



**Universidad
Andrés Bello**

Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**ROL ANTIGÉNICO DEL SITIO DE N-GLICOSILACIÓN 144 EN
LA HEMAGLUTININA DEL VIRUS INFLUENZA A H1N1**

Tesis presentada como requisito para optar al **Grado de Magíster en
Biotecnología.**

Director de Tesis: Dr. Rafael A. Medina Silva
Facultad de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile

GABRIEL IGNACIO GUAJARDO CONTRERAS

**Santiago, Chile.
Mayo, 2018.**



ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Abstract / Resumen.....	5
2. Abreviaciones.....	7
3. Introducción.....	8
3.1. Virus de Influenza A.....	8
3.2. Estructura y Función de la Hemaglutinina.....	10
3.3. Ciclo replicativo del VIA.....	12
3.4. Cambio antigénico en HA.....	14
3.5. Sitios de N-glicosilación.....	16
3.6. Efecto según el tipo de N-glicosilaciones en HA	19
3.7. Efecto según la posición de las N-glicosilaciones en HA	20
3.7.1. Efecto de las N-glicosilaciones en el tallo de HA	21
3.7.2. Efecto de las N-glicosilaciones en la cabeza de HA.....	22
3.8. Planteamiento del Problema.....	25
3.9. Hipótesis.....	26
3.10. Objetivo General	26
3.11. Objetivos Específicos.....	26
3.11.1. Objetivo específico 1.....	26
3.11.2. Objetivo específico 2.....	26
3.11.3. Objetivo específico 3.....	26
4. Materiales y Métodos.....	27
4.1. Materiales.....	27
4.2. Diseño Experimental.....	30
4.2.1. Determinar el perfil de glicosilaciones mediante HA solubles (sHA) y dilucidar el oligosacárido unido en el sitio 144.....	30
4.2.2. Caracterizar y evaluar la antigenicidad del VIA con oligosacáridos del tipo simples (HA _{HM}) o complejos (HA _{CG}) y variaciones en sus sitios de N-glicosilación en HA.....	37
4.2.3. Determinar los epítomos reconocidos por los anticuerpos producidos contra la variante del VIA N-glicosilada en la posición 144 de HA	45



5. Resultados.....	48
5.1. Los constructos diseñados expresan sHA en estado monomérico o agregados de alto peso molecular.....	48
5.2. El sitio de N-glicosilación 144 en HA permite el ensamble de un oligosacárido más grande en comparación a los sitios 142 o 172.....	50
5.3. El sitio de N-glicosilación 144 mantiene su característica de un peso molecular mayor al tener unido un oligosacárido del tipo simple.....	51
5.4. El tipo de N-glicosilación afecta significativamente la avidéz del virus 144.....	52
5.5. La inmunización con el VIA con N-glicosilaciones del tipo simple disminuye la absorbancia de anticuerpos dirigidos contra el tallo de HA o NP.....	54
5.6. La inmunización con las variantes de virus HA _{HM} induce títulos de inhibición menores en comparación con las variantes HA _{CG}	56
5.7. Los anticuerpos inducidos por una variante determinada inhiben de igual manera a virus HA _{CG} y HA _{HM}	57
5.8. El sitio de N-glicosilación 144-172 en HA evade la respuesta policlonal contra las otras variantes de VIA e induce sueros con títulos de UIH altos.....	57
5.9. 1×10^6 UFP y 60 UIH son las condiciones óptimas para aislar placas mutantes de escape de VIA.....	61
6. Discusión.....	63
7. Conclusiones.....	75
8. Proyecciones Biotecnológicas.....	76
Material Suplementario.....	78
Referencias.....	80

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática del Virus Influenza A.....	9
Figura 2: Estructura de HA.....	11
Figura 3: Ciclo replicativo del VIA.....	13
Figura 4: Sitios antigénicos en HA.....	14
Figura 5: Cambio antigénico y sitios de N-glicosilación en HA.....	15



Figura 6: Biosíntesis de las N-glicosilaciones.....	17
Figura 7: Tipos de N-glicosilaciones.....	18
Figura 8: Efecto protector de HA solubles según tipo de N-glicosilaciones	20
Figura 9: Sitios de N-glicosilación en HA (H1N1).....	21
Figura 10: Efecto antigénico del sitio de N-glicosilación 144 en la HA del VIA (H1N1)....	24
Figura 11: Esquema resumen de metodología para la determinación del oligosacárido unido en la posición 144 de HA.....	30
Figura 12: Mapa de plásmidos pCAGGS.SMC_II y pCAGGS_sHA.....	33
Figura 13: Esquema resumen de metodología para evaluar la antigenicidad del VIA con diferentes tipos y sitios de N-glicosilación en HA.....	37
Figura 14: Ensayos de hemaglutinación e inhibición de hemaglutinación.....	43
Figura 15: Esquema resumen para la generación de mutantes de escape.....	45
Figura 16: Clonamiento, purificación y expresión de variantes de sHA.....	49
Figura 17: Determinación de PM en HA con diferentes sitios de N-glicosilación.....	51
Figura 18: Caracterización de HAs de virus con N-glicosilaciones del tipo simples o complejas.....	52
Figura 19: Efecto de los sitios y tipos de N-glicosilación en la avidéz de HA por su receptor en glóbulos rojos.....	53
Figura 20: Absorbancia de anticuerpos producidos contra el tallo de HA o NP, al inmunizar ratones con las variantes N-glicosiladas del VIA.....	55
Figura 21: Títulos de inhibición de HA homólogos para cada variante del VIA.....	56
Figura 22: Títulos de inhibición cruzados de HA.....	58
Figura 23: Títulos de inhibición determinados por cada suero contra cada variante de VIA.....	60
Figura 24: Estandarización de concentraciones de antisuero y virus rWT para la obtención de mutantes de escape de neutralización.....	62
Tabla 1: Partidores diseñados para el clonamiento de sHA.....	31



1. ABSTRACT

During the adaptation of the Influenza A virus (IAV) in humans, antigenic drift is a key process. This integrates mutations primarily in the hemagglutinin (HA) glycoprotein which is the most immunogenic protein of the virus and recognizes the receptor in the host cells. A type of mutations that IAV uses to evade pre-existing antibodies is the addition of N-glycosylation sites, mainly in HA. We have previously shown that glycosylation at position 144 of HA H1N1 induces a polyclonal response capable of neutralizing other N-glycosylated H1N1 variants. In turn, this N-glycosylation site effectively masks the antigenic sites in HA. These data suggest that the type of N-glycosylation at position 144 modulates the antigenic properties of HA redirecting the humoral immune response. To evaluate the characteristics of this oligosaccharide, we express soluble HAs of the H1N1 virus A/Netherlands/602/09 with additional N-glycosylation sites at positions 144, 142, 172 and 144-172. In addition, we produced the same HA variants as recombinant viruses in the presence or absence of the α -mannosidase I inhibitor kifunensine, which generated N-glycosylations of the simple or complex type, respectively. Through Western Blot, we observed that HA 144 had a molecular weight higher than HA 142 and HA 172, suggesting that this position allows the assembly of longer oligosaccharides in comparison with other nearby sites. In addition, we observed that the oligosaccharide in position 144 negatively affects the avidity of IAV for its receptor, but by reducing the length of this (simple type) its avidity increases significantly. The relevance of the position and type of N-glycosylations in the HA head was also evaluated with respect to its modulation of the humoral response. Mice were immunized, and it was determined that the complex-type N-glycosylations produce more antibodies against HA than the simple type. The set of N-glycosylation sites 144-172 in HA evade the humoral response more effectively than only site 144 and in turn induce antibodies that efficiently inhibit the other variants. These results provide new insights into the relevance of N-glycosylation at the 144 HA site of IAV and its potential use for the development of more efficient vaccines.



1. RESUMEN

Durante la adaptación del virus Influenza A (VIA) en el humano, el cambio antigénico es un proceso clave. Este integra mutaciones primordialmente en la glicoproteína hemaglutinina (HA), la cual es la proteína más inmunogénica del virus y reconoce el receptor en las células del hospedero. Un tipo de mutaciones que utiliza el VIA para evadir los anticuerpos preexistentes es la adición de sitios de N-glicosilación, principalmente en HA. Previamente hemos demostrado que la glicosilación en la posición 144 de la HA H1N1 induce una respuesta policlonal capaz de neutralizar otras variantes de H1N1 N-glicosiladas. A su vez, este sitio de N-glicosilación enmascara de manera efectiva los sitios antigénicos en HA. Estos datos sugieren que el tipo de N-glicosilación en la posición 144 modula las propiedades antigénicas de HA redireccionando la respuesta inmune humoral. Para evaluar las características de este oligosacárido, expresamos de manera soluble la HA del virus H1N1 A/Netherlands/602/09 con N-glicosilaciones adicionales en los sitios 144, 142, 172 y 144-172. Además, produjimos las mismas variantes de HA como virus recombinantes en presencia o ausencia del inhibidor de α -manosidasa I kifunensina, lo que generó N-glicosilaciones del tipo simple o complejas, respectivamente. Mediante Western Blot, observamos que la HA 144 tenía un peso molecular mayor que HA 142 y HA 172, sugiriendo que esta posición permite el ensamble de oligosacáridos más largos en comparación con otros sitios cercanos. Además, observamos que el oligosacárido en la posición 144 afecta negativamente la avidéz del VIA por su receptor, pero al reducir la longitud de este (tipo simple) su avidéz aumenta significativamente. También se evaluó la relevancia de la posición y tipo de N-glicosilaciones en la cabeza de HA con respecto a su modulación de la respuesta humoral. Se inmunizaron ratones y se determinó que las N-glicosilaciones de tipo complejo producen más anticuerpos contra HA que las de tipo simple. El conjunto de sitios de N-glicosilación 144-172 en HA evaden la respuesta humoral de manera más eficaz que solo el sitio 144 y a su vez inducen anticuerpos que inhiben eficientemente a las otras variantes. Estos resultados proporcionan nuevos conocimientos sobre la relevancia de la N-glicosilación en el sitio 144 HA del VIA y su potencial uso para el desarrollo de vacunas más eficientes.



2. ABREVIACIONES

VIA: Virus de Influenza A

HA: Hemaglutinina

NA: Neuraminidasa

ARN: Ácido Ribonucleico

PB1: Proteína Básica 1

PB2: Proteína Básica 2

PA: Proteína acídica

RdRP: del inglés RNA-dependent RNA polymerase

NEP: del inglés Nuclear Export Protein

NS1: del inglés Non structural 1

SUR: Sitio de Unión al Receptor

RER: Retículo Endoplásmico Rugoso

rWT: del inglés Recombinant Wild Type

sHA: (Soluble) Hemaglutinina

CGE-LIF: del inglés Capillary Gel Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence

RT-PCR: del inglés Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction

PCR: del inglés Polymerase Chain Reaction

Fw: del inglés Forward

Rv: del inglés Reverse

BPF: Bajo Punto de Fusión

ADN: Ácido desoxirribonucleico

SMC: Sitio de Múltiple Clonamiento

HEK293T: del inglés Human Embryonic Kidney 293T

WB: Western Blot

PM: Peso Molecular

ELISA: del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

Hpi: Horas Post Infección

MDCK: del inglés Madin-Darby Canine Kidney

TPCK: del inglés Tosyl Phenylalanyl Chloromethyl Ketone

Kif: Kifunensina

UHA: Unidades de hemaglutinación

UIH: Unidades de Inhibición de Hemaglutinación

UFP: Unidades Formadoras de Placas

HA_{CG}: del inglés Complex Glycosylations in HA

HA_{HM}: del inglés High-Mannose Glycosylations in HA

RNP: Complejo Ribonucleoproteína

SP-D: del inglés Surfactant Protein D

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Virus de Influenza A.

El virus Influenza A (VIA) es uno de los mayores causantes de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Shaw & Palese, 2013). Se manifiesta como una enfermedad respiratoria altamente contagiosa la cual puede llegar a causar epidemias o pandemias con altas tasas de infección (Wright *et al*, 2013). Cada año, el VIA infecta hasta 100 millones de habitantes a nivel mundial, causando una enfermedad de carácter grave en 3 a 5 millones de personas y entre 250.000 y 500.000 muertes (Sriwilaijaroen & Suzuki, 2012). A esto se le atribuye un costo económico, estimado según la OMS, entre 1 a 6 millones de dólares cada 100.000 personas infectadas (Chugh, 2015). Por otra parte, muchas especies animales pueden ser infectadas por el VIA, lo cual aumenta las probabilidades de transmitir el virus a humanos y generar nuevas pandemias, como la ocurrida el año 2009 (Shaw & Palese, 2013). Una gran preocupación, es que se repita un brote pandémico de la magnitud al ocurrido el año 1918, el cual hasta ahora ha sido el de mayor impacto a nivel mundial, dejando un estimado de 40 millones de fallecidos en menos de 1 año (Palese, 2004), destacando al VIA como uno de los mayores problemas de la salud pública a nivel global.

El VIA pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, la que está compuesta por virus que poseen un genoma de ARN segmentado, hebra simple y polaridad negativa (Shaw & Palese, 2013). El VIA tiene un genoma que comprende 8 segmentos, los cuales codifican entre 12 y 13 proteínas. Este virus se encuentra encapsulado por la proteína de matriz M1 y, a su vez, se encuentra encapsulado en una membrana lipídica proveniente de la célula hospedera. Ancladas a esta membrana se encuentran la proteína del canal iónico M2, esencial para la acidificación del virus, y las dos glicoproteínas de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), fundamentales para la entrada y salida del virus, respectivamente. En el interior del virus, los segmentos de ARN se encuentran empacados alrededor de la nucleoproteína (NP) y acoplados en un extremo al complejo ARN polimerasa ARN dependiente (RdRP) del virus, compuesto por las proteínas básicas 1 y 2 (PB1 y PB2) y la proteína ácida (PA). El conjunto ARN-NP-RdRP se denomina como ribonucleoproteína (RNP).



También, en el interior del virus podemos encontrar las proteínas no estructurales utilizadas para: el exporte nuclear (NEP), inhibir la respuesta antiviral del hospedero (NS1), inducir la apoptosis celular (PB1-F2), y otras de función aún desconocida (N40 y PA-X) (Bavagnoli *et al.*, 2015; Lackey & Olefsky, 2015; Mair *et al.*, 2014; Shaw & Palese, 2013; Sriwilaijaroen & Suzuki, 2012) (Figura 1). Las proteínas virales HA, NA y M2 son traducidas en los ribosomas del retículo endoplásmico y viajan a través del aparato de Golgi hasta la membrana plasmática de la célula hospedera. El resto de las proteínas es traducida en el citoplasma y transportada de vuelta al núcleo para el ensamble de las ribonucleoproteínas (Mair *et al.*, 2014; Shaw & Palese, 2013).

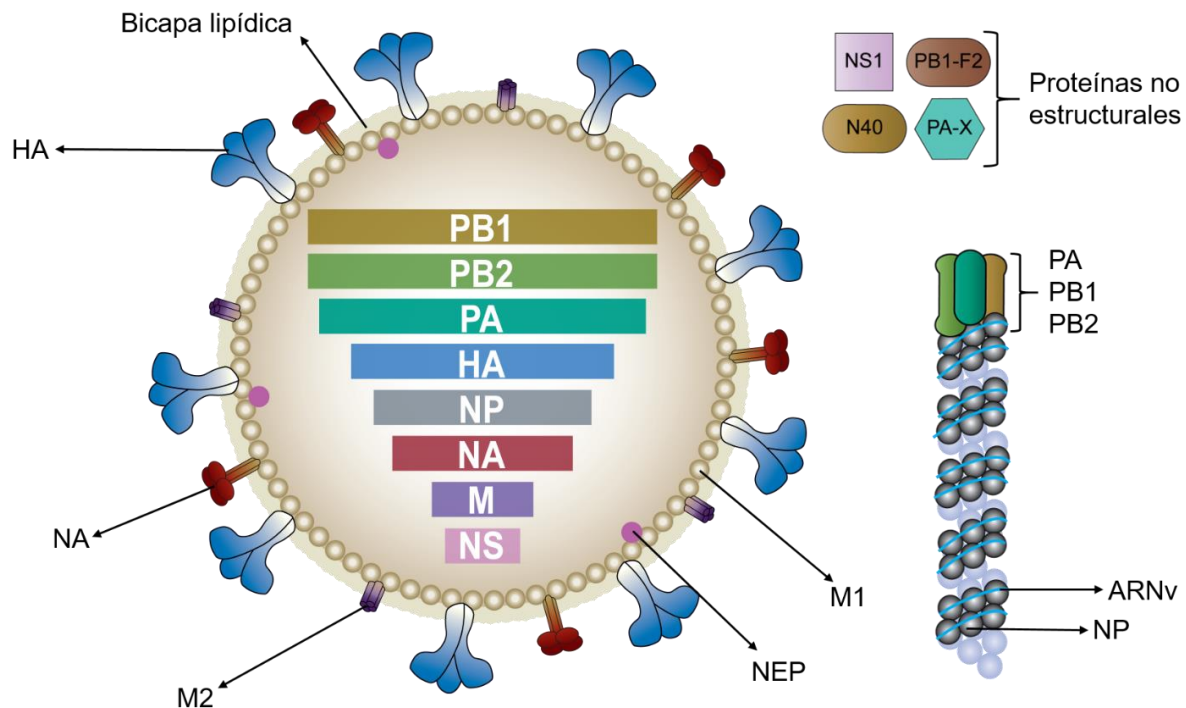


Figura 1. Representación esquemática del Virus de Influenza A.

El VIA se encuentra envuelto por una bicapa lipídica proveniente del hospedero y una matriz compuesta por la proteína M1. En el interior contiene 8 segmentos de ARN y en la superficie se encuentran las glicoproteínas HA, NA y M2. A un costado del virus se representa el complejo de la ribonucleoproteína del VIA. Este consiste en un segmento de ARN viral acoplado a NP y en un extremo unido al complejo RdRP del virus (PA, PB1 y PB2). En la esquina superior derecha se muestran las proteínas no estructurales del virus (NS1, PB1-F2, N40 y PA-X).



Debido a la exposición en la superficie del virus, las glicoproteínas HA y NA son las más importantes en el reconocimiento mediado por el sistema inmune del hospedero. Estas dos proteínas son consideradas las principales determinantes antigénicas del VIA. Existen diferentes variantes de HA y NA, determinadas según las propiedades antigénicas de cada una, encontrándose a la fecha 18 HA (H1-H18) y 11 NA (N1-N11) descritas (Cruz *et al.*, 2017). Esto permite clasificar al virus en subtipos según la combinación de la variante antigénica de cada una de estas proteínas. Durante la historia documentada del VIA, en humanos se ha descrito la circulación de los subtipos H2N2, H3N2 y H1N1, encontrándose presentes solo estos dos últimos desde los años 70 (Palese, 2004; Reading *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2013).

La presente tesis está enfocada en la antigenicidad de la proteína HA del subtipo H1N1. Este subtipo fue el causante de la pandemia más letal por el VIA en el año 1918 y también de la última pandemia, ocurrida en el año 2009 (Xu *et al.*, 2010). Cabe destacar que HA es 4 veces más abundante que NA en la membrana del virus, volviéndose la proteína más importante en cuanto a estudios antigénicos (Shaw & Palese, 2013).

3.2 Estructura y función de la hemaglutinina.

La HA es una glicoproteína de transmembrana tipo I que juega un papel fundamental en las primeras etapas del ciclo de infección del VIA (Sriwilaijaroen & Suzuki, 2012). Esta participa en la entrada viral a la célula hospedera y, posteriormente, media la fusión de la membrana viral con la del endosoma (Reading *et al.*, 2007; Shaw & Palese, 2013).

La HA es codificada por el segmento de ARN 4 del VIA (Sriwilaijaroen & Suzuki, 2012). El monómero de HA es sintetizado como un polipéptido precursor de la proteína (denominado HA0), el cual debe someterse a un clivaje post-traducciona mediado por proteasas de la célula hospedera, lo que genera los polipéptidos HA1 y HA2, los cuales permanecen unidos por puentes disulfuro (Reading *et al.*, 2007) (Figura 2A). Cada monómero de HA tiene una forma de bastón y en él se pueden distinguir dos dominios: El dominio de la cabeza globular (gran parte de HA1), y el dominio del tallo (el resto de HA1 y todo HA2) (Mair *et al.*, 2014; Shaw & Palese, 2013; Sriwilaijaroen & Suzuki,



2012), estando este último anclado a la membrana viral a través de una corta secuencia hidrofóbica (Reading *et al.*, 2007). La HA madura corresponde a un trímero (tres monómeros de HA0 unidos de manera no-covalente) y para que esta pueda ser funcional debe ocurrir el clivaje en las cadenas HA1 y HA2 (Mair *et al.*, 2014; Reading *et al.*, 2007; Shaw & Palese, 2013). En estos dominios estructurales se encuentran: el sitio de unión al receptor (SUR) en HA1; y una secuencia corta hidrofóbica en el extremo amino de HA2, la que cumple la función de péptido de fusión (Shaw & Palese, 2013; Sriwilaijaroen & Suzuki, 2012) (Figura 2B).

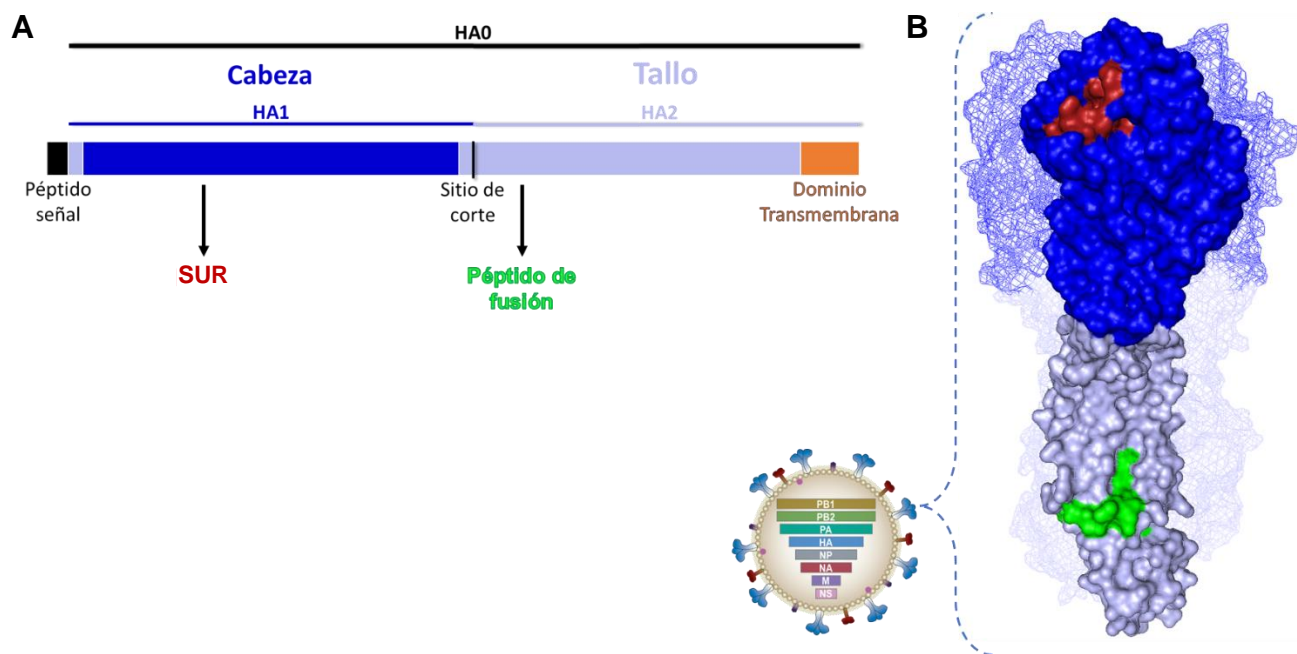


Figura 2. Estructura de HA.

A. Representación de la secuencia aminoacídica de HA. Se señalan el polipéptido previo (HA0) y posterior (HA1 y HA2) a su clivaje en el sitio de corte. Se muestran en colores el segmento perteneciente al dominio de la cabeza globular (azul), el tallo (gris) y el dominio transmembrana (naranja). **B.** Representación tridimensional de HA según colores indicados en A. Vista lateral del trímero de HA, resaltando un monómero. En el dominio de la cabeza se encuentra el SUR (rojo) y en el tallo el péptido de fusión (verde). Modelamiento a partir del archivo PDB: 3LZG.



3.3 Ciclo replicativo del VIA.

En el caso del humano, la infección por VIA ocurre en las células epiteliales del tracto respiratorio. El SUR en HA1 reconoce como receptor el ácido N-acetil neuramínico, conocido de manera general como ácido siálico. Este es un monosacárido que se encuentra frecuentemente en glicoproteínas de superficie de las células epiteliales (Reading *et al.*, 2007; Shaw & Palese, 2013). Posterior al reconocimiento de su receptor, el trímero de HA0 debe ser escindido en su sitio de corte y luego el VIA es internalizado a través de endocitosis mediada por el receptor (Matsuoka *et al.*, 2013; Medina & García-Sastre, 2011). La escisión de HA0 es llevada a cabo extracelularmente por proteasas tipo-tripsina del hospedero que son secretadas o se encuentran unidas a la membrana (Sriwilaijaroen & Suzuki, 2012). Estas proteasas son producidas exclusivamente por células epiteliales del tracto respiratorio, limitando los tejidos u órganos donde el virus podrá infectar / replicarse (Mair *et al.*, 2014; Reading *et al.*, 2007). Una vez endocitado, la disminución de pH asociada al tráfico desde el endosoma temprano hacia el endosoma tardío produce cambios estructurales en HA. Estos cambios llevan a que se exponga el péptido de fusión ubicado en HA2, permitiendo la interacción y fusión con la membrana del endosoma (Kim & Park, 2012; Mair *et al.*, 2014; Shaw & Palese, 2013). Además, el canal iónico M2 permite el ingreso de protones y acidificación del interior del virus, lo que disocia los RNPs de la proteína de matriz M1 (Matsuoka *et al.*, 2013; Medina & García-Sastre, 2011). Posterior a la fusión de las membranas del endosoma y del virus, los RNPs son liberados hacia el citoplasma de la célula hospedera y traslocados al núcleo, donde el ARN viral contenido en los RNPs es utilizado como templado para la transcripción y replicación del genoma. El complejo RdRP del VIA utiliza como templado el ARN viral para sintetizar ARN complementario y ARN mensajero viral. El primero es utilizado para la producción de copias de ARN viral y el último es traslocado al citoplasma y traducido utilizando la maquinaria de la célula hospedera (Matsuoka *et al.*, 2013; Medina & García-Sastre, 2011; Shaw & Palese, 2013). Después de la síntesis de las proteínas virales, aquellas necesarias para la replicación y transcripción son translocadas de vuelta al núcleo para la formación de los nuevos complejos RNPs, los cuales son exportados al igual que el resto de las proteínas virales hacia la membrana

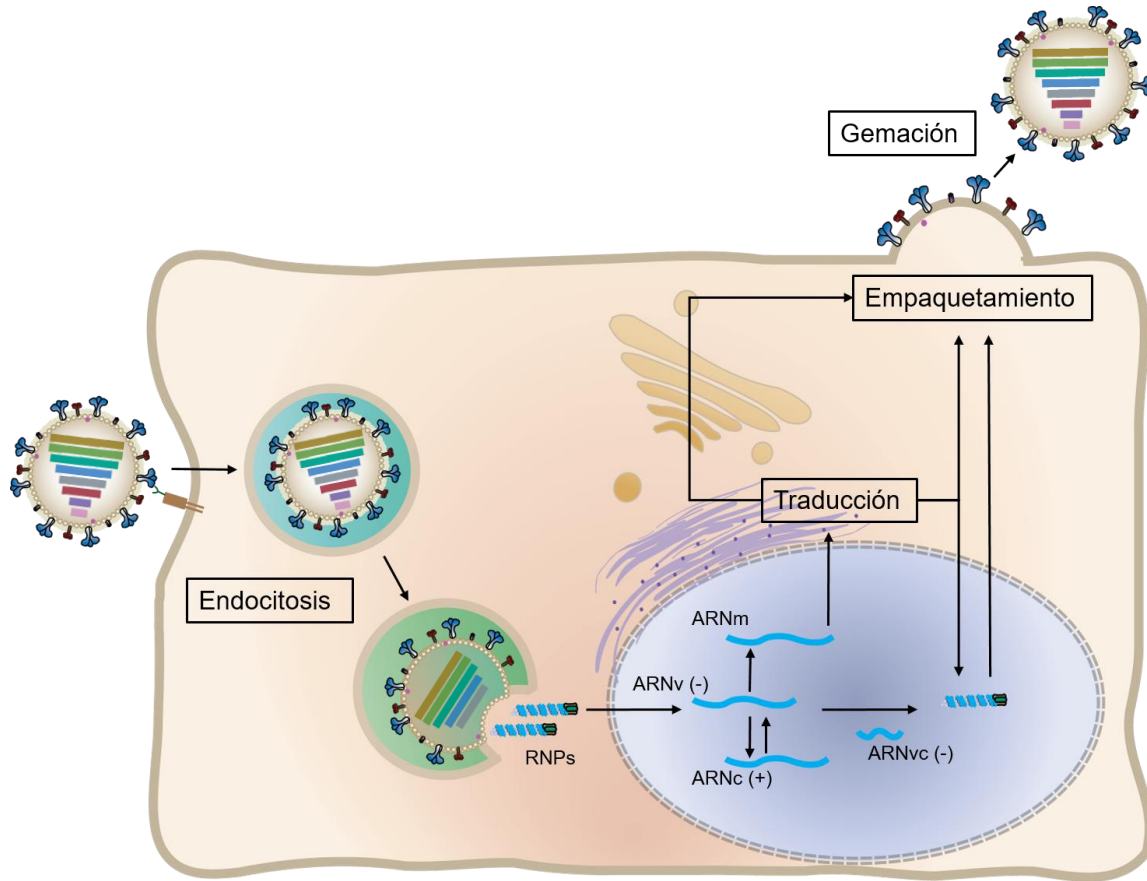


Figura 3. Ciclo replicativo del VIA.

La HA del VIA reconoce como receptor el ácido N-acetilneuramínico, presente en glicoproteínas de superficie de las células epiteliales para luego ser internalizado mediante endocitosis. La disminución de pH asociada al tráfico del endosoma lleva a la exposición del péptido de fusión del VIA y a la liberación de los RNPs hacia el citoplasma de la célula hospedera. Los RNPs son translocados al núcleo donde el ARN viral es utilizado como templado para su replicación y transcripción a través del complejo RdRP del VIA. El ARN mensajero es traducido utilizando la maquinaria del hospedero y las nuevas proteínas virales en conjunto con los RNPs sintetizados son traslocados hacia la membrana apical de la célula hospedera. Aquí ocurre el empaquetamiento del genoma y las proteínas virales para finalmente liberar las nuevas partículas virales a través de gemación y la actividad de la proteína NA. Esta última corta los ácidos siálicos presentes en las glicoproteínas de membrana de la célula hospedera y las proteínas virales para evitar la retención de las partículas virales en la superficie celular.



apical de la célula hospedera (Matsuoka *et al.*, 2013; Medina & García-Sastre, 2011; Shaw & Palese, 2013). En este lugar ocurre el empaquetamiento de las nuevas partículas virales y su posterior gemación, donde la proteína NA libera los nuevos VIA al cortar los ácidos siálicos presentes en las glicoproteínas de superficie tanto de la membrana del hospedero como de la membrana viral. Esto impide que la proteína HA reconozca los ácidos siálicos y los nuevos virus queden retenidos en la membrana del hospedero o formen agregados entre ellos (Medina & García-Sastre, 2011; Shaw & Palese, 2013) (Figura 3).

3.4 Cambio antigénico en HA.

Adicional a su función durante la entrada viral, la HA también es el principal antígeno del VIA. El hospedero induce una respuesta humoral (anticuerpos) específica dirigida mayoritariamente hacia el dominio de la cabeza globular de esta proteína. Estos anticuerpos anti-HA son capaces de neutralizar la infección viral mediante el bloqueo de la interacción entre HA y su receptor; o alternatively, pueden dirigirse al dominio del tallo e inhibir el proceso de fusión entre el virus y la membrana del endosoma (Hervé *et al.*, 2015; Kim & Park, 2012; Shaw & Palese, 2013). A través de análisis comparativo de secuencias y la caracterización de mutantes de escape, se han

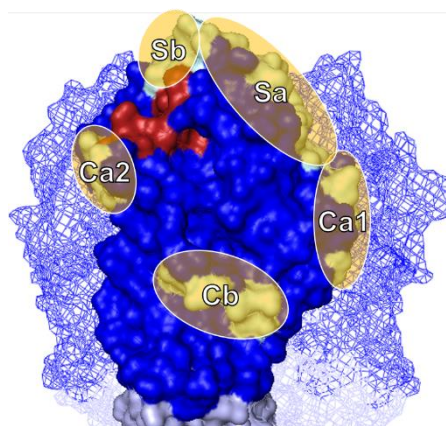


Figura 4. Sitios antigénicos en HA.

HA es la proteína más inmunogénica del VIA. En esta Se han descrito 5 sitios antigénicos, todos ubicados en la región de la cabeza. Dos en la parte superior (Sa y Sb), dos en los costados (Ca1 y Ca2) y uno en la parte inferior (Cb). Modelamiento a partir del archivo PDB: 3LZG.



identificado 5 sitios antigénicos en el VIA. Todos estos sitios se encuentran en el dominio de la cabeza globular de HA (HA1) y han sido denominados para la variante antigénica H1: Sa, Sb, Ca1, Ca2, Cb (Brownlee & Fodor, 2001; Hervé *et al.*, 2015; Sriwilaijaroen & Suzuki, 2012; Wright *et al.*, 2013) (Figura 4).

Debido a la presión ejercida por la respuesta humoral del hospedero, en conjunto con la baja fidelidad del complejo RdRP del VIA, las proteínas virales, especialmente HA, se somete a cambios graduales en su secuencia a través de mutaciones puntuales (mecanismo conocido como cambio antigénico o “*Antigenic drift*”) (Figura 5). Estas mutaciones ocurren principalmente en los sitios antigénicos de HA y llevan a que las nuevas variantes generadas no sean neutralizadas por los anticuerpos preexistentes contra el VIA que infectó originalmente (Hervé *et al.*, 2015; Kim & Park, 2012; Sriwilaijaroen & Suzuki, 2012; Wright *et al.*, 2013). Un tipo de mutaciones observadas en HA son sustituciones asociadas a la adquisición de sitios de N-glicosilación, los cuales permiten la unión de oligosacáridos y HA han demostrado ser una eficiente manera de enmascarar o prevenir el reconocimiento mediado por anticuerpos, contribuyendo al escape del VIA de la respuesta humoral montada por el hospedero (Hervé *et al.*, 2015; Sriwilaijaroen & Suzuki, 2012) (Figura 5).

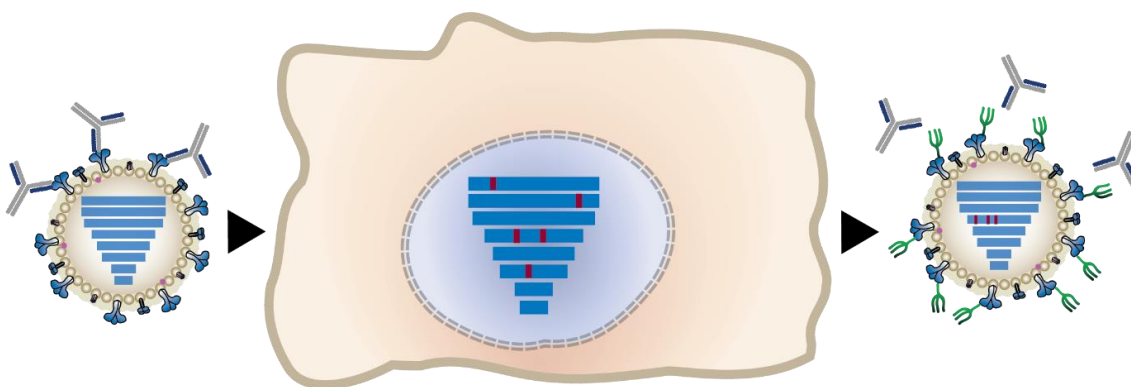


Figura 5. Cambio antigénico y sitios de N-glicosilación en HA.

La baja fidelidad del complejo polimerasa del VIA y la presión ejercida por la respuesta humoral del hospedero llevan a cambios graduales en el genoma del virus durante su replicación. Uno de los cambios que puede ocurrir es la adición de sitios de N-glicosilación en la secuencia aminoacídica de HA. En estos sitios se unen cadenas de oligosacáridos, las cuales enmascaran los sitios antigénicos de HA previniendo el reconocimiento mediado por anticuerpos.



3.5 Sitios de N-glicosilación.

Las N-glicosilaciones consisten en una modificación co- y post-traduccional que resulta en la unión covalente de un oligosacárido a un residuo de asparagina (N) dentro de una cadena polipeptídica (Schwarz & Aebi, 2011). Como condición, este residuo de asparagina debe encontrarse dentro de una secuencia específica, denominada “sitio de N-glicosilación”, que corresponde a una asparagina seguida de cualquier aminoácido (exceptuando prolina) y que finalice con una serina o una treonina (N-X-S/T) (Aebi, 2013; Nettleship, 2012; Schwarz & Aebi, 2011; Weerapana & Imperiali, 2006). El proceso de N-glicosilación inicia en el retículo endoplásmico rugoso (RER), donde se encuentran unidos a la membrana del organelo cadenas de “oligosacáridos base” ya sintetizados. Estos oligosacáridos base son transferidos por un complejo enzimático a la asparagina dentro de la secuencia N-X-S/T en el polipéptido naciente del ribosoma. Posterior a su plegamiento, la proteína, con los oligosacáridos base unidos, continúa por la vía secretoria hacia el aparato de Golgi. Durante el tráfico por este organelo, los oligosacáridos base son modificados por un amplio grupo de enzimas (glicosiltransferasas), resultando en una gran variedad de estructuras finales unidas a cada sitio de N-glicosilación (Figura 6). La diversidad de enzimas en el aparato de Golgi influencia en el tipo de oligosacárido final unido al sitio de N-glicosilación. Estas enzimas son diferentes dependiendo tanto del hospedero como del tipo de célula específica, generando una amplia gama de posibles oligosacáridos unidos a cada sitio (Aebi, 2013; Helenius & Aebi, 2001, 2004; Schwarz & Aebi, 2011; Weerapana & Imperiali, 2006). Por otra parte, el oligosacárido unido también se ve afectado por la posición dentro de la proteína, influyendo la distancia con otro sitio de N-glicosilación, la estructura secundaria o la distancia con el extremo carboxilo. Se estima que aproximadamente 2/3 de los sitios de N-glicosilación en una proteína se encuentran efectivamente siendo ocupados por cadenas de oligosacáridos (Lannoo & Van Damme, 2015; Nettleship, 2012).

Existen tres tipos de N-glicosilaciones, las cuales son clasificadas según los monosacáridos que componen las antenas de un oligosacárido: Simples (o ricas en residuos de manosa), híbridas (antenas de manosa y antenas mixtas) y complejas (todas las antenas mixtas) (Lannoo & Van Damme, 2015; Nettleship, 2012) (Figura 7).

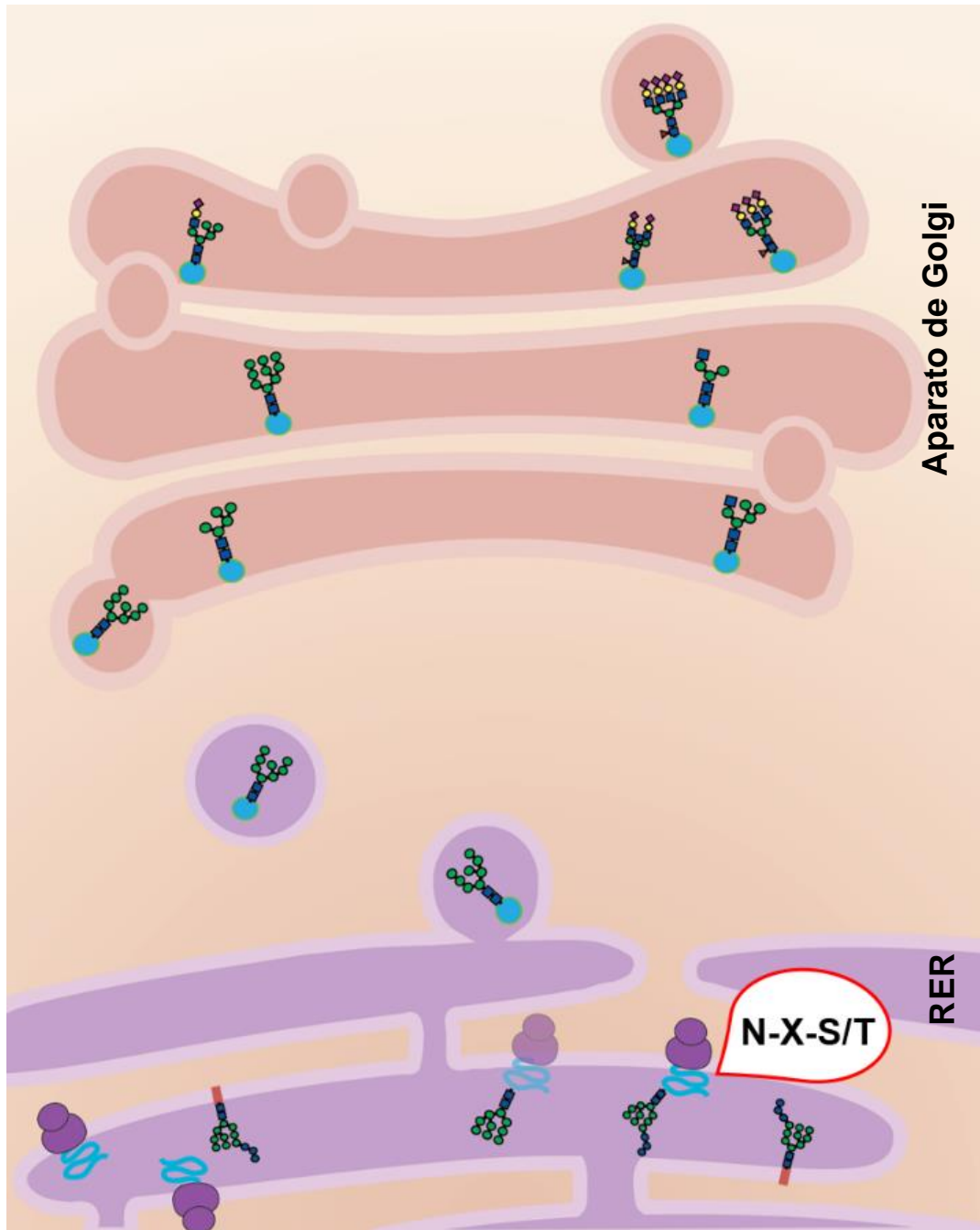


Figura 6. Biosíntesis de las N-glicosilaciones.

El ensamble de las N-glicosilaciones inicia en el RER. Aquí, oligosacáridos “base” preformados son translocados desde la membrana del RER a la secuencia de N-glicosilación N-X-S/T en el polipéptido naciente del ribosoma. Posterior al plegamiento de la proteína, los oligosacáridos unidos sufren modificaciones post-traduccionales durante su tráfico por el aparato de Golgi, alcanzando variadas estructuras finales.



En cuanto a las proteínas virales, los oligosacáridos en los sitios de N-glicosilación pueden tener un efecto tanto local como global dentro de estas, a través de enzimas específicas que reconocen diferentes residuos de azúcares (Helenius & Aebi, 2001). Por lo general, los oligosacáridos están involucrados en el correcto plegamiento o degradación de las proteínas, así como también con su tráfico al interactuar con ciertas enzimas (Lannoo & Van Damme, 2015). Por otra parte, oligosacáridos ubicados en posiciones específicas pueden afectar la afinidad de una proteína por su receptor, volverla reconocible por factores de la inmunidad celular o favorecer la evasión de anticuerpos (Vigerust & Shepherd, 2007).

Para la presente tesis, existen dos áreas de trabajo de gran interés con respecto a las N-glicosilaciones en la HA del VIA. (i) Por un lado, se ha determinado que el tipo de N-glicosilaciones en HA tiene un fuerte impacto tanto en la respuesta humoral del hospedero como en la afinidad de HA por su receptor (De Vries *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2009). (ii) Por otra parte, se ha demostrado que según su posición, los oligosacáridos en el dominio de la cabeza de HA del VIA tienen un efecto en la virulencia, antigenicidad y/o susceptibilidad a enzimas del sistema inmune (Medina *et al.*, 2013; Sun, S. *et al.*, 2012; Sun, X. *et al.*, 2013; Tate *et al.*, 2011).

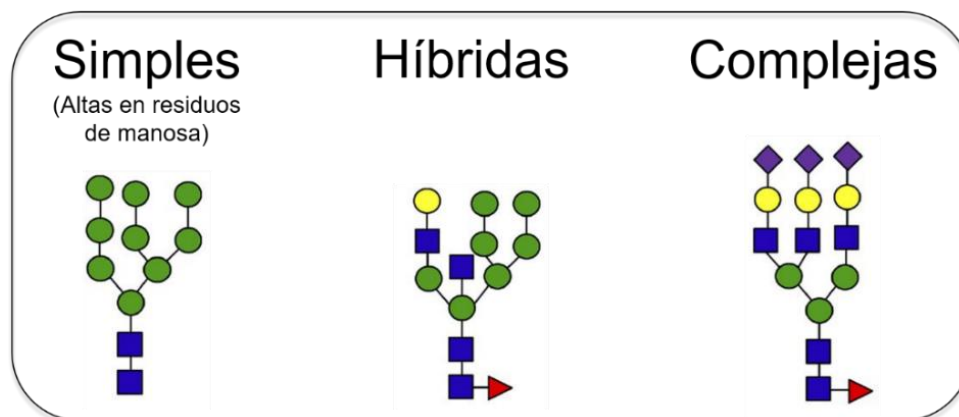


Figura 7. Tipos de N-glicosilaciones.

Se han descrito tres diferentes tipos de N-glicosilaciones según los monosacáridos que componen al oligosacárido. Simples, solo con residuos de manosa en sus antenas; Complejas, con diversos monosacáridos en todas sus antenas; Híbridas, con una o más antenas simples y una o más antenas complejas. Leyenda:

● Manosa, ● Galactosa, ■ N-acetil glucosamina, ◆ Ácido siálico, ► Fucosa.



3.6 Efecto según el tipo de N-glicosilaciones en HA.

El estudio sobre el tipo de N-glicosilaciones en HA se ha realizado ampliamente para el subtipo H5N1. En el trabajo de Wang y colaboradores, en el año 2009, estudiaron el efecto que tenía la inmunización de ratones con HA solubles con diferentes tipos de N-glicosilaciones (Wang *et al.*, 2009). Ellos expresaron HA solubles del subtipo H5 en células HEK293T con o sin la aplicación de tratamientos enzimáticos para poder obtener N-glicosilaciones del tipo complejas o monoglicosiladas (un único residuo de azúcar unido al sitio de N-glicosilación), respectivamente. Estas fueron utilizadas para evaluar su afinidad a diferentes ácidos siálicos y observaron que la reducción del tamaño de la cadena del oligosacárido en HA (monoglicosilada) aumentó la afinidad por su receptor, y además amplió la gama de ácidos siálicos que podía reconocer. Posteriormente, inmunizaron ratones con estas diferentes HA y luego los desafiaron con una dosis letal de un VIA subtipo H5N1. Determinaron que la inmunización con HA monoglicosilada confirió una mejor sobrevivencia en comparación con la inmunización con HA conteniendo N-glicosilaciones del tipo complejas (Wang *et al.*, 2009).

De manera similar, en el trabajo de Lin y colaboradores (Lin *et al.*, 2013), evaluaron las diferencias en la inmunización con HA solubles (Subtipo H5) expresadas en líneas celulares diferentes, obteniendo N-glicosilaciones del tipo simple o complejas. La inmunización de ratones, con HAs con diferentes tipos de N-glicosilaciones, demostró que aquellos ratones inmunizados con N-glicosilaciones del tipo complejas tuvieron una mejor sobrevivencia en comparación con N-glicosilaciones del tipo simple, cuando estos fueron desafiados con un VIA H5N1 (Lin *et al.*, 2013).

Finalmente, otro estudio utilizó HAs del subtipo H5 expresadas de manera soluble en células HEK293T, pero esta vez se realizaron diversos tratamientos para obtener N-glicosilaciones del tipo simples, complejas o monoglicosiladas (De Vries *et al.*, 2012). Estas HA solubles fueron utilizadas para inmunizar ratones y posteriormente evaluar sus sueros en ensayos de inhibición de hemaglutinación. Los sueros producidos por HA con N-glicosilaciones complejas o monoglicosiladas fueron capaces de inhibir de manera más eficaz la actividad de hemaglutinación en comparación a los sueros producidos por HA con N-glicosilaciones del tipo simples. Adicionalmente, al medir los niveles de anti-HA IgG1, observaron que la inmunización con HA con N-glicosilaciones complejas o



monoglicosiladas produjo significativamente más anticuerpos en comparación con los sueros producidos contra HA con N-glicosilaciones simples (De Vries *et al.*, 2012).

De este conjunto de trabajos, se puede concluir las HA solubles generan una mejor respuesta protectora si estas tienen en sus sitios de N-glicosilación monosacáridos, seguido de N-glicosilaciones del tipo complejas, y por último simples (Figura 8).

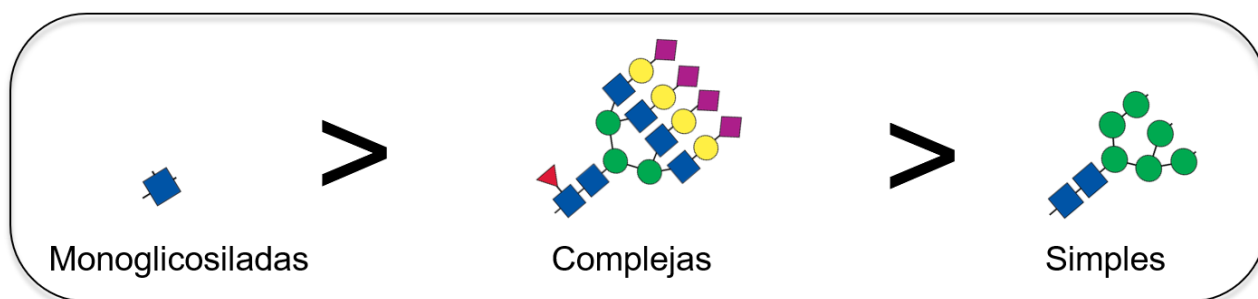


Figura 8. Efecto protector de HA solubles según tipo de N-glicosilaciones.

La inmunización de ratones utilizando como antígeno HA varía en eficiencia según el tipo de N-glicosilaciones. La inmunización con HA llevando monosacáridos en sus sitios de N-glicosilación (monoglicosiladas) confiere una mayor protección al desafío con el VIA. A esta le sigue el uso de HA con N-glicosilaciones complejas como inmunógeno y finalmente la inmunización con HA llevando N-glicosilaciones del tipo simple otorga el menor nivel de protección.

3.7 Efecto según la posición de las N-glicosilaciones en HA.

En el caso del VIA, a través de análisis de secuencias aminoacídicas, se ha revelado que durante la adaptación del virus en humanos, este ha ido variando tanto en la cantidad como la posición de sitios de N-glicosilación en HA (Sun, S. *et al.*, 2011) (Figura 9). Estos sitios difieren entre subtipos o incluso entre cepas dentro de un mismo subtipo (Zhang *et al.*, 2015). Los sitios de N-glicosilación han mostrado efectos positivos o adversos en HA, afectando diferentes eventos durante la infección según su tipo o posición (Vigerust & Shepherd, 2007).



3.7.1 Efecto de las N-glicosilaciones en el tallo de HA.

Existen 5 potenciales sitios de N-glicosilación en el tallo de HA. Estos se encuentran en las posiciones 27/28, 40, 304 y 498 (Numeración para H1) (Figura 9). Para el subtipo H1N1, estas 5 posiciones se encontraron altamente conservadas (98%) entre todas las cepas de H1N1 circulando desde 1918 hasta el año 2009 (Sun, S. *et al.*, 2011). Esta observación llevó a proponer que estos sitios probablemente eran fundamentales para la estabilidad, correcto plegamiento y procesamiento de HA (Reading *et al.*, 2007; Vigerust & Shepherd, 2007). Este concepto se ha apoyado en diversos trabajos realizados con distintos subtipos de HA, donde se ha observado que los sitios de N-glicosilación 27 y

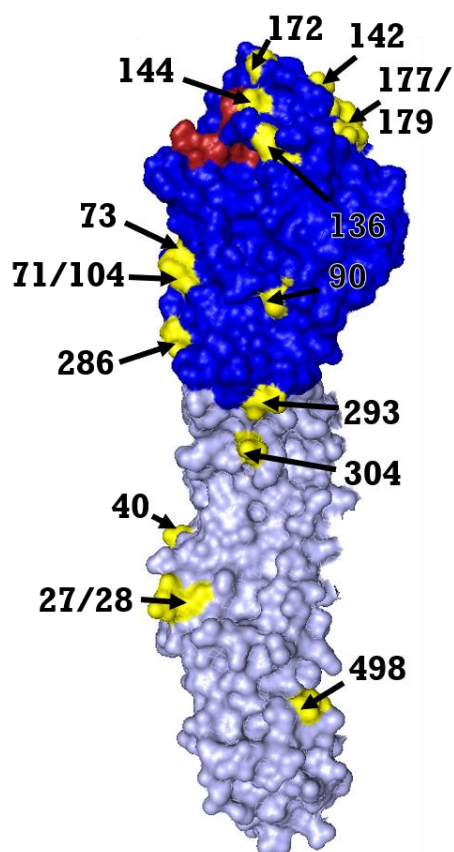


Figura 9. Sitios de N-glicosilación en HA (H1N1).

Se muestra el monómero de HA y sus dominios de la cabeza (azul) y el tallo (gris). En rojo se distingue los aminoácidos que componen el SUR. En amarillo se señalan los sitios de N-glicosilación que ha adquirido el VIA (subtipo H1N1) durante su adaptación en el humano (S. Sun *et al.*, 2011). El número corresponde al aminoácido N dentro de la secuencia N-X-S/T. Modelamiento a partir de PDB: 3LZG.



498 están presentes en todos los subtipos de HA, mientras que el sitio 40 se encuentra presente en la mayoría de estos (Wagner *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2015). Mediante virus recombinantes, en los subtipos H7N1 o H5N1, se determinó los efectos de estos sitios de N-glicosilación al ser eliminados de HA. Se observó que el sitio 27 era crucial para la replicación viral, y que la eliminación de los sitios 27 o 498 tenía un efecto negativo en la estabilidad de HA a pH bajo (Wagner *et al.*, 2002). Por otra parte, se determinó que la eliminación en conjunto de los sitios 27-40 o 27-498 afecta negativamente el clivaje de HA mediado por proteasas. Esto resulta en una baja tasa de crecimiento y un bajo título viral comparado con el virus tipo silvestre (rWT) (Zhang *et al.*, 2015).

3.7.2 Efecto de las N-glicosilaciones en la cabeza de HA.

El dominio de la cabeza globular en HA ha mostrado una gran variabilidad en cuanto a la aparición/desaparición de sitios de N-glicosilación durante su adaptación en el humano (Sun, S. *et al.*, 2011). Esto se ha observado tanto en diferentes subtipos como en diferentes cepas dentro de un mismo subtipo (Reading *et al.*, 2007). En el caso del subtipo H1N1, analizando la secuencia de HA de VIA circulantes en humanos entre las pandemias de 1918 hasta la del año 2009, se ha observado la aparición de los sitios de N-glicosilación 71, 104, 142, 144, 172, 177, 179, 286 y 293 (Figura 9). Algunos de estos sitios aparecieron juntos dentro de un mismo periodo, mientras que otros han desaparecido o fueron reemplazados por sitios de N-glicosilación en posiciones cercanas (Sun, S. *et al.*, 2012). Una característica interesante en el subtipo H1N1, es que ambos virus que causaron pandemias (cepas de 1918 y 2009) carecían de sitios de N-glicosilación en el dominio de la cabeza globular de HA, salvo por el sitio 104, lo cual ha llevado a proponer que la adquisición de los otros sitios adicionales probablemente se ha debido a la adaptación del VIA y la evasión a la respuesta inmune tras su circulación en humanos (Sun, S. *et al.*, 2011).

Se han realizado diversos trabajos para estudiar la relevancia de los oligosacáridos en posiciones específicas de HA del subtipo H1N1. Estos estudios se han llevado a cabo removiendo o adicionando sitios de N-glicosilación en HA dentro de una cepa determinada de VIA. En el trabajo de Tate y colaboradores (Tate *et al.*, 2011), generaron virus recombinantes los cuales diferían únicamente en su secuencia de HA.



Un virus llevaba la HA de una cepa altamente patogénica (PR8), mientras que el otro la HA de una cepa no patogénica (BR). Una diferencia entre estas 2 HA fue que el virus BR tenía 4 sitios de N-glicosilación en el dominio de la cabeza globular de HA (sitios 104, 144, 172 y 177), mientras que el virus PR8 no tenía sitios de N-glicosilación en este dominio. Evaluaron la relevancia de estos cuatro sitios en cuanto a la virulencia del VIA, removiéndolos del virus BR o adicionándolos al virus PR8. En experimentos con ratones, el virus BR sin los sitios -104/144 demostró ser altamente patogénico, y de manera inversa, la adición de los sitios +104/144 al virus PR8 generó una disminución en su patogenicidad (Tate *et al.*, 2011).

Por otra parte, en la investigación de Sun y colaboradores estudiaron la relevancia de tener sitios de N-glicosilación en diferentes zonas dentro del dominio de la cabeza globular de HA (Sun, X. *et al.*, 2013). Evaluaron el efecto de adicionar sitios de N-glicosilación en la zona lateral de HA (sitios 71 y 286), en la zona superior (sitios 142 y 172) o en ambas zonas al mismo tiempo, utilizando la cepa pandémica A/SouthCarolina/1/1918 H1N1. Al evaluar la afinidad de estas variantes del virus, observaron que ninguno de los cuatro sitios de N-glicosilación influía de manera significativa. Aun así, al utilizarlos para inmunizar ratones y evaluar los sueros en ensayos de inhibición de HA si observaron efectos relacionados a la posición. Determinaron que el suero producido por el virus rWT (sin sitios de N-glicosilación en el dominio de la cabeza de HA) era capaz de inhibir al virus con sitios de N-glicosilación al costado (71-286) pero no a aquellos con sitios en la parte superior de la cabeza (142-172 y 71-286-142-172). Por otro lado, el suero producido con cualquiera de estos últimos dos virus, N-glicosilados en la parte superior de HA, era capaz de inhibir a todos los virus evaluados en este trabajo (Sun, X. *et al.*, 2013).

Finalmente, en trabajos previos realizados en el laboratorio, se añadieron a la cepa A/Netherlands/602/2009 (H1N1) sitios de N-glicosilación en la cabeza de HA según su aparición temporal entre las pandemias de 1918 y el año 2009 (Medina *et al.*, 2013). Se produjeron los virus recombinantes con los sitios de N-glicosilación rWT, 144, 144-172, 71-142-177 (3G) y 71-142-172-177 (4G) y se utilizaron para infectar ratones. Los datos obtenidos indicaron que la adición de sitios de N-glicosilación generó la atenuación del virus en comparación con su variante sin oligosacáridos en la cabeza de HA (rWT).



Luego, se utilizaron estos virus para inmunizar ratones y evaluar su capacidad de inducir sueros con actividad inhibitoria de HA. Los sueros producidos con las variantes rWT, 3G o 4G resultaron tener bajos niveles de inhibición cruzada contra HAS glicosiladas en las posiciones 144 o 144-172. Interesantemente, los sueros de las variantes 144 y 144-172 fueron capaces de inhibir a todas las variantes N-glicosiladas evaluadas (Figura 10A). Esto último llevó a estudiar virus con sitios de N-glicosilación descritos cercanos a 144 o 144-172, por lo que se incluyó los virus recombinantes 142, 172, 177, 71-142 y se repitió el protocolo de inmunización en conjunto con los ensayos de inhibición de HA. Ninguno de estos nuevos sueros fue capaz de inhibir a los virus N-glicosilados en las posiciones 144 o 144-172 (Figura 10B), lo que llevó a concluir

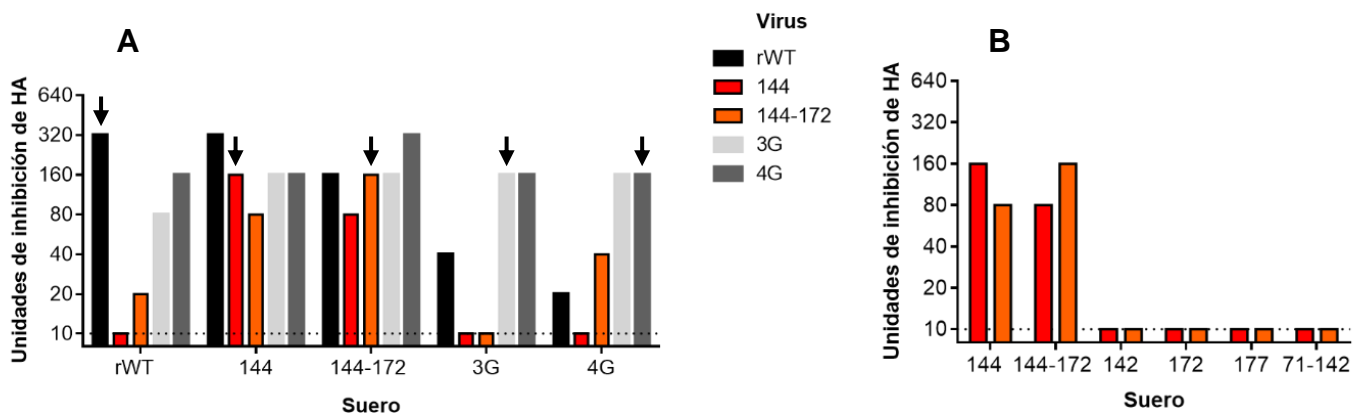


Figura 10. Efecto antigénico del sitio de N-glicosilación 144 en la HA del VIA (H1N1).

Títulos de inhibición de sueros obtenidos contra variantes N-glicosiladas en HA del VIA. (Medina *et al.*, 2013). **A.** Los sitios de N-glicosilación en HA 144 (rojo) o 144-172 (naranja) produjeron sueros capaces de inhibir a las variantes rWT, 3G y 4G. Inversamente, ninguno de los sueros producidos con estas últimas tres variantes fue capaz de inhibir a los virus 144 y 144-172. Se indica con flechas los valores homólogos de cada antisuero contra su virus respectivo. **B.** Evaluación antigénica de sitios de N-glicosilación cercanos al sitio 144. Ninguno de los sueros producidos con las variantes adicionales 142, 172, 177 o 71-142 fue capaz de inhibir a los virus con sitios de N-glicosilación 144 o 144-172 en HA.



que la N-glicosilación en la posición 144 de la HA del VIA tiene un rol fundamental en la evasión de la respuesta humoral del hospedero (Medina *et al.*, 2013).

En conjunto, estos trabajos nos permiten concluir que tanto el número total como la posición específica donde se ubican los sitios de N-glicosilación en HA juegan roles importantes en la patogenicidad y las propiedades antigénicas del VIA, pareciendo ser que aquellos sitios ubicados en la zona superior de la cabeza de HA son más relevantes que aquellos ubicados al costado.

3.8 Planteamiento del problema.

La constante amenaza de pandemias debido a brotes de VIA ha llevado a la vacunación anual de las personas en orden de prevenir su infección. El cambio antigénico, principalmente en HA, ha permitido al VIA mantenerse en constante evolución y circulación en la población humana. La variación en número y posición de los sitios de N-glicosilación en HA ha sido considerada una estrategia del virus que puede enmascarar eficientemente los sitios antigénicos ubicados en la cabeza globular de la proteína. Esto permitiría a nuevas cepas de VIA poder evadir el reconocimiento de anticuerpos generados contra cepas que circularon con anterioridad.

Diversos trabajos han demostrado que el tipo y la posición de los sitios de N-glicosilaciones en HA utilizadas como inmunógeno tiene repercusiones en la respuesta humoral generada. Además, en el trabajo realizado en el laboratorio del Dr. Medina, se determinó que el oligosacárido en la posición 144 de HA tiene un papel clave en la antigenicidad del VIA H1N1. Especulamos que la inmunización con el VIA N-glicosilado en la posición 144 podría inducir una respuesta humoral de amplio espectro, la cual estaría dirigida hacia epítomos fuera de los sitios antigénicos descritos.

Entender la relevancia del oligosacárido en la posición 144 de HA, y además la influencia que tiene el tipo de N-glicosilación en este sitio, pueden contribuir en la producción o mejora de la vacuna actual contra el VIA.



3.9 Hipótesis.

La N-glicosilación 144 en la HA del VIA (H1N1) y el tipo de oligosacárido unido en él inducen una respuesta humoral más amplia en comparación a otros sitios de N-glicosilación cercanos.

3.10 Objetivo general.

Evaluar las propiedades antigénicas de la HA del VIA con diferentes tipos de N-glicosilación en el sitio 144.

3.11 Objetivos específicos.

3.11.1 Objetivo específico 1:

Determinar el perfil de glicosilaciones mediante HA solubles (sHA) y dilucidar el oligosacárido unido en el sitio 144.

3.11.2 Objetivo específico 2:

Evaluar la antigenicidad del VIA con oligosacáridos del tipo simples (HA_{HM}) o complejos (HA_{CG}) y variaciones en sus sitios de N-glicosilación en HA

3.11.3 Objetivo específico 3:

Determinar los epítomos reconocidos por los anticuerpos producidos contra la variante del VIA N-glicosilada en la posición 144 de HA.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

Nombre	Compañía	N° de Catálogo
(meta)Peryodato de potasio (KIO ₄)	Sigma-Aldrich	60450-100G-F
Ácido acético glacial, 100% anhidro	Merck	1.000.632.500
Acrilamida: Bis-Acrilamida 19:1, 40% p/v	Winkler	BM-0090
Agar purificado	OXOID	LP0028
Agarosa	Winkler	BM-0120
Agarosa de bajo punto de fusión (BPF)	Invitrogen	16520-100
Agua grado biología molecular	Nalgene	46-000-CM
Agua grado cultivo celular	Nalgene	25-055-CM
Albúmina Bovina, Solución al 35%	MP Biomedicals	810061
Anticuerpo de cabra, α -IgG de conejo-HRP	Jackson Imm. Res.	111-035-003
Anticuerpo de conejo, α -HA2 PR8 #3951	Suero No comercial	-
Azul Bromofenol	Sigma	B-5525
Bicarbonato de Sodio (NaHCO ₃)	Sigma	S5761-500G
Botella de Laboratorio, 1000 mL	SCHOTT	10042612
Botella de Laboratorio, 250 mL	SCHOTT	10043832
Buffer TAE 50X	Winkler	BM-0490
Cloruro de Magnesio Hexahidratado	Millipore	1.05833.0250
Cloruro de Sodio (NaCl)	Millipore	1.06404.1000
DEAE-Dextrano	Sigma	D9885-10G
EDTA, grado biología molecular	Calbiochem	324503
Enzima de restricción Not I	Thermo Scientific	ER0592
Enzima de restricción Xho I	Thermo Scientific	ER0691
Esparcidor de células desechable	Heathrow Scientific	HS8151
Estándar de ADN GeneRuler 1Kb Plus	Thermo Scientific	SM1331
Estándar dos colores Precision Plus Protein	Bio-Rad	161-0374
Fosfato de Sodio di-hidrogenado	AppliChem	131965.1210
Frasco de Cultivo Celular T150	TPP	90151
Frasco de Cultivo Celular T75	TPP	90075
Geles prefabricados 4-15%	Bio-Rad	456-1083
Glicerol	Calbiochem	356352-1L
Glicerol, grado biología molecular	Calbiochem	356352-1L
Glicina, grado biología molecular	Calbiochem	357002-1KG
Gradilla magnética DynaMag-2	Life technologies	12321D
Hemocitómetro	Sigma	Z359629-1EA
HEPES, Solución 1M	Nalgene	SH30237.01
Imidazol	Sigma-Aldrich	56750
Indicador Cristal Violeta	Millipore	1.01408.0025
Kifunensina	Sigma	K1140-1MG
Kit High Pure Viral Nucleic Acid	Roche	11 858 874 001



Kit Pierce BCA Protein Assay	Thermo Scientific	23227
Kit Pure Yield Plasmid Midiprep System	Promega	A2492
Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up Syst.	Promega	A9282
Leche Descremada	BD	232100
L-Glutamina 200 mM, Solución 100X	Nalgene	SH30034.01
Ligasa de ADN T4	NEB	M0202S
Lipofectamina 2000	Invitrogen	11668-019
Marcador de peso molecular, 1 Kb Plus	Thermo Scientific	SM1331
Matraz Erlenmeyer, 500 mL	SCHOTT	10027905
Medio de cultivo de bacterias, LB Agar	MO BIO	12107-1
Medio de cultivo de bacterias, LB Broth	MO BIO	12106-1
Medio de cultivo DMEM, 1X	Nalgene	10-013-CMR
Medio EMEM, 10X	Nalgene	12-684F
Medio S.O.C.	Invitrogen	15544-034
Membrana de Nitrocelulosa, 0,45 µm	GE Healthcare	10600002
Metanol	Millipore	1.06009.5000
Metaperyodato de Potasio	Sigma-Aldrich	60450-100G-F
n-Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)	Calbiochem	428023
Neuraminidasa de <i>Vibrio cholerae</i>	Roche	11080725001
Opti-MEM I, 1X	Gibco	31985-070
Penicilina / Estreptomina, 10.000X	Gibco	15140-122
Persulfato de Amonio	OmniPur	2310
Pipeta Serológica, 10 mL	SPL	91010
Pipeta Serológica, 2 mL	SPL	91002
Pipeta Serológica, 25 mL	SPL	91025
Pipeta Serológica, 5 mL	SPL	91005
Placa de 96 pocillos, fondo cónico	Greiner bio-one	651101
Placa de 96 pocillos, fondo plano	Greiner bio-one	655061
Placa de Cultivo Celular de 6 pocillos	SPL	32006
Placa Petri 94x16 mm	Greiner bio-one	633181
Platinum Pfx DNA Polymerase	Invitrogen	11708013
Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen	10966-018
PNGasa F	NEB	P0704S
Puntas Pipeta con filtro, 100 – 1000 µL	Sorenson	14200
Puntas Pipeta con filtro, 20 µL	Sorenson	14210
Puntas Pipeta con filtro, 200 µL	Sorenson	14220
Puntas Pipeta con filtro, 5 – 10 µL	Sorenson	15020
Puntas Pipeta, 100 – 1000 µL	Sorenson	17070
Puntas Pipeta, 5 – 200 µL	Sorenson	17090
Sacarosa	Merck	1.07687.1000
Sal sódica de Ampicilina	Sigma	A0166-5G
Sangre de Pavo	Inst. de Salud Pública	-
Sefarosa inmovilizada con níquel	GE Healthcare	28-9673-88
Solución de formaldehído al 4%, pH 6,9	Millipore	1.00496.5000
Suero Fetal Bovino (FBS)	Gibco	10437-028
Superscript III One-Step RT-PCR System	Invitrogen	12574026



Sustrato Quimioluminiscente West Pico	Thermo Scientific	34080
Tampón O, 10X	Thermo Scientific	BO5
Tampón de carga de ADN, 6X	Thermo Scientific	R0611
Tampón de Ligasa de ADN T4, 10X	NEB	B0202S
Tampón fosfato salino (PBS), 1X	Nalgene	SH30256.02
Temed	Winkler	BM-1970
Tinción Azul de Coomassie G250	Merck	1.15444.0025
Tinción Azul de tripano 0,4%	Gibco	15250-061
Tinción de carga de ADN 6X	Thermo Scientific	R0611
Tinción de gel (ADN) SYBR Safe 10.000X	Invitrogen	S33102
Tripsina 0,25%	Nalgene	25-053-CI
Tripsina de páncreas bovino, TPCK tratada	Sigma	T8802-100MG
Tris Base, grado biología molecular	Calbiochem	648310
Tubos cónicos, 15 mL	SPL	50015
Tubos cónicos, 50 mL	SPL	50050
Tubos de centrifuga, 25x89 mm	Beckman Coulter	344058
Tubos de microcentrifuga, 1,5 mL	Sorenson	1740
Tubos de microcentrifuga, 2,0 mL	SARSTEDT	72.694.005
Tubos de PCR, 0,2 mL	Sorenson	16950
Tween 20	Winkler	TW-16520



4.2 Diseño Experimental

4.2.1 Determinar el perfil de glicosilaciones mediante HA solubles (sHA) y dilucidar el oligosacárido unido en el sitio 144.

Se diseñó un protocolo a partir de trabajos previos en investigaciones relacionadas (de Vries *et al.*, 2012; Eggink *et al.*, 2014; Sun, X. *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2009). Brevemente, se diseñaron y clonaron en un plásmido secuencias de ADN que expresaran de manera soluble variantes de HA de la cepa de VIA A/Netherlands/602/09 (H1N1). Las proteínas expresadas contienen en su secuencia los sitios de N-glicosilación de la cepa silvestre (104 / rWT) y los sitios adicionales 142, 144, 172 o 144-172 (numeración H1). Cada constructo fue transfectado en células HEK293T y las proteínas purificadas desde el sobrenadante. Las sHA fueron caracterizadas y en trabajos posteriores el perfil de glicosilaciones de cada variante será determinado a través de electroforesis en gel capilar con fluorescencia inducida por láser (CGE-LIF) (Schwarzer *et al.*, 2008) (Figura 11).

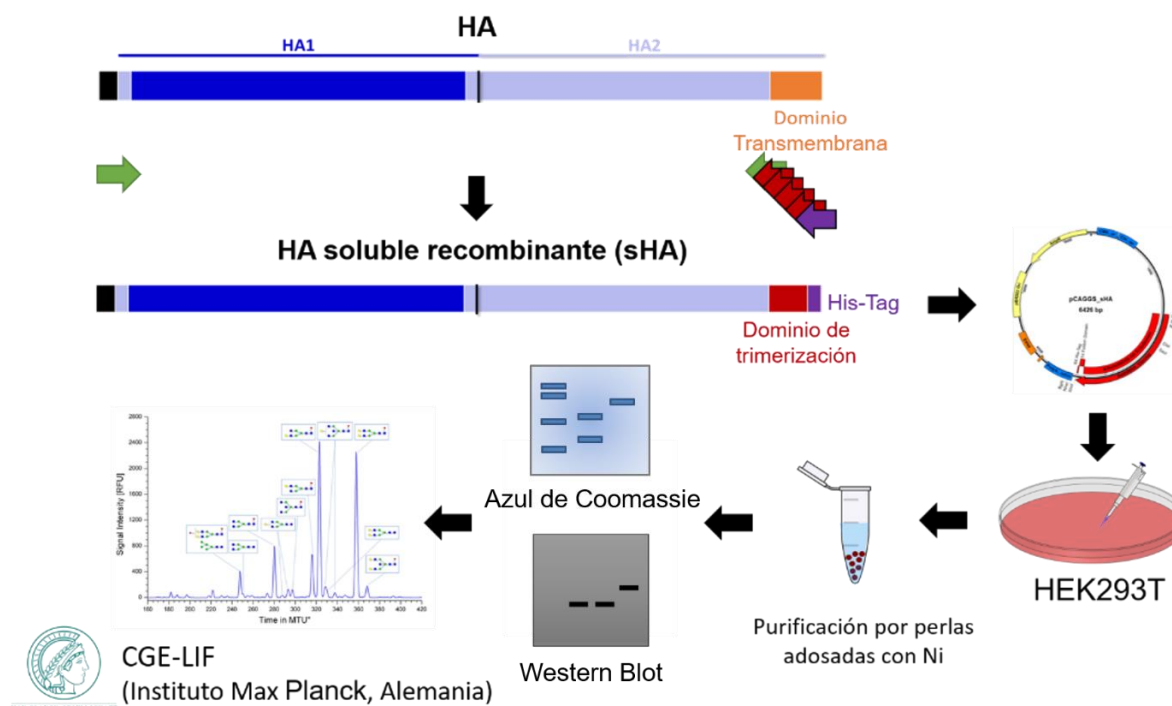


Figura 11. Esquema resumen de metodología para la determinación del oligosacárido unido en la posición 144 de HA.

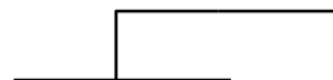
Protocolo ilustrado de la sección 4.2.1. Diseño de secuencias para la expresión y purificación de HA soluble en cultivo celular.



a) Diseño de partidores para el clonamiento de sHA con variaciones en sus sitios de N-glicosilación:

Se diseñó partidores utilizando la herramienta OligoAnalyzer de IDT. El diseño se basó en la secuencia referencia de la cepa A/Netherlands/602/2009 pH1N1 (CY039527) disponible en la base de datos de influenza (Sitio web: www.fludb.org). A través de estos partidores se amplificó la secuencia correspondiente al ectodominio de las diferentes variantes de HA (nucleótidos 1 al 1590) y además se adicionó en el extremo carboxilo un dominio de trimerización Foldon T4 (GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL) seguido de una cola de poli-histidina (HHHHHH) (Krammer *et al.*, 2012). Estos últimos se adicionaron a través de partidores inversos (Rv) que tenían un solapamiento entre ellos de 17 a 19 nucleótidos. Adicionalmente, se diseñaron los partidores de los extremos de manera que agregaran a la secuencia los sitios de restricción Not I y Xho I en los extremos 5' y 3', respectivamente (Tabla 1). La secuencia para cada variante de HA se obtuvo a partir de plásmidos disponibles en el laboratorio o a partir de ARN viral a través de RT-PCR.

Tabla 1. Partidores diseñados para el clonamiento de sHA.



Partidor	Secuencia (5' → 3')	Largo	%GC	Tm (°C)	Sobreposición (pb)
Fw_Not I	CTC TGT GGC GGC CGC <u>ATG AAG GCAATA CTA GTA GTT CTG</u>	39	37,5	52,1	24
Rv_T4 1	<u>GGC CTC GGG AAT ATA ACC AAT CTG GTA AAT CCT TGT TGA TTC</u>	42	33,3	51,4	24
Rv_T4 2	GTA TGC TTG TCC GTC CCT CGG <u>GGC CTC GGG AAT ATA ACC</u>	39	55,6	52,3	18
Rv_T4 3	C CCA CTC ACC ATC TTT GCG AAC <u>GTA TGC TTG TCC GTC CC</u>	39	58,8	52,9	17
Rv_T4 4	ATG AAG GAA CGT GCT GAG CAG CAC <u>CCA CTC ACC ATC TTT GC</u>	41	55,6	53,6	18
Rv_His	GAG TTA GTG GTG GTG ATG GTG <u>ATG AAG GAA CGT GCT GAG</u>	39	50	52,3	18
Rv_Xho I	TCA CTC GAG TTA <u>GTG GTG GTG ATG G</u>	25	52,6	52,5	19

Se utilizó la denominación “Fw” para el partidor directo y “Rv” para los partidores inversos. El subrayado bajo la secuencia indica el fragmento del partidor que se solapa con otro partidor. El porcentaje de guanina-citosina (%GC) y la temperatura de fusión (Tm) están basadas en la secuencia solapada. En verde se destaca el codón de término introducido y en rojo las secuencias de los sitios de corte Not I y Xho I.



b) Clonamiento de cada variante de sHA en el vector pCAGGS.SMC II:

Cada constructo fue generado mediante PCR consecutivo utilizando el kit Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) en un volumen final de 50 μ L por reacción. El programa usado en el termociclador, detallado a continuación, fue adaptado según los partidores y las recomendaciones del fabricante:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (segs)	N° de Ciclos
Denaturación inicial	94	300	1
Denaturación	94	15	13
Hibridación	50	30	
Extensión	68	120	
Extensión final	68	300	1

Los productos de cada reacción de PCR fueron separados en geles al 1% de agarosa de bajo punto de fusión (BPF) (Invitrogen) a 80V y las bandas de ADN de interés se cortaron con el uso de un bisturí y posteriormente fueron purificadas mediante el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega). La concentración de ADN purificado se cuantificó mediante el uso de un equipo NanoDrop.

Para la reacción inicial (partidores Fw_NotI y Rv_T4_1), se utilizó como templado plásmidos disponibles en el laboratorio y para las reacciones posteriores el ADN purificado de la reacción inicial, siendo para ambos casos un templado diluido a una concentración final de 1 ng/ μ L. Para la segunda reacción se utilizó los partidores Fw_NotI y Rv_T4_2 y se repitió el protocolo consecutivamente hasta completar 6 reacciones.

Una vez purificado el fragmento de ADN final de cada variante de sHA, se utilizaron 1000 ng de ADN en una doble digestión enzimática, utilizando solución tampón O 10X y las enzimas de restricción Not I y Xho I (Thermo Scientific). Cada reacción fue incubada a 37°C durante una noche, realizando este paso también para digerir el vector pCAGGS.SMC II en el sitio de múltiple clonamiento (SMC) (Figura 12). Posteriormente, se purificó el ADN de interés doble digerido, el cual fue ligado considerando una razón de 4:1 inserto: vector, de acuerdo al protocolo de ligación con T4 DNA Ligase (NEB) recomendado por el fabricante.

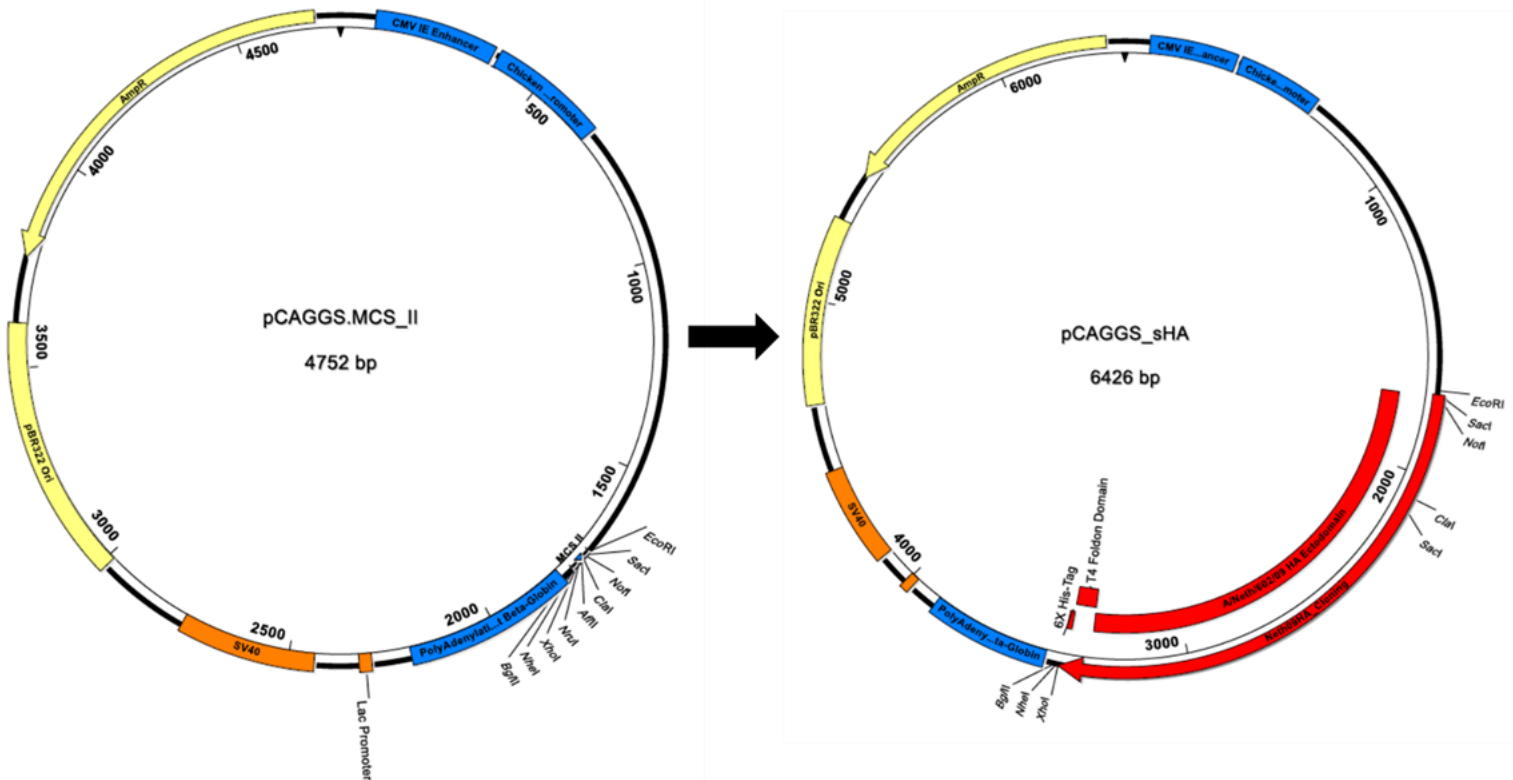


Figura 12. Mapa de plásmidos pCAGGS.SMC_II y pCAGGS_sHA.

Esquema del vector de destino pCAGGS.SMC_II utilizado para el clonamiento de sHA. Se muestran los componentes dentro de la secuencia del plásmido. De izquierda a derecha: potenciador de citomegalovirus, promotor de beta actina de pollo, sitio de múltiple clonamiento (EcoRI, SacI, NotI, ClaI, AflII, NruI, XhoI, NheI, BglII), señal de poliadenilación de beta globina, promotor Lac, origen de replicación eucariote SV40, origen de replicación bacteriano pBR322 y gen de resistencia a ampicilina. A la derecha se esquematiza el vector con el inserto de la secuencia sHA entre los sitios NotI y XhoI. Se incluyen el dominio de trimerización Foldon T4 y la secuencia de poli-histidina adicionales.

c) Transformación de bacterias competentes DH5 α mediante golpe térmico:

Se incubó el volumen total de la reacción de ligación con 50 μ L de bacterias DH5 α en hielo durante 30 mins y colocada en un baño termorregulador a 42 $^{\circ}$ C durante 45 segs. Rápidamente, se incubó la mezcla en hielo durante 2 mins y luego se adicionó 900 μ L de medio SOC (Invitrogen) a T $^{\circ}$ ambiente. Se dejó la mezcla incubando con agitación a 37 $^{\circ}$ C / 200 rpm, durante 1 hr. Finalmente se centrifugaron los tubos durante 1 min a 1000g y



se descartaron 900 μ L de sobrenadante. El pellet obtenido fue resuspendido en el volumen restante y se usaron 100 μ L para ser plaqueados en placas Petri (Greiner bio-one) con medio LB Agar (MO BIO) suplementado con ampicilina 1X (Sigma). Las placas fueron incubadas durante una noche a 37°C. Al día siguiente, se seleccionaron entre 5 y 10 colonias resistentes a ampicilina y se resuspendieron en 200 μ L de medio LB Broth (MO BIO) suplementado con ampicilina 1X. Las bacterias se dejaron crecer con agitación a 37°C / 200 rpm durante 2 hrs.

Posteriormente, se confirmó la presencia del inserto de sHA mediante PCR. Para esto se utilizaron los partidores que flanqueaban la secuencia diseñada y como templado una dilución 1:5 de las colonias resistentes crecidas. La mezcla de la reacción de PCR se realizó según las recomendaciones del kit Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) y el programa del termociclador se adaptó según la secuencia de los partidores. El programa utilizado se detalla a continuación:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (segs)	N° de Ciclos
Denaturación inicial	95	600	1
Denaturación	95	30	40
Hibridación	60	15	
Extensión	72	60	
Extensión final	72	300	1

d) Expansión de DH5 α transformadas con los diferentes plásmidos pCAGGS_sHA:

Por cada variante de sHA, se escogió una colonia transformada y se incubó en 100 mL de medio LB Broth, suplementado con ampicilina 1X, con agitación a 37°C / 200 rpm durante una noche. Al día siguiente, se extrajo los plásmidos de interés con el kit Pure Yield Plasmid Midiprep System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de plásmido obtenido se determinó a través de equipo NanoDrop. Cada plásmido fue enviado a secuenciar por Sanger a Macrogen (Estados Unidos) para confirmar la identidad de la secuencia y la presencia de los sitios de N-glicosilación de interés. Para el secuenciamiento se utilizaron los partidores que flanqueaban la secuencia de sHA (Tabla 1) y el SMC del plásmido pCAGGS.



e) Transfección de plásmidos pCAGGS_sHA en células embrionarias de riñón humano 293T (HEK293T):

Con un día de anterioridad, se sembraron en una placa de cultivo de 6 pocillos (SPL) 500.000 células HEK293T por pocillo y se incubaron a 37°C / 5% CO₂. Al día siguiente, se reemplazó el medio de las células por medio de cultivo fresco [DMEM (Nalgene) suplementado con Penicilina/Estreptomicina 1X (Gibco) y FBS 10% (Gibco)]. Se realizó un protocolo de transfección utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se alicuotó en un tubo eppendorf 250 µL de medio de transfección Opti-MEM I 1X (Gibco) más 4 µg de cada plásmido. En otro tubo se adicionó 250 µL de Opti-MEM I 1X más 10 µL de Lipofectamina 2000. Después de 5 minutos a T° ambiente se mezclaron ambos tubos y se incubaron 20 minutos adicionales a T° ambiente antes de utilizar la mezcla para transfectar las células HEK293T sembradas.

f) Purificación de sHA mediante Sefarosa® magnéticas con Níquel:

48 horas post transfección, se recolectó el sobrenadante de las células HEK293T transfectadas con cada plásmido variante de sHA. Cada sobrenadante se alicuotó en criotubos y se limpió de residuos celulares mediante centrifugación por 5 mins a 5500 rpm. Posteriormente, se purificó cada variante de sHA mediante sus colas de polihistidina utilizando un kit de Sefarosa® magnética adosadas con Níquel (GE Healthcare), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El volumen de tampón de elución utilizado fue de 120 µL para 2 mL de sobrenadante.

g) Caracterización de variantes de sHA purificadas mediante Western blot:

Para confirmar la generación de sHA glicosiladas se realizó un protocolo de Western Blot (WB) con cada sHA con diferentes sitios de N-glicosilación. Las proteínas purificadas se corrieron en geles de gradiente 4-15% (Bio-Rad), donde se cargaron 8 µL de cada fracción de elución posterior a un paso de denaturación a 95°C durante 5 mins. Se realizó la electroforesis a 80V hasta que el frente de migración alcanzó el límite inferior del gel. Luego, se llevó a cabo la electrotransferencia del gel hacia una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) a 100V durante 75 mins. La membrana fue incubada en



solución de bloqueo (leche descremada (BD) al 5%, diluida en PBS-Tween 0,1%) con agitación leve a 4°C durante una noche. Al día siguiente, se retiró la solución de bloqueo y se incubó la membrana con suero policlonal dirigido al dominio del tallo de HA (Anticuerpo de conejo, α -HA2 PR8 #3951). Este suero se diluyó 1:4000 en solución de bloqueo y se incubó con la membrana durante 2 hrs a T° ambiente. Posteriormente, se lavó tres veces la membrana, siendo cada paso de lavado 10 minutos en PBS-Tween 0,1% y luego se incubó la membrana con anticuerpo secundario diluido 1:8000, durante 1 hr a T° ambiente (Anticuerpo de cabra, α -IgG de conejo acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) para su detección [Jackson Immuno Research]). Finalmente se repitió el paso de lavado y se reveló la membrana utilizando el reactivo quimioluminiscente West-Pico (ThermoScientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. El revelado se llevó a cabo utilizando el equipo de fotocaptura de UVitec Alliance 2.7, donde adicionalmente, se determinó el peso molecular (PM) para las bandas observadas a través de la herramienta “estimación de PM” contenida en el programa del equipo de fotocaptura.

Paralelamente, se verificó la pureza de sHA obtenida en la fracción eluída a través de geles teñidos con azul de Coomassie (Merck). Se cargaron 20 μ L de las diferentes fracciones obtenidas durante el protocolo de purificación en geles de poliacrilamida al 4% concentrador – 8% separador. La electroforesis se realizó de la misma manera mencionada anteriormente. Se dejó el gel teñiendo en solución de azul de Coomassie durante 2 hrs y luego se destiño sumergiéndolo en agua destilada durante una noche, ambos pasos con agitación constante.



4.2.2 Evaluar la antigenicidad del VIA con oligosacáridos del tipo simples (HA_{HM}) o complejos (HA_{CG}) y variaciones en sus sitios de N-glicosilación en HA.

Para determinar la relevancia del tipo y posición de las N-glicosilaciones en HA y su efecto en la respuesta humoral producida por el hospedero. Para esto, se utilizaron virus recombinantes disponibles en el laboratorio, correspondientes a la cepa rWT del virus A/Netherlands/602/09 y sus variantes N-glicosiladas en HA en las posiciones 142, 144, 172 y 144-172. Estas variantes fueron caracterizadas mediante WB y además se determinó su título de hemaglutinación y su título viral. Esto se repitió adicionando kifunensina al medio durante la replicación viral para poder obtener virus con N-glicosilaciones del tipo simple. Los 10 virus obtenidos fueron utilizados para inmunizar ratones en colaboración con la Escuela de Medicina en Mount Sinai (Estados Unidos). Se obtuvo el suero de los ratones inmunizados y estos fueron utilizados en ensayos de inhibición de hemaglutinación y ELISA contra proteínas del VIA (Figura 13).

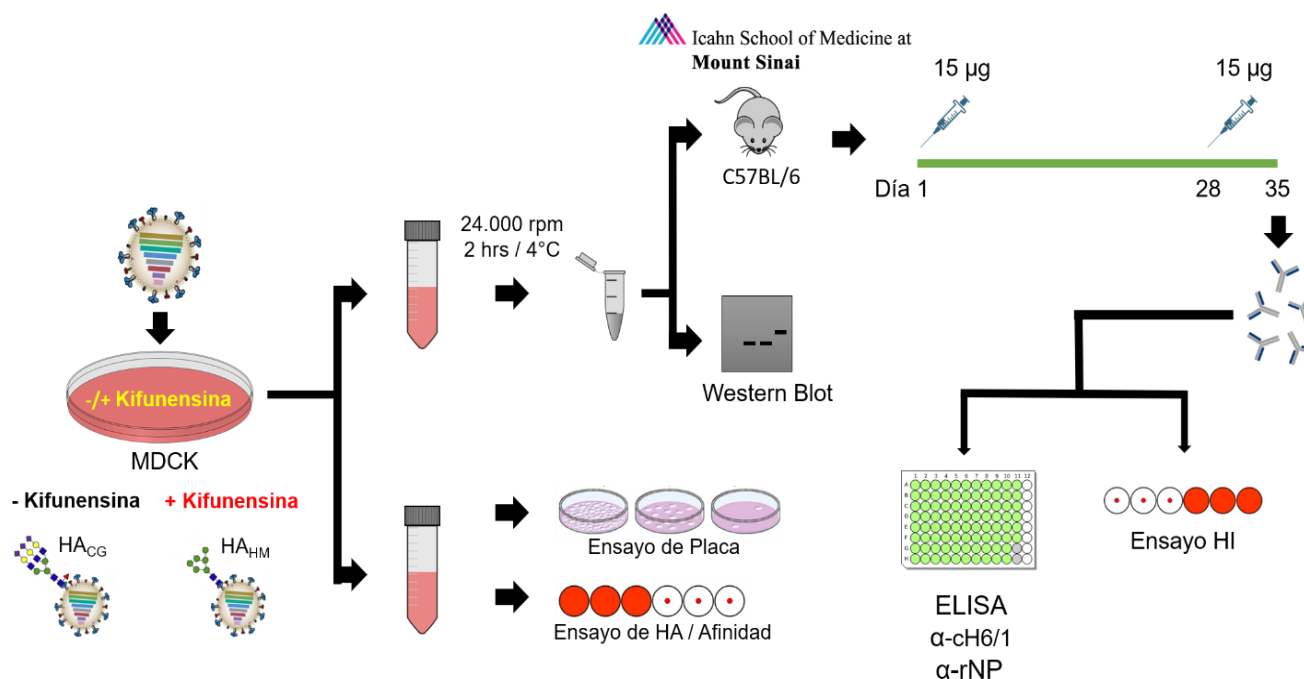


Figura 13. Esquema resumen de metodología para evaluar la antigenicidad del VIA con diferentes tipos y sitios de N-glicosilación en HA.

Protocolo ilustrado de la sección 4.2.2. Obtención de virus stock y sueros de ratones inmunizados utilizando VIA con distintas variantes de HA y N-glicosilaciones del tipo simple o complejas.



a) Crecimiento de virus con N-glicosilaciones del tipo simples o complejas:

Se crecieron 5 virus recombinantes de la cepa de VIA A/Netherlands/602/09 (H1N1) conservando 7 de los segmentos del virus A/Netherlands/602/09, y el segmento de HA con variaciones en sus sitios de N-glicosilación (rWT y los sitios adicionales 142, 144, 172 o 144-172). Para el crecimiento de estos virus, se siguió el protocolo establecido para crecimiento de virus Influenza en cultivo celular (Cottey *et al.*, 2001). En placas de 6 pocillos, se sembraron con un día de anterioridad 540.000 células de riñón de perro Madin-Darby (MDCK) por pocillo. Al día siguiente, se lavó las células con PBS 1X (Nalgene) y se inocularon con 200 μ L de cada virus stock diluido. Las placas fueron incubadas durante 1 hr a 37°C, agitándose cada 10 mins. Posteriormente, se retiró el inóculo y se adicionó 2 mL de medio de infección por pocillo (EMEM 1X (Nalgene), [NaHCO₃ 5%, DEAE-Dextrano 1%, Tripsina-TPCK 1 mg/mL (Sigma)]). Las células fueron incubadas por 48 hrs a 37°C / 5% CO₂. Por cada virus se consideró cuatro placas de 6-pocillos (48 mL de volumen de virus final).

En paralelo, para obtener virus con N-glicosilaciones del tipo simple, durante el paso de infección se adicionó Kifunensina 5 μ M (Sigma), de acuerdo a estudios previos donde se utilizó este reactivo para crecer VIA en células MDCK (Elbein *et al.*, 1991). Este compuesto químico inhibe la enzima α -manosidasa I, la cual se encuentra en el RER y es clave para el posterior procesamiento de oligosacáridos de tipo simple a complejo en el aparato de Golgi (Tropea, 1990).

48 horas post infección (hpi), se confirmó el crecimiento de virus mediante ensayos de hemaglutinación (descrito en 4.2.2.d) y posteriormente, se centrifugaron los 48 mL de sobrenadante para clarificarlos de residuos celulares y se dividieron en 2 alícuotas. 36 mL fueron concentrados mediante ultra-centrifugación a 24.000 rpm y 4°C durante 2 hrs en colchón de sacarosa al 30% (Merck). El pellet obtenido fue resuspendido en 100 μ L de solución tampón TNE ([Tris-HCl pH 7.4 50 mM, EDTA 0.1 mM (Calbiochem)], NaCl 100 mM (Millipore)). Los 12 mL restantes se alícuotaron en criotubos y estos se almacenaron a -80°C hasta su uso.



b) Secuenciación y confirmación de sitios de N-glicosilación en variantes de HA:

Se tomaron 200 µL de virus en sobrenadante y se utilizaron para extraer ARN a través del kit High Pure Viral Nucleic Acid (Roche) siguiendo el protocolo del fabricante. Luego, se retro-transcribió el ARN viral y se amplificó el segmento HA utilizando el kit SuperScript III One-Step RT-PCR (Invitrogen). Se utilizaron las siguientes condiciones y ciclos de amplificación, siguiendo las recomendaciones del fabricante:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (segs)	N° de Ciclos
Síntesis de ADN complementario	55	120	1
	42	2700 (45 mins)	
	94	120	
Denaturación	94	30	30
Hibridación	56	30	
Extensión	68	180	
Extensión final	68	600	1

Para confirmar la identidad de las secuencias y descartar la introducción de mutaciones adicionales en cada HA, el producto de RT-PCR obtenido fue enviado a secuenciar por Sanger a la empresa Macrogen (Estados Unidos). Las secuencias aminoacídicas de cada variante de HA fueron alineadas y analizadas a través de las herramientas del programa DNASTAR Lasergene v11.

c) Determinación de título viral mediante ensayo de placas:

Se expresó el título viral como “unidades formadoras de placas por mL” (UFP/mL), siguiendo el protocolo establecido para virus Influenza (Cottey *et al.*, 2001). Brevemente, se realizó un protocolo de infección como se describió en la sección 4.2.2.a) pero con pequeñas modificaciones. (i) Se realizaron diluciones de 1:10³ hasta 1:10⁸ de cada virus en PBS suplementado con Albúmina bovina 0,21% (MP Biomedicals), Penicilina/Estreptomina 1X (Gibco) y solución de Calcio/Magnesio 1X (Millipore). (ii) Al medio de infección se agregó como agente solidificante agar purificado al 2% (OXOID) y a las 48 hpi las células se fijaron agregando 0,5 – 1 mL de formaldehído al 4%, pH 6,9



(Millipore) durante al menos 1 hr a T° ambiente. Posteriormente se retiró el medio solidificado y se tiñeron los pocillos con solución de cristal violeta al 0,5% (Millipore). Los pocillos fueron lavados con agua del grifo y se calculó el título viral según la fórmula:

$$\text{UFP/mL} = \frac{\text{Promedio N}^\circ \text{ de placas}}{\text{Factor de dilución} * \text{Inóculo (vol)}} ; \text{ Donde el factor de dilución corresponde}$$

a la dilución del pocillo donde se contaron las placas y el inóculo son los 200 μL usados en la infección.

d) Determinación de título de unidades de hemaglutinación (UHA):

El ensayo de hemaglutinación se basa en la capacidad de HA del VIA de unirse a glóbulos rojos. En un pocillo de fondo cónico, una solución de glóbulos rojos precipita, formándose un punto rojo en el fondo (Figura 14A). Cuando el VIA se adiciona a la solución, la HA se une a los ácidos siálicos de los receptores en los glóbulos rojos y forma un entramado que se mantiene en suspensión, lo que evita que estos precipiten. Este proceso es llamado “hemaglutinación” (Cottey *et al.*, 2001).

En placas de 96 pocillos de fondo cónico (Greiner bio-one) se agregaron 100 μL de cada virus en la primera columna y 50 μL de PBS 1X en el resto de las columnas. Se realizó una dilución seriada 1:1 de cada virus. Luego, se preparó una solución de glóbulos rojos de pavo al 0,5% (ISP) en PBS, de la cual se agregaron 50 μL a todos los pocillos de la placa. Esta mezcla fue homogeneizada pipeteando 5 veces, desde la dilución más alta a la más baja. La mezcla se incubó 35 mins a 4°C y posteriormente se observó la actividad de hemaglutinación, definiendo como unidades de hemaglutinación (UHA) el valor recíproco de la dilución más alta que permitió observar actividad de hemaglutinación (Figura 14B). Este ensayo también se utilizó para evaluar la avidéz de cada variante de HA por su receptor en glóbulos rojos. Para este fin, el ensayo se realizó considerando un inóculo inicial de 2.000.000 de UFP en la primera columna de la placa de 96 pocillos.

e) Caracterización de HA mediante WB:

Utilizando los virus concentrados, crecidos en ausencia o presencia de kifunensina, se determinó inicialmente la concentración de proteínas totales a través del kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific). Luego, se utilizaron 10 o 15 μg de proteínas



totales según muestras con N-glicosilaciones del tipo complejas o simples, respectivamente. Las muestras fueron denaturadas y cargadas siguiendo el mismo protocolo para WB descrito en 4.2.1.f).

f) Inmunización de ratones con VIA variantes en HA y con N-glicosilaciones del tipo simple o complejas:

Se inmunizaron ratones para evaluar la antigenicidad de HA con diferentes posiciones de sus sitios de N-glicosilación en la cabeza globular. Además, se estudió el efecto relacionado al tipo de N-glicosilaciones, ya sea simples o complejas. Inicialmente, se inactivaron 150 µg de cada virus con solución de formaldehído al 4%, pH 6,9 en un volumen final de 150 µL. Estos virus inactivos fueron utilizados para inmunizar 5 ratones hembras C57BL/6, de 6 semanas de edad, por virus. Este experimento fue realizado en colaboración con la Escuela de Medicina de Mount Sinaí (Estados Unidos). A cada ratón se le aplicó una inyección intraperitoneal con 15 µg de virus en conjunto con adyuvante incompleto de Freund. Al día 28, se estimuló nuevamente la respuesta inmune, repitiendo la inyección a cada ratón. El día 35 se extrajo sangre y se centrifugó para separar los glóbulos rojos del suero. Como grupo control se inmunizaron ratones con PBS. Los experimentos con animales se realizaron conforme a las reglas de ética y bienestar animal establecidas en un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de la Escuela de Medicina en Mount Sinaí.

g) Medición de anticuerpos en suero contra proteínas del VIA a través de ELISA:

En colaboración con la Escuela de Medicina de Mount Sinaí, se determinó mediante ELISA la cantidad de anticuerpos contra el tallo de HA y la proteína viral NP, presentes en el suero de cada ratón inmunizado. Se utilizaron placas de ELISA a las que se adosaron en su superficie la proteína recombinante NP (rNP) o la proteína de HA quimérica compuesta por el dominio de la cabeza de H6 (cepa A/Mallard/Sweden/81/02, H6N4) y el dominio del tallo de H1 (cepa A/California/04/09, H1N1), abreviada como cH6/1 (Jacobsen *et al.*, 2017). Se adicionaron en la primera columna de las placas una muestra de suero diluida 1:100 y se realizaron diluciones seriadas 1:1 del suero. Las



placas fueron lavadas e incubadas con anticuerpo secundario α -IgG de ratón-HRP para finalmente medir absorbancia a una longitud de onda de 490 en lector de placas.

h) Inactivación de sueros mediante tratamiento con tripsina, calor y KIO₄:

Este procedimiento tiene como objetivo remover inhibidores de hemaglutinación no específicos de muestras de suero previo a realizar el ensayo de inhibición de hemaglutinación. Para esto, se mezcló una alícuota de 100 μ L de suero con 50 μ L de Tripsina-TPCK 8 mg/mL y se incubó en un baño termo-regulador a 56°C durante 30 mins. Posteriormente, se adicionaron 300 μ L de (meta)peroydato de potasio 0.011 M [(KIO₄) Sigma-Aldrich] y se incubó durante 15 mins a T° ambiente. Luego, se agregaron 300 μ L de solución de glicerol (Calbiochem) al 1% en PBS y se volvió a realizar una incubación de 15 mins a T° ambiente. Finalmente, se añadieron 250 μ L de una solución de PBS al 85% en agua destilada y se almacenó el suero inactivo a -20°C hasta su uso. Posterior al tratamiento, cada muestra de suero quedó en una dilución de 1:10.

i) Determinación de título de unidades de inhibición de hemaglutinación (UIH):

Se evaluó la capacidad de inhibición de los sueros inducidos por los virus con variantes de HA, evaluando también el efecto de la inmunización con virus con N-glicosilaciones del tipo simples o complejas. Este protocolo sigue el mismo principio del ensayo de hemaglutinación mencionado en 4.2.2.d) (Cotley *et al.*, 2001).

Inicialmente, se determinó las UHA de cada uno de los 10 virus y se diluyeron hasta UHA = 8 para cada uno. En placas de 96 pocillos de fondo cónico, se agregó 50 μ L de cada muestra de suero inactivo en la primera columna, 25 μ L de PBS entre las columnas 2 - 11 y 50 μ L de PBS en la última columna (control negativo). Se realizó una dilución seriada 1:1 del suero inactivo y luego se adicionaron 25 μ L del respectivo virus en todos los pocillos, salvo los de la última columna. Cada placa fue incubada 35 mins a 4°C. Se preparó una solución de glóbulos rojos de pavo al 0,5% y se adicionaron 50 μ L de esta a todos los pocillos de la placa. La mezcla se incubó 35 mins a 4°C y finalmente se determinó la inhibición de la actividad de hemaglutinación mediada por cada suero. Se definió como unidades de inhibición de hemaglutinación (UIH) el valor recíproco de la dilución más alta que permitió observar inhibición de la



actividad de HA (Figura 14C). Se evaluó las UIH de cada antisuero contra su variante homóloga y para los ensayos cruzados (cada antisuero contra las variantes no homólogas) se utilizó un único antisuero por variante con 640 UIH contra su virus homólogo en triplicado. Este ensayo se realizó contra los grupos de variantes de virus con N-glicosilaciones del tipo simples o complejas.

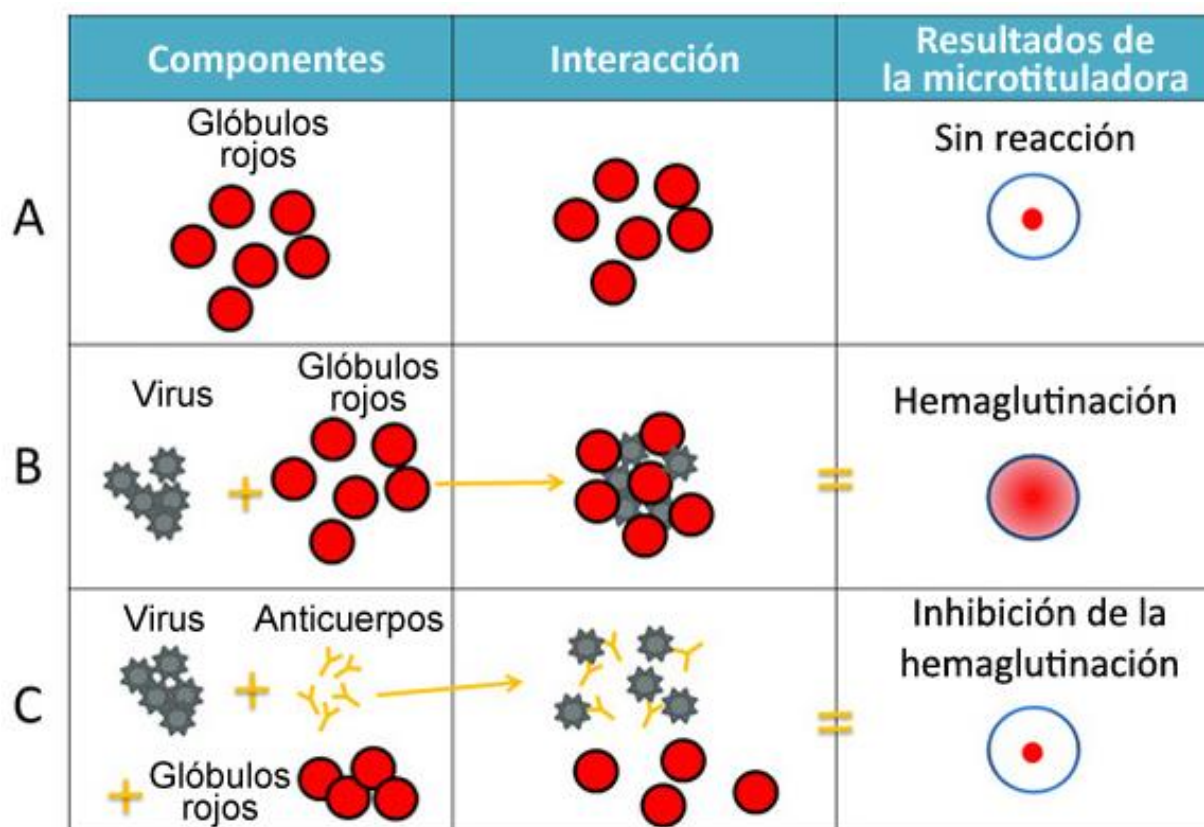


Figura 14. Ensayos de hemaglutinación e inhibición de hemaglutinación.

A. Una solución de glóbulos rojos en ausencia de VIA precipita en un recipiente de fondo cónico. **B.** Al agregar VIA, a través de HA, se reconoce el receptor de ácidos siálicos presente en los glóbulos rojos y se forma un entramado virus-glóbulos que se mantiene en suspensión, evento denominado hemaglutinación. **C.** La adición de anticuerpos contra HA bloquean la interacción entre el VIA y su receptor, evitando la formación del entramado y causando la precipitación de los glóbulos rojos de igual manera que en A. Imagen adaptada del sitio web del CDC > Influenza (flu).



j) Análisis estadístico:

Los valores de los datos de UHA relacionados a avidéz, UIH y absorbancias obtenidas mediante ELISA se analizaron estadísticamente con el método de análisis de la varianza (ANOVA). Se utilizó one-way ANOVA en aquellos experimentos donde se evaluó solo posición o solo tipo de glicosilaciones y two-way ANOVA cuando se evaluaron ambos en conjunto. Como post-test se analizó los datos mediante el test de comparación múltiple Dunnett en los análisis one-way ANOVA, evaluando cada grupo contra el grupo rWT como control. Para los análisis realizados mediante two-way ANOVA, se utilizó el post-test de Sidak, evaluando el promedio de cada columna graficada contra las demás. Los asteriscos (*) en los gráficos indican diferencias significativas entre datos seleccionados según el valor P, donde * indica un valor $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$. Todos los gráficos y análisis fueron realizados en el programa GraphPad Prism v6.01.

k) Modelamiento estructural:

Las representaciones estructurales de cada variante de HA se realizaron utilizando el programa PyMOL v1.7.4 para Windows y como modelo la estructura cristalizada de HA de la cepa A/California/04/2009 (Entrada PDB: 3LZG) (Xu *et al.*, 2010). Se mostró el monómero de HA a través de la opción “Surface” y para el caso del trímero de HA, los dos monómeros restantes fueron representados a través de la opción “Mesh”.



4.2.3 Determinar los epítomos reconocidos por los anticuerpos producidos contra la variante del VIA N-glicosilada en la posición 144 de HA.

Con el fin de identificar los aminoácidos reconocidos por el suero producido contra la variante HA 144, se estableció un protocolo para detectar mutantes de escape de neutralización basándose en trabajos relacionados (Das *et al.*, 2011; Manicassamy *et al.*, 2010; Tsuchiya *et al.*, 2002). Se estandarizó el protocolo con el virus rWT determinando tanto el título viral como la concentración de suero óptimos para poder aislar virus mutantes de escape en presencia de anticuerpos. Los virus que se lograron aislar fueron evaluados en su capacidad de evadir los anticuerpos presentes en el suero anti-HA rWT y análisis de secuencia futuros permitirán determinar el o los aminoácidos reconocidos por estos anticuerpos producidos contra HA y que sean responsables del escape de neutralización (Figura 15).

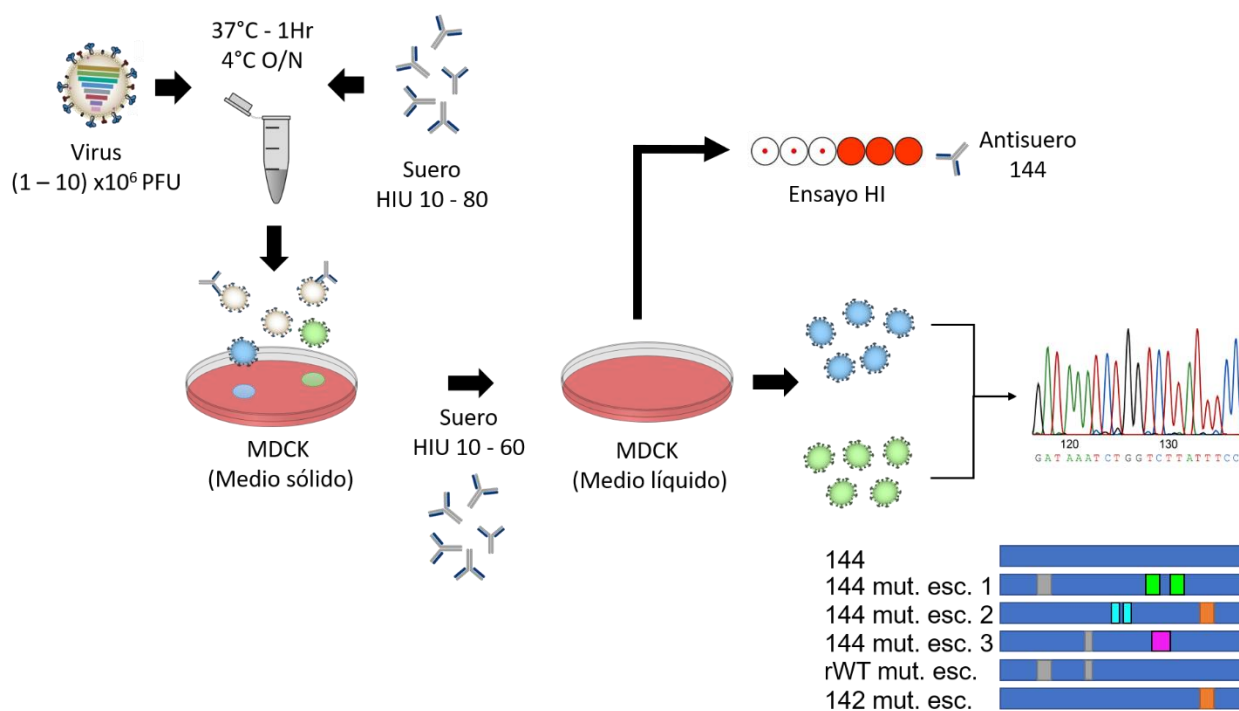


Figura 15. Esquema resumen para la generación de mutantes de escape.

Protocolo ilustrado de la sección 4.2.3. Establecimiento de condiciones experimentales para la obtención de virus mutantes capaces de evadir el reconocimiento de anticuerpos presentes en suero.



a) Estandarización de concentración de virus y suero adecuadas para aislar placas generadas por mutantes de escape:

Con el fin de aislar virus mutantes de escape de neutralización, se utilizó un protocolo similar al descrito para determinar título viral mediante ensayo de placas, explicado con anterioridad (sección 4.2.2.c), pero con algunas modificaciones. (i) Se realizó una incubación previa de virus más suero inactivo durante 1 hr a 37°C y luego a 4°C durante una noche; (ii) 48 hpi, antes de fijar las placas y teñir células, con el uso de una micropipeta se tomó muestras de las placas identificadas a ojo desnudo y cada una fue resuspendida en 200 µL de medio de infección libre de tripsina-TPCK.

Se estandarizó la concentración de virus y suero óptimas para obtener placas con la variante del virus HA rWT y su antisuero respectivo. Se probaron las concentraciones 1×10^6 , 5×10^6 y 10×10^6 UFP y el suero inactivado a un título desde 10 a 80 UIH. Las diluciones se realizaron en medio de infección libre de tripsina-TPCK y se ajustaron a un volumen final de 200 µL.

b) Obtención de virus mutantes de escape de neutralización:

A partir de las placas aisladas, se realizó el protocolo de infección (sección 4.2.2.a) con una modificación. Previo a la infección, las placas resuspendidas fueron mezcladas nuevamente con su antisuero inactivo, evaluando diluciones desde 0 a 60 UIH y se incubaron de la misma manera que se mencionó en la sección 4.2.3.a). 48 hpi, se determinó el crecimiento de virus mediante el ensayo de hemaglutinación (sección 4.2.2.d). Aquellos sobrenadantes que dieron UHA fueron clarificados de restos celulares por centrifugación, alicuotados en criotubos y almacenados a -20°C hasta su uso.

c) Confirmación de mutantes de escape mediante ensayo de inhibición de HA:

Aquellos virus que lograron ser aislados de placas y crecidos en presencia de suero se utilizaron en un ensayo de inhibición de HA. El protocolo utilizado fue el mismo mencionado en la sección 4.2.2.i). Se añadió al ensayo la variante rWT (sin mutaciones) como control.



d) Protocolo alternativo de mutantes de escape de neutralización:

Basándose en otra metodología descrita en bibliografía (Leon *et al.*, 2017), se probó una segunda alternativa para estandarizar el protocolo de virus mutantes de escape.

De igual manera, se incubó 1×10^6 UFP de virus rWT con su antisuero inactivo diluido 1:5, 1:10, 1:15 y 1:20. La mezcla de virus y suero se utilizó para realizar un protocolo de infección tal como se describió en la sección 4.2.2.a). 48 hpi, se determinó el crecimiento viral a través del ensayo de hemaglutinación, descrito en la sección 4.2.2.d). Aquellos sobrenadantes que dieron actividad positiva se clarificaron de restos celulares por centrifugación y se confirmaron como mutantes de escape a través del ensayo de inhibición de HA, descrito en la sección 4.2.3.c).



5. RESULTADOS

5.1 Los constructos diseñados expresan sHA en estado monomérico o agregados de alto peso molecular.

Con el fin de determinar la composición del oligosacárido unido en el sitio de N-glicosilación 144 de HA, se buscó determinar el perfil de glicosilaciones de esta proteína y otras variantes con sitios de N-glicosilación cercanos. Para esto, se expresó de manera soluble la proteína HA, clonando la secuencia de la cepa A/Netherlands/602/09 (rWT) y sus variantes N-glicosiladas adicionalmente en las posiciones 142, 144, 172 y 144-172. Los partidores diseñados (Tabla 1) se utilizaron para poder reemplazar el dominio transmembrana de la secuencia de cada variante de HA por un dominio de trimerización Foldon T4 y una cola de poli-histidina para su posterior purificación. Se observó una diferencia en la migración de las bandas que correspondían a la secuencia de ADN del ectodominio de HA (Rx 1) o la secuencia completa de sHA (Rx 6) (Figura 16A), consecuente con lo esperado según la cantidad de nucleótidos adicionales debido a la adición del dominio Foldon T4 y la cola de poli-histidina (99 nts). El análisis de la secuencia aminoacídica de cada sHA confirmó la identidad de secuencia de las proteínas y la presencia de los sitios de N-glicosilación insertados específicamente en estas variantes. Como excepción, solo la variante 172 presentó una mutación inesperada (K60E).

Las sHA clonadas en el vector pCAGGS fueron transfectadas en células HEK293T para poder expresar sHA recombinantes secretadas en el sobrenadante y 48 hrs post-transfección se purificaron las variante a través de perlas adosadas con níquel. La pureza de las proteínas fue corroborada mediante gel teñido con azul de Coomassie. En la fracción de elución, la banda de mayor intensidad observada mostró un PM consistente con el monómero de sHA (aproximadamente 70 KDa) (Maciola *et al.*, 2017; Hutter *et al.*, 2013; Reading *et al.*, 2009). También se advirtió la presencia de bandas inesperadas de diferentes PMs, sugiriendo que se purificaron proteínas no específicas (Figura 16B). Al analizar las variantes de sHA mediante WB, se pudo determinar que las bandas de las variantes 142, 144, 172 y 144-172 migraron menos que la variante rWT, indicando que estos sitios fueron efectivamente glicosilados durante su expresión en células HEK293T.

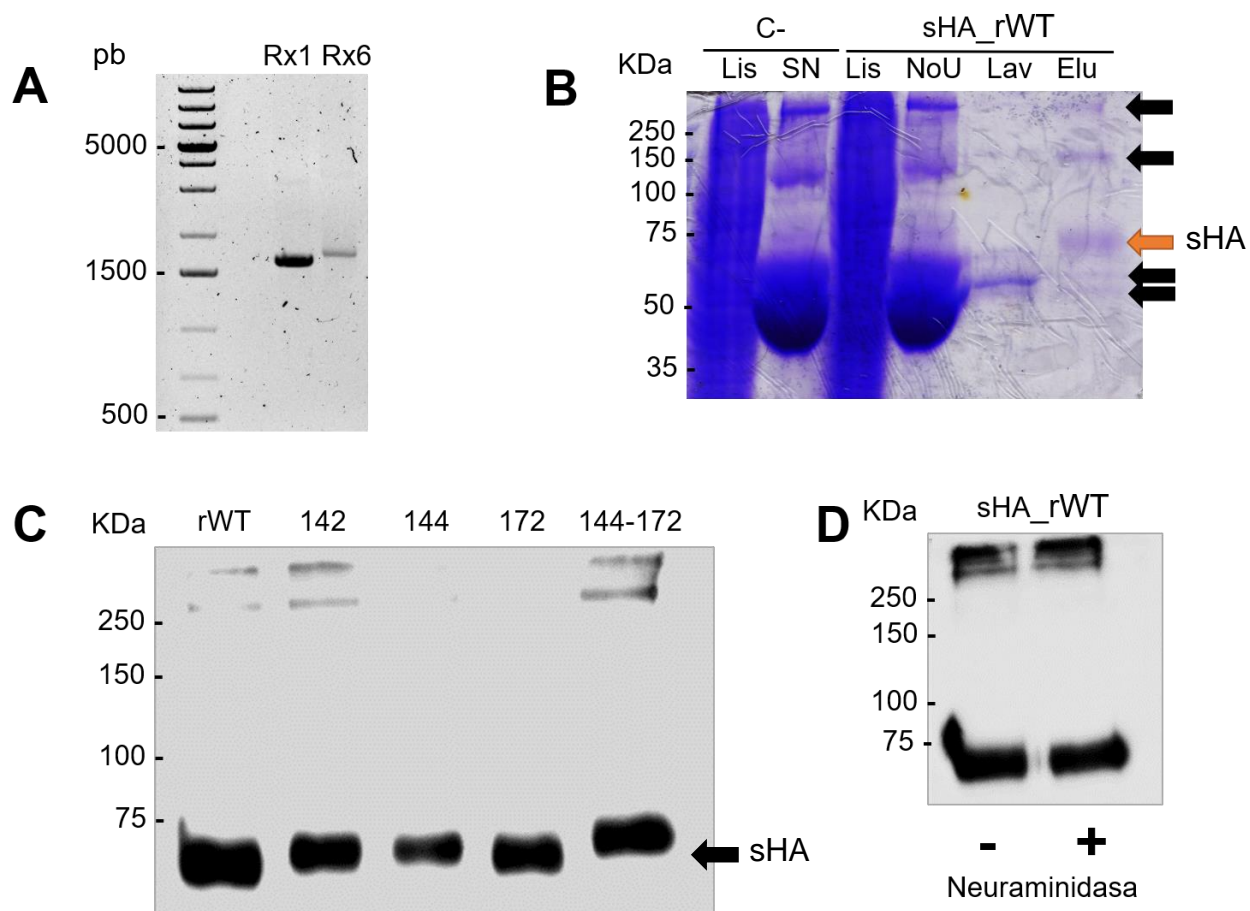


Figura 16. Clonamiento, purificación y expresión de variantes de sHA N-glicosiladas.

A. Gel de agarosa posterior a la resolución de productos de PCR purificados. Se muestran las bandas correspondientes a las secuencias de ADN que codifican el ectodominio de HA (Rx1) y la sHA completa (Rx6). **B.** Gel teñido con azul de Coomassie. Fracciones obtenidas durante la purificación del sobrenadante de la variante sHA rWT. Se muestran los lisados (Lis) de células HEK293T con y sin transfectar (sHA_rWT y C-, respectivamente); el sobrenadante de células sin transfectar (SN) y la fracción no unida (NoU) a las perlas de Níquel; la fracción de lavado (Lav) y elución (Elu). Se indica con flechas las bandas observadas en la fracción de elución, encontrándose en naranja aquella con un PM correspondiente al monómero de sHA. **C.** Western Blot de variantes de sHA purificadas. Se indica con una flecha negra el PM del monómero de sHA. **D.** Western Blot de muestra de sHA rWT con (-) y sin (+) tratamiento con NA exógena de *Vibrio cholerae*.



Adicional a las bandas correspondientes al PM del monómero de HA, en la parte superior del gel se pudo observar una señal que no logró ser resuelta (PM sobre los 250 KDa), lo que podría ser la formación de agregados de sHA de alto PM (Figura 16C). Dado que las sHA son expresadas en ausencia de NA, la cual remueve los ácidos siálicos tanto de las células hospederas como de HA, favoreciendo su disociación (Shaw & Palese, 2013), quisimos evaluar si los agregados de sHA se debían al reconocimiento de ácidos siálicos entre sHAs. Por tanto, se adicionó NA exógena de *Vibrio cholerae* a una alícuota de sHA rWT purificada y se repitió el protocolo de WB. Sin embargo, el tratamiento con neuraminidasa no fue efectivo en la disociación de los agregados de sHA (Figura 16D).

Los monómeros de sHA se utilizarán para determinar el perfil de N-glicosilaciones para cada variante mediante CGE-LIF. Comparando los perfiles de cada variante, y sustrayendo la información relativa al perfil de sHA rWT, se podrá aproximar las azúcares simples que componen el oligosacárido específico en el sitio 144 y posiciones vecinas. Esto será realizado como una continuación de este trabajo, en colaboración con el el instituto MaxPlanck para la dinámica de los sistemas técnicos complejos (Magdeburgo, Alemania).

5.2 El sitio de N-glicosilación 144 en HA permite el ensamble de un oligosacárido más grande en comparación con los sitios 142 o 172.

Para entender la relevancia del VIA N-glicosilado en la posición 144 de HA con respecto a la respuesta humoral producida en el hospedero, se utilizaron virus recombinantes de la cepa A/Netherlands/602/09 con variaciones en sus sitios de N-glicosilación en HA (rWT, 142, 144, 172 y 144-172). Del mismo modo que para las variantes de sHA, se corroboró mediante WB que los sitios de N-glicosilación de cada variante se encontraran ocupados por oligosacáridos. Todos los virus recombinantes con sitios adicionales de N-glicosilación migraron menos en comparación con la HA del virus rWT. Interesantemente, además se observó que el virus N-glicosilado en el sitio 144 tenía un PM mayor a los otros virus con un solo sitio de N-glicosilación adicional 142 y 172 (72.3 versus 70.3 y 70.9 KDa, respectivamente; Figura 17A). Al realizar el mismo análisis en las sHA se observó el mismo patrón de PM entre las variantes de sHA 144, 142 y 172 (65.5 versus 64.8 y 64.2 KDa, respectivamente; Figura 17B). Estos resultados sugieren



que este aumento de PM en la HA 144 se debe a que este sitio permitiría el ensamble de un oligosacárido más grande en comparación con los sitios de N-glicosilación 142 o 172.

Como control para corroborar que las variantes de virus recombinantes se encontraban N-glicosiladas, los oligosacáridos fueron escindidos mediante el uso de PNGasa F y analizados mediante WB contra HA. Se observó una diferencia en la migración de las bandas al ser tratadas con PNGasa F, confirmando que los sitios de N-glicosilación en los virus recombinantes se encuentran efectivamente con oligosacáridos unidos en HA (Datos no mostrados).

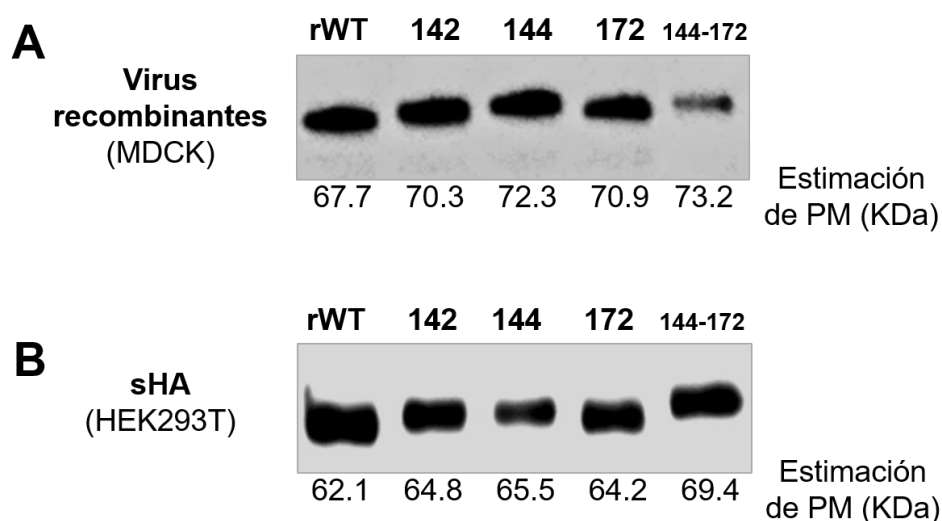


Figura 17. Determinación de PM en HA con diferentes sitios de N-glicosilación.

Western blot de variantes de HA según sus sitios de N-glicosilación. Se muestra el PM estimado de cada HA, calculado a través del programa de fotocaptura UVitec Alliance 2.7. **A.** HA de virus recombinantes crecidos en células MDCK. **B.** sHA expresadas en células HEK293T.

5.3 El sitio de N-glicosilación 144 mantiene su característica de un peso molecular mayor al tener unido un oligosacárido del tipo simple.

Con el fin de evaluar la relevancia del tipo de N-glicosilación en la modulación de la respuesta humoral producida por la variante de HA 144, se creció los VIA rWT, 142, 144, 172 y 144-172 en presencia de kifunensina, inhibidor de la α -manosidasa I, impidiendo la maduración de los oligosacáridos en el aparato de Golgi. Al analizar mediante WB



confirmamos que la adición de kifunensina fue suficiente para generar variantes de HA con una migración más rápida en comparación con su contraparte respectiva sin la adición de kifunensina (Figura 18). Este resultado fue notado en las bandas correspondientes a los monómeros, dímeros y trímeros de HA, indicando la producción de virus recombinantes con N-glicosilaciones del tipo simple. Interesantemente el virus con N-glicosilaciones simples en la posición 144 volvió a mostrar un PM mayor en comparación con los sitios 142 y 172 (63.6 versus 62.9 y 61.7 KDa, respectivamente). Este resultado apoya la hipótesis de que estructuralmente el sitio 144 permite el ensamble de un oligosacárido más grande en HA en comparación a otros sitios de N-glicosilación cercanos.

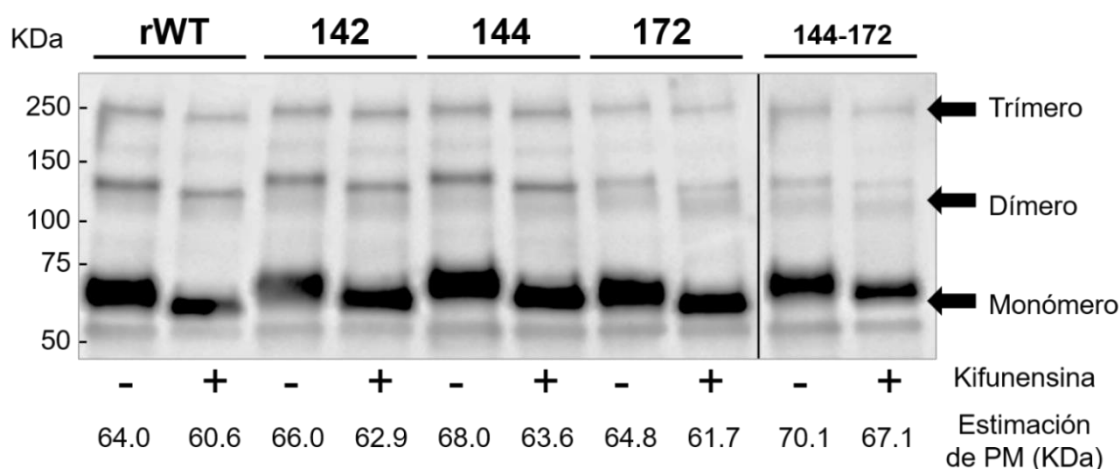


Figura 18. Caracterización de HAs de virus recombinantes con N-glicosilaciones del tipo simples o complejas.

WB de variantes de HA del VIA con N-glicosilaciones del tipo simples o complejas según se haya adicionado (+) o no (-) kifunensina 5 μ M, respectivamente. Las flechas indican las bandas respectivas al PM del monómero, dímero y trímero de HA. En la parte inferior se detalla el peso molecular estimado del monómero HA, calculado a través del programa de fotocaptura UVitec Alliance 2.7.

5.4 El tipo de N-glicosilación afecta significativamente la avidéz del virus 144.

Dado al PM mayor de la variante HA 144 y su cercanía con el SUR, se determinó el efecto de este sitio de N-glicosilación en la avidéz por su receptor. Para esto, se analizó la avidéz de cada variante de VIA por su receptor, el ácido siálico, presente en glóbulos



rojos de pavo. El análisis por ANOVA indicó que hay una diferencia significativa en la avidéz según virus con diferentes sitios de N-glicosilación (datos no mostrados) aunque el test de comparación múltiple no indicó variaciones significativas entre las variantes con respecto al virus rWT. Aún así, se observó una tendencia que sugiere que los sitios de N-glicosilación 144 o 172 afectaron negativamente la avidéz, mientras que los sitios 142 y 144-172 resultaron en afinidades similares a la obtenida con el virus rWT (Figura 19A; Material Suplementario 1). Luego, se evaluó la avidéz de cada variante al reducir la longitud de la cadena de oligosacáridos unidos en los sitios de N-glicosilación, utilizando las variantes crecidas en presencia de kifunensina. Se observó una tendencia al aumento de la avidéz de cada variante por su receptor, siendo esta estadísticamente significativa

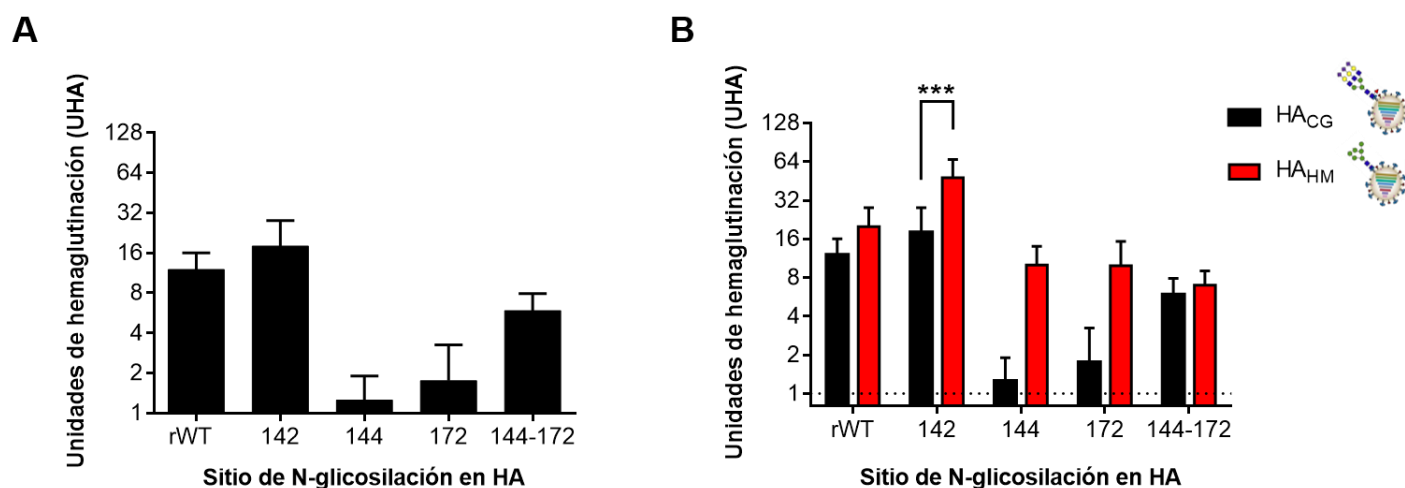


Figura 19. Efecto de los sitios y tipos de N-glicosilación en la avidéz de HA por su receptor en glóbulos rojos.

Ensayos de avidéz medidos a través de UHA. Se realizaron ensayos de hemaglutinación con una cantidad inicial de 2×10^6 UFP por variante de VIA. **A.** Ensayo utilizando las variantes de VIA con N-glicosilaciones del tipo complejas. Se indica la significancia estadística con respecto al virus rWT. **B.** Ensayo utilizando las variantes de VIA con N-glicosilaciones del tipo simple. Se indica la significancia estadística entre una misma variante con diferentes tipos de N-glicosilaciones. Las columnas representan los promedios y sus respectivas desviaciones estándar de 4 réplicas experimentales. * significa valor $p < 0.05$. Se describe como HA_{CG} a las variantes de virus con N-glicosilaciones del tipo complejas en HA y HA_{HM} a aquellas con N-glicosilaciones del tipo simple.



para la variante HA 142 y observándose que las variantes 144 y 172 con N-glicosilaciones del tipo simple resultaron en valores similares a los de la variante rWT (Figura 19B; Material suplementario 1). Estos resultados sugieren que tanto la posición como el tipo de N-glicosilación afectan en la avidéz del VIA por su receptor en glóbulos rojos y apoyan la hipótesis de un oligosacárido grande unido en la posición 144 de HA, el cual debido a su cercanía al SUR afecta estéricamente la avidéz del VIA por su receptor.

5.5 La inmunización con variantes de VIA con N-glicosilaciones del tipo simple disminuye la absorbancia de anticuerpos dirigidos contra el tallo de HA o NP.

Posteriormente, se estudió las diferencias en la respuesta humoral relacionadas al tipo y sitios de N-glicosilación en la HA del VIA. Se evaluaron los sueros obtenidos al inmunizar ratones C57BL/6 usando cada variante del VIA con diferentes tipos y sitios de N-glicosilación (rWT, 142, 144, 172 y 144-172, con o sin kifunensina). A partir de los sueros obtenidos, se determinó la cantidad de anticuerpos dirigidos al tallo de HA o la proteína NP mediante ELISA. En general, se observó que los sueros producidos por virus con N-glicosilaciones del tipo simple (denominados HA_{HM}) contenían una cantidad de anticuerpos significativamente menor en comparación con la cantidad inducida al inmunizar con virus con N-glicosilaciones complejas (denominados HA_{CG}), ya sea contra el tallo de HA (Figura 20A), como contra la proteína NP (Figura 20B). Así mismo, la cantidad de anticuerpos en suero contra el tallo de HA fue mayor que la cantidad contra NP, ya sea al inmunizar con HA_{HM} o HA_{CG}.

Al analizar los datos obtenidos de manera individual, para cada variante de VIA, se observó una tendencia a la disminución de anticuerpos inducidos al inmunizar con las variantes HA_{HM}. Estos valores fueron significativamente menores para las variantes 142 y 144-172 en el caso de HA (Figura 20C) y para la variante 144-172 en el caso de NP (Figura 20D). Interesantemente, se pudo observar que la variante 144 mostró una tendencia inversa a las demás contra ambas proteínas, es decir, los sueros producidos contra el virus HA_{HM} 144 mostraron una mayor cantidad de anticuerpos contra el tallo de HA y NP, siendo cantidades similares a las obtenidas con los sueros producidos con las variantes HA_{CG} rWT, 142, 172 o 144-172, sugiriendo que el oligosacárido más grande unido en la posición 144 también tiene un efecto en la cantidad de anticuerpos inducidos.

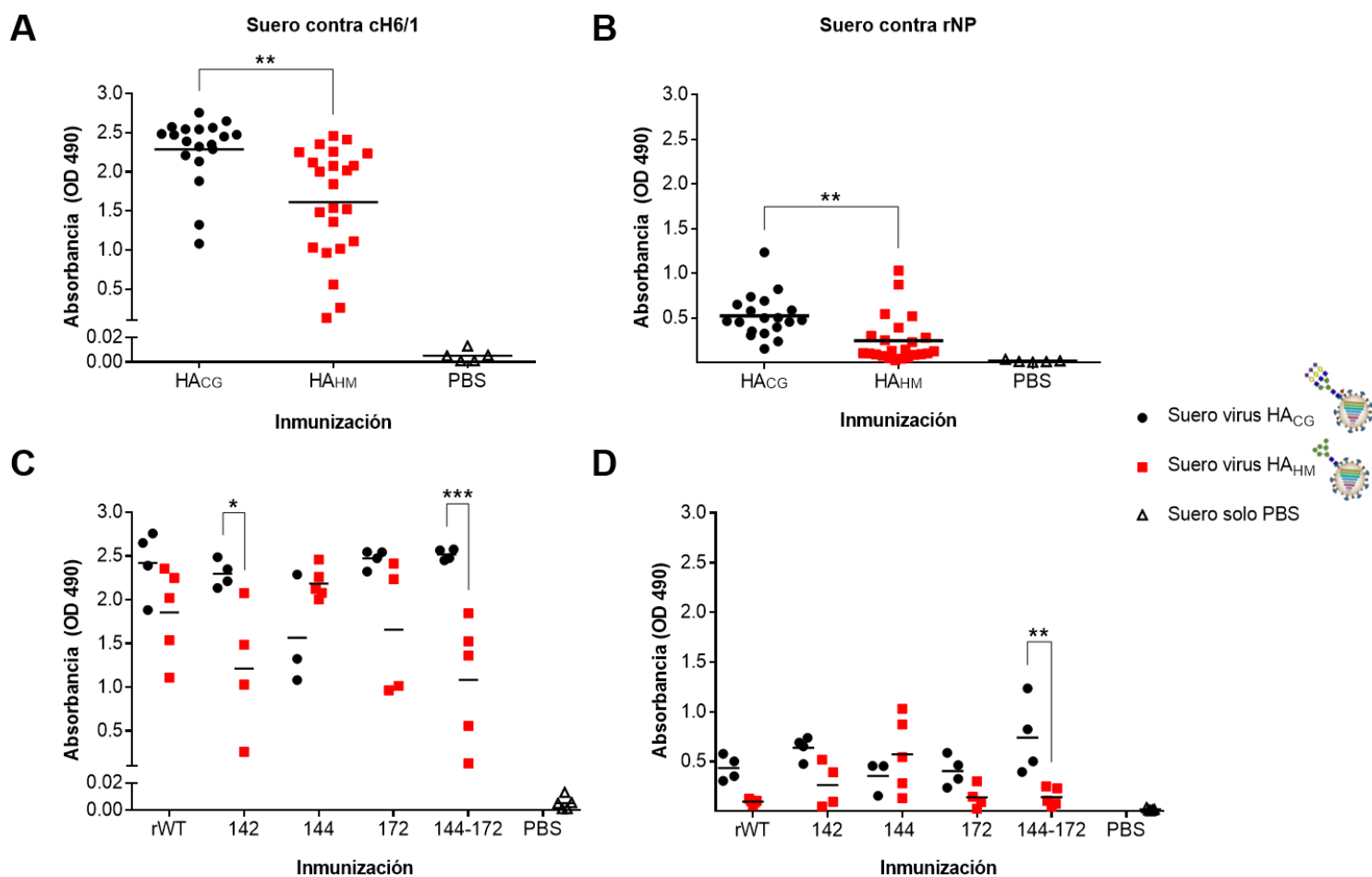


Figura 20. Absorbancia de anticuerpos producidos contra el tallo de HA o NP, al inmunizar ratones con las variantes N-glicosiladas del VIA.

Medición de anticuerpos presentes en suero mediante ELISA al inmunizar ratones con las variantes N-glicosiladas del VIA con o sin la adición de kifunensina (HA_{HM}; rojo y HA_{CG}; negro, respectivamente). **A,C** Muestran los sueros evaluados contra la proteína HA quimérica (cH6/1) y **B,D** contra la proteína recombinante NP. Se muestran las absorbancias obtenidas según el tipo de N-glicosilaciones en el inmunógeno, ya sea de manera grupal **A,B**; o individual por cada variante del VIA **C,D**. Cada punto representa el valor promedio del duplicado obtenido por suero de un ratón. Se indica la significancia estadística para los virus agrupados o por variante con diferentes tipos de N-glicosilación. * significa un valor $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ y *** $p < 0.0005$.



5.7 Los anticuerpos inducidos por una variante determinada inhiben de igual manera a virus HA_{CG} y HA_{HM}.

Utilizando por variante un antisuero con 640 UIH contra su virus homólogo o el título de UIH más alto posible, se determinó la protección cruzada conferida realizando ensayos de inhibición contra ambos grupos de virus HA_{CG} y HA_{HM}. De manera general, la inmunización con las variantes de virus HA_{CG} resultó en sueros con UIH más altas, con un promedio de 320 contra ambos grupos, mientras que la inmunización con las variantes HA_{HM} indujo sueros con una actividad inhibitoria significativamente menor, promediando 160 UIH contra ambos grupos (Figura 22A). Al analizar estos sueros separándolos por variante y contra un solo grupo de virus, ya sea HA_{CG} (Figura 22B) o HA_{HM} (Figura 22C), se obtuvo resultados similares al mencionado anteriormente, es decir, la inmunización con cualquier variante de virus HA_{CG} tendió a mayores UIH en comparación a las obtenidas con su contraparte HA_{HM}. Estos resultados sugieren que la inmunización con VIA con N-glicosilaciones complejas inducen una mejor respuesta humoral en el hospedero en comparación al VIA con N-glicosilaciones simples, pero estos anticuerpos inducidos inhiben de igual manera al VIA con diferentes tipos de N-glicosilaciones.

5.8 El sitio de N-glicosilación 144-172 en HA evade la respuesta policlonal contra las otras variantes de VIA e induce sueros con títulos de UIH altos.

Se determinó la capacidad de inhibición de cada suero obtenido, analizando el título de UIH cruzadas inducidas en un suero contra todas las variantes de VIA de manera individual. En el caso de los sueros obtenidos con las variantes HA_{CG} (Figura 23 A y C), se observó que la inmunización con la variante rWT indujo UIH altas solo contra su virus homólogo, mostrando UIH bajas contra cualquiera de las otras variantes (530 UIH versus 80 UIH). De manera contraria, la inmunización con cualquiera de las otras tres variantes (142, 144 y 144-172) indujo títulos de UIH altas contra el virus rWT (entre 850 y 530 UIH), sugiriendo que los anticuerpos presentes en los sueros se dirigen hacia los sitios antigénicos enmascarados por estos sitios de N-glicosilación adicionales. La inmunización con la variante 142 indujo un título de 530 UIH contra las variantes 142 y 144, y un título menor contra la variante 144-172 (210 UIH), mientras la variante 144 indujo 530 UIH contra su virus homólogo y UIH menores contra las variantes 142 y 144-

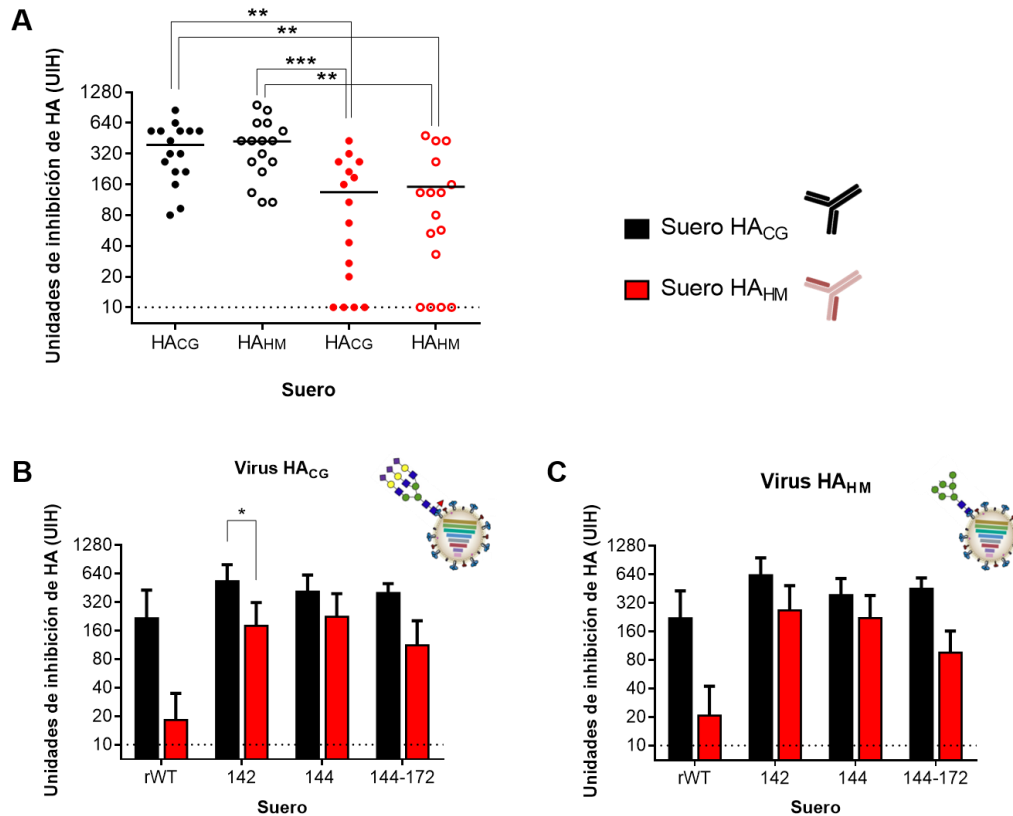


Figura 22. Títulos de inhibición cruzados de HA.

Ensayos de inhibición de hemaglutinación de cada suero inducido al inmunizar con virus HA_{CG} (negro) o HA_{HM} (rojo), los cuales fueron evaluados contra las variantes de VIA con N-glicosilaciones del tipo complejas (●/●) o simples (○/○). **A**. Vista general de cada suero contra todas las variantes, divididas según el tipo de N-glicosilaciones en el virus. **B y C**. Ensayos de inhibición analizados por variante. Se muestran las UIH obtenidas por cada suero contra el grupo de virus HA_{CG} (**B**) o HA_{HM} (**C**). Cada punto representa el promedio de UIH obtenidos para un suero contra cada variante de VIA. La línea en cada conjunto de datos indica el promedio de los datos graficados. Cada barra representa los promedios obtenidos para 3 réplicas experimentales. Las barras de error indican la desviación estándar del conjunto de datos. La línea punteada en la parte inferior señala el límite de detección del ensayo. Se indica significancia estadística según valores obtenidos entre virus con diferentes tipos de N-glicosilaciones. * Indica un valor $p < 0.05$, ** un valor $p < 0.005$ y *** un valor $p < 0.0005$. Se describe como HA_{CG} a las variantes de virus con N-glicosilaciones del tipo complejas en HA y HA_{HM} a aquellas con N-glicosilaciones del tipo simple.



172 (270 y 210 UIH, respectivamente). Estos resultados sugieren que la respuesta policlonal inducida al tener el sitio de N-glicosilación 142 en HA es más efectiva que al tener el sitio 144, y a su vez, que el sitio de N-glicosilación 172 es capaz de evadir parte de esta respuesta policlonal producida por ambas variantes. Finalmente, la inmunización con la variante 144-172 indujo un título de 430 UIH contra su virus homólogo y 320 UIH contra las variantes 142 y 144 (Material suplementario 2), indicando que la inmunización con la variante 144-172 indujo los títulos de UIH más altos contra las 4 variantes evaluadas en la presente tesis, sugiriendo que probablemente el sitio de N-glicosilación 172 tenga un rol importante en la modulación de la respuesta humoral. Los resultados observados al analizar los ensayos de inhibición con los sueros producidos con las variantes HA_{CG} fueron similares contra los grupos de virus HA_{CG} (Figura 23A) y HA_{HM} (Figura 23C).

Al analizar los títulos de UIH presentes en sueros al inmunizar con las variantes de virus HA_{HM} (Figura 23 B y D) todos los valores fueron menores, observándose una tendencia similar a la mencionada anteriormente con los sueros HA_{CG}. La inmunización con la variante rWT indujo un título de 40 UIH contra su virus homólogo y fue incapaz de inhibir a las variantes 142, 144 y 144-172 (<10 UIH), mientras que la inmunización con cualquiera de estas variantes indujo entre 210 y 430 UIH contra el virus rWT. El suero producido con la variante 142 indujo 480 UIH contra su virus homólogo y UIH bajas contra las variantes 144 y 144-172 (130 y 30 UIH, respectivamente), mientras que el suero 144 indujo 270 UIH contra su virus homólogo y 190 y 20 UIH contra las variantes 142 y 144-172, respectivamente. La inmunización con la variante de virus 144-172 HA_{HM} indujo 70 UIH contra su virus homólogo y 160 UIH contra la variante 144, mientras que no presentó actividad inhibitoria contra el virus 142 (<10 UIH), siendo esto último diferente a lo observado contra el virus 142 al inmunizar con el virus 144-172 HA_{CG}. Los resultados observados al analizar los ensayos de inhibición con los sueros producidos con las variantes de virus HA_{HM} fue similar contra los grupos de virus HA_{CG} (Figura 23B) y HA_{HM} (Figura 23D). Estos resultados reflejan que la inmunización con los virus HA_{HM} induce títulos de inhibición menores a los obtenidos al inmunizar con cada contraparte HA_{CG} (Material suplementario 2), y también indican que el tipo de N-glicosilación en el VIA no afecta en la amplitud de la respuesta humoral inducida en el hospedero.

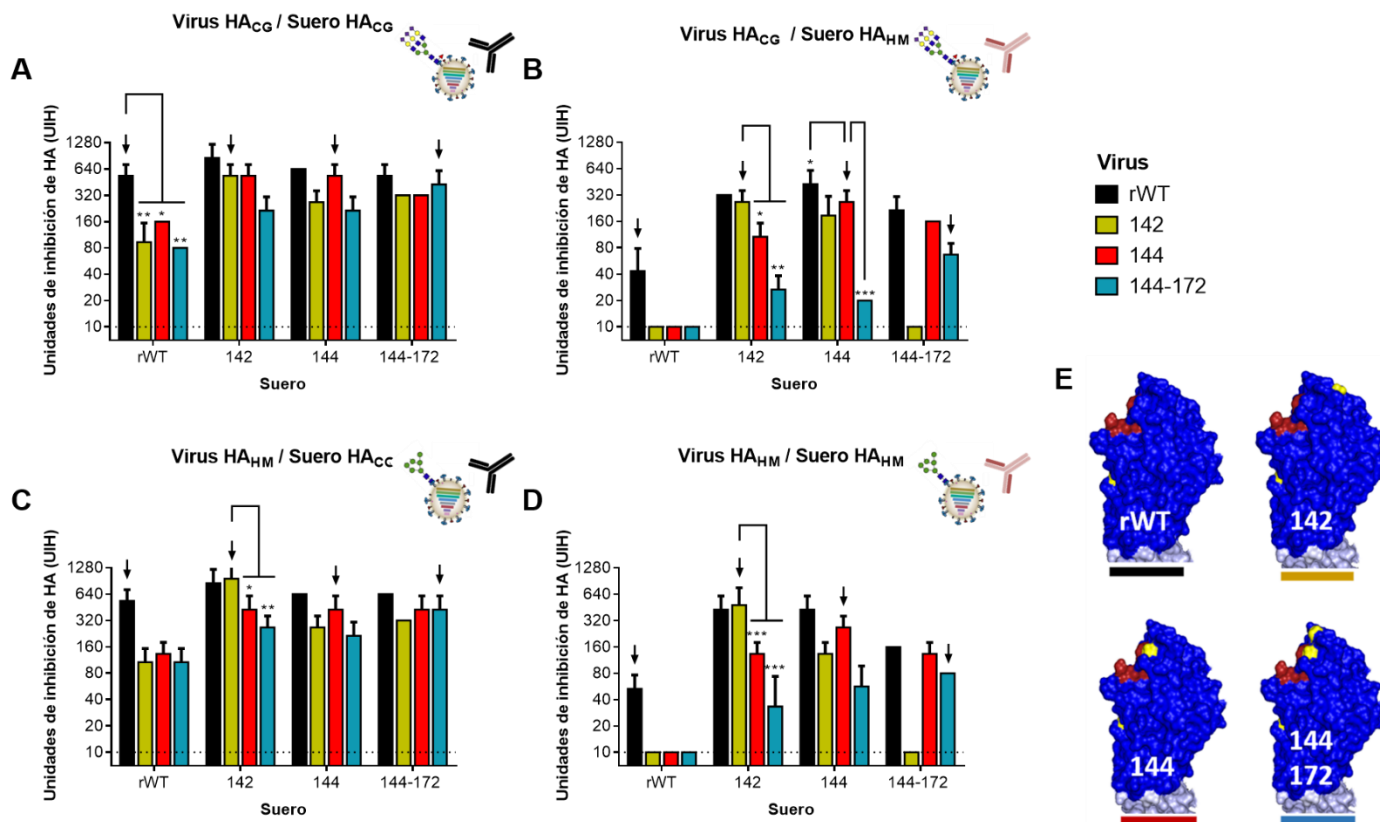


Figura 23. Títulos de inhibición determinados por cada suero contra cada variante de VIA.

Ensayos de inhibición de hemaglutinación utilizando el antisuero producido por cada variante de VIA, con N-glicosilaciones simples y complejas. Se muestran las UIH inducidas en sueros producidos con las variantes de virus HA_{CG} (**A y C**; anticuerpo negro) o HA_{HM} (**B y D**; anticuerpo rojo). Se analizaron las UIH de cada suero contra los grupos de virus HA_{CG} (**A,B**) y HA_{HM} (**C,D**). Se indica con una flecha el valor de UIH homólogo de cada virus contra su respectivo antisuero. Cada columna representa el promedio de 3 réplicas experimentales en conjunto con sus desviaciones estándar. Se indican cada variante de virus según el color de la columna: negro (rWT), amarillo (142), rojo (144) y celeste (144-172). En líneas punteadas se indica el valor mínimo de detección del ensayo. **E.** Representación estructural del dominio de la cabeza de HA de cada variante evaluada. En rojo se resalta el SUR y en amarillo los sitios de N-glicosilación de cada variante. En la parte inferior de cada estructura se encuentra el color respectivo a cada gráfico de barra. El modelamiento estructural se realizó a partir del archivo PDB: 3LZG.



5.9 1×10^6 UFP y 60 UIH son las condiciones óptimas para aislar placas mutantes de escape de VIA.

Con el fin de determinar los epítomos reconocidos por los anticuerpos presentes en suero al inmunizar con la variante 144, se estandarizaron las condiciones necesarias para poder aislar virus mutantes de escape de neutralización. Utilizando la variante rWT y su antisuero homólogo, se determinaron las concentraciones de virus y suero necesarias para poder obtener una cantidad de placas virales adecuada para aislar con mayores probabilidades un virus a causa de la evasión de anticuerpos. Inicialmente, se probaron inoculaciones con 1×10^6 , 5×10^6 y 10×10^6 UFP mezcladas con 10, 40 u 80 UIH de antisuero. Con estas mezclas de virus y antisuero se realizaron ensayos de placa, donde se observó que ninguna concentración de suero fue capaz de inhibir el crecimiento del inóculo con 10×10^6 UFP. Por otro lado, la mezcla del inóculo con 5×10^6 UFP y 80 UIH permitieron observar un alto número de placas, sugiriendo que probablemente estas fueron formadas por exceso de virus rWT y no por la evasión de los anticuerpos presentes en el suero. La inoculación con 1×10^6 UFP permitió la formación de un bajo número de placas al mezclarse con 40 UIH, mientras que al mezclarse con 80 UIH el suero inhibió completamente la formación de placas virales (Figura 24A). Debido a estos resultados, se evaluó el uso del inóculo con 1×10^6 UFP mezclado con un rango diluciones de antisuero más estrecho, utilizando 20, 30, 40, 50 y 60 UIH. Se observó formación de placas de manera descendente a medida que se incrementaba la concentración de antisuero utilizada, permitiendo la mezcla de 1×10^6 UFP en conjunto con 60 UIH la formación de aproximadamente 5 placas por ensayo (Figura 24B), sugiriendo esta mezcla como la mejor condición para obtener placas a causa de virus mutantes de escape de neutralización. Posteriormente, se aislaron y expandieron los virus de placas observadas en las mezclas 1×10^6 UFP + 40 UIH o 1×10^6 UFP + 60 UIH, logrando ser expandidos en presencia de bajas concentraciones de antisuero (20 UIH o menos; datos no mostrados). Se determinó que los virus aislados y expandidos fueran mutantes de escape de neutralización mediante ensayos de inhibición de hemaglutinación, esperando que el antisuero rWT resultara en UIH menores contra virus mutantes en comparación con el virus homólogo. No obstante, todos los virus evaluados dieron el mismo título de UIH que el virus rWT, descartando la posibilidad de que sean mutantes de escape de



neutralización (Datos no mostrados). A causa de esto, se realizaron modificaciones al protocolo basándose en una segunda metodología descrita para obtener virus mutantes de escape (ver metodología, sección 4.2.3.d)), utilizando un inóculo de 1×10^6 UFP mezclado con diluciones de antisuero 1:5, 1:10, 1:15 y 1:20. Los virus que lograron crecer en presencia del antisuero fueron evaluados como mutantes de escape mediante ensayos de inhibición de hemaglutinación de igual manera a la mencionada anteriormente. Todos los virus crecidos mostraron valores de UIH iguales a los obtenidos con el virus rWT, por lo que se descartó la obtención virus mutantes de escape mediante esta metodología (Datos no mostrados).

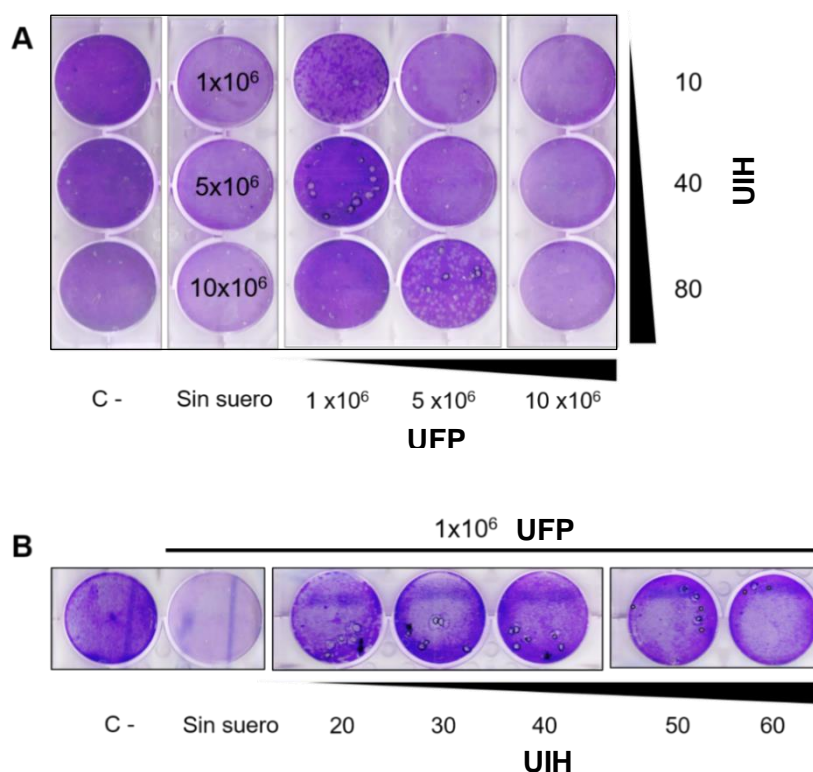


Figura 24. Estandarización de concentraciones de antisuero y virus rWT para la obtención de mutantes de escape de neutralización.

Ensayos de placa obtenidos tras la evaluación de: **A.** Mezcla de diferentes inóculos de virus rWT (1 , 5 y 10×10^6 UFP) con diluciones de antisuero (10 , 40 y 80 UIH). **B.** Inóculo de 1×10^6 UFP de virus rWT mezclado con diferentes diluciones de antisuero (20 , 30 , 40 , 50 y 60 UIH). Se muestran los pocillos control sin agregar virus ni suero (C-) o mezclando el virus con PBS (Sin suero).



6. DISCUSIÓN

Las pandemias son el evento más crítico que puede ocurrir a causa de un brote de VIA. Cada uno de estos episodios ocurridos han afectado entre el 20 y 40% de la población mundial y causado altas tasas de mortalidad, siendo la primera pandemia datada en el año 1918, y en junio del año 2009, la OMS declaró como pandémico el brote de VIA ocurrido en esa época, ambos episodios por el subtipo H1N1 (Wright *et al.*, 2013). Diversos estudios han surgido a raíz de estos eventos, donde un foco particular ha sido la producción de vacunas más eficientes para poder prevenir futuras pandemias.

Durante la adaptación del subtipo H1N1 desde las pandemias entre los años 1918 y 2009, el VIA ha ido adquiriendo o eliminando sitios de N-glicosilación en su glicoproteína de superficie HA (Medina *et al.*, 2013). Esta proteína es la más inmunogénica del virus y la de mayor relevancia en el desarrollo de nuevas vacunas (De Vries *et al.*, 2012; Maciola *et al.*, 2017; Weldon *et al.*, 2010), habiéndose demostrado que los sitios de N-glicosilación en HA pueden ser eficientes en enmascarar los sitios antigénicos y a su vez tener un efecto en las propiedades antigénicas del virus según su tipo o posición (Lin *et al.*, 2013; Sun, X. *et al.*, 2013; Tate *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2009; Wanzeck *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015). El sitio de N-glicosilación en la posición 144 de HA, del subtipo H1N1, ha demostrado ser relevante en cuanto al escape de la respuesta humoral del hospedero, permitiendo la evasión del reconocimiento mediado por anticuerpos producido por otras variantes del subtipo H1N1 con diferentes sitios de N-glicosilación en HA (71, 142, 172 y/o 177). Así mismo, el sitio de N-glicosilación 144 en HA pareciera modular las propiedades antigénicas del VIA, induciendo una respuesta humoral de amplio espectro en el hospedero, capaz de inhibir a otras variantes con diferentes sitios de N-glicosilación (Medina *et al.*, 2013).

Con el fin de poder dilucidar el oligosacárido específico unido al sitio de N-glicosilación 144, se expresó de manera soluble la HA de variantes de la cepa pandémica A/Netherlands/602/09 H1N1, difiriendo únicamente en sus sitios de N-glicosilación en el dominio de la cabeza globular (residuos 104 (rWT) y adicionales 142, 144, 172 o 144-172). Estas variantes fueron seleccionadas debido a que: (i) son sitios de N-glicosilación descritos en la HA del VIA H1N1 que fue adquiriendo durante su adaptación al humano,



y (ii) son sitios de N-glicosilación cercanos al sitio 144, el cual es de interés para la presente tesis (Medina *et al.*, 2013).

Al expresar variantes de sHA y purificarlas, se observó múltiples bandas en la fracción de elución, probablemente debido a otras proteínas solubles expresadas por las células HEK293T y que tengan dentro de su secuencia aminoacídica regiones ricas en residuos de histidina (Bornhorst & Falke, 2000). Mediante WB se observó diferencias en la migración de las bandas correspondientes a las variantes de sHA con sitios de N-glicosilación adicionales, sugiriendo que estos sitios fueron ocupados por oligosacáridos durante su traducción en células HEK293T. Además se observó una señal sobre los 250 KDa, sin observar la presencia de bandas del PM esperado de los trímeros de sHA (aproximadamente 200 KDa) (Sun, X. *et al.*, 2013) (Figura 16). El dominio de trimerización Foldon T4 se ha descrito que puede disociarse en un estado monomérico, encontrándose en solución ambos estados (trímero y monómero) para una misma proteína, siendo esta disociación favorecida en un pH inferior a 4.6 o en temperaturas sobre los 80°C (Meier *et al.*, 2004). Durante el protocolo utilizado en la presente tesis, las proteínas se encontraban resuspendidas en una solución a pH 7.4 y eran sometidas a un paso de denaturación a 95°C durante 5 mins previo a ser cargadas en un gel de poliacrilamida. Al omitir el paso de denaturación sólo se observaba la señal de alto PM en la parte superior del gel (datos no mostrados), indicando que el calor utilizado para denaturar las muestras de sHA estaría relacionado a la disociación del agregado de alto peso molecular en su estado monomérico. Por otra parte, la HA del VIA reconoce ácidos siálicos como receptores durante el inicio de la infección viral, mientras que en la etapa de gemación, la glicoproteína NA, con actividad sialidasa, corta estos ácidos siálicos para evitar que las nuevas partículas virales queden retenidas en la membrana de las células hospederas (Shaw & Palese, 2013). La expresión de las variantes de sHA en ausencia de NA podría explicar la señal sobre los 250 KDa, siendo esta un agregado de trímeros de sHA. Sin embargo, al adicionar NA exógena a una muestra purificada de sHA no se observó una disociación del agregado (Figura 16D). La actividad óptima de esta enzima está descrita entre valores de pH 5.5 – 6.0 (Moustafa *et al.*, 2004), siendo probable que la disociación de los agregados de sHA no se haya logrado debido a las condiciones de pH no óptimas de la solución de elución pH 7.4. Por tanto, sería posible en el futuro



evaluar el uso de esta enzima en una solución tampón de pH adecuado. Otra opción podría ser que el agregado de alto PM se deba al reconocimiento de ácidos siálicos en otras proteínas solubles expresadas por las células HEK293T, por lo que la adición de detergentes no iónicos en las soluciones utilizadas durante el protocolo de purificación podría ser otra estrategia a evaluar en un futuro (Bornhorst & Falke, 2000). Además, otra alternativa sería reemplazar las secuencias adicionadas en los constructos de sHA por los dominios de trimerización GCN4pII y la secuencia Strep-tag II. Estas dos secuencias también han sido ampliamente utilizadas para poder expresar de manera soluble la HA del VIA y su purificación a partir de sobrenadante mediante kits comerciales (De Vries *et al.*, 2012; De Vries *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2013; Weldon *et al.*, 2010).

Para poder determinar el oligosacárido específico en la posición 144 de la sHA, en una etapa posterior a esta tesis, se determinará el perfil de glicosilaciones mediante Electroforesis en gel capilar con fluorescencia inducida por láser (CGE-LIF) (Schwarzer *et al.*, 2008). Luego el perfil obtenido será comparado con los perfiles de las otras variantes de sHA (rWT, 142, 172 y 144-172) para poder dilucidar el oligosacárido específico unido. Este experimento se realizará en colaboración con investigadores del instituto Max Planck para la dinámica de los sistemas técnicos complejos (Alemania), complementando los resultados de la presente tesis. Este experimento requiere de los monómeros de cada variante de sHA, indicando que no habría impedimento en poder dilucidar el oligosacárido unido al sitio de N-glicosilación 144 o adyacentes en HA, aunque la obtención del trímero de sHA sería importante de considerar para futuros estudios debido a que el trímero de HA induce una mayor cantidad de anticuerpos en comparación con su monómero al ser utilizados como inmunógenos (Weldon *et al.*, 2010). Dentro de las variantes de sHA expresadas, solo la variante sHA 172 mostró una mutación en su secuencia (K60E). Los sitios de N-glicosilación se pueden ver afectados por la secuencia aminoacídica que los rodea, la estructura secundaria de la proteína u otro sitio de N-glicosilación cercano (Aebi, 2013; Nettleship, 2012). Debido a la distancia entre los residuos 60 y 172 dentro de HA, esta mutación probablemente no presenta mayores repercusiones en el sitio de N-glicosilación 172.

Posterior a la expresión de las variantes de sHA para determinar el oligosacárido unido en la posición 144, se procedió a estudiar las propiedades antigénicas del VIA al



encontrarse con un sitio de N-glicosilación adicional en dicha posición. Mediante virus recombinantes, se creció en cultivo de células MDCK la misma cepa pandémica A/Netherlands/602/09 utilizada en la expresión de sHA. De igual manera se crecieron las mismas variantes con sitios de N-glicosilación adicionales en HA.

Entre las variantes de HA se observó que la variante 144 mostró un PM estimado más alto que el obtenido con las variantes 142 y 172, ya sea expresadas de manera soluble, o como parte de VIA recombinantes (Figura 17). Esta diferencia de PM podría deberse a que el sitio de N-glicosilación 144 en HA se encontraría más accesible a las enzimas participantes en el ensamble del oligosacárido, permitiendo la adición de un mayor número de monosacáridos en comparación a los adicionados en los sitios cercanos 142 y 172 (Lannoo & Van Damme, 2015). La diferencia de PM obtenidos entre virus recombinantes y HA solubles podría ser causa de las líneas celulares utilizadas, encontrándose descrito que el VIA crecido en células MDCK adiciona en los sitios de N-glicosilación oligosacáridos complejos de dos hasta cuatro antenas y un alto número de monosacáridos en comparación a células de pato o células Vero (Hutter *et al.*, 2013; Rödig, Djeljadini *et al.*, 2011; Rödig, Rapp *et al.*, 2011). Así mismo, la línea celular HEK293T también une en HA N-glicosilaciones del tipo complejas (Parsons *et al.*, 2017), demostrándose que son más grandes que los oligosacáridos adicionados por línea celular CHO (Butler & Spearman, 2014; Croset *et al.*, 2012). A pesar de no existir una comparación directa entre oligosacáridos unidos a sitios de N-glicosilación por células MDCK y HEK293T, probablemente la diferencia de pesos moleculares observada entre los virus recombinantes y sHA se deba a que la línea celular MDCK adicione oligosacáridos complejos con un mayor número de monosacáridos que la línea celular HEK293T. Para poder confirmar esta hipótesis, se podría realizar el protocolo de obtención de perfiles de N-glicosilación mediante CGE-LIF con las variantes de HA de virus recombinantes y proteínas solubles, y además nos permitiría corroborar en dos líneas celulares diferentes la hipótesis de un oligosacárido grande que se une a la posición 144 de HA.

Con el fin de estudiar la relevancia del tipo de N-glicosilaciones en el VIA, se creció los las variantes de VIA en presencia de kifunensina, la cual es compuesto químico inhibidor de la enzima α -manosidasa I (Tropea, 1990) y que ha sido ampliamente utilizado en



estudios del tipo de N-glicosilaciones en HA (De Vries *et al.*, 2012; Wei, C. *et al.*, 2010). Al inhibir la actividad de la α -manosidasa I no es posible llevar a cabo la maduración de los oligosacáridos en el aparato de Golgi, permitiendo obtener oligosacáridos altos en residuos de manosa (N-glicosilaciones del tipo simple) que son adicionados en el RER (Butler & Spearman, 2014; Nettleship, 2012; Tropea, 1990). Se observó que a pesar de tener oligosacáridos más cortos la HA de la variante 144 volvió a mostrar un PM mayor al de las otras variantes con un solo sitio de N-glicosilación adicional (Figura 18), apoyando nuevamente la hipótesis de que la posición 144 en HA permite el ensamble de un oligosacárido compuesto por una mayor cantidad de unidades de azúcares, independiente del tipo de N-glicosilaciones.

Los sitios de N-glicosilación en HA pueden o no afectar la avidéz del VIA por su receptor según su cercanía con el SUR (Alymova *et al.*, 2016; Sun, X. *et al.*, 2013; Zhang, X. *et al.*, 2015; Zhang, Y. *et al.*, 2013), por lo que se evaluó si los sitios de N-glicosilación adicionales en la cabeza de HA tenían un efecto en su avidéz por su receptor en glóbulos rojos de pavo. Se observó una tendencia donde los sitios de N-glicosilación 144 y 172 afectaban negativamente la avidéz del VIA, mientras que las variantes 142 y 144-172 no, en comparación con la variante rWT (Figura 19A). El análisis de estos datos no entrega diferencias significativas debido a las desviaciones estándar y el n de las muestras (n = 4 por variante) por lo que el tamaño de la muestra debería ser aumentado para resultados más conclusivos en un futuro. No obstante, los resultados obtenidos con la variante 142 concuerdan con los observados en otros trabajos, donde la adición de este sitio de N-glicosilación en HA no afectaba la avidéz del VIA por su receptor en glóbulos rojos o adosado en una placa (Sun, X. *et al.*, 2013; Zhang, Y. *et al.*, 2013). Por otra parte, el sitio de N-glicosilación 144 en HA se encuentra adyacente al SUR, siendo presumible que un oligosacárido unido en este sitio afecte de manera estérica la avidéz del VIA. A la fecha, este sitio no ha sido evaluado en su efecto sobre la avidéz del VIA H1N1, pero esta observación ha sido descrito en el sitio 158 en el subtipo H5N1, donde se ha demostrado que su cercanía al SUR compromete la avidéz del VIA por su receptor en glóbulos rojos (Zhang, X. *et al.*, 2015). Por otra parte, tener dos sitios de N-glicosilación próximos entre ellos afecta la estructura final del oligosacárido unido en cada sitio (Lannoo & Van Damme, 2015; Nettleship, 2012), lo que podría explicar que al tener los sitios 144 y 172



por separado comprometen la afinidad del VIA, pero si están presentes al mismo tiempo se reduciría el largo de los oligosacáridos unidos, dejando de impedir estéricamente el reconocimiento de su receptor. Esta observación ha sido estudiada en el subtipo H3N2, adicionando en conjunto los sitios de N-glicosilación 63 y 126 en HA, la afinidad del virus por receptores adosados en placa se ve afectada negativamente, pero al adicionar cuatro sitios de N-glicosilación (63, 126, 133 y 146) la afinidad del VIA es comparable a la afinidad de la cepa H3N2 rWT, sin sitios adicionales en la cabeza de HA (Alymova *et al.*, 2016).

Además, al evaluar la avidéz al reducir el largo de los oligosacáridos utilizando las variantes de VIA con N-glicosilaciones del tipo simple, se observó que la avidéz de las variantes 144 y 172 era similar a la obtenida con la variante rWT (Figura 19B). Esta observación es conexas con los resultados obtenidos en trabajos con otros subtipos de HA, donde se observó que la disminución en la longitud de los oligosacáridos unidos a la HA de virus recombinante del subtipo H5N1 aumentaba su afinidad por receptores adosados en una placa (Wang *et al.*, 2009). Además, este resultado también se ha observado en modelos de HA soluble de los subtipos H2 y H7 (De Vries *et al.*, 2010).

También se estudió las diferencias en la respuesta humoral producida por el hospedero al ser inmunizado con variantes del VIA con diferentes sitios y tipos de N-glicosilaciones en HA. Al inmunizar ratones, se observó que aquellos sueros producidos con las variantes con N-glicosilaciones de tipo simple llevaban a una disminución en la cantidad de anticuerpos IgG producidos (Figura 20), indicando que el largo de los oligosacáridos unidos a sitios de N-glicosilación tiene una relevancia en la respuesta humoral producida por el hospedero. Este resultado concuerda con el trabajo de Hutter y colaboradores, donde utilizaron virus producidos en células MDCK y Vero, y observaron que al remover los oligosacáridos de los virus producidos en ambas líneas celulares, había una disminución en la cantidad de anticuerpos anti-HA presentes en el suero (Hutter *et al.*, 2013). Este resultado también se ha observado en trabajos que realizaron inmunizaciones con HA solubles (De Vries *et al.*, 2012; Wei, C.-J. *et al.*, 2008), sugiriendo para experimentos futuros evaluar las diferencias al inmunizar con las variantes de sHA con N-glicosilaciones de tipo simple y complejas y determinar si existe diferencias en la cantidad de anticuerpos producidos.



La determinación de la absorbancia de anticuerpos presentes en suero se evaluó contra las proteínas del tallo de HA y NP, obteniendo que absorbancias mayores contra el tallo de HA en comparación a la proteína NP (Figura 20 A y B). Esta observación es correspondiente con lo esperado según literatura, donde se ha demostrado que la proteína HA es la más inmunogénica del VIA (Igarashi *et al.*, 2008; Jacobsen *et al.*, 2017; Rödig *et al.*, 2011; Sun, X. *et al.*, 2013; Tate *et al.*, 2014). Al analizar estos resultados por cada variante de VIA utilizada como inmunógeno, se observó en general el mismo resultado, produciendo una mayor absorbancia aquellos sueros producidos con variantes con N-glicosilaciones del tipo complejas (HA_{CG}) en comparación con el tipo simple (HA_{HM}; Figura 20 C y D). Esta observación fue diferente solo para la variante 144, donde se observó una tendencia inversa, siendo mayor la cantidad de anticuerpos en sueros obtenidos al inmunizar con la variante 144 HA_{HM}. Este resultado podría indicar que tanto un oligosacárido muy grande como uno muy corto podrían disminuir la cantidad de anticuerpos producidos al ser utilizados en inmunógenos.

Aparte de la absorbancia de anticuerpos, estos sueros también se evaluaron en su capacidad de poder inhibir la actividad de HA del VIA, observándose que los sueros producidos con las variantes HA_{CG} indujeron títulos de inhibición homólogos más altos en comparación a los producidos con las variantes HA_{HM} (Figura 21). Este resultado es similar al observado en los ensayos de ELISA, sugiriendo que los títulos de inhibición están probablemente relacionados a la cantidad de anticuerpos producidos. Cabe mencionar que la variante 172 no dio títulos de inhibición homólogos detectables, sin importar el tipo de N-glicosilaciones en HA, lo cual se contrasta con los resultados obtenidos anteriormente en el laboratorio, donde se obtuvo títulos de inhibición contra la variante 172 con N-glicosilaciones complejas (Medina *et al.*, 2013). Este resultado llama la atención puesto que los sueros obtenidos al inmunizar con la variante 172 HA_{CG} o HA_{HM} si dieron lecturas en los ensayos de ELISA (Figura 20 C y D). El ensayo de inhibición de hemaglutinación se basa en anticuerpos que puedan reconocer el dominio de la cabeza globular de HA e impedir la unión a su receptor (Jacobsen *et al.*, 2017), por lo que probablemente los sueros producidos con las variantes 172 HA_{CG} y HA_{HM} inducen anticuerpos que se unen efectivamente solo al tallo de HA (anticuerpos medidos en ELISA). De todos modos, es necesario repetir el protocolo de inmunización con la variante



172 con ambos tipos de N-glicosilaciones para descartar problemas relacionados al procedimiento experimental. La observación de que el tipo de N-glicosilaciones en HA module la capacidad inhibitoria de los sueros también ha sido demostrado en otros trabajos, mediante la inmunización con virus recombinantes (Hutter *et al.*, 2013) o HA solubles (De Vries *et al.*, 2012) se ha determinado que los sueros obtenidos al inmunizar con HA con N-glicosilaciones complejas inducen títulos de inhibición mayores a los obtenidos con su contraparte con N-glicosilaciones simples.

Interesantemente, se observó que los sueros producidos con un tipo de N-glicosilaciones induce títulos de inhibición similares ya sea contra los grupos de virus HA_{CG} o HA_{HM} (Figura 22), es decir, el suero obtenido utilizando una variante HA_{CG} determinada, induce títulos de inhibición similares contra los virus HA_{CG} y su contraparte HA_{HM}. Este resultado se observó para todas las variantes de VIA, indicando que probablemente la unión de un oligosacárido a un sitio de N-glicosilación es suficiente para enmascarar determinados sitios antigénicos, sin que el largo del oligosacárido unido tenga repercusiones mayores. A la fecha no hay literatura relacionada al VIA que describa esta observación, habiendo solo un trabajo semejante, donde se evaluó sueros luego de inmunizar con HA solubles expresadas en células Sf9 (N-glicosilaciones simples) o células CHO (N-glicosilaciones complejas), observando que cada HA soluble inducía en suero una cantidad de anticuerpos IgG anti-HA similar contra cualquiera de las dos diferentes HA solubles (Lin *et al.*, 2013).

Finalmente, se determinó la inmunización inducida en suero por cada variante, analizando los títulos de inhibición obtenidos contra cada variante de VIA del grupo HA_{CG} o HA_{HM}. Se observó que el suero obtenido con la variante rWT presentó títulos de inhibición bajos contra todas las demás variantes y, además pudo ser inhibida eficientemente por los sueros producidos con cualquiera de los virus utilizados (Figura 23; suero rWT), sugiriendo que se inducen anticuerpos contra el dominio de la cabeza de HA (Wright *et al.*, 2013). Estos anticuerpos inhiben a la variante rWT debido a que esta no tiene sitios de N-glicosilación en este dominio, mientras que las variantes 142, 144 y 144-172 evaden el reconocimiento mediado por anticuerpos anti-rWT al enmascarar sus sitios antigénicos Sa o Sb con cadenas de oligosacáridos (Medina *et al.*, 2013, Sun, S. *et al.*, 2012) . Resultados similares han sido observados en otros trabajos, donde los sueros



producidos con las variantes sin sitios de N-glicosilación en la cabeza de HA no pueden inhibir eficientemente a una misma cepa con sitios de N-glicosilación en este dominio (Medina *et al.*, 2013; Sun, X. *et al.*, 2013; Wei, C. *et al.*, 2010). La variante 142 indujo sueros que inhibían de manera similar a las variantes 142 y 144, siendo solo la variante 144-172 inhibida de manera levemente menos eficiente, siendo esta observación contrastada con los resultados obtenidos en el trabajo previo del laboratorio, donde el suero 142 no fue capaz de inhibir a la variante 144 (Medina *et al.*, 2013). Es posible que las diferencias entre los protocolos de inmunización expliquen esta discrepancia, dado a que en el presente estudio se utilizó un adyuvante y se realizó una segunda inmunización antes de la recolección de sangre desde los roedores, mientras que en el trabajo previo del laboratorio, se realizó una inmunización sin el uso de adyuvante ni una re-inmunización (Medina *et al.*, 2013). El adyuvante incompleto de Freund estimula la respuesta humoral del hospedero, induciendo una mayor producción de anticuerpos (Jennings, 1995), por lo que su uso durante la inmunización podría explicar que el suero 142 pueda inhibir en este estudio a la variante 144. Por otra parte, la inmunización con esta última variante indujo sueros con títulos de inhibición altos contra las variantes rWT y 144, siendo levemente menores contra las variantes 142 y 144-172, sugiriendo estos resultados que la respuesta humoral inducida con la variante 142 es más efectiva en comparación con la variante 144, y a su vez, que la adición del sitio 172 enmascara un sitio antigénico reconocido por estos anticuerpos inducidos por ambas variantes. La variante 144-172 indujo un suero capaz de inhibir de manera eficiente a todas las variantes evaluadas (Figura 23; suero 144-172), contrastando con el resultado observado en el trabajo previo del laboratorio, donde el suero 144-172 no indujo títulos de inhibición altos contra la variante 144 (Medina *et al.*, 2013). Probablemente, el mismo motivo de las diferencias en el protocolo de inmunización puede explicar estos resultados. Interesantemente, en otros trabajos han utilizado la combinación de sitios de N-glicosilación 142-177, los cuales fueron los sitios presentes previos a la pandemia del año 2009 (Sun, X. *et al.*, 2013; Wei, C. *et al.*, 2010), y observaron que el antisuero 142-177 no fue capaz de inhibir a las variantes rWT, sin sitios de N-glicosilación adicionales en la cabeza de HA. En la presente tesis, el antisuero 144-172 si fue capaz de inhibir eficientemente a la variante rWT, correspondiente a una cepa pandémica del año 2009,



sugiriendo que la inmunización con la variante 144-172 produciría una respuesta humoral más eficiente que la inducida por la variante 142-177 y la combinación de estos sitios de N-glicosilación sería relevante para futuros estudios relacionados a la modulación de propiedades antigénicas del VIA.

Debido a la respuesta humoral observada al utilizar la variante 144 como inmunógeno en trabajos previos del laboratorio (Medina *et al.*, 2013), se planteó dilucidar los epítomos reconocidos por el antisuero 144 mediante la generación de virus mutantes de escape de neutralización. Este protocolo permite aislar virus que hayan adquirido mutaciones que les permitan la evasión de anticuerpos generados por el hospedero (Das *et al.*, 2011; Manicassamy *et al.*, 2010; Tsuchiya *et al.*, 2002), para lo que inicialmente se procedió a estandarizar las concentraciones de virus y suero necesarias para poder aislar placas virales producto de la evasión de anticuerpos. Utilizando la variante rWT y su antisuero respectivo, se estandarizó como condiciones óptimas el uso de 1×10^6 UFP en conjunto con antisuero diluido a 60 UIH, aunque ninguna de las placas aisladas mediante dos metodologías similares logró ser confirmada como virus mutantes de escape de neutralización (Figura 24). La confirmación de mutantes se sustenta en que un virus que evade los anticuerpos presentes en el antisuero debería presentar títulos de inhibición de HA menores a los de la cepa parental (Leon *et al.*, 2017), lo cual no fue logrado con los virus aislados desde placas. Una diferencia importante, con respecto a trabajos publicados donde se han generado mutantes de escape, fue el uso de anticuerpos monoclonales a diferencia de suero policlonal, utilizado en este estudio (Das *et al.*, 2011; Kim & Park, 2012; Lambkin *et al.*, 1994; Leon *et al.*, 2017; Manicassamy *et al.*, 2010; Tsuchiya *et al.*, 2002). El uso de suero policlonal podría haber interferido en la obtención de mutantes de escape, puesto que para poder evadirlo eficientemente un virus debe requerir varias mutaciones puntuales (Laver *et al.*, 1979; Webster & Laver, 1980), por lo que es posible que las placas aisladas hayan sido producto de un mayor número de virus en relación a los anticuerpos presentes en la mezcla, siendo estos virus aislados la misma variante rWT. Otra opción es que se hayan logrado aislar virus mutantes de escape, pero no se hayan logrado confirmar estos mediante el ensayo de inhibición debido a que la evasión de un solo anticuerpo presente en el suero no podría asegurar una disminución en los títulos de inhibición. La presencia de otros anticuerpos neutralizantes podría dar



como resultado un mismo título de inhibición para un virus mutante como el virus rWT, por lo que se propone aislar los anticuerpos presentes en el antisuero 144 mediante el uso de hibridomas, como se ha descrito en otros trabajos relacionados al estudio de la respuesta humoral producida por el VIA (Li *et al.*, 2006; Wrammert *et al.*, 2008).

Diversos estudios han demostrado la relevancia de adquirir sitios de N-glicosilación en HA y el enmascaramiento de sitios antigénicos del VIA. Esto no solo se ha demostrado para el subtipo H1N1, sino que también en estudios realizados con el subtipo humano H3N2 (Abe *et al.*, 2004; Zost *et al.*, 2017) o subtipos de VIA de cerdos (Hause *et al.*, 2012) y aves (Hervé *et al.*, 2015). Por ejemplo, se ha demostrado que la adición del sitio de N-glicosilación 158 del subtipo H5N1 ha mostrado tener un efecto en su virulencia en ratones, cambios en la avidéz por su receptor y sus propiedades antigénicas (Gu *et al.*, 2017; Suptawiwat *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2017). Por otro lado, la adición de sitios de N-glicosilación en HA puede tener efectos en la afinidad de otros subtipos de VIA. Se ha demostrado, en el subtipo H3N2, que la adición de los sitios de N-glicosilación 63-126-133-146 en HA no afectan la avidéz del VIA por su receptor, pero modulan los diferentes ácidos siálicos que puede reconocer esta variante en comparación a la cepa rWT (Alymova *et al.*, 2016). Cabe mencionar que este efecto en la avidéz del subtipo H3N2 se ha relacionado estrechamente al tipo de N-glicosilaciones en HA, puesto que se ha demostrado que la mayoría de sus sitios son ocupados por oligosacáridos del tipo simple (An *et al.*, 2015; Vigerust *et al.*, 2007). Por lo tanto, el efecto en la avidéz del VIA subtipo H3N2 puede deberse al hecho de tener oligosacáridos cortos unidos en sus sitios de N-glicosilación, lo cual enmascararía sus sitios antigénicos sin comprometer la avidéz del virus por su receptor, a diferencia de la variante 144 en el subtipo H1N1.

Por otra parte, en este trabajo demostramos que las N-glicosilaciones del tipo simple en el VIA subtipo H1N1 disminuyen la cantidad de anticuerpos inducidos en el hospedero. Esto se ha observado en el subtipo H3N2, demostrando que al tener principalmente N-glicosilaciones del tipo simple (An *et al.*, 2015; Vigerust *et al.*, 2007), el aumento de sitios de N-glicosilación en HA no confiere protección contra virus con menos sitios de N-glicosilación y además produce títulos de inhibición de HA muy bajos (Wanzeck *et al.*, 2011). Esta disminución en la cantidad de anticuerpos se ha relacionado al reconocimiento de oligosacáridos del tipo simple por la proteína surfactante D (SP-D) del



sistema inmune innato, la cual se encuentra en la mucosa del tracto respiratorio (An *et al.*, 2015; Tate *et al.*, 2011; Vigerust *et al.*, 2007). Variantes del subtipo H3N2 con un mayor número de sitios de N-glicosilación son neutralizados por la proteína SP-D antes de poder ser presentadas al sistema inmune adaptativo, disminuyendo la cantidad de partículas infecciosas en el hospedero. Además, al realizar infecciones con variantes del VIA H3N2, con varios sitios de N-glicosilación adicionales en HA, en ratones mutantes que no expresaran SP-D, el VIA con varios sitios adicionales no era inhibido y resultaba más patogénico que cepas con menos sitios de N-glicosilación en HA (Vigerust *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que el tipo de N-glicosilaciones en HA influye fuertemente en la respuesta humoral del hospedero, siendo los oligosacáridos dependientes del sistema o línea celular que se utilice para expresar una determinada proteína (Aebi, 2013; Nettleship, 2012). El VIA se ha expresado en diferentes líneas de cultivo celular, lo cual tiene un impacto tanto en el tipo de N-glicosilaciones como en la respuesta humoral del hospedero, siendo las células MDCK por excelencia la línea celular utilizada para cultivar el VIA (Cotter *et al.*, 2001; Hutter *et al.*, 2013). Trabajos han demostrado que la línea celular MDCK produce virus con N-glicosilaciones del tipo complejas más grandes que las expresadas en células de pato AGE1.CR.pIX (Rödig *et al.*, 2011), así como la línea celular Sf9 solo permite obtener oligosacáridos del tipo simple en HA (Liu *et al.*, 2017). Del mismo modo, trabajos en otros subtipos del VIA han demostrado que la línea celular utilizada tiene un impacto en los oligosacáridos unidos en HA (Chen *et al.*, 2017; Parsons *et al.*, 2017; Romanova *et al.*, 2003; Wei, C.-J. *et al.*, 2008). Es por esto, que el estudio de la relevancia de oligosacáridos unidos en sitios de N-glicosilación específicos debe también considerar la relevancia del sistema utilizado para la expresión del VIA. Ambos factores son relevantes en cuanto a la respuesta humoral producida en el hospedero y un mejor entendimiento de la relación entre la posición y el tipo de los sitios de N-glicosilación llevará a la producción de futuras vacunas más eficientes contra el VIA.



7. CONCLUSIONES

Se logró diseñar y clonar secuencias de ADN que expresaran de manera soluble el monómero de variantes de HA con diferentes sitios de N-glicosilación en el dominio de la cabeza globular, quedando pendiente la obtención de perfiles de N-glicosilación mediante CGE-LIF y el oligosacárido unido en el sitio 144 de HA.

Se observó que la inmunización de ratones con VIA con N-glicosilaciones simples llevó a una disminución en la cantidad de anticuerpos y títulos de inhibición, determinando que el tipo de N-glicosilación influye en la cantidad de anticuerpos producidos por el hospedero, pero no en la amplitud de la respuesta humoral inducida.

Además, se sugirió que el sitio de N-glicosilación 144 permite el ensamble de un oligosacárido más grande en comparación a sitios vecinos y que este oligosacárido unido en la posición 144 disminuye la avidéz del VIA por su receptor.

También se observó que la combinación de los sitios de N-glicosilación 144-172 en HA produce anticuerpos con títulos de inhibición altos contra todas las variantes evaluadas y además enmascaró eficientemente los sitios antigénicos en HA.

Finalmente, se estandarizó el protocolo de virus mutantes de escape, estableciendo el uso de 1×10^6 UFP de VIA en combinación con antisuero diluido a 60 UIH para la formación de un bajo número de placas, quedando pendiente la realización del ensayo con el antisuero 144 para poder determinar los epítomos reconocidos por los anticuerpos presentes en este suero.

En conjunto, estas conclusiones nos permiten entender de mejor manera la relevancia de los sitios de N-glicosilación en la HA del VIA, especialmente el sitio 144. Este trabajo aporta nuevos conocimientos con respecto al efecto de los sitios de N-glicosilación en la avidéz de HA por su receptor y su modulación en las propiedades antigénicas en la respuesta humoral del hospedero. Futuras investigaciones relacionadas a este trabajo ayudarán en el desarrollo de una mejor y más eficiente vacuna contra el VIA.



8. PROYECCIONES BIOTECNOLÓGICAS

Actualmente se encuentran disponibles diversas patentes relacionadas al virus Influenza A. Con respecto a la presente tesis, ya existen patentes relacionadas al uso de HA solubles o virus recombinantes como inmunógenos (US 8,771,703 B2, 2014; US 2011/0045022 A1, 2011), así como la modificación de sitios de N-glicosilación en HA para modular la respuesta antigénica del hospedero (WO 088428 A1, 2012; US 0132330 A1, 2015). Aun así, a pesar de ser metodologías ya patentadas, descubrimientos científicos posteriores relacionados a esta investigación podrían ser protegidos como modelos de utilidad, es decir, títulos de propiedad industrial que, al igual que las patentes, protegen invenciones, pero de escaso valor creativo o de innovación no radical, siguiendo los criterios de novedad y aplicación industrial.

La idea de la expresión de HA de manera soluble reemplazando el dominio transmembrana por un dominio de trimerización y alguna secuencia para posterior purificación ya ha sido planteada en investigaciones previas. Estas investigaciones han hecho uso de las mismas secuencias utilizadas en esta tesis (dominio Foldon T4 y cola de poli-histidina) (Krammer *et al.*, 2012) o secuencias como el dominio de trimerización GCN4 y purificación a través de la secuencia Strep-Tag II (Cornelissen *et al.*, 2010; De Vries *et al.*, 2010; Weldon *et al.*, 2010). Así mismo, el uso de virus recombinantes que han sido modificados en sus sitios de N-glicosilación en el dominio de la cabeza globular también han sido ampliamente utilizado (Hervé *et al.*, 2015; Maciola *et al.*, 2017; Medina *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013), por lo que la existencia de esta información resta de carácter innovativo e inventivo a las HA solubles o los virus recombinantes aquí utilizados.

No obstante, estudios futuros relacionadas a la caracterización de los oligosacáridos unidos a los sitios de N-glicosilación 144 y/o 172 podrían llevar al desarrollo de herramientas que puedan ser patentables. Según los resultados obtenidos en este trabajo, estos sitios de N-glicosilación llevarían una respuesta humoral eficiente, capaz de inducir anticuerpos contra otras variantes de VIA del subtipo H1N1. Los oligosacáridos unidos en estos sitios y su uso en inmunógenos no se encuentran descritos a la fecha, otorgando las características de novedad y nivel inventivo a una futura invención. Esta futura herramienta podría ser desarrollada de manera ingenieril mediante glicoingeniería, la cual consiste en el desarrollo de métodos para controlar la composición de los



oligosacáridos en una determinada glicoproteína (Nischan & Kohler, 2016; Clausen *et al.*, 2017). Esta área ha sido de gran importancia en el área biofarmacéutica debido a que las propiedades terapéuticas de las proteínas se ven afectadas por la composición de sus oligosacáridos (Clausen *et al.*, 2017; Seeberger & Cummings, 2017).

Diferencias en la composición de los oligosacáridos pueden tener implicaciones en la patentabilidad de un agente en el cual el polipéptido se mantiene constante, siempre y cuando estos oligosacáridos definan a un agente como único (Seeberger & Cummings, 2017), por lo que las herramientas desarrolladas con estos oligosacáridos específicos 144 y/o 172 serían evaluadas en su potencial como inductores de una respuesta humoral de amplio espectro contra diferentes cepas de VIA y ensayos de desafío a roedores con dosis letales y sobrevivencia post-inmunización. Estos oligosacáridos podrían ser utilizados en inmunógenos como virus recombinantes, HA solubles o en pequeños péptidos de HA, cumpliendo con el requisito de aplicación industrial.

El desarrollo de esta herramienta seguiría un modelo de transferencia tecnológica “Catch-up”, insertando en el mercado una competencia a través de la mejora de un producto ya existente, que serían las actuales vacunas contra el VIA, y que se podría comercializar con los actuales proveedores de estas vacunas (las compañías Seqirus, GlaxoSmithKline, Sanofi Pasteur, Protein Sciences o MedImmune).

La relevancia de los oligosacáridos específicos unidos a sitios de N-glicosilación puntuales en una glicoproteína no es un área todavía estudiada para el caso del VIA, por lo que el proceso ingenieril y desarrollo de esta herramienta permitirían una ventana de posibles negociaciones con empresas interesadas en la producción de vacunas más eficientes contra el VIA y con el uso de tecnología innovadora, volviendo factible un posible desarrollo biotecnológico con los resultados mostrados en la presente tesis.



MATERIAL SUPLEMENTARIO

Material suplementario 1: Datos originales de ensayos de avidéz por receptores en glóbulos rojos utilizando variantes N-glicosiladas de VIA. Se muestran los valores por réplica y los datos promedio graficados en la figura 19. Se indican en rojo los valores no considerados.

		Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Réplica 4		X
Virus		UHA		UHA		UHA		UHA		UHA
HA _{CG}	rWT	16	16	8	8	16	8	64	64	12
	142	32	32	8	8	16	16	16	16	18
	144	2	2	1	1	0	1	1	2	1,5
	172	4	4	0	2	1	1	1	1	1,75
	144-172	8	8	4	4	4	8	0	0	6
HA _{HM}	rWT	32	32	16	16	16	16	16	16	20
	142	64	64	32	32	64	64	32	32	48
	144	16	16	8	8	8	8	8	8	10
	172	16	16	4	8	32	32	8	8	10,7
	144-172	8	8	8	8	8	8	4	4	7

Material suplementario 2: Datos originales de ensayos inhibición de hemaglutinación cruzados a partir de sueros obtenidos contra variantes N-glicosiladas de VIA. Se muestran los valores por réplica y los datos promedio graficados en la 23. Se indica en recuadro coloreado el título de inhibición homólogo entre cada suero y virus.

		Virus								
Rep 1		HA_{CG}				HA_{HM}				
UIH		rWT	142	144	144-172	rWT	142	144	144-172	
Suero	HA _{CG}	rWT	320	40	160	80	320	80	80	80
		142	640	320	320	320	640	320	320	320
		144	640	160	320	320	640	160	320	160
		144-172	640	320	320	640	640	320	640	640
	HA _{HM}	rWT	40	<10	<10	<10	40	<10	<10	<10
		142	320	160	80	20	320	160	80	80
		144	320	80	160	20	320	80	160	80
		144-172	160	<10	160	80	160	<10	160	80



		Virus								
Rep 2		HA _{CG}				HA _{HM}				
UIH		rWT	142	144	144-172	rWT	142	144	144-172	
Suero	HA _{CG}	rWT	640	80	160	80	640	80	160	160
		142	1280	640	640	160	1280	1280	640	320
		144	640	320	640	160	640	320	640	320
		144-172	640	320	320	320	640	320	320	320
	HA _{HM}	rWT	80	<10	<10	<10	80	<10	<10	<10
		142	320	320	160	20	640	640	160	10
		144	640	160	320	20	640	160	320	80
		144-172	320	<10	160	40	160	<10	160	80
		Virus								
Rep 3		HA _{CG}				HA _{HM}				
UIH		rWT	142	144	144-172	rWT	142	144	144-172	
Suero	HA _{CG}	rWT	640	160	160	80	640	160	160	80
		142	640	640	640	160	640	1280	320	160
		144	640	320	640	160	640	320	320	160
		144-172	320	320	320	320	640	320	320	320
	HA _{HM}	rWT	10	<10	<10	<10	40	<10	<10	<10
		142	320	320	80	40	320	640	160	10
		144	320	320	320	20	320	160	320	10
		144-172	160	<10	160	80	160	<10	80	80
		Virus								
X		HA _{CG}				HA _{HM}				
UIH		rWT	142	144	144-172	rWT	142	144	144-172	
Suero	HA _{CG}	rWT	533	93	160	80	533	107	133	107
		142	853	533	533	213	853	960	427	267
		144	640	267	533	213	640	267	427	213
		144-172	533	320	320	427	640	320	427	427
	HA _{HM}	rWT	43	<10	<10	<10	53	<10	<10	<10
		142	320	267	107	27	427	480	133	33
		144	427	187	267	20	427	133	267	57
		144-172	213	<10	160	67	160	<10	133	80



REFERENCIAS

Abe, Y., Takashita, E., Sugawara, K., Matsuzaki, Y., & Muraki, Y. (2004). Effect of the Addition of Oligosaccharides on the Biological Activities and Antigenicity of Influenza A / H3N2 Virus Hemagglutinin. *Journal of Virology*, 78 (18), 9605–9611.

Aebi, M. (2013). N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833 (11), 2430–2437.

Alymova, I. V., York, I. A., Air, G. M., Cipollo, J. F., Gulati, S., Baranovich, T., Kumar, A., Zeng, H., Gansebom, S., & McCullers, J. A. (2016). Glycosylation changes in the globular head of H3N2 influenza hemagglutinin modulate receptor binding without affecting virus virulence. *Scientific Reports*, 6 (1), 36216.

An, Y., McCullers, J. A., Alymova, I., Parsons, L. M., & Cipollo, J. F. (2015). Glycosylation analysis of engineered H3N2 influenza A virus hemagglutinins with sequentially added historically relevant glycosylation sites. *Journal of Proteome Research*, 14 (9), 3957–3969.

Bavagnoli, L., Cucuzza, S., Campanini, G., Rovida, F., Paolucci, S., Baldanti, F., & Maga, G. (2015). The novel influenza A virus protein PA-X and its naturally deleted variant show different enzymatic properties in comparison to the viral endonuclease PA. *Nucleic Acids Research*, 43 (19), 9405–9417.

Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods in Enzymology*, 326, 245–254.

Brownlee, G. G., & Fodor, E. (2001). The predicted antigenicity of the haemagglutinin of the 1918 Spanish influenza pandemic suggests an avian origin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356 (1416), 1871–1876.

Butler, M., & Spearman, M. (2014). The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 107–112.

Chen, W., Zhong, Y., Su, R., Qi, H., Deng, W., Sun, Y., Ma, T., Wang, X., Yu, H., Wang, X., & Li, Z. (2017). N-glycan profiles in H9N2 avian influenza viruses from chicken eggs and human embryonic lung fibroblast cells. *Journal of Virological Methods*, 249, 10–20.



Chugh, K. (2015). Economics of seasonal influenza epidemics. *Current Medicine Research and Practice*, 5 (4), 161–162.

Clausen, H., Wandall, H. H., Steentoft, C., Stanley, P., & Schnaar R. L. (2017). Chapter 56, Glycosylation Engineering. In *Essentials of Glycobiology, 3rd edition*.

Cornelissen, L. A. H. M., de Vries, R. P., de Boer-Luijtz, E. A., Rigter, A., Rottier, P. J. M., & de Haan, C. A. M. (2010). A single immunization with soluble recombinant trimeric hemagglutinin protects chickens against highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *PLoS ONE*, 5 (5).

Cottey, R., Rowe, C. A., & Bender, B. S. (2001). Influenza virus. In *Current Protocols in Immunology* (Vol. 1, pp. 1–32). John Wiley and Sons.

Couture, M., Landry, N., Vezina, L.-P., & Dargis, M. (2014). Soluble recombinant influenza antigens. *US 8,771,703 B2*. United States.

Croset, A., Delafosse, L., Gaudry, J. P., Arod, C., Glez, L., Losberger, C., Begue, D., Krstanovic, A., Robert, F., Vilbois, F., Chevalet, L., & Antonsson, B. (2012). Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *Journal of Biotechnology*, 161 (3), 336–348.

Cruz, E., Cain, J., Crossett, B., & Kayser, V. (2017). Site-specific glycosylation profile of influenza A (H1N1) hemagglutinin through tandem mass spectrometry. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 0 (0), 1–10.

Das, S. R., Hensley, S. E., David, A., Schmidt, L., Gibbs, J. S., Puigbo, P., Ince, W. L., Bennink, J. R., & Yewdell, J. W. (2011). Fitness costs limit influenza A virus hemagglutinin glycosylation as an immune evasion strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(51), E1417–E1422.

de Vries, R. P., de Vries, E., Bosch, B. J., de Groot, R. J., Rottier, P. J. M., & de Haan, C. A. M. (2010). The influenza A virus hemagglutinin glycosylation state affects receptor-binding specificity. *Virology*, 403 (1), 17–25.

de Vries, R. P., Smit, C. H., de Bruin, E., Rigter, A., de Vries, E., Cornelissen, L. A. H. M., Eggink, D., Chung, N. P. Y., Moore, J. P., Sanders, R. W., Hokke, C. H., Koopmans, M., Rottier, P. J. M., & de Haan, C. A. M. (2012). Glycan-Dependent Immunogenicity of Recombinant Soluble Trimeric Hemagglutinin. *Journal of Virology*, 86 (21), 11735–11744.

Eggink, D., Goff, P. H., & Palese, P. (2014). Guiding the Immune Response against



Influenza Virus Hemagglutinin toward the Conserved Stalk Domain by Hyperglycosylation of the Globular Head Domain. *Journal of Virology*, 88 (1), 699–704.

Elbein, A. D., Kerbacher, J. K., Schwartz, C. J., & Sprague, E. A. (1991). Kifunensine inhibits glycoprotein processing and the function of the modified LDL receptor in endothelial cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288 (1), 177–184.

Gale, S., Liu, Y., Massare, M., & Singhvi, R. (2012). Modified influenza hemagglutinin proteins and uses thereof. *WO2012088428A1*. United States.

García-Sastre, A., Palese, P., Krammer, F., Pica, N., Eggink, D., Medina-Silva, R., & Hai R. (2015). Influenza virus vaccines and uses thereof. *US20150132330A1*. United States.

Gu, M., Li, Q., Gao, R., He, D., Xu, Y., Xu, H., Xu, L., Wang, X., Hu, J., Liu, X., Hu, S., Peng, D., Jiao, X., & Liu, X. (2017). The T160A hemagglutinin substitution affects not only receptor binding property but also transmissibility of H5N1 clade 2.3.4 avian influenza virus in guinea pigs. *Veterinary Research*, 48 (1), 7.

Hause, B. M., Stine, D. L., Sheng, Z., Wang, Z., Chakravarty, S., Simonson, R. R., & Lib, F. (2012). Migration of the swine influenza virus ??-cluster hemagglutinin N-linked glycosylation site from N142 to N144 results in loss of antibody cross-reactivity. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19 (9), 1457–1464.

Helenius, A., & Aebi, M. (2001). Intracellular Functions of N-Linked Glycans. *Science*, 291 (5512), 2364–2370.

Helenius, A., & Aebi, M. (2004). Roles of N-Linked Glycans in the Endoplasmic Reticulum. *Annual Review of Biochemistry*, 73 (1), 1019–1049.

Hervé, P. L., Lorin, V., Jouvion, G., Da Costa, B., & Escriou, N. (2015). Addition of N-glycosylation sites on the globular head of the H5 hemagglutinin induces the escape of highly pathogenic avian influenza A H5N1 viruses from vaccine-induced immunity. *Virology*, 486, 134–145.

Hutter, J., Rodig, J. V., Hoper, D., Seeberger, P. H., Reichl, U., Rapp, E., & Lepenies, B. (2013). Toward Animal Cell Culture-Based Influenza Vaccine Design: Viral Hemagglutinin N-Glycosylation Markedly Impacts Immunogenicity. *The Journal of Immunology*, 190 (1), 220–230.



Igarashi, M., Ito, K., Kida, H., & Takada, A. (2008). Genetically destined potentials for N-linked glycosylation of influenza virus hemagglutinin. *Virology*, 376 (2), 323–329.

Jacobsen, H., Rajendran, M., Choi, A., Sjursen, H., Brokstad, K. a, Cox, R. J., Palese, P., Krammer, F., & Nachbagauer, R. (2017). Influenza Virus Hemagglutinin Stalk- Specific Antibodies in Human Serum are a Surrogate Marker for In Vivo Protection in a Serum Transfer Mouse Challenge Model. *mBio*, 8 (5), 1–13.

Jennings, V. M. (1995). Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production. *Institute of Laboratory Animal Resources*, 37 (3), 119–125.

Kim, J. II, & Park, M. S. (2012). N-Linked Glycosylation in the Hemagglutinin of Influenza A Viruses. *Yonsei Medical Journal*, 53 (5), 886–893.

Krammer, F., Margine, I., Tan, G. S., Pica, N., Krause, J. C., & Palese, P. (2012). A carboxy-terminal trimerization domain stabilizes conformational epitopes on the stalk domain of soluble recombinant Hemagglutinin substrates. *PLoS ONE*, 7 (8).

Lambkin, R., McLain, L., Jones, S. E., Aldridge, S. L., & Dimmock, N. J. (1994). Neutralization escape mutants of type A influenza virus are readily selected by antisera from mice immunized with whole virus: A possible mechanism for antigenic drift. *Journal of General Virology*, 75 (12), 3493–3502.

Lannoo, N., & Van Damme, E. J. M. (2015). Review/N-glycans: The making of a varied toolbox. *Plant Science*, 239, 67–83.

Laver, W. G., Air, G. M., Webster, R. G., Gerhard, W., Ward, C. W., & Dopheide, T. A. A. (1979). Antigenic drift in type A influenza virus: Sequence differences in the hemagglutinin of Hong Kong (H3N2) variants selected with monoclonal hybridoma antibodies. *Virology*, 98 (1), 226–237.

Leon, P. E., Wohlbold, T. J., He, W., Bailey, M. J., Henry, C. J., Wilson, P. C., Krammer, F., & Tan, G. S. (2017). Generation of Escape Variants of Neutralizing Influenza Virus Monoclonal Antibodies. *Journal of Visualized Experiments*, 17 (4), 519–527.

Li, J., Sai, T., Berger, M., Chao, Q., Davidson, D., Deshmukh, G., Drozdowski, B., Ebel, W., Harley, S., Henry, M., Jacob, S., Kline, B., Lazo, E., Rotella, F., Routhier, E., Rudolph, K., Sage, J., Simon, P., Yao, J., Zhou, Y., Kavuru, M., Bonfield, T., Thomassen, M. J., Sass, P. M., Nicolaidis, N. C. & Grasso, L. (2006). Human antibodies for immunotherapy development generated via a human B cell hybridoma technology. *Proceedings of the*



National Academy of Sciences of the United States of America, 103 (10), 3557–62.

Lin, S. C., Jan, J. T., Dionne, B., Butler, M., Huang, M. H., Wu, C. Y., Wong, C. H., & Wu, S. C. (2013). Different Immunity Elicited by Recombinant H5N1 Hemagglutinin Proteins Containing Pauci-Mannose, High-Mannose, or Complex Type N-Glycans. *PLoS ONE*, 8 (6).

Liu, Y.-J., Wu, S.-L., Love, K. R., & Hancock, W. S. (2017). Characterization of Site-Specific Glycosylation in Influenza A Virus Hemagglutinin Produced by *Spodoptera frugiperda* Insect Cell Line. *Analytical Chemistry*, 89 (20), 11036–11043.

Maciola, A. K., Pietrzak, M. A., Kosson, P., Czarnocki-Cieciura, M., Śmietanka, K., Minta, Z., & Kopera, E. (2017). The length of N-glycans of recombinant H5N1 hemagglutinin influences the oligomerization and immunogenicity of vaccine antigen. *Frontiers in Immunology*, 8, 1–10.

Mair, C. M., Ludwig, K., Herrmann, A., & Sieben, C. (2014). Receptor binding and pH stability - How influenza A virus hemagglutinin affects host-specific virus infection. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838 (4), 1153–1168.

Manicassamy, B., Medina, R. A., Hai, R., Tsibane, T., Stertz, S., Nistal-Villán, E., Palese, P., Basler, C. F., & García-Sastre, A. (2010). Protection of mice against lethal challenge with 2009 H1N1 influenza A virus by 1918-like and classical swine H1N1 based vaccines. *PLoS Pathogens*, 6 (1).

Matsuoka, Y., Matsumae, H., Katoh, M., Einfeld, A. J., Neumann, G., Hase, T., Ghosh, S., Shoemaker, J. E., Lopes, T. J. S., Watanabe, T., Watanabe, S., Fukuyama, S., Kitano, H., & Kawaoka, Y. (2013). A comprehensive map of the Influenza A virus replication cycle. *BMC Systems Biology*, 7 (97), 1-18.

Medina, R. A., & García-Sastre A. (2011). Influenza A viruses: New research developments. *Nature Reviews Microbiology*, 9 (8), 590-603.

Medina, R. A., Stertz, S., Manicassamy, B., Zimmermann, P., Sun, X., Albrecht, R. A., Ussi-Kerttula, H., Zagordi, O., Belshe, R. B., Frey, S. E., Tumpey, T. M. & Garcia-Sastre, A. (2013). Glycosylations in the Globular Head of the Hemagglutinin Protein Modulate the Virulence and Antigenic Properties of the H1N1 Influenza Viruses. *Science Translational Medicine*, 5 (187), 187ra70-187ra70.

Meier, S., Güthe, S., Kiefhaber, T., & Grzesiek, S. (2004). Foldon, the natural



trimerization domain of T4 fibrin, dissociates into a monomeric A-state form containing a stable β -hairpin: Atomic details of trimer dissociation and local β -hairpin stability from residual dipolar couplings. *Journal of Molecular Biology*, 344 (4), 1051–1069.

Moustafa, I., Connaris, H., Taylor, M., Zaitsev, V., Wilson, J. C., Kiefel, M. J., von Itzstein, M., & Taylor, G. (2004). Sialic acid recognition by *Vibrio cholerae* neuraminidase. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (39), 40819–40826.

Nettleship, J. E. (2012). Structural Biology of Glycoproteins. In *Glycosylation* (pp. 41–62). INTECH.

Nischan, N., & Kohler, J. J. (2016). Advances in cell surface glycoengineering reveal biological function. *Glycobiology*, 26 (8), 1-8.

Palese, P. (2004). Influenza: old and new threats. *Nature Medicine*, 10(12s), S82–S87.

Parsons, L. M., An, Y., De Vries, R. P., De Haan, C. A. M., & Cipollo, J. F. (2017). Glycosylation Characterization of an Influenza H5N7 Hemagglutinin Series with Engineered Glycosylation Patterns: Implications for Structure-Function Relationships. *Journal of Proteome Research*, 16 (2), 398–412.

Reading, P. C., Tate, M. D., Pickett, D. L., & Brooks, A. G. (2007). Glycosylation as a Target for Recognition of Influenza Viruses by the Innate Immune System. In J. D. Lambris (Ed.), *Current Topics in Innate Immunity* (Vol. 598, pp. 279–292). Springer.

Rödig, J., Rapp, E., Djeljadini, S., Lohr, V., Genzel, Y., Jordan, I., Sandig, V., & Reichl, U. (2011). Impact of Influenza Virus Adaptation Status on HA N-Glycosylation Patterns in Cell Culture-Based Vaccine Production. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 30 (4–6), 281–290.

Rödig, J. V., Rapp, E., Genzel, Y., & Reichl, U. (2011). Impact of different influenza cultivation conditions on HA N-Glycosylation. *BMC Proceedings*, 5 (Suppl 8), P113.

Romanova, J., Katinger, D., Ferko, B., Voglauer, R., Mochalova, L., Bovin, N., Lim, W., Katinger, H., & Egorov, A. (2003). Distinct host range of influenza H3N2 virus isolates in Vero and MDCK cells is determined by cell specific glycosylation pattern. *Virology*, 307 (1), 90–97.

Schwarz, F., & Aebi, M. (2011). Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*, 21 (5), 576–582.

Schwarzer, J., Rapp, E., & Reichl, U. (2008). N-glycan analysis by CGE-LIF: Profiling



influenza A virus hemagglutinin N-glycosylation during vaccine production. *Electrophoresis*, 29 (20), 4203–4214.

Seeberger P. H., & Cummings, R. D. (2017). Chapter 57, Glycans in Biotechnology and the Pharmaceutical Industry. In *Essentials of Glycobiology*, 3rd edition.

Shaw, M. L., & Palese, P. (2013). Chapter 40 Orthomyxoviridae. In *Fields Virology*, 6th Edition (Vol. 1, pp. 1–54).

Sriwilaijaroen, N., & Suzuki, Y. (2012). Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 88 (6), 226–49.

Sun, S., Wang, Q., Zhao, F., Chen, W., & Li, Z. (2011). Glycosylation site alteration in the evolution of influenza a (H1N1) viruses. *PLoS ONE*, 6 (7).

Sun, S., Wang, Q., Zhao, F., Chen, W., & Li, Z. (2012). Prediction of biological functions on glycosylation site migrations in human influenza H1N1 viruses. *PLoS ONE*, 7 (2).

Sun, X., Jayaraman, A., Maniprasad, P., Raman, R., Houser, K. V., Pappas, C., ... Tumpey, T. M. (2013). N-Linked Glycosylation of the Hemagglutinin Protein Influences Virulence and Antigenicity of the 1918 Pandemic and Seasonal H1N1 Influenza A Viruses. *Journal of Virology*, 87 (15), 8756–8766.

Suptawiwat, O., Boonarkart, C., Chakritbudsabong, W., Uprasertkul, M., Puthavathana, P., Wiriyarat, W., & Auewarakul, P. (2014). The N-linked glycosylation site at position 158 on the head of hemagglutinin and the virulence of H5N1 avian influenza virus in mice. *Archives of Virology*, 160 (2), 409–415.

Tate, M. D., Brooks, A. G., & Reading, P. C. (2011). Specific Sites of N-Linked Glycosylation on the Hemagglutinin of H1N1 Subtype Influenza A Virus Determine Sensitivity to Inhibitors of the Innate Immune System and Virulence in Mice. *The Journal of Immunology*, 187 (4), 1884–1894.

Tate, M. D., Job, E. R., Brooks, A. G., & Reading, P. C. (2011). Glycosylation of the hemagglutinin modulates the sensitivity of H3N2 influenza viruses to innate proteins in airway secretions and virulence in mice. *Virology*, 413 (1), 84–92.

Tate, M. D., Job, E. R., Deng, Y. M., Gunalan, V., Maurer-Stroh, S., & Reading, P. C. (2014). Playing hide and seek: How glycosylation of the influenza virus



hemagglutinin can modulate the immune response to infection. *Viruses*, 6 (3), 1294–1316.

Tsai, T. (2011). Vaccines including antigen from four strains of influenza virus. *US 2011/0045022 A1*. United States.

Tropea, E. (1990). Kifunensine , a Potent Inhibitor Mannosidase I * of the Glycoprotein Processing. *Enzyme*, 265 (26), 15599–15605.

Tsuchiya, E., Sugawara, K., Hongo, S., Matsuzaki, Y., Muraki, Y., Li, Z. N., & Nakamura, K. (2002). Effect of addition of new oligosaccharide chains to the globular head of influenza A/H2N2 virus haemagglutinin on the intracellular transport and biological activities of the molecule. *Journal of General Virology*, 83 (5), 1137–1146.

Vigerust, D. J., & Shepherd, V. L. (2007). Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends in Microbiology*, 15 (5), 211–218.

Vigerust, D. J., Ulett, K. B., Boyd, K. L., Madsen, J., Hawgood, S., & McCullers, J. A. (2007). N-Linked Glycosylation Attenuates H3N2 Influenza Viruses. *Journal of Virology*, 81 (16), 8593–8600.

Wagner, R., Heuer, D., Wolff, T., Herwig, A., & Klenk, H. D. (2002). N-glycans attached to the stem domain of haemagglutinin efficiently regulate influenza A virus replication. *Journal of General Virology*, 83 (3), 601–609.

Wang, C. -C., Chen, J.-R., Tseng, Y.-C., Hsu, C.-H., Hung, Y.-F., Chen, S.-W., Chen, C.-M., Khoo, K.-H., Cheng, T.-J., Cheng, Y.-S. E., Jan, J.-T., Wu, C.-Y., Ma, C., & Wong, C.-H. (2009). Glycans on influenza hemagglutinin affect receptor binding and immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (43), 18137–18142.

Wanzeck, K., Boyd, K. L., & McCullers, J. A. (2011). Glycan shielding of the influenza virus hemagglutinin contributes to immunopathology in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183 (6), 767–773.

Webster, R. G., & Laver, W. G. (1980). Determination of the number of nonoverlapping antigenic areas on Hong Kong (H3N2) influenza virus hemagglutinin with monoclonal antibodies and the selection of variants with potential epidemiological significance. *Virology*, 104 (1), 139–148.

Weerapana, E., & Imperiali, B. (2006). Asparagine-linked protein glycosylation: From eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology*, 16 (6), 91–101.

Wei, C. -J., Xu, L., Kong, W.-P., Shi, W., Canis, K., Stevens, J., Yang, Z.-Y., Dell, A.,



Haslm, S. M., Wilson, I. A., & Nabel, G. J. (2008). Comparative Efficacy of Neutralizing Antibodies Elicited by Recombinant Hemagglutinin Proteins from Avian H5N1 Influenza Virus. *Journal of Virology*, 82 (13), 6200–6208.

Wei, C., Boyington, J. C., Dai, K., Houser, K. V, Melissa, B., Kong, W., Yang, Z., Tumpey, T. M., & Nabel, G. J. (2010). Cross-Neutralization of 1918 and 2009 Influenza Viruses: Role of Glycan in Viral Evolution and Vaccine Design. *Science Translational Medicine*, 2 (24), 1–16.

Weldon, W. C., Wang, B. Z., Martin, M. P., Koutsonanos, D. G., Skountzou, I., & Compans, R. W. (2010). Enhanced immunogenicity of stabilized trimeric soluble influenza hemagglutinin. *PLoS ONE*, 5 (9), 1–8.

Wrammert, J., Smith, K., Miller, J., Langley, W. A., Kokko, K., Larsen, C., Zheng, N. Y., Mays, I., Garman, L., Helms, C., James, J., Air, G. M., Capra, J. D., Ahmed, R., & Wilson, P. C. (2008). Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature*, 453 (7195), 667–671.

Wright, P. F., Neumann, G., & Kawaoka, Y. (2013). Chapter 41 Orthomyxoviruses. *Fields Virology, 6th Edition*, 1, 1–83.

Xu, R., Ekiert, D. C., Krause, J. C., Hai, R., Jr., J. E. C., & Wilson, I. A. (2010). Structural basis of pre-existing immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *Science*, 328 (5976), 357–360.

Zhang, X., Chen, S., Jiang, Y., Huang, K., Huang, J., Yang, D., Zhu, J., Zhu, Y., Shi, S., Peng, D., & Liu, X. (2015). Hemagglutinin glycosylation modulates the pathogenicity and antigenicity of the H5N1 avian influenza virus. *Veterinary Microbiology*, 175 (2–4), 244–256.

Zhang, X., Wang, X., Liu, X., Yang, D., Chen, S., Peng, D., & Zhu, J. (2015). Role of stem glycans attached to haemagglutinin in the biological characteristics of H5N1 avian influenza virus. *Journal of General Virology*, 96 (6), 1248–1257.

Zhang, Y., Zhu, J., Li, Y., Bradley, K. C., Cao, J., Chen, H., Jin, M., & Zhou, H. (2013). Glycosylation on Hemagglutinin Affects the Virulence and Pathogenicity of Pandemic H1N1/2009 Influenza A Virus in Mice. *PLoS ONE*, 8 (4), 1–9.

Zhao, D., Liang, L., Wang, S., Nakao, T., Li, Y., Liu, L., GUan, Y., Fukuyama, S., Bu, Z., Kawaoka, Y., & Chen, H. (2017). Glycosylation of the Hemagglutinin Protein of



H5N1 Influenza Virus Increases Its Virulence in Mice by Exacerbating the Host Immune Response. *Journal of Virology*, 91 (7), 1–14.

Zost, S. J., Parkhouse, K., Gumina, M. E., Kim, K., Diaz Perez, S., Wilson, P. C., Treanor, J. J., Sant, A. J., Cobey, S., & Hensley, S. E. (2017). Contemporary H3N2 influenza viruses have a glycosylation site that alters binding of antibodies elicited by egg-adapted vaccine strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114 (47), 201712377.