencia de la fuerza iónica de la interacción, ya que a las concentraciones de NaCl que se realizaron los experimentos anteriores (0.3 M NaCl) con la proteína M_{2-1} de tamaño completo la interacción fue indetectable, por lo que decidimos bajar la concentración de sal del buffer a 0.1 M para poder observar la unión.

Las curvas fueron ajustadas a una ecuación de un modelo de unión 1:1 y pudimos observar que no hay diferencias significativas de afinidad entre P y P_{NTET} , (Tabla II.3) siendo este último la región mínima de unión al core de M_{2-1} . Por otro lado, se observó que existe un efecto en conjunto de la monomerización y/o presencia de sitios adicionales de unión a P en M_{2-1} (N-terminal) que causa una disminución en la afinidad ~ 25 veces (Tabla II.2 y Tabla II.3), con un $\Delta\Delta G$ de $3.4 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para P y de $2.4 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para P_{NTET} .

Tabla II.3. Unión de M_{2-1} core con P y P_{NTET} .

Fragmento	K_D	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	r_0	r_{final}	Δr
P-FITC	$1.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$	-8.1	0.095	0.102	0.007
P_{NTET} -FITC	$1.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$	-8.0	0.107	0.121	0.014

r_0 : valor de anisotropía inicial. r_{final} : valor de anisotropía final.

II.3. Efecto de la fuerza iónica en la interacción $M_{2-1}:P_{NTET}$.

Analizando la distribución de cargas en la superficie de M_{2-1} (pI 9.13) y del modelo de P (pI 4.5), observamos un posible componente electrostático. Para estudiar este efecto en la interacción se utilizó el mismo buffer, pero variando la fuerza iónica de la solución. Se determinó la constante de disociación del complejo $M_{2-1}:P_{NTET}$ utilizando el mismo buffer pero modificando la concentración de NaCl entre 0.1 y 1 M y el cálculo de la constante de disociación se realizó utilizando la misma metodología que en las titulaciones al equilibrio realizadas anteriormente en el presente capítulo para una unión 1:1. En la Figura II.8.A se observa cómo se modifican las curvas de titulación de acuerdo a la concentración de sal utilizada, como así también se puede ver el ajuste de cada una de las curvas que nos permitió obtener la K_D . En la Figura II.8.B se muestra la variación de las K_D en función de la fuerza iónica y puede observarse que la K_D fue debilitada a mayor concentración de NaCl (Tabla II.4).

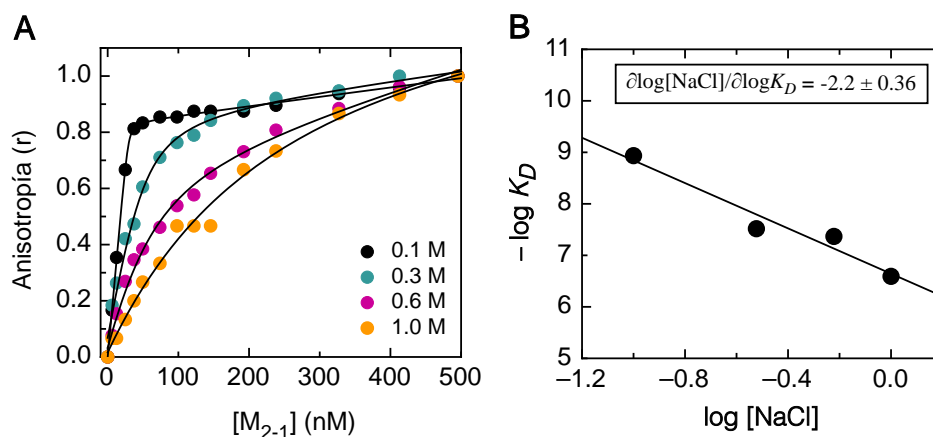


Figura II.8. Dependencia de la afinidad en función de la fuerza iónica. Los datos fueron obtenidos a partir del ajuste de curvas de titulación de FITC- P_{NTET} con concentraciones crecientes de tetrámero M_{2-1} seguido por anisotropía de fluorescencia (A). Se obtuvieron los valores de constantes de afinidad al equilibrio a distintas concentraciones de NaCl (B).

Tabla II.4. Efecto de la fuerza iónica en la interacción $M_{2-1}:P_{NTET}$.

[NaCl] (M)	K_D (nM)
0.1	1.2 ± 0.6
0.3	25 ± 5
0.6	43 ± 9
1	255 ± 15

A alta fuerza iónica se produce un aumento en la constante dieléctrica del medio que atenúa los potenciales electrostáticos debilitando las interacciones de tipo electrostático. El efecto es conocido como apantallamiento de cargas. Esto nos sugiere que la formación del

complejo estaría fuertemente influenciada por la cantidad de sal presente en el medio, por lo tanto, existen fuerzas electrostáticas que están mediando la interacción de M_{2-1} con P.

II.4. Competencia entre P y sus fragmentos por la unión a M_{2-1} .

Con el fin de comparar la contribución de los fragmentos de P en la unión con M_{2-1} , se llevaron a cabo ensayos de competición. Para realizar estos experimentos, se formó un complejo estequiométrico de 100 nM FITC-P: M_{2-1} el cual fue desplazado mediante el agregado de cantidades crecientes (0 - 3.6 μ M) de cada una de las variantes de P sin marcar (P de tamaño completo, P_{NTET} , P_{TETC} y P_N) (Figura II.9) siguiendo el cambio de anisotropía de fluorescencia. Al realizar los experimentos con los fragmentos P_{TETC} y P_N como desplazantes, los mismos no produjeron desplazamiento significativo de P del complejo con M_{2-1} . En cambio, tanto para los experimentos realizados con P como para P_{NTET} se observó desplazamiento de FITC-P del complejo con M_{2-1} . Utilizando estos datos a través de la ecuación derivada de Kuzmic (89) (ver materiales y métodos) se obtuvo el valor de la constante de disociación para cada variante estudiada (Figura II.9).

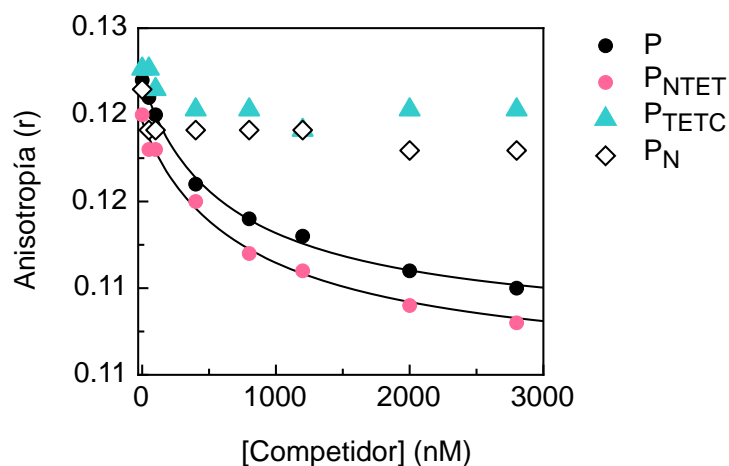


Figura II.9. Desplazamiento de P FITC del complejo con M_{2-1} con los fragmentos de P. Se formó el complejo con 100 nM de P FITC y 300 nM de M_{2-1} , luego se agregaron concentraciones crecientes del desplazante frío (P_{TETC} , P_N , P y P_{NTET}) hasta 3.6 μ M, incubando 5 minutos entre punto y punto seguido por anisotropía de fluorescencia.

Los resultados obtenidos a partir de los ajustes de los datos se muestran en la Tabla II.5. Se observó que el principal componente de la unión a M_{2-1} se encuentra en el fragmento P_{NTET} , ya que tanto para este último como para P completa se obtuvieron valores de K_D similares, al igual que la energía de la unión está aportada principalmente por el fragmento P_{NTET} al no encontrarse diferencias significativas en los ΔG obtenidos (Tabla II.5).

Tabla II.5. Experimentos de competición entre P y sus fragmentos por la unión a M_{2-1} .

Proteína	K_D (nM)	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	r_i	r_f
P	18.4 ± 2.6	-10.6 ± 1.7	0.158	0.112
P_{NTET}	22.8 ± 4.5	-10.4 ± 1.4	0.156	0.109
P_{TETC}	ND	ND	0.152	0.150
P_N	ND	ND	0.156	0.153

ND: no determinado. r_i : valor de anisotropía antes del desplazamiento. r_f : valor de anisotropía después del desplazamiento.

II.5. Rearreglos estructurales en el complejo M_{2-1} :P.

Una parte de la disección del mecanismo de interacción entre M_{2-1} y P consiste en el análisis de posibles cambios conformacionales producto de la unión, en uno o ambos componentes. Para ello, se realizaron espectros de CD en UV lejano de M_{2-1} , P y la mezcla 1:1 del complejo, y se comparó la suma aritmética de los espectros (espectro M_{2-1} más espectro P) con la mezcla 1:1 de ambos componentes y se observó la presencia o no de cambios en la estructura secundaria de los mismos. En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se vió que el espectro del complejo real obtenido de la mezcla de los tetrámeros mostró un aumento sustancial en el contenido de α hélice, lo que sugirió una reorganización estructural en una o ambas proteínas tras la formación del complejo (72). Por lo tanto, se decidió diseccionar estos reordenamientos o cambios estructurales que ocurrían en P, por lo que se utilizaron los fragmentos P_{NTET} y P_{TETC} . Se realizaron los espectros de CD en UV lejano de cada componente individual (M_{2-1} , P_{NTET} , P_{TETC} y a la proteína P como referencia), como así también, se formaron los complejos estequiométricos P: M_{2-1} , P_{NTET} : M_{2-1} y P_{TETC} : M_{2-1} , los cuales fueron comparados con la suma aritmética de los espectros individuales (espectro M_{2-1} más espectro del fragmento de P) (Figura II.10).

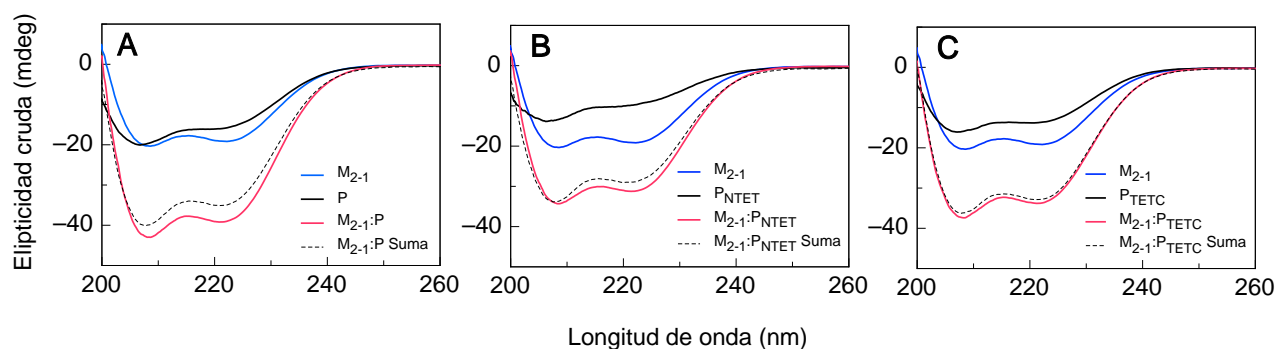


Figura II.10. Disección de los rearrreglos estructurales dentro del complejo M_{2-1} :P seguidos por dicroísmo circular UV lejano. Reordenamientos estructurales de 6 μ M de los complejos M_{2-1} : P (A), M_{2-1} : P_{NTET} (B) y M_{2-1} : P_{TETC} (C). Los espectros mostrados corresponden a 6 μ M de los componentes individuales (negro y azul), el espectro suma aritmética o teórica (línea punteada negra) y el espectro experimental del complejo (rojo).

Se visualizó una diferencia entre los espectros de CD del complejo y la suma aritmética para $M_{2-1}:P_{\text{NTET}}$ (Figura II.10.B), al igual que lo observado para la proteína P (referencia) (Figura II.10.A), este cambio puede atribuirse a una reorganización conformacional dentro del complejo, el cual no se observa para $M_{2-1}:P_{\text{TETC}}$ donde los espectros de la suma aritmética y de la suma experimental son idénticos, lo que sugiere que no hay cambios de estructura secundaria que se originen en este fragmento. Por lo tanto, se puede decir que los cambios estructurales con ganancia de α hélice se encuentran originados principalmente en el fragmento P_{NTET} .

II.6. Análisis termodinámico de la interacción $M_{2-1}:P$.

Para comprender el mecanismo de interacción entre M_{2-1} y P es necesario realizar también un análisis termodinámico del mismo, para ello se utilizó la técnica de calorimetría de titulación isotérmica (ITC). Este método permite determinar cuantitativamente de manera directa el cambio de entalpia (ΔH), la constante de afinidad (K_A), cuyo valor recíproco es la K_D y la estequiometría de la reacción. Luego a partir de estos valores, utilizando distintas relaciones termodinámicas (ver materiales y métodos) obtener los valores de ΔG y el componente entrópico de la interacción. La disección de la energía libre de unión en sus componentes entálpico y entrópico nos permite realizar un análisis más detallado de los resultados presentados previamente. Por último, el cambio de la capacidad calorífica a presión constante (ΔC_p) resulta de medir el ΔH en función de la temperatura, por lo que también pudo ser determinado por esta técnica. Generalmente, los cambios de ΔC_p están relacionados al ocultamiento de superficie al solvente luego de formada la interfaz molecular.

Inicialmente antes de comenzar los experimentos de ITC, se establecieron las condiciones óptimas de medición, ya que estos experimentos se realizan a altas concentraciones de proteína por lo tanto es necesaria la planificación previa antes de llevarlos a cabo. Se decidió seguir utilizando el buffer 20 mM fosfato pH 7.4 y 300 mM de NaCl ya que se ha observado que el fosfato y la sal estabilizan a M_{2-1} principalmente cuando se encuentra a altas concentraciones. Otro factor que se tuvo en cuenta es que para los experimentos presentados previamente fue utilizado ditioneitol (DTT) en el buffer de unión dado que la presencia de un agente reductor en soluciones experimentales a menudo es necesaria para que algunas proteínas mantengan su actividad y estabilidad y/o eviten que forme agregados. El DTT es inestable y tiende a sufrir oxidación en la solución en presencia de aire por lo cual, podría tener un efecto adverso en la línea base de la calorimetría. Se ha probado que otro agente reductor como lo es el β -Mercaptoetanol no produce este efecto, con lo cual se utilizó para nuestros experimentos de ITC en una proporción de 5 mM. Por otro lado, se decidió colocar en la celda de mezclado a M_{2-1} ya que se necesita menos concentrada y nos garantiza

su estabilidad, y en la jeringa como titulante colocamos a P más concentrada la cual es más estable a altas concentraciones.

Las calorimetrías fueron medidas utilizando 40 μM de M_{2-1} en la celda y se tituló con 400 μM de la proteína P en la jeringa (ver materiales y métodos), evaluando diferentes temperaturas, 15, 20, 25, 30 y 35 $^{\circ}\text{C}$ (Figura II.11), todas en el mismo buffer el cual fue el mismo utilizado para realizar varias rondas de diálisis de ambas proteínas (ver materiales y métodos).

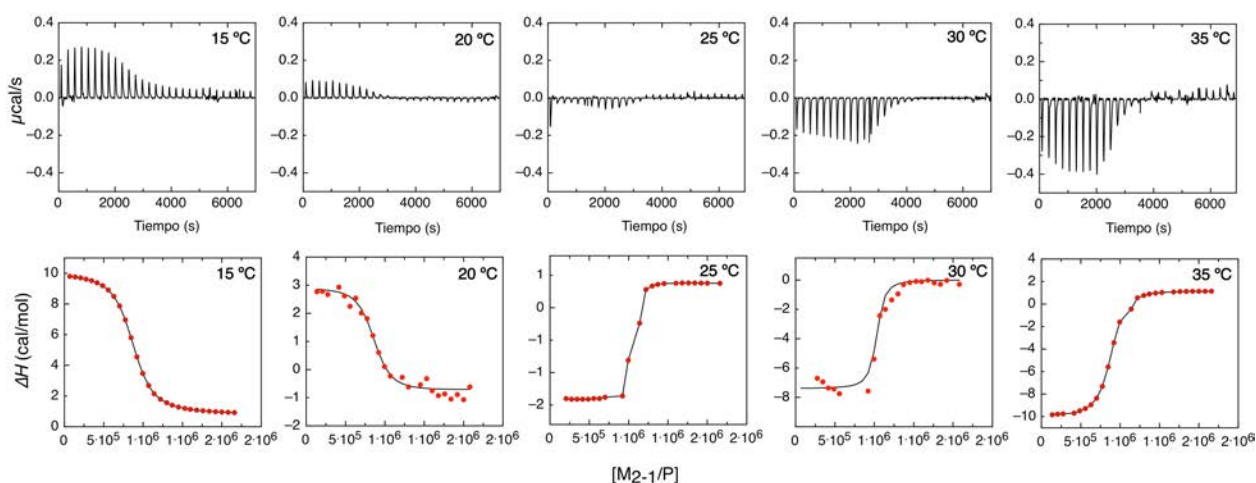


Figura II.11. $\text{M}_{2-1}:\text{P}$ experimentos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) a diferentes temperaturas. En los paneles superiores podemos observar los datos crudos de ITC para cada temperatura (15-35 $^{\circ}\text{C}$) del complejo $\text{M}_{2-1}:\text{P}$. En los paneles inferiores se muestran los ajustes de cada isoterma para obtener los parámetros termodinámicos.

Los datos obtenidos de las titulaciones fueron procesados utilizando AFFINIMETER, una aplicación desarrollada para optimizar el diseño de experimentos de ITC, para analizar las mediciones, ayudar en la interpretación de los datos y organizar los resultados. Los ajustes de cada isoterma se muestran en los paneles inferiores de la Figura II.11 y los datos obtenidos de los ajustes se muestran en la Tabla II.6.

Tabla II.6. Datos termodinámicos de la unión $\text{M}_{2-1}:\text{P}$ obtenidos por ITC.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Temperatura (K)	ΔH ($\text{cal}\cdot\text{mol}^{-1}$)	ΔS ($\text{cal}\cdot\text{K}^{-1}$)	ΔG ($\text{cal}\cdot\text{mol}^{-1}$)	K_D (nm)	Estequiometría
15	288.15	5706	52,50	-9424,6	71 ± 7	1
20	293.15	3800	44,34	-9196,8	139 ± 59	0,84
25	298.15	-1658	24,65	-9005,9	250 ± 30	1,16
30	303.15	-7680	9,45	-10543,9	25 ± 2	0,99
35	308.15	-16550	-19,91	-10414,9	41 ± 3	0,97

A partir de los datos obtenidos de los ajustes de las curvas de titulación se puede decir en primer lugar que tanto los valores de K_D que se encuentran en el orden nanomolar como los valores de la estequiometría de unión (Tabla II.6) concuerdan con los datos obtenidos por otras técnicas (SEC y anisotropía de fluorescencia) para la unión $M_{2-1}:P$.

En segundo lugar, al analizar los datos termodinámicos se observó que, a temperaturas más bajas la reacción es endotérmica y a medida que aumenta la temperatura la reacción se va haciendo exotérmica, y se mantiene entálpicamente favorable a temperaturas mayores de 298 K (valores de ΔH negativos, Figura II.12.A). También se observó como la entropía fue disminuyendo a medida que aumentaba la temperatura (Figura II.12.B), estos cambios junto con los del ΔH originan una compensación entrópica/entálpica que permite mantener la energía de unión (ΔG) constante y negativa (Figura II.12.C), es decir, termodinámicamente favorable, lo que asegura una unión fuerte entre las proteínas M_{2-1} y P ($\Delta G \sim -10 \text{ kcal.mol}^{-1}$).

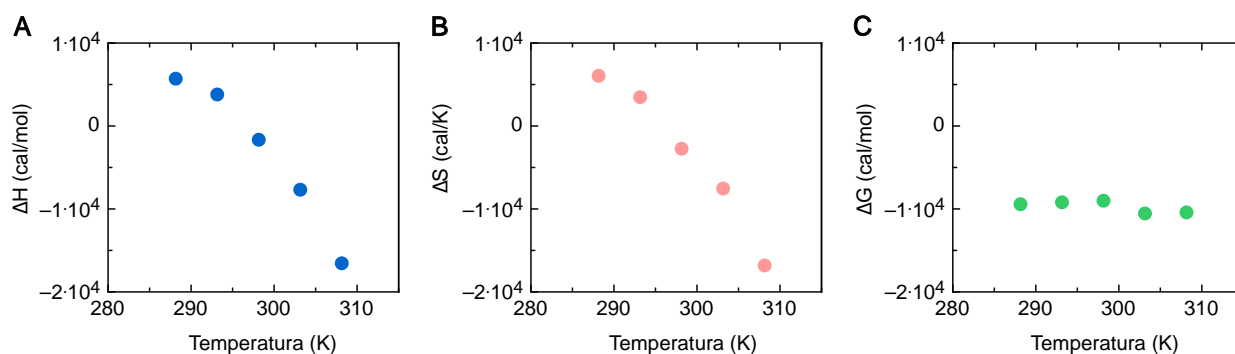


Figura II.12. Análisis termodinámico de la unión $M_{2-1}:P$ seguida por ITC. Valores de ΔH (A) ΔS (B) y ΔG (C) obtenidos para cada temperatura evaluada.

La compensación entrópica/entálpica puede apreciarse bien en la correlación lineal entre el ΔH y ΔS (Figura II.13). Cuando un ligando ingresa a la superficie potencial del sitio de unión de una macromolécula, cuanto más fuertemente se une (cuanto más negativo sea el ΔH de unión), más se restringirá su libertad de rotación y traslación (cuanto más negativo sea el ΔS). Esta compensación entrópica/entálpica es común en sistemas de múltiples interacciones.

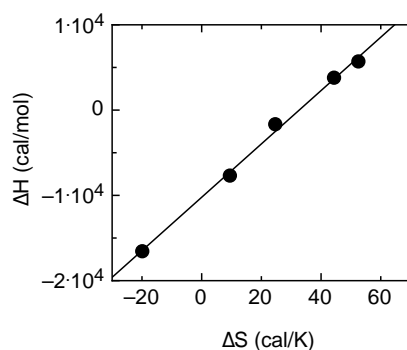


Figura II.13. Compensación entrópica-entálpica en la unión $M_{2-1}:P$. Correlación entre el ΔH y el ΔS .

Una unión involucra un cambio en el ΔC_p , parámetro de gran interés ya que permite realizar inferencias en relación al área de superficie que se oculta luego de la interacción. Describimos el ΔC_p por la pendiente de la dependencia lineal del ΔH con la temperatura, el cual se determinó que fue de $-1120 \pm 144 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ (Figura II.14). Una disminución en la capacidad calorífica puede ser indicativa de una disminución en la exposición de la superficie hidrofóbica de la proteína, frecuentemente interpretados en términos de los cambios en la superficie macromolecular oculta durante la unión (119). ΔC_p grandes pueden reflejar grandes áreas de contacto.

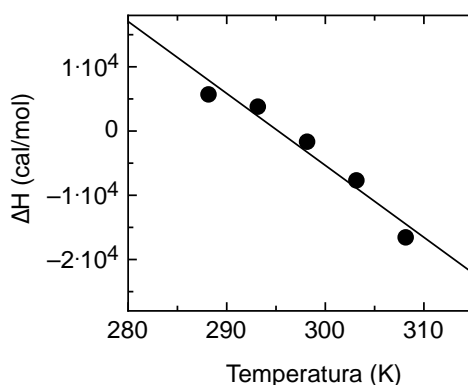


Figura II.14. Entalpía de unión en función de la temperatura, cálculo del ΔC_p . Los datos de ΔH de la unión $M_{2-1}:P$ obtenidos a distintas temperaturas por ITC fueron ajustados a una recta y a partir de la pendiente se extrajo el valor de ΔC_p .

Previamente en nuestro laboratorio se realizaron experimentos de desnaturalización térmica con la proteína P monitoreando la señal a 220 nm por dicroísmo circular entre 5 y 85 °C (278 y 358 K). Se observó que P presenta dos transiciones estructurales: una transición de estructura secundaria reversible pronunciada entre 5 y 45 °C (278 y 318 K) con un grado de cooperatividad y una segunda transición a partir de 65 °C (338 K) que no se completa en el rango de temperatura estudiado y que corresponde al desplegamiento y disociación del dominio de tetramerización, altamente estable (Figura II.15.A) (73).

Nuestros experimentos de ITC fueron realizados en el rango de temperatura entre 15 y 35 °C (288 y 308 K), donde tiene lugar la primera transición estructural de P, como vimos anteriormente la entropía disminuye a medida que aumenta la temperatura (Figura II.15.B), es decir, el componente entrópico deja de gobernar el valor de ΔG , esto puede deberse a que el tetrámero se va desplegando y de esta manera se vuelve más accesible para la unión de M_{2-1} . De esta manera, el ΔG siempre se mantiene negativo (Figura II.15.B) favoreciendo la formación del complejo $M_{2-1}:P$ aun a bajas temperaturas donde la proteína P conserva su estructura nativa.

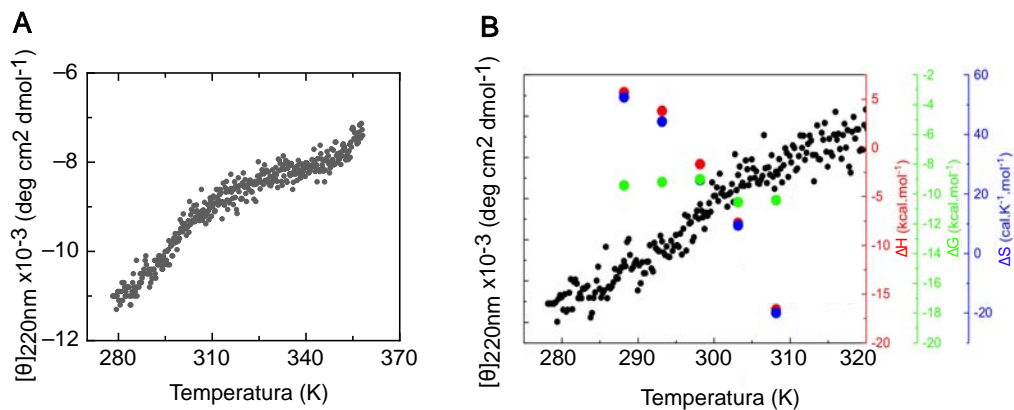


Figura II.15. Estabilidad térmica de P y parámetros termodinámicos. (A) Experimento de desnaturalización térmica de la fosfoproteína P entre 278.15 y 358.15 K (5 y 85 °C) monitoreando la pérdida de señal de CD a 220 nm al aumentar la temperatura. (B) Desnaturalización térmica de P entre 278.15 y 320.15 K (5 y 47 °C) monitoreando la pérdida de señal de CD a 220 nm al aumentar la temperatura (puntos negros). ΔH (círculos llenos de color rojo), ΔG (círculos llenos de color verde) y ΔS (círculos azules) obtenidos de los experimentos de ITC para la unión M₂:1: P a diferentes temperaturas.

Estos resultados muestran una compensación entrópica/entálpica en un rango de temperatura donde el complejo de replicación se ensambla y desensambla.

DISCUSION II

El funcionamiento eficiente del complejo polimerasa de RSV depende en gran medida de las múltiples interacciones proteína-proteína y proteína-ARN, reguladas y altamente específicas que ocurren dentro del mismo, las cuales constituyen blancos potenciales para antivirales dada su presencia exclusiva en pneumovirus (120).

La fosfoproteína P fue descrita inicialmente como un cofactor esencial de la polimerasa viral. Como se explicó previamente en la introducción y en este capítulo se trata de una proteína modular con un dominio de tetramerización central flanqueado por dos dominios N y C terminal intrínsecamente desordenados. En un trabajo previo en nuestro laboratorio se demostró que estos dominios N y C terminal poseen distinto grado de desorden, el N es IDP del tipo *random coil* y el C posee un grado sustancial de estructura secundaria y terciaria, posee una estructura metaestable rica en α hélice estabilizada por el dominio de tetramerización (73). La proteína P actúa como un andamiaje estructural en el ensamblado del complejo polimerasa y juega un papel fundamental a través sus múltiples sitios de interacción ubicados en diferentes regiones, principalmente en el N y C terminal (121–124). Los virus poseen una alta proporción de proteínas desordenadas, las cuales le confieren una gran flexibilidad estructural y a su vez ofrecen sitios para múltiples interacciones.

Como se detalló previamente, la proteína M_{2-1} cumple un rol fundamental al permitir que se transcriban todos los genes en su extensión completa, actuando como un antiterminador viral o un factor elongador de la transcripción. La función de andamiaje que cumple P en el complejo polimerasa puede ser importante para la incorporación de M_{2-1} al complejo (42), ya que como se ha visto en trabajos previos el reclutamiento de M_{2-1} a cuerpos de inclusión citoplasmáticos que se consideran los sitios de síntesis de ARN viral, se encuentra mediado por la proteína P (37,61,102). La región de unión a M_{2-1} en P fue mapeada previamente en los residuos 100-120 destacándose el papel de los residuos específicos L101, Y102, F109, T105 y T108 (42,61). Durante el transcurso de esta tesis doctoral, se publicó un trabajo (102), en el cual a través de distintos enfoques mapearon con precisión la región de unión de M_{2-1} en P, región que abarca los residuos 93-110 e identificaron 7 residuos de P que se encuentran directamente involucrados en la interacción, esto se puede ver detallado en la Figura II.16.

En este capítulo de la tesis disectamos por dominios (N terminal, N con el dominio de tetramerización y dominio de tetramerización con el C terminal) la interacción de M_{2-1} con la proteína P (Figura Anexo 7), utilizando técnicas bioquímicas y biofísicas que nos permitieron concluir acerca de los determinantes estructurales y termodinámicos que gobiernan la interacción.

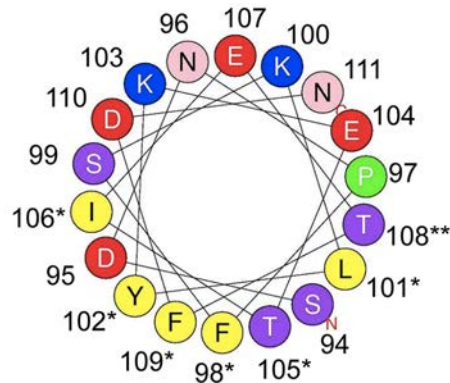


Figura II.16. Identificación de los residuos involucrados en la unión con M_{2-1} . Los residuos críticos para la unión a M_{2-1} se indican con una estrella, el residuo fosforilable T108 se indica con dos estrellas, los residuos cargados positivamente en azul, los residuos cargados negativamente en rojo, los supuestos residuos fosforilados en púrpura y los residuos hidrófobos en amarillo (102).

Estudios previos en nuestro laboratorio a través de mediciones de anisotropía de fluorescencia en solución demostraron que M_{2-1} y P se unen con una estequiometría 1:1 y se determinó una constante de disociación en el orden nanomolar baja (~ 8 nM) (72). Continuando con la misma metodología, en este capítulo especificamos que P_{NTET} es la región de P que se une a M_{2-1} principalmente, ya que no se descarta un posible sitio de contacto en el C-terminal de menor afinidad que estabiliza la interacción. A través de diversas técnicas determinamos la estequiometría del complejo $P_{NTET}:M_{2-1}$ la cual resultó ser de 1:1 en concordancia con lo observado para la proteína P. En cuanto a la afinidad se observó una diferencia en la K_D obtenida para P_{NTET} (25 nM) con respecto a P, al igual que la energía de unión del complejo (Tabla II.2), esta leve pero significativa diferencia apoya la hipótesis de un posible sitio de contacto en el C-terminal que podría aumentar la afinidad por M_{2-1} y contribuir energéticamente a la unión a la proteína P de tamaño completo.

Al evaluar la unión del M_{2-1} con el dominio N-terminal (P_N), que contiene una parte de la región recientemente mapeada de unión a M_{2-1} ; por experimentos de SEC o por anisotropía de fluorescencia no se observó unión, por lo tanto, podemos decir que se requiere del sitio intacto de unión a M_{2-1} en P para que se produzca la interacción con el antiterminador.

Utilizando el fragmento monomérico de M_{2-1} generado en nuestro laboratorio (M_{2-1} core, residuos 73-194) el cual incluye el sitio de unión de P (37), decidimos caracterizar las regiones mínimas de interacción con P empleando el fragmento P_{NTET} . En Blondot y col. (2012) se determinó una estequiometría de unión de 1:4 (4 monómeros de M_{2-1} core por tetrámero P) y una afinidad de ~ 3 μ M entre la proteína P completa y el monómero de M_{2-1} que comprende solo el dominio de unión a P (residuos 58-177) similar a nuestra construcción (37). Realizamos un análisis más detallado de esta interacción a partir de titulaciones al equilibrio del complejo FITC- $P_{NTET}:M_{2-1}$ core, a partir de las mismas se determinó una estequiometría de unión de 1:4

(4 monómeros de M_{2-1} core por tetrámero P) y fue estimada una K_D de 1.4 μM . A modo de referencia realizamos bajo las mismas condiciones titulaciones al equilibrio del complejo FITC-P: M_{2-1} core, obteniendo una K_D de 1.1 μM , por consiguiente, podemos decir que al no observar diferencias de afinidad ni de la energía de unión ($\Delta G \sim 8$ kcal/mol para ambos), P_{NTET} contiene la región necesaria para la unión al core, pero a su vez no se descartan contactos adicionales que incrementen la afinidad. Comparando las afinidades obtenidas para la unión M_{2-1} de tamaño completo con P (8 nM) y con P_{NTET} (25 nM) las cuales resultan ser mucho más afines que las observadas para M_{2-1} core, nos permite plantear un posible efecto de la monomerización, ya que un arreglo tetrámero:tetrámero o posibles sitios de contacto en el N-terminal de M_{2-1} podrían estar estabilizando la unión con P haciéndola más afín.

Por otra parte estudios previos en nuestro laboratorio del complejo M_{2-1} :P por SEC demostraron que el comportamiento hidrodinámico del complejo era casi superponible con el de la proteína P sola, si bien el complejo no es globular, la unión con M_{2-1} produjo una “globularización” parcial en la interfaz del complejo al igual que en la estructura secundaria seguida por CD, la cual a su vez cambió sustancialmente con la formación del complejo. Esto se observa en la diferencia entre la suma de los espectros individuales de P y M_{2-1} y el espectro del complejo, produciéndose una ganancia de α -hélice (72). Tomando esto en consideración, se decidió evaluar la formación del complejo con las distintas regiones de P y así obtener información acerca de cuál es el determinante del comportamiento hidrodinámico y la ganancia de α -hélice en P. Observamos que de los fragmentos solo P_{NTET} se unió a M_{2-1} produciendo el mismo efecto que la proteína completa, por lo tanto, podemos decir que estos efectos se encuentran originados principalmente en la región que comprende el fragmento P_{NTET} , estos efectos incluyen un reordenamiento estructural o una compactación que lleva a la formación de un complejo más estable y compacto.

De acuerdo a las cargas en las superficies tanto de M_{2-1} como de P, nos planteamos la hipótesis de una posible interacción electrostáticamente dirigida. En Tanner y col. (2014) se presentó la superficie electrostática de M_{2-1} en la cual se observan extensas regiones compuestas por residuos cargados positivamente (Figura II.17.A), principalmente en la región core, donde es capaz de unirse la fosfoproteína (16) y por otro lado, se examinó el mapa electrostático de superficie del modelo de P (Figura II.17.B) (65), en el cual se predijo que el extremo N-terminal exhibe propiedades electronegativas netas, debido a la ubicación externa de la cadena lateral de los ácidos glutámicos 104, 107, 113, 114, 115 y ácido aspártico 110 localizados en esta región y a la falta de residuos cargados positivamente en el área circundante. Se observa también en el dominio central de P una naturaleza alternante de aminoácidos cargados positiva y negativamente que se equilibran entre sí y el extremo C-

terminal que se caracteriza por la presencia de un gran número de residuos hidrofóbicos, que contribuyen a la estabilidad estructural del tetrámero (65).

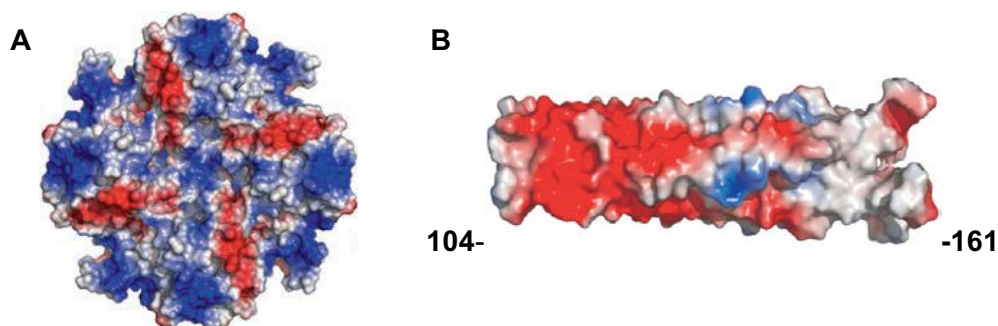


Figura II.17. Modelo de la superficie electrostática de M₂₋₁ y de la fosfoproteína P. (A) Representación de la superficie del potencial electrostático del tetrámero M₂₋₁ con sus cuatro protómeros, indicados en rojo las regiones cargadas negativamente y en azul las regiones cargadas positivamente (16). (B) Representación de la superficie electrostática del fragmento tetramérico de P que comprende los residuos 104 al 161, coloreado de acuerdo con las propiedades electrostáticas calculadas. Los colores rojo y azul indican parches de superficie con carga negativa y positiva, respectivamente (65).

En base a esta información y analizando nuestros resultados del efecto de la fuerza iónica sobre la interacción donde vemos un efecto en el valor de la K_D , disminuyendo la afinidad del complejo M₂₋₁:P al aumentar la fuerza iónica del medio, podemos decir que la unión se encuentra gobernada por un componente electrostático.

Como se expresó previamente, las interacciones entre macromoléculas no es simplemente una función de complementariedad espacial, si no que involucran una serie de cambios energéticos tanto en la superficie de interacción de las proteínas como en el solvente, para pasar del estado libre al unido. Por consiguiente, se planteó el estudio termodinámico de la interacción M₂₋₁:P utilizando ITC para realizar un análisis termodinámico de la unión.

En principio podemos decir que a partir de los experimentos de ITC, confirmamos la estequiometría de unión 1:1 del complejo M₂₋₁:P, con una afinidad en el rango nanomolar, coincidente con lo observado en nuestro laboratorio previamente por Esperante y col. (2012) y con los experimentos de SEC y anisotropía de fluorescencia presentados en este capítulo. La interacción M₂₋₁:P resultó ser endotérmica y entálpicamente dirigida a mayores temperaturas, es decir, termodinámicamente favorable. Típicamente un cambio negativo de entalpía se encuentra asociado a la formación de interacciones que favorecen y estabilizan al complejo. Con respecto a la entropía si bien se observaron valores pequeños, pasó de ser positiva a negativa, es decir disminuyó también con el aumento de la temperatura. Esto puede ser explicado por la transición estructural que sufre la proteína P en el rango de temperatura en el que realizamos nuestros experimentos.

A partir de estudios realizados en nuestro laboratorio se caracterizó la desnaturalización de P y se observaron dos transiciones, la primera que correspondía al despliegue real ya que se pierde una cantidad sustancial de estructura α -helicoidal lo cual podría concernir a uno o ambos dominios N y C terminal, con una cooperatividad marginal, lo que sugiere una naturaleza intrínsecamente desordenada; y la segunda transición correspondió a la disociación/despliegue del tetrámero (72).

Continuando con la línea de investigación antes mencionada de nuestro laboratorio, se estudió más a fondo la estabilidad conformacional de los elementos estructurales metaestables dentro de P (73), para ello se utilizaron construcciones de P que comprenden sus distintos módulos y fueron sometidas a desnaturalización térmica. La proteína P de tamaño completo reveló una transición estructural entre 5 y 45 °C, con cierto grado de cooperatividad y dentro de este rango de temperatura, P_{TET} , P_{NTET} y P_N no mostraron transición térmica, mientras que P_C y P_{TETC} mostraron transiciones similares a las de P. Entre 65 y 85 °C, se visualizó el comienzo de una segunda transición, que corresponde al despliegue del dominio de tetramerización coincidente con lo observado por Esperante y col. (2012). Por lo tanto, la región N-terminal que comprende el sitio de unión a M_{2-1} resultó ser desordenada, pero con elementos α -helicoidales locales independientes del dominio de tetramerización. La estabilidad marginal frente a los cambios de temperatura del sitio de unión a M_{2-1} conlleva a que la entropía sea mayor y de este modo exponer la región de interacción en P, así la entropía se encuentra favoreciendo la unión. Por lo tanto, a menores temperaturas el proceso se encuentra entrópicamente dirigido y al aumentar la temperatura la reacción se vuelve exotérmica, entálpicamente dirigida y la fosfoproteína se despliega perdiendo la estructura residual que le confiere carácter de IDP y se hace más accesible al ligando. Esto muestra una compensación entrópica/entálpica que permiten que el valor de energía libre se mantenga constante y negativo favoreciendo de este modo el proceso de unión $M_{2-1}:P$.

En este capítulo de tesis proporcionamos los fundamentos termodinámicos de la unión $M_{2-1}:P$, que implican reordenamientos estructurales dentro del complejo para poder llegar al estado final estable. Revelamos aspectos importantes acerca de la relación existente entre las propiedades conformacionales y la termodinámica que dirige el proceso.

Muchas interacciones proteína-proteína median el ensamblaje y la función de los complejos de transcripción, por ejemplo, el ensamblaje de los complejos de iniciación y elongación de la transcripción de la ARN polimerasa II. Además, se sabe que los complejos multiprotéicos son importantes en la regulación de la transcripción viral como es el caso del VIH donde la proteína reguladora Tat mejora drásticamente la eficiencia de la transcripción viral al unirse a factores celulares (36,125,126) y en bacteriófagos la antiterminación mediada por λ N

la cual involucra un gran número de interacciones proteína-proteína para cumplir su función (36,94).

El estudio de como los componentes del RPC interactúan entre si nos permite comprender mejor el mecanismo molecular detrás de la replicación y transcripción del genoma viral y son la base para descifrar la jerarquía del ensamblado del RCP. Todos estos conocimientos constituyen un punto de partida para el diseño de antivirales para RSV y virus relacionados.

CAPITULO III

ESTRUCTURA Y ESTABILIDAD DEL DOMINIO DE UNION AL ARN DE M₂₋₁

INTRODUCCION

Como se expresó anteriormente, M₂₋₁ es una proteína multidominio y homotetramérica. Su protómero posee cuatro regiones distintas: un dominio de unión a zinc N-terminal (ZBD; residuos 7-25), un dominio de tetramerización α -helicoidal (TD; residuos 32-49), un dominio *core* de unión a ARN (RBD; residuos 69-172) y una región C-terminal no estructurada (residuos 173-194). Previamente se ha determinado una estructura cristalina del tetrámero M₂₋₁ (16) y una estructura por RMN del RBD monomérico (residuos 58-177) (37).

La oligomerización de M₂₋₁ es impulsada principalmente por una α hélice de tetramerización central y es estabilizada también por contactos entre el ZBD y el RBD de un monómero adyacente (16) (Figura III.1). Nuestro laboratorio demostró que la eliminación de zinc conduce a la disociación del tetrámero en una especie monomérica en solución denominada 'apo' M₂₋₁. Por lo tanto, la integridad del ZBD es crítica para el ensamblado tetramérico y para la función de la proteína (127).

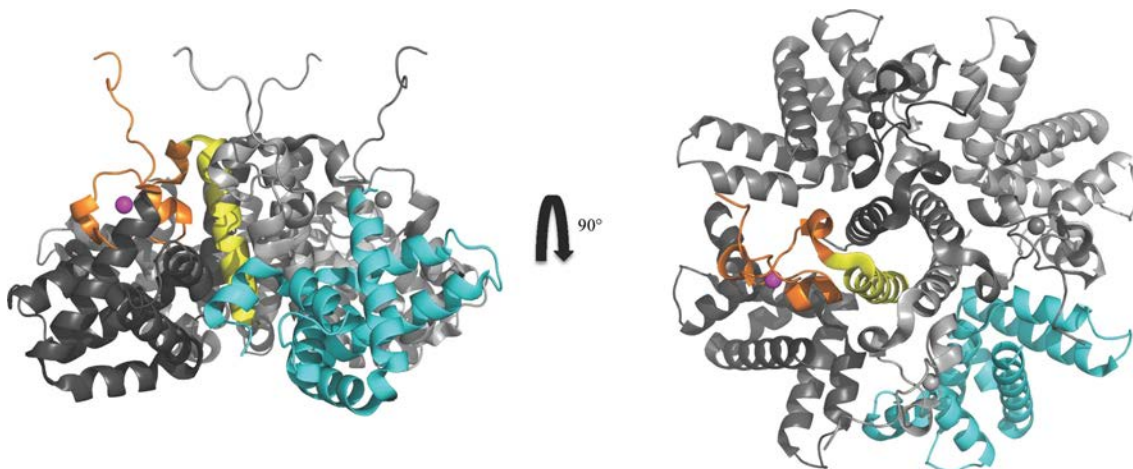


Figura III.1. Interacciones entre dominios en la proteína M₂₋₁ de RSV. Los monómeros se muestran en tonos grises. Se observa el dominio de tetramerización en amarillo, el dominio de unión a zinc anaranjado, el ion Zn²⁺ en magenta y el dominio *core* en cian (entrada PDB 4c3b).

La estructura cristalográfica de la proteína M₂₋₁ del Metapneumovirus humano (hMPV) reveló que el ZBD interactúa con la hélice de tetramerización a través de una interfaz hidrofóbica. El dominio *core* interactúa con el ZBD y el TD y los dominios *core* de los protómeros adyacentes, principalmente a través de contactos polares (50). Curiosamente, cada protómero existe en un equilibrio entre una conformación abierta y cerrada y la unión del ARN induce el estado cerrado, mientras que la adición de concentraciones sub-desnaturalizantes de cloruro de guanidinio (Gdm.Cl) induce un estado abierto, consistente con la naturaleza polar de las interacciones entre el dominio *core* y el resto de la molécula (50). Dada la relevancia y la

singularidad de este antiterminador de la transcripción viral, nos propusimos investigar el dominio de unión a ARN (residuos 73-194) como hemos denominado previamente M_{2-1} core, usando cristalografía de rayos X, analizamos su plegamiento y estabilidad al equilibrio. Los experimentos de este capítulo fueron realizados en colaboración con el Dr. Henning Tidow y su grupo de la Universidad de Hamburgo y por la Dra. María García Alai a cargo de las instalaciones de preparación y caracterización de muestras EMBL, Hamburgo, Alemania.

RESULTADOS

III.1. Cristalización y colección de datos.

El dominio *core* de unión a ARN de M_{2-1} , cristalizó en dos grupos espaciales diferentes $P2$ y $P3_221$ (Tabla III.1) y la estructura pudo ser determinada con una resolución de 2.0 Å. Los cristales aparecieron después de un día y crecieron hasta sus dimensiones máximas de 0.6 - 0.8 - 1.0 mm en una semana (Figura III.2.A).

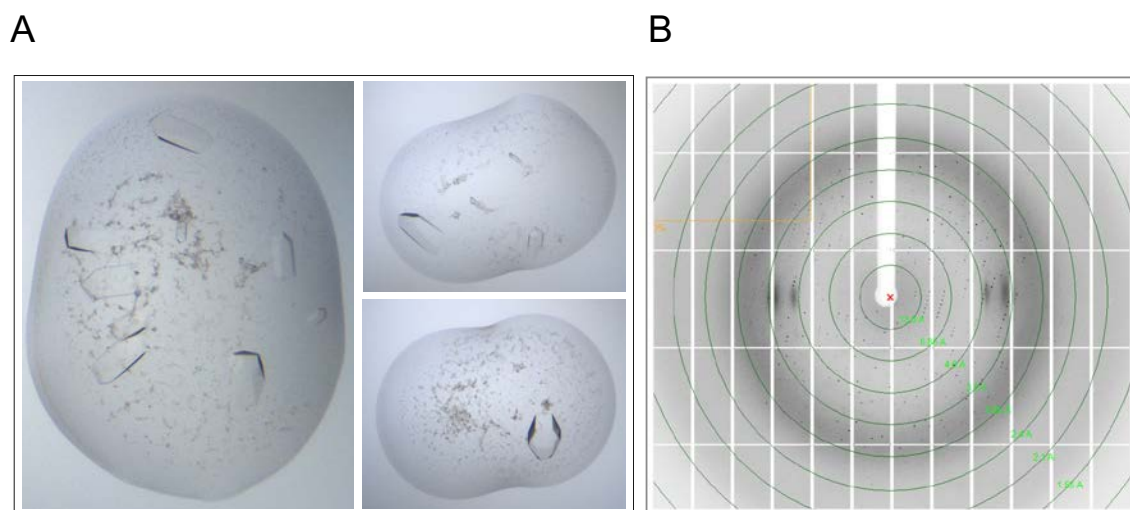


Figura III.2. Cristales y patrón de difracción. (A) Cristales representativos utilizados para la determinación de la estructura de M_{2-1} core. (B) Patrón de difracción.

Los datos de difracción fueron recogidos con un límite de resolución de 1.8 - 2.0 Å, como se puede observar en la Figura III.2.B del patrón de difracción. El conjunto completo de datos con un intervalo de 0.1° fueron recogidos para ambas formas cristalinas en la línea de cristalografía de proteínas P14 en EMBL/DESY, Hamburgo, Alemania. El conjunto de datos fue procesado con XDS y fueron fusionados con AIMLESS (ver materiales y métodos). Un resumen de los datos estadísticos se muestra en la Tabla III.1.

Tabla III. 1. Colección de datos y estadísticas de refinamiento (reemplazo molecular). Los valores entre paréntesis corresponden a la capa de mayor resolución.

	M₂₋₁ Core RSV	M₂₋₁ Core RSV
Colección de datos		
Grupo espacial	<i>P2</i>	<i>P3₂21</i>
<i>a, b, c</i> (Å)	37.95, 69.24, 46.60	91.95, 94.95, 97.80
α, β, γ (°)	90, 90.05, 90	90, 90, 120
Resolución (Å)	46.60-1.80 (1.86-1.80)	41.67-2.00 (2.07-2.00)
R_{merge}	0.05 (0.518)	0.043 (0.570)
$I / \sigma(I)$	12.1(1.70)	10.00 (1.29)
Complejidad (%)	94.8 (69.4)	99.98 (100.00)
Multiplicidad	3.1(2.4)	2.0 (2.0)
$CC_{1/2}$	0.99 (0.66)	0.99 (0.29)
Refinamiento		
Resolución (Å)	1.8	2.0
Nº de reflexiones	21206 (1591)	32735 (3196)
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.171/0.210	0.189/0.229
Nº de átomos		
Total	1794	1857
Proteína	1618	1668
Agua	176	189
Factor B (Å ²)		
Proteína	37.9	42.07
Agua	45.3	50.40
Desviaciones r.m.s.		
Longitudes de enlace (Å)	0.007	0.003
Longitudes de ángulos (°)	0.83	0.54

III.2. Determinación de la estructura, refinamiento y análisis del monómero M₂₋₁ core.

La estructura consiste en seis α hélices conectadas por pequeños *loops* (Figura III.3.A). Las estructuras de ambas formas cristalinas obtenidas (*P2* y *P3₂21*) son virtualmente idénticas en la región *core* (residuos 58-177), con un error cuadrático medio (r.m.s.d. en átomos C ^{α}) de 0.3 Å. También son muy similares a los dominios *core* observados en la estructura cristalina de M₂₋₁ tetramérica del RSV de longitud completa ((16); rmsd de 0.7 Å) y a la estructura de RMN ((37); r.m.s.d. de 1.39 Å) (Figura III.3.B). Una excepción notable es la región C-terminal (residuos 178-194), que pudo modelarse claramente en un monómero; el refinamiento fue realizado usando *phenix.refine*, el cual permitió la construcción del modelo de una extensión corta del C-terminal de M₂₋₁ core (residuos 73-185) en el grupo espacial *P3₂21*. En la estructura cristalina tetramérica de M₂₋₁, esta región estaba desordenada y, por lo tanto, no era visible (16). En nuestra estructura del dominio *core P3₂21*, esta región C-terminal está ubicada en una

hendidura entre las hélices H3 y H6 y ocupa una posición que interferiría con el dominio de unión a zinc de otro monómero en el ensamblado tetramérico (Figura III.3.C y III.4).

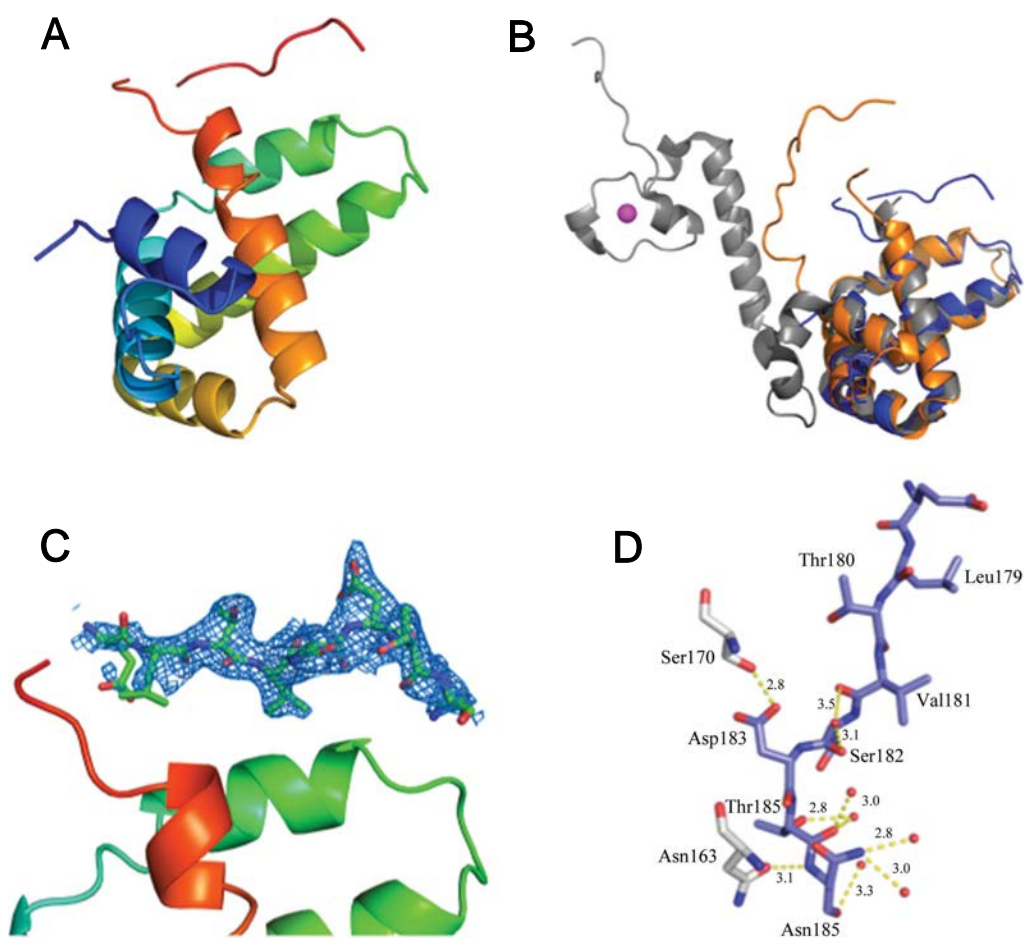


Figura III.3. Estructura general de M₂₋₁ core de RSV. (A) Representación M₂₋₁ core con los colores del arcoíris desde el N-terminal (azul) hasta el C-terminal (rojo). (B) Superposición de la estructura cristalina de M₂₋₁ core (azul), con la estructura de RMN (anaranjado) y la estructura cristalina del dominio, correspondiente en el conjunto tetramérico (gris). (C) Mapa OMIT compuesto del extremo C-terminal (residuos 178-185) en la estructura de M₂₋₁ core de RSV (forma cristalina P₃₂₂₁) contorneada a 1.5 σ . El código de color y la orientación son como se observa en (A), a excepción del extremo C-terminal, que se muestra según el tipo de átomo. (D) Primer plano del extremo C-terminal con residuos de contacto, aguas y longitudes de enlace.

Los modelos finales arrojaron factores *R* cristalográficos de 17 y 19% y factores *R* libres de 21 y 23% para los cristales en los grupos espaciales *P*₂ y *P*₃₂₂₁, respectivamente (ver Tabla III.1). Los modelos fueron validados usando *MolProbity*. La evaluación del diagrama de Ramachandran mostró que todos los residuos estaban en las regiones permitidas (97-99% en las regiones favorecidas). Los datos han sido depositados en el Protein Data Bank con los códigos PDB 5noh (*P*₂) y 5nkx (*P*₃₂₂₁).

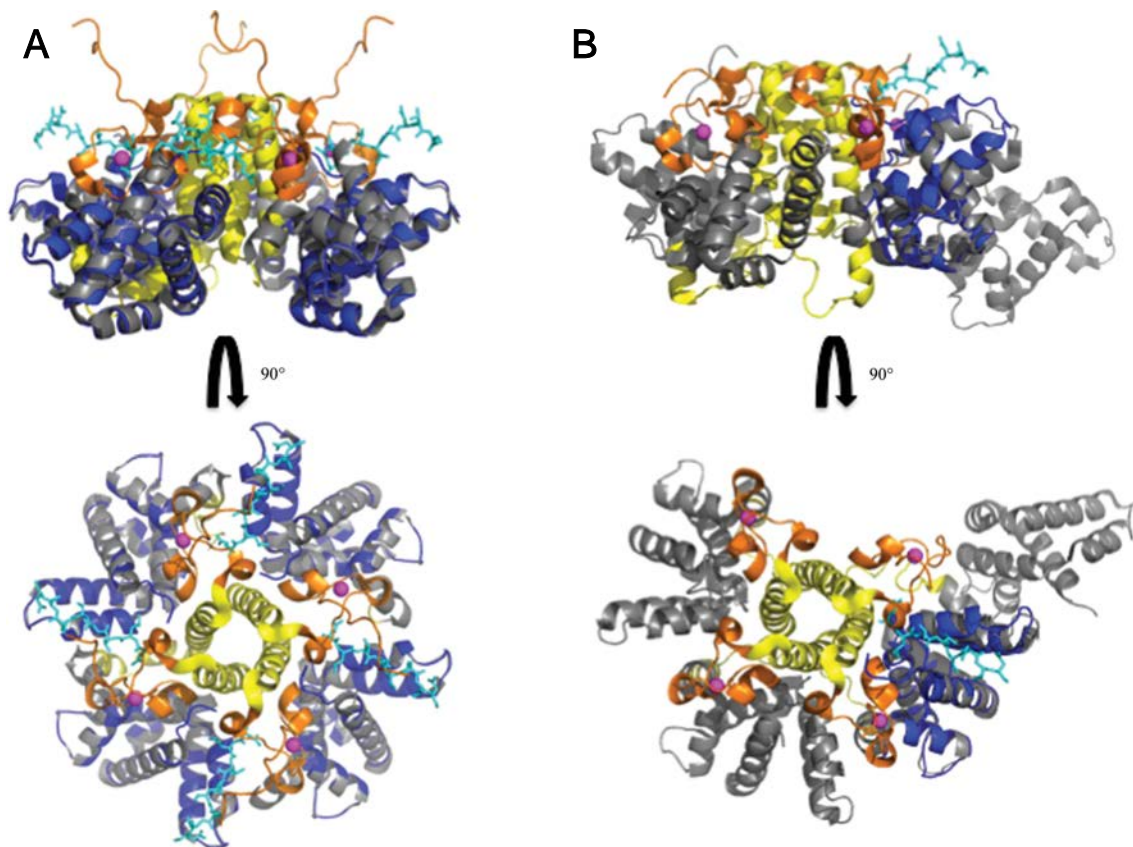


Figura III.4. Comparación estructural de los tetrameros de longitud completa M_{2-1} RSV y M_{2-1} hMPV. (A) Superposición de M_{2-1} core (azul) con M_{2-1} de longitud completa ambos del RSV. **(B)** Superposición del M_{2-1} core RSV (azul), con M_{2-1} hMPV de longitud completa. Dentro de las proteínas de longitud completa, los dominios de tetramerización se muestran de color amarillo, los dominios de unión de zinc de color anaranjado y los dominios centrales core en gris. Los iones Zn^{2+} se muestran como esferas magenta. El extremo C-terminal (residuos 178-185) en la estructura M_{2-1} core de RSV que no está presente en la estructura cristalina tetramérica se muestra como barras y coloreado en cian.

III.3. Análisis de M_{2-1} core por SAXS.

El RBD de M_{2-1} de RSV cristalizó con dos moléculas en la unidad asimétrica. El perfil de elución de la cromatografía de exclusión por tamaño indica que M_{2-1} core existe como un monómero en solución (no se muestra). Sin embargo, para confirmar su estado oligomérico en solución a la alta concentración utilizada en las condiciones de cristalización, se realizaron experimentos de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS). El análisis sin modelo de los datos de SAXS arrojó un R_g (radio de giro) de 20.3 Å a partir del diagrama de Guinier (Figura III.5.A) y un volumen de Porod de 26.4 nm³, lo que indica un peso molecular de 15 kDa.

Por otro lado, el análisis del gráfico de Kratky de los datos puede revelar información con respecto a la "plegabilidad" de la molécula (128). Una curva en forma de campana en el diagrama de Kratky sugiere una conformación bien plegada, globular y compacta (129). Por el contrario, un gráfico de Kratky que forma una meseta o que aumenta a un alto q (nm⁻¹) sugiere una molécula más elongada o, alternativamente, parcialmente plegada (Figura III.6). A partir de

nuestros datos se observó que la curva tiende a aumentar a mayores valores de q (Figura III.5.B), lo que nos estaría indicando posiblemente la presencia de un *core* estructurado o plegado con una cola flexible terminal.

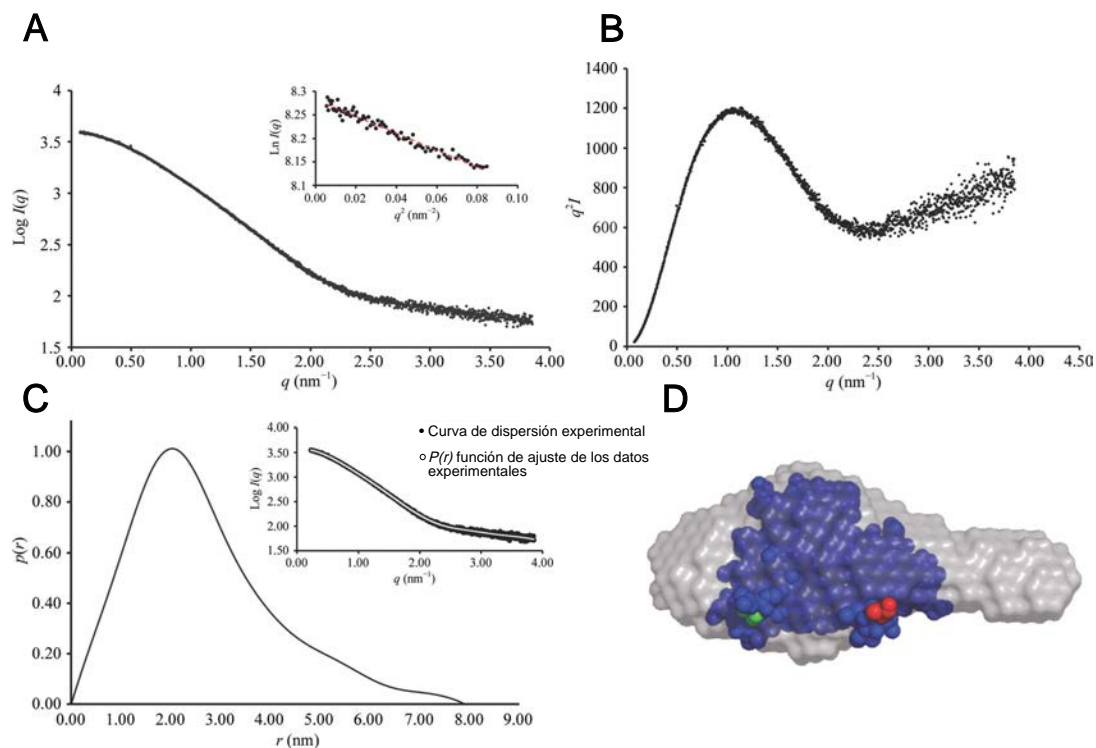


Figura III.5. Análisis de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) de M₂₋₁ core. (A) Perfil de dispersión crudo de M₂₋₁ core. La región de Guinier se muestra en el recuadro. (B) Diagrama de Kratky que sugiere la presencia de un *core* plegado con una cola flexible. (C) Diagrama de distribución de distancia. (D) Reconstrucción de forma *ab initio* (gris) superpuesta a la estructura cristalina de M₂₋₁ core (entrada PDB 5noh; azul). Los extremos N y C terminal de la proteína se resaltan en verde y rojo, respectivamente.

La función de distribución de distancia por pares indica una partícula globular con una cola, con dimensiones máximas (D_{max}) de 8 nm (Figura III.5.C). El modelo *ab initio* de M₂₋₁ core obtenido usando *DAMMIF* es comparable a la estructura cristalina del monómero (Figura III.5.D). El extremo C-terminal observado en nuestro modelo *P3₂21* podría extenderse en solución y, por lo tanto, explicaría la falta de globularidad en nuestro modelo de SAXS. La densidad de electrones para esta región no se ha observado en estructuras cristalinas previas.

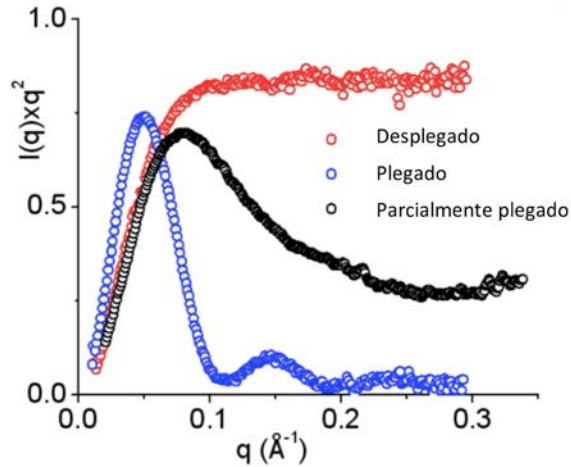


Figura III.6. Gráfico de Kratky teórico. El gráfico de Kratky permite inferir características del plegado de la proteína.

III.4. Plegado y estabilidad de M_{2-1} core.

El estudio del plegamiento de una proteína permite determinar su estabilidad, obtener parámetros termodinámicos e inferir información en relación a su estructura nativa, así como posibles conformaciones alternativas.

El dominio *core* de unión a ARN parece ser una unidad de plegamiento compacta y cooperativa según lo observado en la estructura que pudimos cristalizar y la estructura de RMN presentada previamente de un fragmento similar (37). Sin embargo, hay varios contactos entre los protómeros en el tetrámero y otros contactos que se conectan con otras regiones de la proteína, lo que plantea la cuestión de si el dominio se estabiliza mediante interacciones intradominio y en qué medida el dominio es compacto y estable en solución. Por ello, se decidió evaluar la estabilidad del conjunto de interacciones que mantienen plegada a la molécula mediante la perturbación del equilibrio entre el estado plegado y el estado desplegado, por el agregado de cantidades crecientes de un agente desnaturante. Analizamos la estabilidad del monómero M_{2-1} core mediante la desnaturación química con cloruro de guanidinio (Gdm.Cl), para esto incubamos por 16 horas a 20 °C a la proteína con concentraciones crecientes de este reactivo y seguimos la transición de la estructura secundaria monitoreando los cambios de CD en el UV lejano y en este caso, la intensidad de fluorescencia de la tirosina la cual reporta cambios en la estructura terciaria.

El espectro mayormente α -helicoidal con los mínimos característicos a 208 y 222 nm se pierde gradualmente tras el aumento del desnaturante, lo que indica el desplegado completo de la proteína (Figura III.7.A). El cambio de elipticidad molar a 222 nm muestra una transición altamente cooperativa que sugiere una transición de dos estados (Figura III.7.B). Como no hay residuos de triptófano, se utilizó la fluorescencia intrínseca de la tirosina como sonda para

seguir la estructura terciaria, que produce una transición superponible con la estructura secundaria, lo cual, es un fuerte indicador de un proceso de desplegamiento de dos estados (Figura III.7.B).

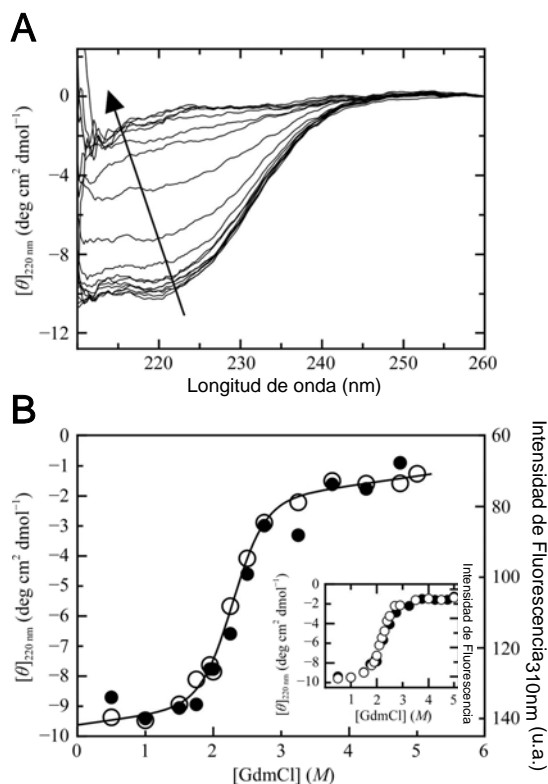


Figura III.7. Transiciones de desplegamiento de M_{2-1} core. (A) Espectros CD UV lejano de M_{2-1} core con concentraciones crecientes de Gdm.Cl entre 0 y 5 M, indicado por la flecha. (B) Transición de desplegamiento al equilibrio de M_{2-1} core siguiendo la elipticidad molar a 220 nm (círculos vacíos) y la fluorescencia de tirosina a 310 nm (círculos llenos). Los datos de elipticidad se ajustaron a un modelo de desplegamiento de dos estados (ver materiales y métodos). Recuadro: comparación del desplegamiento al equilibrio con Gdm.Cl de apo M_{2-1} (círculos vacíos) con M_{2-1} core (círculos llenos) siguiendo los cambios en la elipticidad molar a 220 nm. Los experimentos se llevaron a cabo a pH 7.0 (ver materiales y métodos).

Para un análisis cuantitativo de la estabilidad termodinámica, ajustamos los datos de elipticidad a un modelo de dos estados (76) (ver materiales y métodos). Este ajuste de los datos, el cual se basa en un método de extrapolación lineal, permite obtener los siguientes parámetros termodinámicos: $\Delta G^{H_2O}_{NU}$ y m . El parámetro $\Delta G^{H_2O}_{NU}$ refleja el cambio de energía libre entre el estado nativo y el estado desplegado extrapolado a 0 M de desnaturante, como una estimación de la estabilidad conformacional de la molécula y el parámetro m es una medida de la dependencia de ΔG^{H_2O} con la concentración de desnaturante y refleja la cooperatividad del proceso.

A partir de nuestros datos se obtuvo un cambio de energía libre de desplegamiento (ΔG^{H_2O}) de $5.21 \pm 0.92 \text{ kcal mol}^{-1}$ y un valor de m de $2.28 \pm 0.38 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{M}^{-1}$, el cual coincide con lo

esperado para un plegamiento globular de dos estados de este tamaño (130); estos resultados en conjunto con la transición superponible de la estructura secundaria (CD) y terciaria (fluorescencia de la tirosina) sugieren fuertemente una transición con características de dos estados al equilibrio.

Nuestro laboratorio ha demostrado previamente que la eliminación de zinc disocia el tetrámero, y el monómero "apo" M_{2-1} obtenido muestra una estructura secundaria sorprendentemente idéntica a la del tetrámero (127). La transición de desplegado de M_{2-1} core aquí presentado, es superponible a la del monómero apo M_{2-1} (Figura III.7.B, recuadro), con un ΔG^{H_2O} de 5.89 ± 0.33 kcal mol⁻¹ y un valor m de 2.62 ± 0.15 kcal.mol⁻¹.M⁻¹, que está en excelente acuerdo con la estabilidad y el valor de m de nuestro monómero M_{2-1} core, lo que confirma que el dominio monomérico de unión a ARN aislado es una unidad de plegamiento independiente del resto de la molécula, ya sea como un tetrámero o un monómero de apo. Estos resultados podrían indicar que el resto del polipéptido (residuos 1-72) se desordena cuando se elimina el zinc y el tetrámero se disocia, o al menos no hay una estructura compacta cooperativa.

DISCUSION III

En este capítulo hemos caracterizado la estructura y estabilidad del dominio de unión a ARN de M_{2-1} como una unidad estructural y funcional independiente del contexto del tetrámero. M_{2-1} core se observa como un dominio estable y compacto con una transición reversible cooperativa de dos estados (nativo y desplegado), y presenta una estabilidad termodinámica idéntica al monómero apo M_{2-1} (Figura III.8). Estos resultados en conjunto nos indican que la región que falta en el dominio aislado en estudio (residuos 1-72) no participa en ninguna estructura persistente, no está conectada al core y forma la interfaz tetramérica solo cuando el motivo de unión a zinc está intacto (Figura III.1) (127).

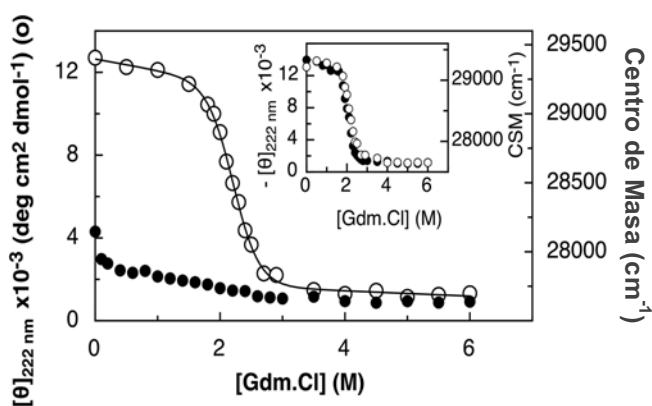


Figura III.8. Desdoblamiento al equilibrio de apo- M_{2-1} con Gdm.Cl a pH 7.0. La transición de despliegue al equilibrio fue seguida monitoreando la elipticidad molar a 222 nm (o) y el centro masa espectral (CSM) de la fluorescencia del triptófano (●). Los datos de CD se ajustaron a un modelo de despliegue de dos estados (línea continua). Recuadro: Despliegue al equilibrio del tetrámero M_{2-1} con Gdm.Cl a pH 7.0 siguiendo los cambios en la elipticidad molar a 222 nm (o) y CSM de fluorescencia (●) (127).

Aunque solo se observó una estructura altamente simétrica en la estructura cristalina del tetrámero M_{2-1} RSV (16), la proteína homóloga M_{2-1} HMPV mostró un equilibrio entre conformaciones abiertas y cerradas en las cuales las regiones core de los protómeros adyacentes se alejan de la disposición tetramérica (Figura III.9). Este cambio conformacional fue propuesto como resultado de la unión del ARN al dominio core y por contactos con el ZBD (50), este equilibrio probablemente le confiere a la proteína la flexibilidad requerida para unir diversas secuencias de ARN.

En proteínas con múltiples sitios de unión separados por regiones desordenadas, las mayores velocidades de unión observadas se explican por el mecanismo de *fly casting* o pesca con mosca (131). En trabajos previos observaron que la velocidad de unión puede aumentar significativamente al desplegarse la proteína sobre la velocidad de unión de una proteína completamente plegada. Cuando se trata de una proteína desplegada o con regiones desordenadas es más accesible a la unión de ligandos frente a una proteína o dominio plegado.

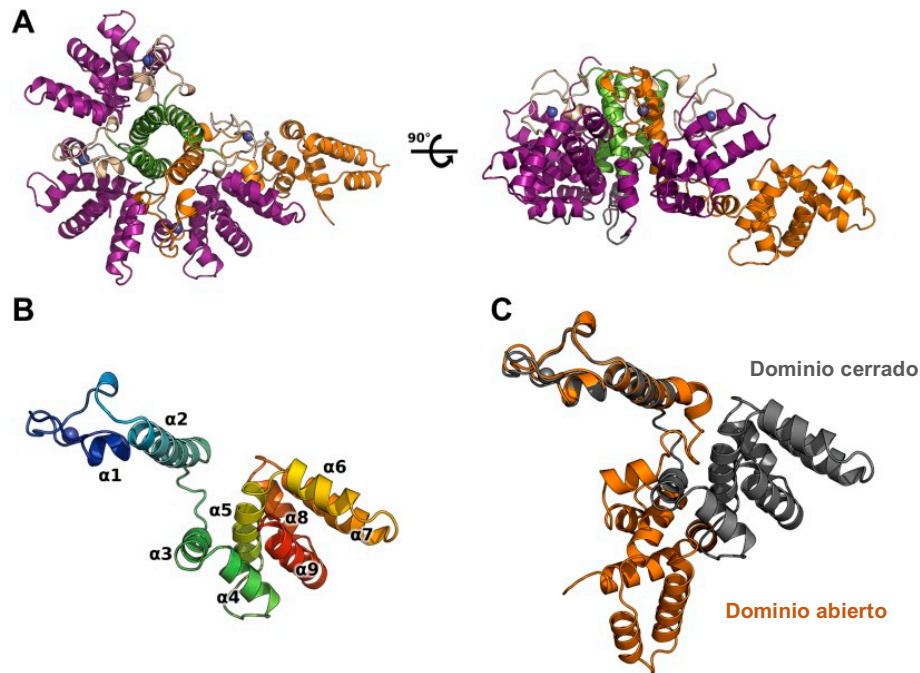


Figura III.9. Estructura cristalina de M₂₋₁ HMPV. (A) Vista superior (izquierda) y vista lateral (derecha) del tetrámero. Los protómeros cerrados se colorean por dominio, ZBD en color trigo, la hélice de tetramerización en verde y el dominio *core* en púrpura. Los átomos de zinc se representan como esferas azules. El protómero abierto está coloreado en anaranjado. (B) Vista en primer plano de un protómero cerrado. Se muestra el N-terminal en azul y el C-terminal en rojo y se marcan todas las hélices. (C) Comparación entre protómero abierto (anaranjado) y cerrado (gris) (50).

La estructura del *core* de HMPV no cambia en las conformaciones abiertas o cerradas, lo que sugiere que debe haber una región reguladora flexible que mueva el *core* en una conformación a otra. Los contactos entre las regiones *core* u otras regiones (es decir, el ZBD) dentro del contexto del tetrámero, deben cumplir solo una función reguladora, sin efecto en la conformación o estabilidad del dominio *core*. En el tetrámero M₂₋₁ de RSV, tres de las cadenas muestran ausencia de densidad electrónica entre el dominio de tetramerización y el *core* (16), coincidente con lo que podría constituir una región bisagra flexible que pueda modular la transición abierta-cerrada. En la estructura del tetrámero M₂₋₁ HMPV, la misma región también carece de densidad electrónica en la región *linker* entre el dominio de tetramerización y el *core*, lo que indica una gran flexibilidad, como lo reflejan para ambos casos los factores B muy altos para los residuos de estas regiones flexibles. En cristalografía, la incertidumbre en las posiciones de los átomos aumenta con el desorden en el cristal de proteína. El desorden puede tener dos componentes, estático y dinámico. La resolución representa la incertidumbre promedio para todos los átomos. En contraste, el valor del factor B (también llamado factor de temperatura) cuantifica la incertidumbre para cada átomo. En las resoluciones típicas para los cristales de proteínas un factor de temperatura alta refleja una baja densidad electrónica

empírica para el átomo. Como puede observarse en la Figura III.10 en la estructura de M_{2-1} resuelta por cristalografía la región *linker* entre el dominio de tetramerización y el *core* parece ser altamente flexible, observándose una baja densidad electrónica y factores B altos (16), lo que no permite una resolución satisfactoria.

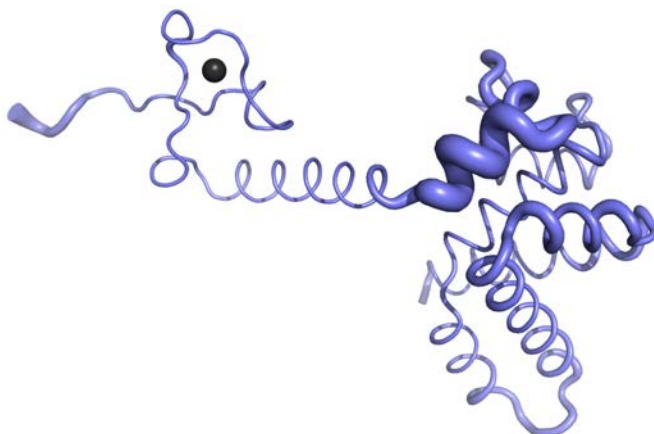
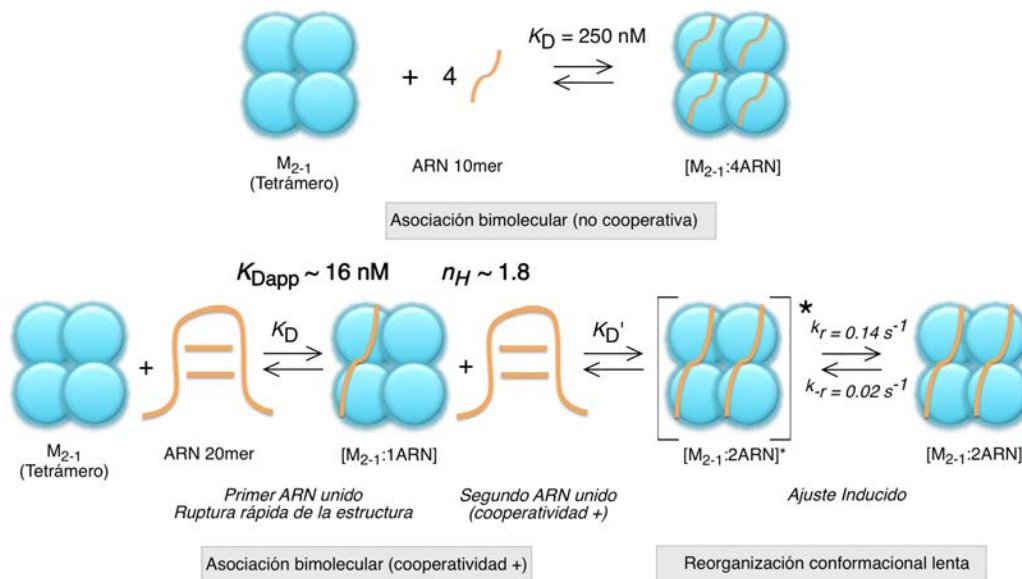


Figura III.10. Representación del factor B de la estructura cristalográfica de M_{2-1} . Representación en *worm* de un protómero de M_{2-1} donde el ancho de la figura es proporcional al valor del factor B obtenido (16).

Por otro lado, la estructura cristalina presentada en este capítulo sugiere fuertemente que la región C-terminal de la proteína no estaría estructurada en la conformación cerrada presente en el tetrámero sin ARN y se pliega sobre la hendidura helicoidal correspondiente a la región del ZBD. Nuestro laboratorio ha demostrado previamente que la eliminación del zinc conduce a una forma monomérica 'apo', que contiene precisamente la misma estructura secundaria que la especie tetramérica, lo que indica que el ZBD modula la oligomerización de M_{2-1} . De hecho, esta transición tetrámero-monómero se incrementa a pH 5.5, lo que sugiere fuertemente que la ZBD actúa como un sensor de pH que modula la estructura cuaternaria (127). Por lo tanto, esta región es importante para la tetramerización de M_{2-1} y consecuentemente para la unión a ARN, si bien no une directamente, pero se ha demostrado que es esencial para llevar a cabo su función antiterminadora, ya que la región N-terminal incrementa la afinidad de M_{2-1} tanto para la fosfoproteína P como para el ARN. Aunque como pudimos ver en esta tesis M_{2-1} es capaz de plegarse independientemente, en ausencia del dominio de tetramerización o la región N-terminal e incluso continúa uniendo ARN y P, aunque con menor afinidad.

CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo de tesis, se ha caracterizado una interacción tripartita entre componentes del complejo polimerasa de RSV, las proteínas M_{2-1} , P y el ARN, los cuales son esenciales para el ciclo de vida del virus. M_{2-1} es una proteína de unión a ARN y la anulación de esta capacidad coincide con la pérdida de la procesividad de la polimerasa viral, lo que indica que la unión de ARN es fundamental para la función antiterminadora transcripcional de M_{2-1} (37). En esta tesis determinamos cuantitativamente la afinidad y la estequiometría de unión de la proteína M_{2-1} de RSV con una variedad de oligonucleótidos de ARN virales. Describimos un evento cooperativo que no se había determinado previamente y observamos la unión del ARN en el tiempo a través de experimentos cinéticos. Además, abordamos la termodinámica de la unión cooperativa M_{2-1} :ARN cuyos resultados nos permitieron realizar un análisis global de la interacción. En el Esquema I se puede observar una organización integrada de los resultados de la unión M_{2-1} :ARN.



Esquema I. Modelo de interacción entre el tetrámero M_{2-1} y ARN. (A) M_{2-1} se asocia de un modo no cooperativo a ARN cortos, cada uno de los cuales cubre un único sitio de unión en cada protómero. El complejo resultante tiene 4 moléculas de ARN unidas por tetrámero M_{2-1} , con un $K_D = 250 \text{ nM}$. (B) El modelo muestra la unión secuencial de dos moléculas de ARN largas al tetrámero M_{2-1} . Los rápidos pasos de asociación bimolecular proceden de manera gradual e implican la ruptura de las interacciones de apilamiento de las bases en el ARN. Se observa una cooperatividad positiva, con una $K_{Dapp} \sim 16 \text{ nM}$, y el coeficiente de Hill es de ~ 1.8 . Después de la unión, se producen reordenamientos conformacionales lentos del complejo, produciendo un complejo final formado por dos moléculas de ARN por tetrámero M_{2-1} .

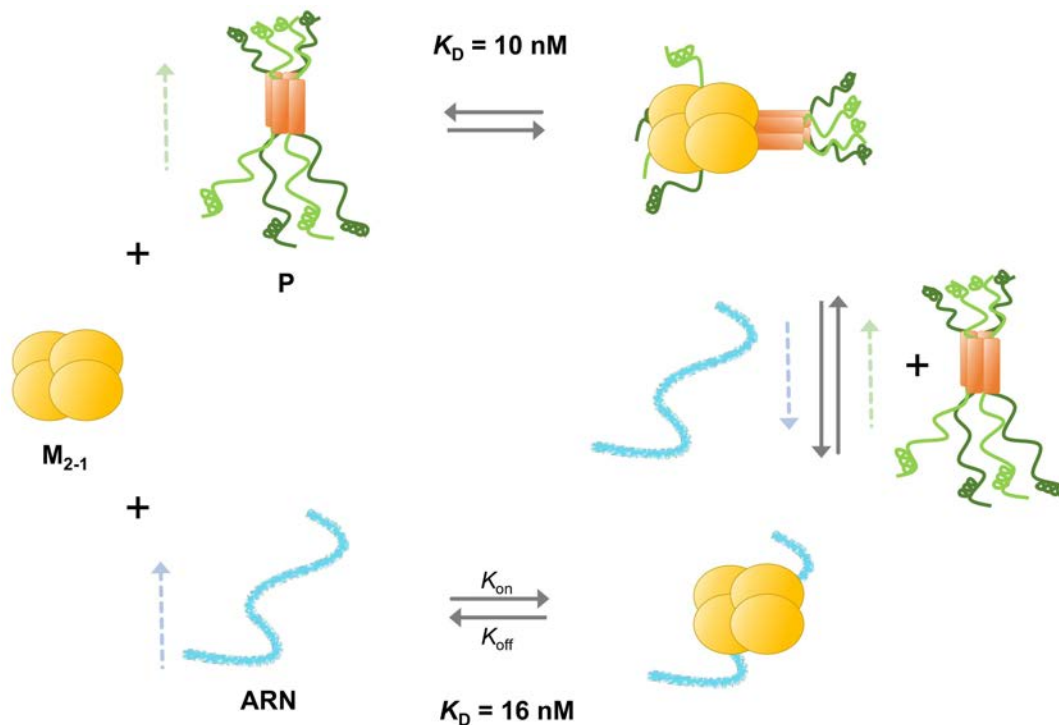
Este trabajo presenta evidencia de que M_{2-1} no tiene una preferencia por una secuencia de ARN en particular, de hecho, puede unir con igual afinidad secuencias de ARN de un virus no emparentado como así también, secuencias relacionadas al genoma de RSV, las cuales presentan la misma afinidad observada para secuencias poli-A previamente descritas como

principal blanco de unión de M_{2-1} (16). Sugerimos la participación de residuos adicionales a la región *core*, incluidos en el extremo N-terminal de la proteína ya que observamos un aumento en la afinidad con el largo del oligonucleótido, el cual podría abarcar más residuos y a su vez esto estaría favorecido por las cargas de los residuos presentes en esa región (16,37). Muchos antiterminadores de la transcripción se unen a secuencias dentro de los ARNm nacientes, y actúan impidiendo la formación de estructuras que actúan como señales de terminación, las cuales son ignoradas por la polimerasa (36). En este trabajo hemos demostrado que el antiterminador viral M_{2-1} se une al ARN y es capaz de romper las interacciones que le permiten formar una estructura secundaria, aunque esta no es muy estable.

La interacción entre P y M_{2-1} se ha propuesto como fundamental para reclutar a M_{2-1} a los cuerpos de inclusión donde se agrupan los componentes del complejo polimerasa durante la transcripción (49), y la anulación de la unión a P provoca la relocalización de M_{2-1} de estos sitios (37). En esta tesis hemos realizamos una disección de la unión M_{2-1} :P a través de experimentos en solución, caracterizamos los determinantes mínimos de la unión y realizamos un análisis termodinámico de la misma. Como hemos descrito en secciones anteriores, a partir trabajos previos se sabe que la unión de ARN a M_{2-1} es mutuamente excluyente de la interacción M_{2-1} : P, debido a la superposición parcial de las superficies de interacción (37,41). Dado que la unión de M_{2-1} tanto al ARN como a P son de alta afinidad (~ 10 nM) como vimos en este trabajo, es interesante especular sobre cómo el ARN podría interrumpir la fuerte interacción M_{2-1} :P o viceversa. Observamos que ambos tienen la capacidad de desplazar al otro cuando se encuentran formando complejo con M_{2-1} , solo si el desplazante se encuentra en altas concentraciones. Esto nos lleva a pensar que la unión del ARN o P a M_{2-1} depende en mayor medida de la cantidad del componente que se encuentra en el medio en ese momento y que a su vez esa unión puede estar condicionada por la temperatura, el pH, el hacinamiento molecular, la fuerza iónica del medio, ya que como hemos visto un componente de la interacción, pero no determinante, es el electrostático, entre otros factores.

Sobre la base de los resultados obtenidos en la presente tesis, proponemos un modelo que explica de manera resumida las interacciones tripartitas entre M_{2-1} , ARN y P (Esquema II). Proponemos un equilibrio de unión de M_{2-1} con el ARN o con P, según las concentraciones relativas de los mismos presentes en el medio. Integrando nuestros resultados con estudios previos sobre estas interacciones, podemos decir que en principio M_{2-1} se une a P y de este modo es reclutada a cuerpos de inclusión junto al resto de los componentes del complejo polimerasa donde tiene lugar la transcripción, por lo cual estos sitios activos de síntesis de ARN se los considera actualmente como “fábricas virales”. Una vez iniciada la síntesis se produce una acumulación de ARNm nacientes en el medio, los cuales desplazan a P y se unen a M_{2-1}

agrupándose en sub-compartimientos (IBAGs) dentro de los cuerpos de inclusión de manera transitoria para luego ser transportados al citoplasma donde ocurre la traducción viral.



Esquema II. Modelo de la interacción tripartita M₂₋₁, ARN y P. Se indican los tres componentes de la interacción, M₂₋₁, ARN y P, cuya interacción depende de la cantidad de los mismos en el medio, lo cual determinará el equilibrio hacia un lado o hacia el otro.

Estudios previos revelaron que los cuerpos de inclusión aparecen como agregados de naturaleza amorfa o granular y que los IBAGs son estructuras altamente dinámicas cuya formación depende de la presencia de M₂₋₁ por lo tanto de la síntesis de ARNm (49,102). Como dijimos previamente el resto de los componentes del complejo polimerasa se encuentran excluidos de los IBAGs, por lo cual la manera competitiva en la que se unen ARN y P a M₂₋₁ es consistente con la segregación observada de P de estos sub-compartimientos. La formación de estas organelas sin membrana puede considerarse como una separación de fases líquida-líquida, el cual es un proceso fisicoquímico en el que una solución con determinados componentes (proteínas y ácidos nucleicos en general) particiona en una fase de alta concentración y otra de baja. La gran mayoría de las proteínas que participan de este proceso presentan regiones IDPs y dominios de unión a ARN. La formación de estos cuerpos de inclusión por separación de fases está impulsada por múltiples interacciones de baja afinidad, esto ocurre cuando una mezcla de moléculas forma una red de interacciones que conducen a la concentración de moléculas en una fase separada. M₂₋₁ forma tetrámeros y como vimos en

esta tesis tiene la capacidad de unir varios ARN simultáneamente, representando a los ARNm recién sintetizados y por lo tanto podría promover la formación de estas redes de interacción.

La formación de estas organelas sin membrana es un mecanismo común entre los virus pertenecientes al orden Mononegavirales, se han observado inclusiones citoplasmáticas morfológicamente similares para varios miembros de este orden como lo son el virus de la Rabia, el virus de la Estomatitis Vesicular y el virus Ebola.

Esta tesis proporciona un primer paso significativo para comprender la antiterminación en la familia *Pneumoviridae* y constituye un avance en la comprensión de cómo se ensambla el complejo polimerasa y cómo interactúan algunos de sus componentes, lo cual puede ser extrapolado a otras familias pertenecientes al orden *Mononegavirales*.

Tesista

Mic. Ivana Gisele Molina

Director de Tesis

Dr. Gonzalo de Prat Gay

ANEXO

Anexo Tabla 1. Determinación de los valores de K_D para interacciones M_{2-1} /ARN no cooperativas.

<i>M₂₋₁ core:10mer ARN</i>			
[6-FAM ARN] (nM)	K_D (nM)	$DS K_D$ (nM)	Técnica
4600	400	240	EMSA
2800	72	37	EMSA
Promedio[#] (n = 2)	236	232	-
<i>M₂₋₁ core:20mer ARN</i>			
[6-FAM ARN] (nM)	K_D (nM)	$DS K_D$ (nM)	Técnica
1400	370	230	Fluorescencia
1770	133	150	Fluorescencia
3000	234	146	Fluorescencia
3200	75	48	Fluorescencia
2940	232	96	EMSA
3180	260	220	EMSA
4000	371	217	EMSA
Promedio[#] (n = 7)	239	110	-
<i>M₂₋₁ Tetrámero:10mer ARN</i>			
[6-FAM ARN] (nM)	K_D (nM)	$DS K_D$ (nM)	Técnica
1000	250	145	Fluorescencia
1600	280	100	Fluorescencia
2012	400	110	Fluorescencia
2020	550	150	Fluorescencia
2250	170	265	EMSA
2700	66	80	EMSA
Promedio[#] (n = 6)	286	170	-

Todos los parámetros fueron obtenidos a partir de ajustes de los datos utilizando un modelo de unión no cooperativo 1:1.

La desviación estándar para los valores promedios de K_D fueron calculados como

$$DE_{KD} = \sqrt{\frac{\sum (Kd - Kd \text{ prom})^2}{(n-1)}}, \text{ donde } Kd \text{ prom es el promedio } K_D, \text{ y } n \text{ es el número de determinaciones.}$$

Anexo Tabla 2. Análisis de la unión cooperativa (Hill).

<i>Unión del tetrámero M₂₋₁ con ARN 20mer no relacionado</i>			
[ARN]	<i>n_H</i>	<i>K_{Dapp}</i> (nM)	Coefficiente Corr
10 nM	2.0 ± 0.1	14.6 ± 2.7	0.968
10 nM II	1.4 ± 0.1	5.6 ± 1.4	0.974
20 nM	2.0 ± 0.2	12.0 ± 3.2	0.973
20 nM II	1.7 ± 0.4	13.4 ± 6.6	0.936
30 nM	1.9 ± 0.3	16.1 ± 5.1	0.963
40 nM	1.4 ± 0.2	22.8 ± 5.4	0.980
<i>Unión del tetrámero M₂₋₁ con ARN 20mer relacionado a RSV</i>			
[ARN]	<i>n_H</i>	<i>K_{Dapp}</i> (nM)	Coefficiente Corr
10 nM	1.7 ± 0.1	14.1 ± 1.7	0.994
10 nM II	1.9 ± 0.2	13.5 ± 3.2	0.979
10 nM III	2.0 ± 0.2	9.5 ± 3.0	0.963
20 nM	1.6 ± 0.3	18.0 ± 5.0	0.975
20 nM II	1.6 ± 0.3	18.0 ± 6.8	0.950
20 nM III	1.8 ± 0.2	15.3 ± 3.4	0.984
40 nM	2.0 ± 0.1	24.1 ± 4.4	0.983

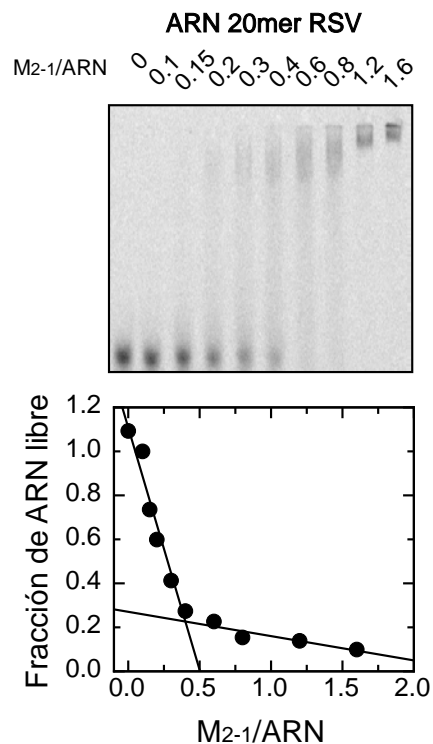


Figura Anexo 1. Estequiometría de unión del tetrámero M₂₋₁ con ARN 6-FAM 20mer RSV determinada por el ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA). Panel superior: electroforesis en gel nativo de acrilamida. Se incubó una concentración fija de 200 nM de ARN durante 20 minutos a temperatura ambiente con cantidades crecientes de M₂₋₁ hasta un exceso de 1,25 molar. Panel inferior: la estequiometría para cada interacción probada se determinó mediante densitometría de las bandas del ARN libre. Los gráficos representan la fracción de ARN libre en función de la relación molar tetrámero M₂₋₁:ARN.

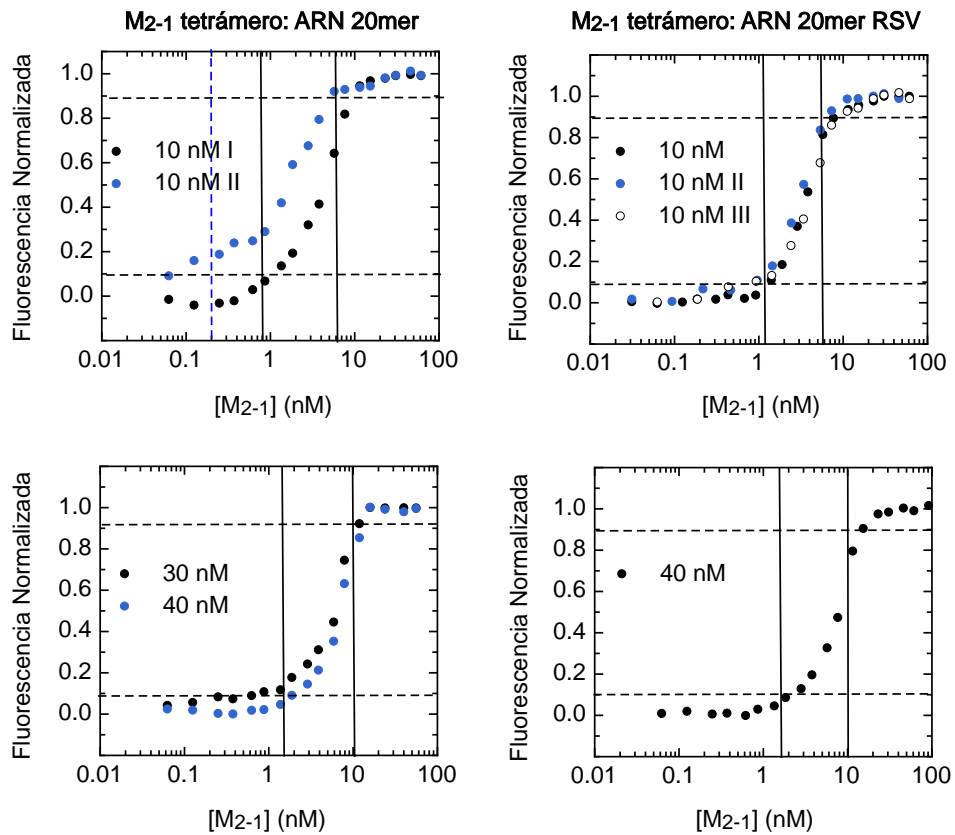


Figura Anexo 2. Titulaciones al equilibrio de la interacción del tetramero M₂-1 con ARN en escala logarítmica. Las titulaciones se muestran con el eje x en escala logarítmica. El número de unidades logarítmicas requeridas para la transición de saturación de 0.1 a 0.9 está marcado por barras verticales.

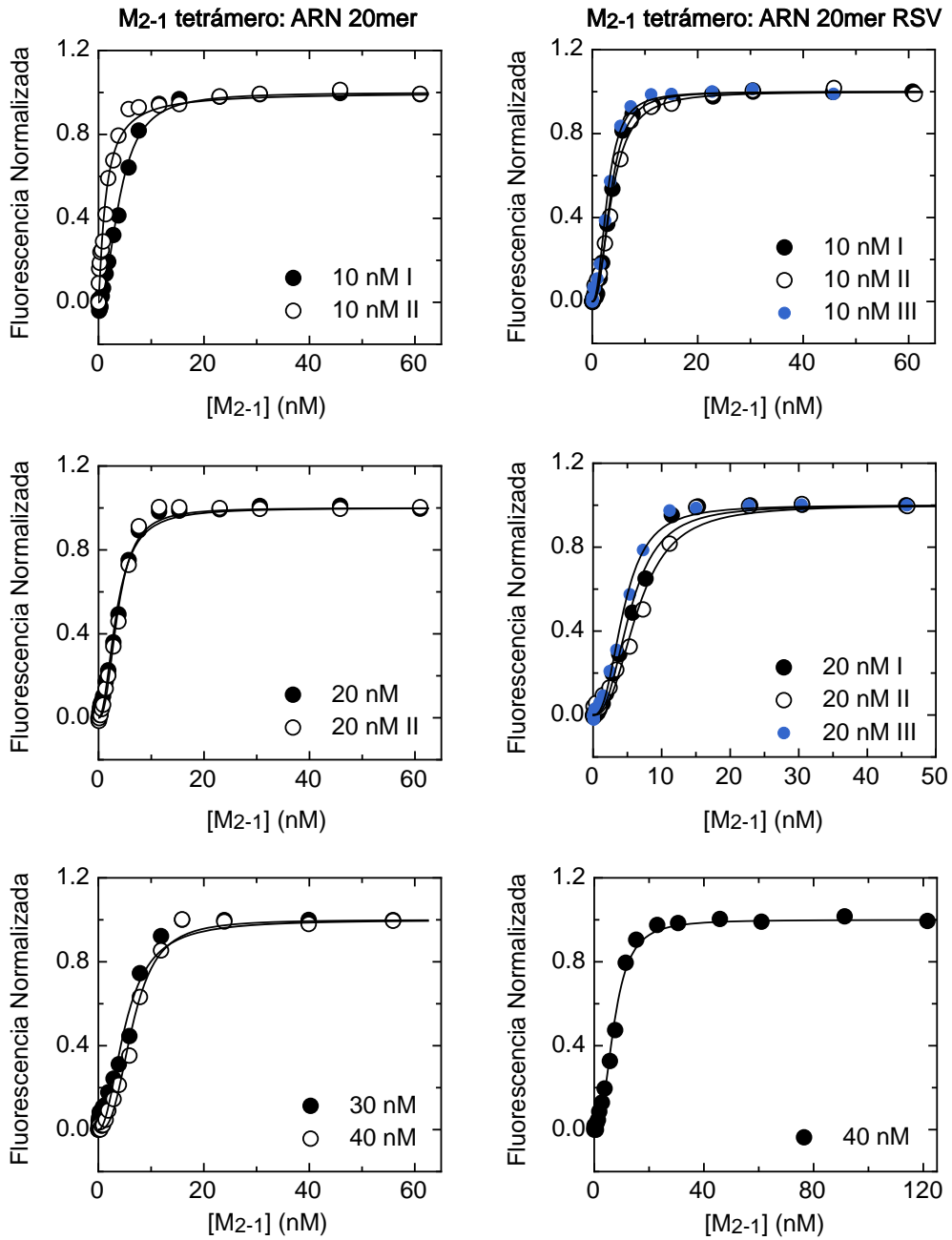


Figura Anexo 3. Titulación al equilibrio de la interacción del tetrámero M_{2-1} con ARN. Las titulaciones se realizaron con ARN 20mer marcados con 6-FAM cognados y no cognados a diferentes concentraciones subestequiométricas que varían de 10 a 40 nM. Se realizaron varias repeticiones de cada concentración de ARN y se ajustaron a la ecuación de Hill (ver materiales y métodos).

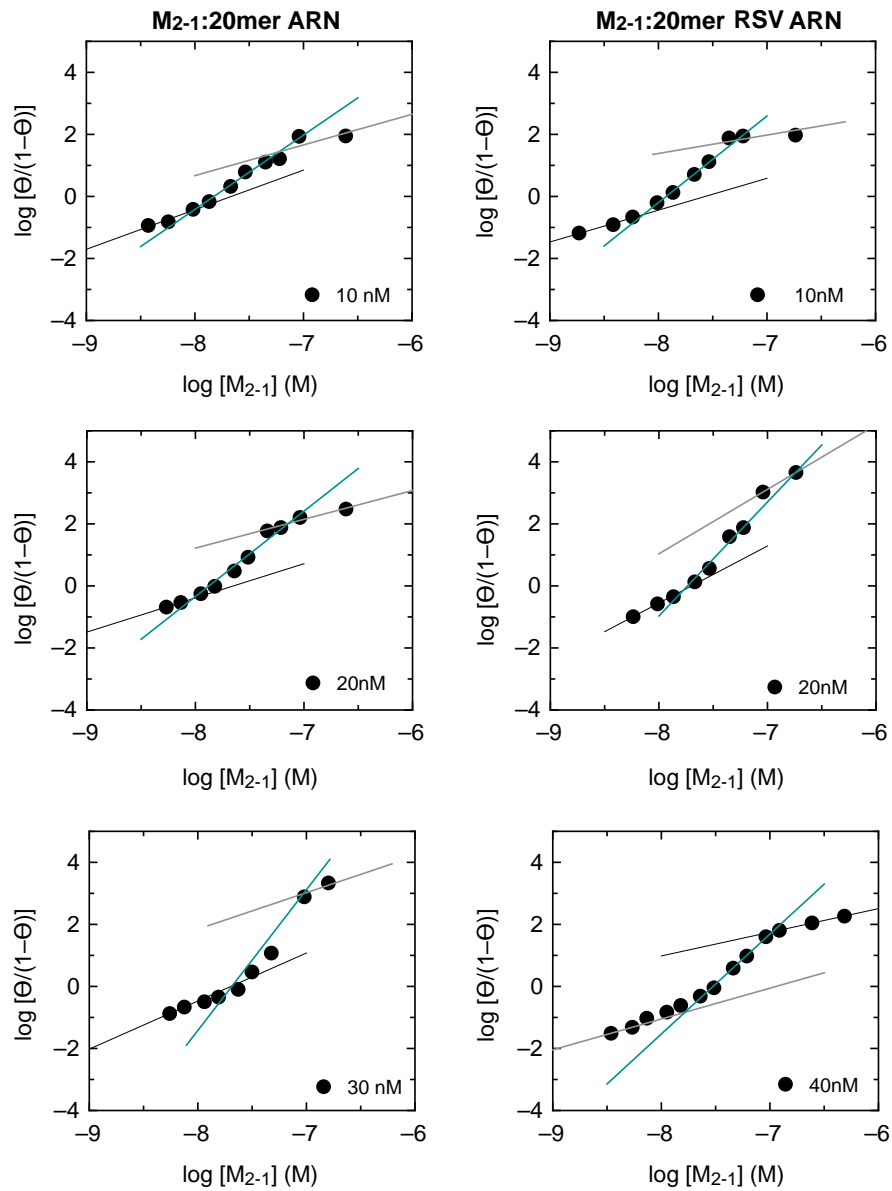


Figura Anexo 4. Transformación lineal de la ecuación de Hill para estimar los parámetros n_H y K_{Dapp} para el modelo de unión del ARN al tetrámero M_{2-1} a las diferentes concentraciones de ARN. Los datos de las titulaciones al equilibrio se normalizaron y se ajustaron mediante regresión lineal. Los parámetros obtenidos de los ajustes y sus errores se muestran en la Tabla Anexo 2. Para fines de ajuste, la concentración de M_{2-1} se expresa en unidades monoméricas.

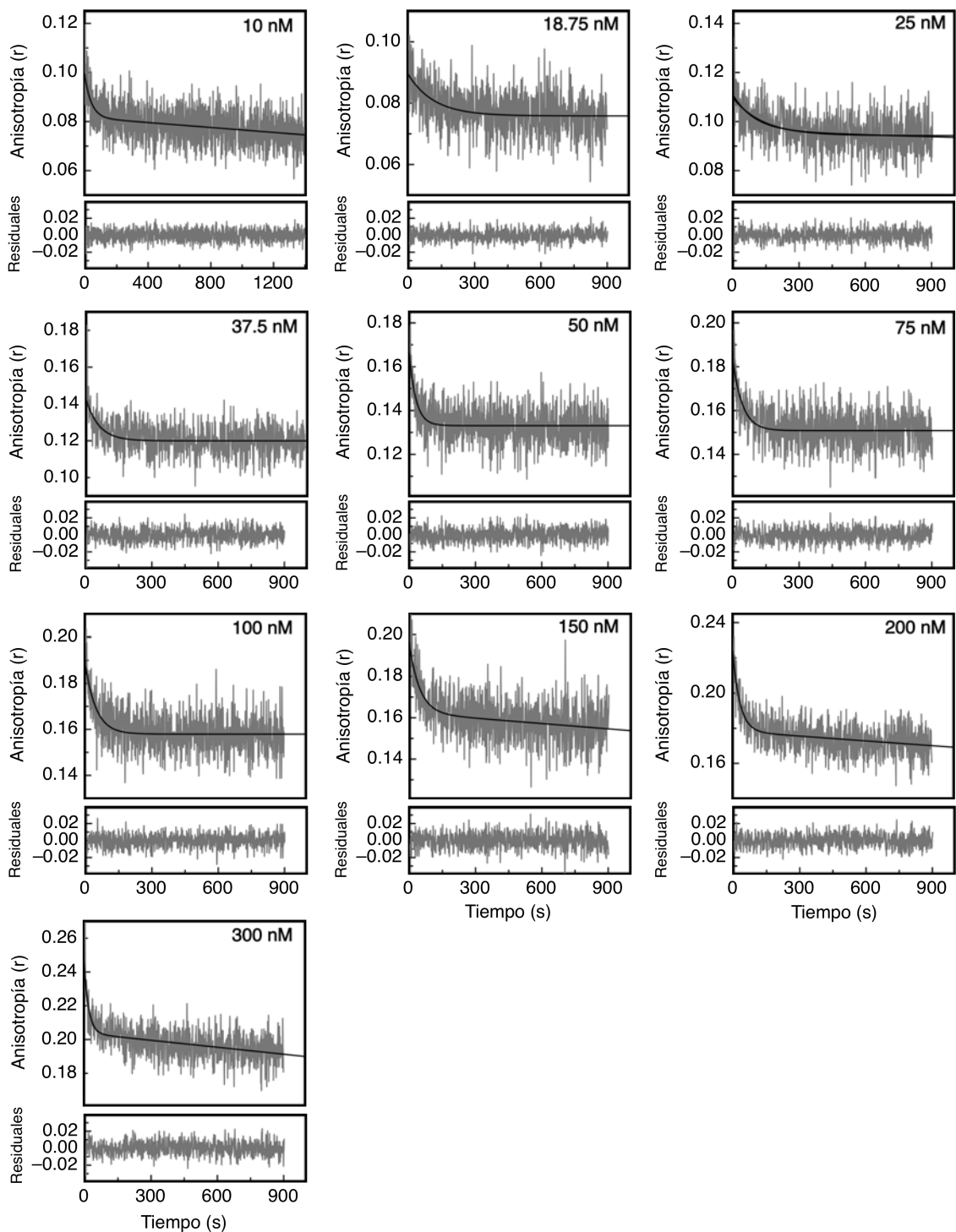


Figura Anexo 5. Ajustes de los datos de las cinéticas de asociación tetramero M_{2-1} :ARN seguida por anisotropía de fluorescencia. Se añadieron diferentes concentraciones de M_{2-1} por mezclado manual (tiempo muerto 5 segundos) a una cubeta que contenía 5 nM de ARN 20mer marcado con 6-FAM. La interacción fue seguida en el tiempo por cambios de anisotropía de fluorescencia hasta la saturación. La señal de anisotropía para diferentes concentraciones de tetramero se ajustó a una ecuación monoexponencial. Los residuales se muestran debajo de los ajustes.

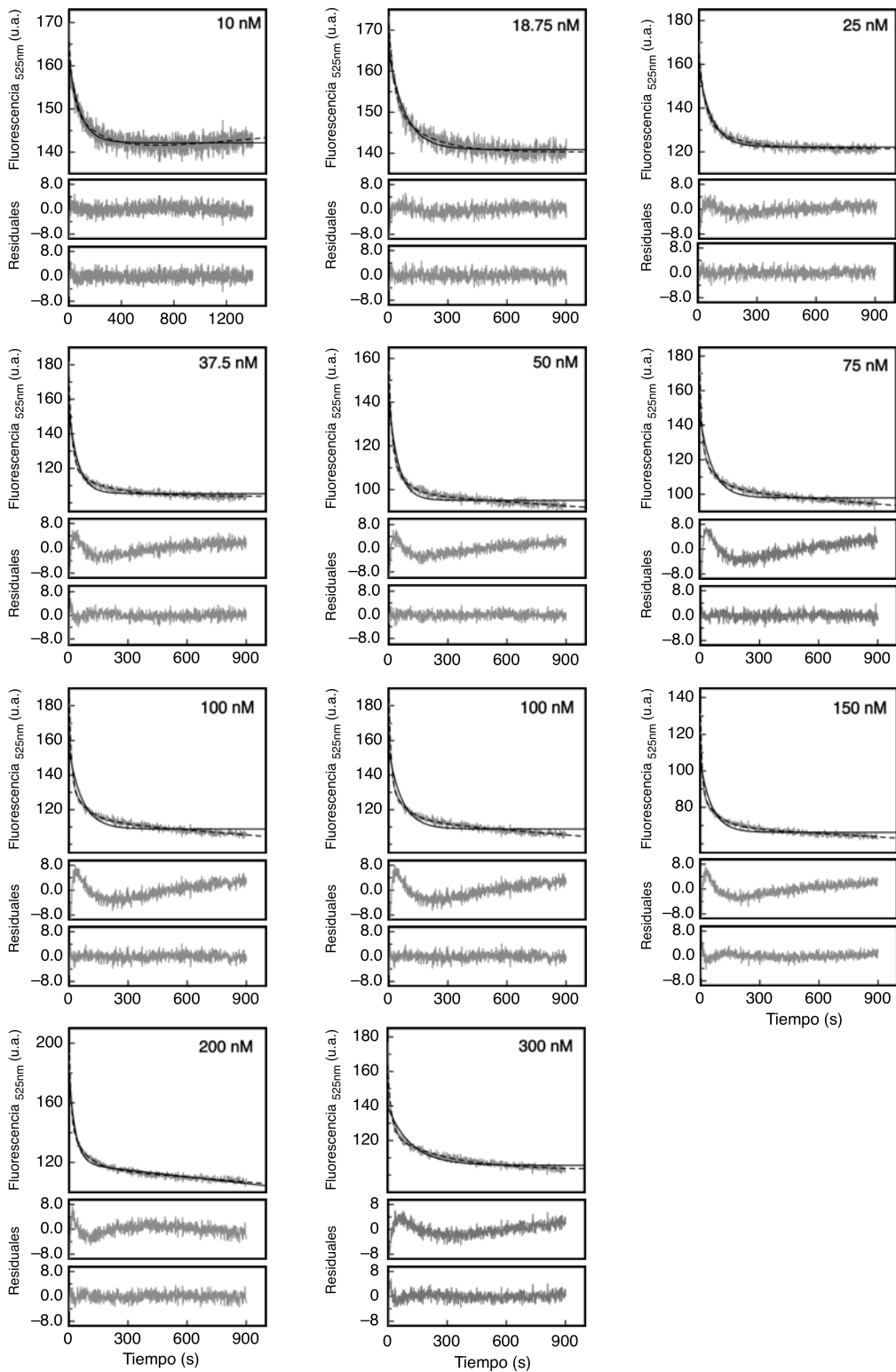


Figura Anexo 6. Ajustes de los datos de las cinéticas de asociación tetrámero M_{2-1} :ARN seguida por fluorescencia a 525 nm. Se añadieron diferentes concentraciones de M_{2-1} por mezclado manual (tiempo muerto 5 segundos) a una cubeta que contenía 5 nM de ARN 20mer marcado con 6-FAM. La interacción fue seguida en el tiempo por cambios de fluorescencia a 525 nm hasta la saturación. La señal de anisotropía para diferentes concentraciones de tetrámero se ajustó a una ecuación monoexponencial (línea continua negra) o a una ecuación biexponencial (línea discontinua).

Los residuales del ajuste monoexponencial se muestra en el panel superior y los residuales del ajuste biexponencial se muestra en el panel inferior.

MEKFAPEFHGEDANNRATKFLESIKGKFTSPKDPKPKKDSIISVN
 SIDIEVTKESPITSNSTIINPTNETDDTAGNKPNYQRKPLVSFKE
 DPTPSDNPFSKLYLVPRGSKETIETFDNNEEESSYSYEEINDQT
 NDNITARLDRIDEKLSEILGMLHLLVVASAGPTS LVPRGSARDGI
 RDAMIGLREEMIEKIRTEALMTNDRLEAMARLRNEESEKMAKD
 TSDEVSLNPTSEKLNLLLEGNDSDNDLSLEDF

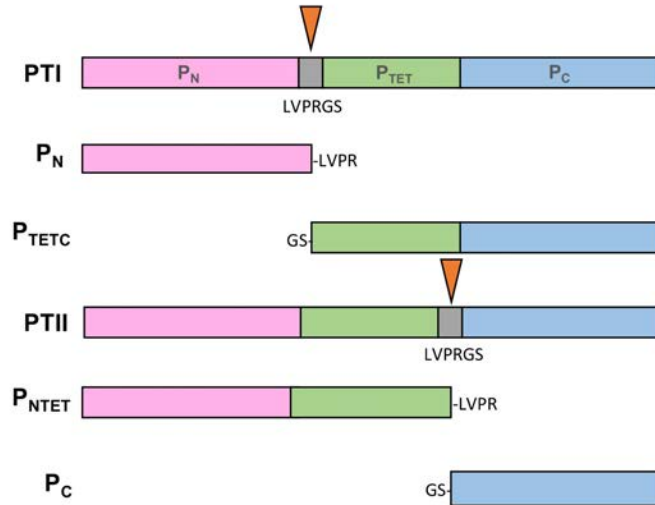


Figura Anexo 7. En la parte superior observamos la secuencia completa de P, se puede diferenciar el sitio mapeado de unión a M_{2-1} (102) resaltado en amarillo (residuos 93-110), el dominio de tetramerización denotado con letras rojas (residuos 103-161) y los sitios de corte con trombina (LVPRGS) generados en el laboratorio previamente (73) en letra de color azul. En el panel inferior podemos observar los fragmentos de P generados a partir de dos construcciones llamadas P trombina I (PTI) y P trombina II (PTII) con sus sitios de corte con la enzima trombina (círculos invertidos anaranjados) que nos permite obtener la región P_N (residuos 1-102) y P_{TETC} (residuos 103-241) (PTI) y los fragmentos P_{NTET} (residuos 1-161) y P_C (residuos 161-241) (PTII), con los cuales se desarrollaron los experimentos del capítulo II de esta tesis.

BIBLIOGRAFIA

1. Monto AS. Epidemiology of viral respiratory infections. *The American Journal of Medicine* [Internet]. 22 de abril de 2002 [citado 13 de septiembre de 2018];112(6, Supplement 1):4-12. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002934301010580>
2. Robinson RF. Impact of respiratory syncytial virus in the United States. *Am J Health Syst Pharm.* 1 de diciembre de 2008;65(23 Suppl 8):S3-6.
3. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
4. Marcone DN, Ellis A, Videla C, Ekstrom J, Ricarte C, Carballal G, et al. Viral etiology of acute respiratory infections in hospitalized and outpatient children in Buenos Aires, Argentina. *Pediatr Infect Dis J.* marzo de 2013;32(3):e105-110.
5. Mufson MA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* octubre de 1985;66 (Pt 10):2111-24.
6. Cui G, Zhu R, Qian Y, Deng J, Zhao L, Sun Y, et al. Genetic Variation in Attachment Glycoprotein Genes of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroups A and B in Children in Recent Five Consecutive Years. *PLoS One* [Internet]. 17 de septiembre de 2013 [citado 26 de octubre de 2018];8(9). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3775769/>
7. Obodai E, Odoom JK, Adiku T, Goka B, Wolff T, Biere B, et al. The significance of human respiratory syncytial virus (HRSV) in children from Ghana with acute lower respiratory tract infection: A molecular epidemiological analysis, 2006 and 2013-2014. *PLoS One* [Internet]. 10 de septiembre de 2018 [citado 26 de octubre de 2018];13(9). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6130863/>
8. Krilov LR. Respiratory syncytial virus disease: update on treatment and prevention. *Expert Rev Anti Infect Ther.* enero de 2011;9(1):27-32.
9. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. The IMPact-RSV Study Group. *Pediatrics.* septiembre de 1998;102(3 Pt 1):531-7.
10. Hussman JM, Li A, Paes B, Lanctôt KL. A review of cost-effectiveness of palivizumab for respiratory syncytial virus. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* octubre de 2012;12(5):553-67.
11. Afonso CL, Amarasinghe GK, Bányai K, Bào Y, Basler CF, Bavari S, et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch Virol.* agosto de 2016;161(8):2351-60.
12. Samal SK, editor. *The Biology of paramyxoviruses*. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2011. 469 p.
13. Ortín J, Martín-Benito J. The RNA synthesis machinery of negative-stranded RNA viruses. *Virology.* mayo de 2015;479-480:532-44.
14. Cox R, Plemper RK. The paramyxovirus polymerase complex as a target for next-generation anti-paramyxovirus therapeutics. *Front Microbiol.* 2015;6:459.
15. Tawar RG, Duquerroy S, Vornrhein C, Varela PF, Damier-Piolle L, Castagné N, et al. Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science.* 27 de noviembre de 2009;326(5957):1279-83.
16. Tanner SJ, Ariza A, Richard C-A, Kyle HF, Dods RL, Blondot M-L, et al. Crystal structure of the essential transcription antiterminator M2-1 protein of human respiratory syncytial virus and implications of its phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 28 de enero de 2014 [citado 17 de agosto de 2018];111(4):1580-5. Disponible en: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1317262111>
17. Collins PL, Fearn R, Graham BS. *Respiratory Syncytial Virus: Virology, Reverse Genetics, and Pathogenesis of Disease*. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2013 [citado 14 de septiembre de 2018];372:3-38. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4794264/>
18. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiología médica*. Barcelona: Elsevier : Mosby; 2006.
19. Noton SL, Fearn R. INITIATION AND REGULATION OF PARAMYXOVIRUS

- TRANSCRIPTION AND REPLICATION. *Virology* [Internet]. mayo de 2015 [citado 18 de septiembre de 2018];0:545-54. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4424093/>
20. Muniyandi S, Pangratiou G, Edwards TA, Barr JN. Structure and Function of the Human Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein. En: Harris JR, Bhella D, editores. *Virus Protein and Nucleoprotein Complexes* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2018 [citado 17 de agosto de 2018]. p. 245-60. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-8456-0_11
 21. Tremaglio CZ, Noton SL, Deflubé LR, Fearn R. Respiratory syncytial virus polymerase can initiate transcription from position 3 of the leader promoter. *J Virol.* marzo de 2013;87(6):3196-207.
 22. Kuo L, Fearn R, Collins PL. Analysis of the gene start and gene end signals of human respiratory syncytial virus: quasi-templated initiation at position 1 of the encoded mRNA. *J Virol* [Internet]. julio de 1997 [citado 17 de septiembre de 2018];71(7):4944-53. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC191725/>
 23. Yu Q, Hardy RW, Wertz GW. Functional cDNA clones of the human respiratory syncytial (RS) virus N, P, and L proteins support replication of RS virus genomic RNA analogs and define minimal trans-acting requirements for RNA replication. *J Virol.* abril de 1995;69(4):2412-9.
 24. Collins PL, Hill MG, Camargo E, Grosfeld H, Chanock RM, Murphy BR. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 5 de diciembre de 1995;92(25):11563-7.
 25. Collins PL, Hill MG, Cristina J, Grosfeld H. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 9 de enero de 1996 [citado 17 de septiembre de 2018];93(1):81-5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC40182/>
 26. Fearn R, Collins PL. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol.* julio de 1999;73(7):5852-64.
 27. Sutherland KA, Collins PL, Peeples ME. Synergistic effects of gene-end signal mutations and the M2-1 protein on transcription termination by respiratory syncytial virus. *Virology.* 30 de septiembre de 2001;288(2):295-307.
 28. Hardy RW, Wertz GW. The Product of the Respiratory Syncytial Virus M2 Gene ORF1 Enhances Readthrough of Intergenic Junctions during Viral Transcription. *J Virol* [Internet]. enero de 1998 [citado 17 de septiembre de 2018];72(1):520-6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC109403/>
 29. Qanungo KR, Shaji D, Mathur M, Banerjee AK. Two RNA polymerase complexes from vesicular stomatitis virus-infected cells that carry out transcription and replication of genome RNA. *PNAS* [Internet]. 20 de abril de 2004 [citado 18 de septiembre de 2018];101(16):5952-7. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/101/16/5952>
 30. Curran J, Kolakofsky D. Nonsegmented negative-strand RNA virus RNA synthesis in vivo. *Virology* [Internet]. 20 de febrero de 2008 [citado 18 de septiembre de 2018];371(2):227-30. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682207007921>
 31. Noton SL, Deflubé LR, Tremaglio CZ, Fearn R. The Respiratory Syncytial Virus Polymerase Has Multiple RNA Synthesis Activities at the Promoter. *PLoS Pathog* [Internet]. 18 de octubre de 2012 [citado 18 de septiembre de 2018];8(10). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3475672/>
 32. Morin B, Rahmeh AA, Whelan SP. Mechanism of RNA synthesis initiation by the vesicular stomatitis virus polymerase. *The EMBO Journal* [Internet]. 7 de marzo de 2012 [citado 18 de septiembre de 2018];31(5):1320-9. Disponible en: <http://emboj.embopress.org/content/31/5/1320>
 33. Collins PL, Hill MG, Johnson PR. The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and

expression in vitro. *J Gen Virol.* diciembre de 1990;71 (Pt 12):3015-20.

34. Collins PL, Wertz GW. The envelope-associated 22K protein of human respiratory syncytial virus: nucleotide sequence of the mRNA and a related polytranscript. *J Virol.* abril de 1985;54(1):65-71.
35. Kuehner JN, Pearson E, Moore CL. Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2011;12:283-94.
36. Greenblatt J, Nodwell JR, Mason SW. Transcriptional antitermination. *Nature* [Internet]. julio de 1993 [citado 19 de septiembre de 2018];364(6436):401-6. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/364401a0>
37. Blondot M-L, Dubosclard V, Fix J, Lassoued S, Aumont-Nicaise M, Bontems F, et al. Structure and Functional Analysis of the RNA- and Viral Phosphoprotein-Binding Domain of Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein. *PLOS Pathogens* [Internet]. 31 de mayo de 2012 [citado 19 de septiembre de 2018];8(5):e1002734. Disponible en: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002734>
38. Tran T-L, Castagne N, Dubosclard V, Noinville S, Koch E, Moudjou M, et al. The Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Forms Tetramers and Interacts with RNA and P in a Competitive Manner. *Journal of Virology* [Internet]. 1 de julio de 2009 [citado 17 de agosto de 2018];83(13):6363-74. Disponible en: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00335-09>
39. Esperante SA, Chemes LB, Sánchez IE, de Prat-Gay G. The Respiratory Syncytial Virus Transcription Antiterminator M₂₋₁ Is a Highly Stable, Zinc Binding Tetramer with Strong pH-Dependent Dissociation and a Monomeric Unfolding Intermediate. *Biochemistry* [Internet]. 11 de octubre de 2011 [citado 17 de agosto de 2018];50(40):8529-39. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi200661k>
40. Cartee TL, Wertz GW. Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Requires Phosphorylation for Efficient Function and Binds Viral RNA during Infection. *J Virol* [Internet]. diciembre de 2001 [citado 19 de septiembre de 2018];75(24):12188-97. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC116116/>
41. Tran T-L, Castagne N, Dubosclard V, Noinville S, Koch E, Moudjou M, et al. The Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Forms Tetramers and Interacts with RNA and P in a Competitive Manner. *Journal of Virology* [Internet]. 1 de julio de 2009 [citado 17 de agosto de 2018];83(13):6363-74. Disponible en: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00335-09>
42. Mason SW, Aberg E, Lawetz C, DeLong R, Whitehead P, Liuzzi M. Interaction between human respiratory syncytial virus (RSV) M2-1 and P proteins is required for reconstitution of M2-1-dependent RSV minigenome activity. *J Virol.* octubre de 2003;77(19):10670-6.
43. Cuesta I, Geng X, Asenjo A, Villanueva N. Structural phosphoprotein M2-1 of the human respiratory syncytial virus is an RNA binding protein. *J Virol.* noviembre de 2000;74(21):9858-67.
44. Richard C-A, Rincheval V, Lassoued S, Fix J, Cardone C, Esneau C, et al. RSV hijacks cellular protein phosphatase 1 to regulate M2-1 phosphorylation and viral transcription. *PLOS Pathogens* [Internet]. 28 de febrero de 2018 [citado 3 de septiembre de 2018];14(3):e1006920. Disponible en: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1006920>
45. Norrby E, Marusyk H, Orvell C. Morphogenesis of respiratory syncytial virus in a green monkey kidney cell line (Vero). *J Virol.* agosto de 1970;6(2):237-42.
46. Lahaye X, Vidy A, Pomier C, Obiang L, Harper F, Gaudin Y, et al. Functional Characterization of Negri Bodies (NBs) in Rabies Virus-Infected Cells: Evidence that NBs Are Sites of Viral Transcription and Replication. *Journal of Virology* [Internet]. 15 de agosto de 2009 [citado 20 de septiembre de 2018];83(16):7948-58. Disponible en: <https://jvi.asm.org/content/83/16/7948>
47. Dolnik O, Stevermann L, Kolesnikova L, Becker S. Marburg virus inclusions: A virus-induced microcompartment and interface to multivesicular bodies and the late endosomal compartment. *Eur J Cell Biol.* septiembre de 2015;94(7-9):323-31.
48. Baskerville A, Fisher-Hoch SP, Neild GH, Dowsett AB. Ultrastructural pathology of

experimental Ebola haemorrhagic fever virus infection. *J Pathol.* noviembre de 1985;147(3):199-209.

49. Rincheval V, Lelek M, Gault E, Bouillier C, Sitterlin D, Blouquit-Laye S, et al. Functional organization of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected by respiratory syncytial virus. *Nat Commun.* 15 de 2017;8(1):563.

50. Leyrat C, Renner M, Harlos K, Huiskonen JT, Grimes JM. Drastic changes in conformational dynamics of the antiterminator M2-1 regulate transcription efficiency in Pneumovirinae. *Elife.* 19 de mayo de 2014;3:e02674.

51. Biedenkopf N, Hartlieb B, Hoenen T, Becker S. Phosphorylation of Ebola Virus VP30 Influences the Composition of the Viral Nucleocapsid Complex. *J Biol Chem* [Internet]. 19 de abril de 2013 [citado 20 de septiembre de 2018];288(16):11165-74. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3630872/>

52. Grifoni A, Lo Presti A, Giovanetti M, Montesano C, Amicosante M, Colizzi V, et al. Genetic diversity in Ebola virus: Phylogenetic and in silico structural studies of Ebola viral proteins. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* [Internet]. 1 de abril de 2016 [citado 20 de septiembre de 2018];9(4):337-43. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764516300165>

53. Hartlieb B, Muziol T, Weissenhorn W, Becker S. Crystal structure of the C-terminal domain of Ebola virus VP30 reveals a role in transcription and nucleocapsid association. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 9 de enero de 2007 [citado 17 de agosto de 2018];104(2):624-9. Disponible en: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0606730104>

54. García-Barreno B, Delgado T, Melero JA. Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions. *Journal of Virology* [Internet]. 1 de febrero de 1996 [citado 20 de septiembre de 2018];70(2):801-8. Disponible en: <https://jvi.asm.org/content/70/2/801>

55. Tran T-L, Castagné N, Bhella D, Varela PF, Bernard J, Chilmonczyk S, et al. The nine C-terminal amino acids of the respiratory syncytial virus protein P are necessary and sufficient for binding to ribonucleoprotein complexes in which six ribonucleotides are contacted per N protein protomer. *J Gen Virol.* enero de 2007;88(Pt 1):196-206.

56. Yunus AS, Khattar SK, Samal SK. Mapping the domains on the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus required for N–P and P–L interactions using a minigenome system. *Journal of General Virology* [Internet]. 1 de abril de 2001 [citado 20 de septiembre de 2018];82(4):775-9. Disponible en: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-82-4-775>

57. Slack MS, Easton AJ. Characterization of the interaction of the human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleocapsid protein using the two-hybrid system. *Virus Research* [Internet]. 1 de junio de 1998 [citado 31 de octubre de 2018];55(2):167-76. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170298000422>

58. Karlin D, Ferron F, Canard B, Longhi S. Structural disorder and modular organization in Paramyxovirinae N and P. *J Gen Virol.* diciembre de 2003;84(Pt 12):3239-52.

59. Leyrat C, Yabukarski F, Tarbouriech N, Jr EAR, Jensen MR, Blackledge M, et al. Structure of the Vesicular Stomatitis Virus N0-P Complex. *PLOS Pathogens* [Internet]. 22 de septiembre de 2011 [citado 31 de octubre de 2018];7(9):e1002248. Disponible en: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002248>

60. Esperante SA, Paris G, de Prat-Gay G. Modular Unfolding and Dissociation of the Human Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein P and Its Interaction with the M₂₋₁ Antiterminator: A Singular Tetramer–Tetramer Interface Arrangement. *Biochemistry* [Internet]. 16 de octubre de 2012 [citado 17 de agosto de 2018];51(41):8100-10. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi300765c>

61. Asenjo A, Calvo E, Villanueva N. Phosphorylation of human respiratory syncytial virus P

protein at threonine 108 controls its interaction with the M2-1 protein in the viral RNA polymerase complex. *J Gen Virol.* diciembre de 2006;87(Pt 12):3637-42.

62. Asenjo A, González-Armas JC, Villanueva N. Phosphorylation of human respiratory syncytial virus P protein at serine 54 regulates viral uncoating. *Virology* [Internet]. octubre de 2008 [citado 20 de septiembre de 2018];380(1):26-33. Disponible en: <http://europepmc.org/abstract/med/18706669>

63. Llorente MT, García-Barreno B, Calero M, Camafeita E, López JA, Longhi S, et al. Structural analysis of the human respiratory syncytial virus phosphoprotein: characterization of an alpha-helical domain involved in oligomerization. *J Gen Virol.* enero de 2006;87(Pt 1):159-69.

64. Mazumder B, Barik S. Requirement of casein kinase II-mediated phosphorylation for the transcriptional activity of human respiratory syncytial viral phosphoprotein P: transdominant negative phenotype of phosphorylation-defective P mutants. *Virology.* 15 de noviembre de 1994;205(1):104-11.

65. Llorente MT, Taylor IA, López-Viñas E, Gomez-Puertas P, Calder LJ, García-Barreno B, et al. Structural properties of the human respiratory syncytial virus P protein: evidence for an elongated homotetrameric molecule that is the smallest orthologue within the family of paramyxovirus polymerase cofactors. *Proteins.* 15 de agosto de 2008;72(3):946-58.

66. Castagné N, Barbier A, Bernard J, Rezaei H, Huet J-C, Henry C, et al. Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain. *J Gen Virol.* junio de 2004;85(Pt 6):1643-53.

67. Tarbouriech N, Curran J, Ruigrok RW, Burmeister WP. Tetrameric coiled coil domain of Sendai virus phosphoprotein. *Nat Struct Biol.* septiembre de 2000;7(9):777-81.

68. Leyrat C, Renner M, Harlos K, Grimes JM. Solution and Crystallographic Structures of the Central Region of the Phosphoprotein from Human Metapneumovirus. *PLOS ONE* [Internet]. 4 de noviembre de 2013 [citado 31 de octubre de 2018];8(11):e80371. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0080371>

69. Renner M, Paesen GC, Grison CM, Granier S, Grimes JM, Leyrat C. Structural dissection of human metapneumovirus phosphoprotein using small angle x-ray scattering. *Sci Rep* [Internet]. 1 de noviembre de 2017 [citado 31 de octubre de 2018];7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5665942/>

70. Carromeu C, Simabuco FM, Tamura RE, Farinha Arcieri LE, Ventura AM. Intracellular localization of human respiratory syncytial virus L protein. *Arch Virol* [Internet]. 1 de diciembre de 2007 [citado 24 de septiembre de 2018];152(12):2259-63. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00705-007-1048-4>

71. García J, García-Barreno B, Vivo A, Melero JA. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology.* julio de 1993;195(1):243-7.

72. Esperante SA, Paris G, de Prat-Gay G. Modular Unfolding and Dissociation of the Human Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein P and Its Interaction with the M₂₋₁ Antiterminator: A Singular Tetramer-Tetramer Interface Arrangement. *Biochemistry* [Internet]. 16 de octubre de 2012 [citado 17 de agosto de 2018];51(41):8100-10. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi300765c>

73. Noval MG, Esperante SA, Molina IG, Chemes LB, Prat-Gay G de. Intrinsic Disorder to Order Transitions in the Scaffold Phosphoprotein P from the Respiratory Syncytial Virus RNA Polymerase Complex. *Biochemistry* [Internet]. 15 de marzo de 2016 [citado 17 de agosto de 2018];55(10):1441-54. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biochem.5b01332>

74. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* noviembre de 1995;4(11):2411-23.

75. Fersht A, Fersht UA. Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme

- Catalysis and Protein Folding. W. H. Freeman; 1999. 660 p.
76. Pretel E, Camporeale G, de Prat-Gay G. The non-structural NS1 protein unique to respiratory syncytial virus: a two-state folding monomer in quasi-equilibrium with a stable spherical oligomer. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e74338.
 77. Kabsch W. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. febrero de 2010;66(Pt 2):125-32.
 78. Evans P. Scaling and assessment of data quality. *Acta Cryst D, Acta Cryst Sect D, Acta Crystallogr D, Acta Crystallogr Sect D, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* [Internet]. 1 de enero de 2006 [citado 21 de agosto de 2018];62(1):72-82. Disponible en: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?ba5084>
 79. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr*. 01 de 2007;40(Pt 4):658-74.
 80. Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst D, Acta Cryst Sect D, Acta Crystallogr D, Acta Crystallogr Sect D, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* [Internet]. 1 de diciembre de 2004 [citado 21 de agosto de 2018];60(12):2126-32. Disponible en: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?ba5070>
 81. Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Echols N, Headd JJ, Moriarty NW, Mustyakimov M, et al. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. abril de 2012;68(Pt 4):352-67.
 82. Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Cryst D, Acta Cryst Sect D, Acta Crystallogr D, Acta Crystallogr Sect D, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* [Internet]. 1 de enero de 2010 [citado 21 de agosto de 2018];66(1):12-21. Disponible en: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?dz5180>
 83. PyMOL | pymol.org [Internet]. [citado 21 de agosto de 2018]. Disponible en: <https://pymol.org/2/>
 84. Franke D, Petoukhov MV, Konarev PV, Panjkovich A, Tuukkanen A, Mertens HDT, et al. ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *J Appl Crystallogr*. 1 de agosto de 2017;50(Pt 4):1212-25.
 85. Konarev PV, Volkov VV, Sokolova AV, Koch MHJ, Svergun DI. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J Appl Cryst, J Appl Crystallogr* [Internet]. 1 de octubre de 2003 [citado 21 de agosto de 2018];36(5):1277-82. Disponible en: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?ks5004>
 86. Svergun DI. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J Appl Cryst, J Appl Crystallogr* [Internet]. 1 de agosto de 1992 [citado 21 de agosto de 2018];25(4):495-503. Disponible en: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?wi0087>
 87. Franke D, Svergun DI. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J Appl Crystallogr*. 1 de abril de 2009;42(Pt 2):342-6.
 88. Vogt AD, Di Cera E. Conformational selection or induced fit? A critical appraisal of the kinetic mechanism. *Biochemistry*. 31 de julio de 2012;51(30):5894-902.
 89. Kuzmič P, Moss ML, Kofron JL, Rich DH. Fluorescence displacement method for the determination of receptor-ligand binding constants. *Analytical Biochemistry* [Internet]. agosto de 1992 [citado 27 de septiembre de 2018];205(1):65-9. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000326979290579V>
 90. Cattoni DI, Chara O, Kaufman SB, González Flecha FL. Cooperativity in Binding Processes: New Insights from Phenomenological Modeling. *PLoS One* [Internet]. 30 de diciembre de 2015 [citado 21 de agosto de 2018];10(12). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4696654/>
 91. Ames JB, Porumb T, Tanaka T, Ikura M, Stryer L. Amino-terminal Myristoylation Induces Cooperative Calcium Binding to Recoverin. *J Biol Chem* [Internet]. 3 de marzo de 1995 [citado 21 de agosto de 2018];270(9):4526-33. Disponible en: <http://www.jbc.org/content/270/9/4526>
 92. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al.

UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* octubre de 2004;25(13):1605-12.

93. Santangelo TJ, Artsimovitch I. Termination and antitermination: RNA polymerase runs a stop sign. *Nat Rev Microbiol.* mayo de 2011;9(5):319-29.

94. Weisberg RA, Gottesman ME. Processive Antitermination. *J Bacteriol* [Internet]. enero de 1999 [citado 27 de septiembre de 2018];181(2):359-67. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC93386/>

95. Zhang J, Landick R. A Two-Way Street: Regulatory Interplay between RNA Polymerase and Nascent RNA Structure. *Trends Biochem Sci.* 2016;41(4):293-310.

96. Hardy RW, Wertz GW. The Cys(3)-His(1) motif of the respiratory syncytial virus M2-1 protein is essential for protein function. *J Virol.* julio de 2000;74(13):5880-5.

97. Frisch C, Fersht AR, Schreiber G. Experimental assignment of the structure of the transition state for the association of barnase and barstar. *J Mol Biol.* 20 de abril de 2001;308(1):69-77.

98. Schreiber G. Kinetic studies of protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol.* febrero de 2002;12(1):41-7.

99. Ferreira DU, de Prat-Gay G. A protein-DNA binding mechanism proceeds through multi-state or two-state parallel pathways. *J Mol Biol.* 1 de agosto de 2003;331(1):89-99.

100. Sheinerman F. Electrostatic aspects of protein-protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology* [Internet]. 1 de abril de 2000 [citado 27 de septiembre de 2018];10(2):153-9. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959440X00000658>

101. Song B, Cho J-H, Raleigh DP. Ionic-strength-dependent effects in protein folding: analysis of rate equilibrium free-energy relationships and their interpretation. *Biochemistry.* 11 de diciembre de 2007;46(49):14206-14.

102. Richard C-A, Rincheval V, Lassoued S, Fix J, Cardone C, Esneau C, et al. RSV hijacks cellular protein phosphatase 1 to regulate M2-1 phosphorylation and viral transcription. Schnell MJ, editor. *PLOS Pathogens* [Internet]. 28 de febrero de 2018 [citado 17 de agosto de 2018];14(3):e1006920. Disponible en: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1006920>

103. Nilson KA, Price DH. The Role of RNA Polymerase II Elongation Control in HIV-1 Gene Expression, Replication, and Latency [Internet]. *Genetics Research International.* 2011 [citado 2 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/gri/2011/726901/>

104. Kumar PKR, Kumarevel T, Mizuno H. Structural basis of HutP-mediated transcription anti-termination. *Curr Opin Struct Biol.* febrero de 2006;16(1):18-26.

105. Phadtare S, Severinov K. RNA remodeling and gene regulation by cold shock proteins. *RNA Biol.* diciembre de 2010;7(6):788-95.

106. Gusarov I, Nudler E. The mechanism of intrinsic transcription termination. *Mol Cell.* abril de 1999;3(4):495-504.

107. Landick R. The regulatory roles and mechanism of transcriptional pausing. *Biochem Soc Trans.* diciembre de 2006;34(Pt 6):1062-6.

108. Hardy RW, Harmon SB, Wertz GW. Diverse gene junctions of respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated antitermination. *J Virol.* enero de 1999;73(1):170-6.

109. Schlereth J, Grünweller A, Biedenkopf N, Becker S, Hartmann RK. RNA binding specificity of Ebola virus transcription factor VP30. *RNA Biol.* 2016;13(9):783-98.

110. Biedenkopf N, Schlereth J, Grünweller A, Becker S, Hartmann RK. RNA Binding of Ebola Virus VP30 Is Essential for Activating Viral Transcription. *J Virol.* 15 de 2016;90(16):7481-96.

111. Brockmann C, Soucek S, Kuhlmann SI, Mills-Lujan K, Kelly SM, Yang J-C, et al. Structural basis for polyadenosine-RNA binding by Nab2 Zn fingers and its function in mRNA nuclear export. *Structure.* 6 de junio de 2012;20(6):1007-18.

112. Williams SG, Hall KB. Linkage and Allostery in snRNP Protein/RNA Complexes. *Biochemistry* [Internet]. 10 de junio de 2014 [citado 2 de octubre de 2018];53(22):3529-39. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4059526/>

113. Mackereth CD, Sattler M. Dynamics in multi-domain protein recognition of RNA. *Curr Opin Struct Biol.* junio de 2012;22(3):287-96.
114. Recht MI, Williamson JR. Central domain assembly: thermodynamics and kinetics of S6 and S18 binding to an S15-RNA complex. *J Mol Biol.* 12 de octubre de 2001;313(1):35-48.
115. Esperante SA, Alvarez-Paggi D, Salgueiro M, Prat Gay G de. Mechanism of Tetramer Dissociation, Unfolding, and Oligomer Assembly of Pneumovirus M2-1 Transcription Antiterminators. *ACS Omega* [Internet]. 30 de noviembre de 2018 [citado 8 de noviembre de 2018];3(11):14732-45. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01600>
116. John SP, Wang T, Steffen S, Longhi S, Schmaljohn CS, Jonsson CB. Ebola virus VP30 is an RNA binding protein. *J Virol.* septiembre de 2007;81(17):8967-76.
117. Heinrich BS, Cureton DK, Rahmeh AA, Whelan SPJ. Protein Expression Redirects Vesicular Stomatitis Virus RNA Synthesis to Cytoplasmic Inclusions. *PLoS Pathog* [Internet]. 24 de junio de 2010 [citado 28 de septiembre de 2018];6(6). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2891829/>
118. Atkins P, Paula J de. *Atkins' Physical Chemistry.* OUP Oxford; 2010. 1006 p.
119. Makhatazde GI, Privalov PL. Heat capacity of proteins: I. Partial molar heat capacity of individual amino acid residues in aqueous solution: Hydration effect. *Journal of Molecular Biology* [Internet]. 20 de mayo de 1990 [citado 12 de septiembre de 2018];213(2):375-84. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283605801974>
120. Cox R, Plemper RK. Structure-guided design of small-molecule therapeutics against RSV disease. *Expert Opinion on Drug Discovery* [Internet]. 2 de junio de 2016 [citado 5 de octubre de 2018];11(6):543-56. Disponible en: <https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1174212>
121. Habchi J, Mamelli L, Darbon H, Longhi S. Structural disorder within Henipavirus nucleoprotein and phosphoprotein: from predictions to experimental assessment. *PLoS ONE.* 21 de julio de 2010;5(7):e11684.
122. Habchi J, Longhi S. Structural Disorder within Paramyxoviral Nucleoproteins and Phosphoproteins in Their Free and Bound Forms: From Predictions to Experimental Assessment. *Int J Mol Sci* [Internet]. 10 de julio de 2015 [citado 5 de octubre de 2018];16(7):15688-726. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4519920/>
123. Gerard FCA, de Almeida Ribeiro E, Leyrat C, Ivanov I, Blondel D, Longhi S, et al. Modular Organization of Rabies Virus Phosphoprotein. *Journal of Molecular Biology* [Internet]. [citado 5 de octubre de 2018];388(5):978-96. Disponible en: http://www.academia.edu/18576717/Modular_Organization_of_Rabies_Virus_Phosphoprotein
124. Cox R, Pickar A, Qiu S, Tsao J, Rodenburg C, Dokland T, et al. Structural studies on the authentic mumps virus nucleocapsid showing uncoiling by the phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 21 de octubre de 2014;111(42):15208-13.
125. Kobor MS, Greenblatt J. Regulation of transcription elongation by phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 13 de septiembre de 2002;1577(2):261-75.
126. Lee TI, Young RA. Transcription of Eukaryotic Protein-Coding Genes. *Annu Rev Genet* [Internet]. 1 de diciembre de 2000 [citado 9 de octubre de 2018];34(1):77-137. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.genet.34.1.77>
127. Esperante SA, Noval MG, Altieri TA, de Oliveira GAP, Silva JL, de Prat-Gay G. Fine Modulation of the Respiratory Syncytial Virus M₂₋₁ Protein Quaternary Structure by Reversible Zinc Removal from Its Cys₃-His₁ Motif. *Biochemistry* [Internet]. octubre de 2013 [citado 17 de agosto de 2018];52(39):6779-89. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi401029q>
128. Doniach S. Changes in Biomolecular Conformation Seen by Small Angle X-ray Scattering. *Chem Rev* [Internet]. 1 de junio de 2001 [citado 29 de agosto de 2018];101(6):1763-78. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/cr990071k>
129. Walenta E. *Small angle x-ray scattering.* Von O. GLATTER und O. KRATKY. London: Academic Press Inc. Ltd. 1982. ISBN 0-12-286280-5. X, 515 Seiten, geb. £ 43,60; US \$ 81.00. *Acta Polymerica* [Internet]. 1 de mayo de 1985 [citado 29 de agosto de 2018];36(5):296-296.

Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/actp.1985.010360520>

130. Myers JK, Pace CN, Scholtz JM. Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci* [Internet]. octubre de 1995 [citado 27 de septiembre de 2018];4(10):2138-48. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2142997/>

131. Shoemaker BA, Portman JJ, Wolynes PG. Speeding molecular recognition by using the folding funnel: The fly-casting mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1 de agosto de 2000 [citado 3 de octubre de 2018];97(16):8868-73. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC16787/>