

## Construcción de un vector plasmídico para el estudio del proceso de fusión celular mediado por la glicoproteína fusogénica del Paramyxovirus SV5

Silvia María Aldana Salazar<sup>a</sup> Alberto Gómez Treviño<sup>a,b</sup>, Edgar Allan Blanco Gámez<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, Pedro de Alba s/n, San Nicolás de los Garza, N.L., México.

\* [silviaaldana29@hotmail.com](mailto:silviaaldana29@hotmail.com)

**Palabras clave:** proteína fusogénica, fusión celular, virus SV5.

### Introducción

Las glicoproteínas fusogénicas víricas son proteínas integrales de membrana que atraviesan la bicapa de lípidos en los virus con envoltura, las cuales tienen la función de unirse a células diana<sup>1</sup>. El reordenamiento conformacional y desencadenamiento de la proteína fusogénica F resulta en la fusión de membranas de células vecinas. Las etapas tempranas en el proceso de fusión de membranas incluyen la formación y expansión de poros de fusión<sup>2</sup>. La expresión de la glicoproteína fusogénica del Paramyxovirus SV5 clonada tiene como consecuencia la formación de masas de células fusionadas cuando se ensaya en cultivo celular, estos cúmulos de células se denominan sincitios y finalmente llevan a la muerte celular<sup>3</sup>. Poder cronometrar de manera fiel un proceso de fusión celular, permitiría obtener información valiosa, tal como el aprovechamiento de la formación de poros para la administración de fármacos antineoplásicos en células resistentes a los tratamientos. Este proyecto plantea la construcción de vectores plasmídicos de expresión conjunta de la glicoproteína fusogénica del Paramyxovirus SV5 y la proteína verde fluorescente GFP para monitorización del proceso de fusión celular.

### Parte experimental

La secuencia nucleotídica de la glicoproteína fusogénica del Paramyxovirus SV5, GenBank CAG44619.1 (1.8 kb) se amplificó mediante reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) empleando para ello los *primers* SV5-F up 5'ATG GGT ACT ATA ATT CAA TTT CTG 3' y SV5-F down 5'TCT TGT TCC AAG AGT TGC AG 3', en condiciones para ser clonada en el plásmido pcDNA3.1. Se clonó el fragmento de la proteína F amplificado en la versión unida al carboxilo terminal con la versión de dicho plásmido descrita como CT-GFP-TOPO, y una segunda versión unida al amino terminal definida como NT-GFP- TOPO. Una vez llevada a cabo la reacción de ligación se realizó transformación por choque térmico con *E. coli* HB101. Las clonas obtenidas por selección de resistencia a ampicilina fueron aisladas y sometidas a análisis de restricción enzimática para comprobación de presencia del inserto.

### Resultados y discusión

El fragmento de 1.8 kb amplificado por PCR fue clonado en cada uno de los vectores. La aparición de una banda en gel de agarosa (al 1%, 76 volts por 40 min) correspondiente a 7.2 kb indica la incorporación del fragmento amplificado en el plásmido de 5.4 kb. Mediante la reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se amplificó la secuencia de la glicoproteína fusogénica para ambos vectores y T7 y GFP para CT-GFP-TOPO y GFP y BGH para NT-GFP- TOPO. Se amplificaron ambos vectores en *E. coli* HB101.

Los miembros de la familia *Paramyxoviridae* requieren la co-expresión de proteínas de unión, pero la glicoproteína fusogénica F de SV5, es fusogénicamente activa y permite la fusión celular sin requerir la co-expresión de las proteínas de unión<sup>4</sup>. Se realizarán estudios de fusión celular con líneas celulares en cultivo para monitorizar el proceso de fusión.

### Conclusiones

- Se logró la construcción de los vectores plasmídicos para la expresión de la proteína F unida tanto al C- terminal y al N- terminal de la GFP.

### Referencias

1. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A., Medical Microbiology, (2009), Elsevier, Spain.
2. Aguilar, H. Henderson, B. Zamora, J. Johnston, G. Paramyxovirus Glycoproteins and the Membrane Fusion Process. *Virology* (2016) Springer International Publishing.
3. Gómez- Treviño, A., Mercade E., Estudio de la glicoproteína fusogénica (F) del paramyxovirus SV5 como nueva herramienta para eliminar células tumorales (2005) Ciencia UANL Vol II, No. 2
4. Dutch, R. E., Joshi, S. B. and Lamb, R. A. Membrane fusion promoted by increasing surface densities of the paramyxovirus F and HN proteins: Comparison of the fusion reactions mediated by Simian virus 5 F, Human parainfluenza virus type 3 F, and Influenza virus HA. (1998) *J. Virol.* 72:7745-7753.