

ESTUDIO DE LA GLICOPROTEÍNA FUSOGÉNICA (F) DEL PARAMYXOVIRUS SV5 COMO NUEVA HERRAMIENTA PARA ELIMINAR CÉLULAS TUMORALES

ALBERTO GÓMEZ TREVIÑO*, ELENA MERCADÉ GIL**

Las glicoproteínas de los virus con envuelta permiten la unión del virus con la célula blanco y median la entrada de éstos en el huésped respectivo. Para algunos virus es necesario y suficiente el producto de un solo gen, la proteína fusogénica (F), para presentar un efecto de fusión de las membranas cuando se expresa en células en cultivo; a diferencia de otros virus que requieren de al menos dos glicoproteínas para que se presente tal efecto.¹⁻⁶ El proceso de fusión requiere de condiciones de bajo pH posterior a la entrada del virus en la célula blanco para algunas familias víricas (*Orthomyxoviridae*, *Togaviridae* y *Rhabdoviridae*), o la unión a receptores específicos en condiciones de pH neutro para otras (*Paramyxoviridae*, *Retroviridae*, *Coronaviridae*). La glicoproteína F del paramyxovirus SV5 media la entrada del mismo en la célula huésped y provoca la fusión de ésta con las células de su entorno. Este proceso desencadena la aparición de masas de células fusionadas, denominadas sincitios. Esta glicoproteína se sintetiza como un precursor inactivo (F_0), mismo que se activa por hidrólisis durante su transporte en la red del aparato de Golgi en dos subunidades (F_1 y F_2) unidas por un puente disulfuro.⁷ El elemento clave para su función es una región hidrofóbica denominada péptido de fusión, que para la mayoría de los paramyxovirus se localiza en el extremo N-terminal de la subunidad F_1 .⁸ Se ha es-

tablecido que los péptidos de fusión se intercalan en la membrana celular desestabilizando la bicapa lipídica, creando condiciones propicias e induciendo así el proceso de fusión. Así generan sincitios a partir de una sola célula infectada, la cual termina fusionándose con las células de su entorno, para, finalmente, conducir a la muerte celular a causa de trastornos metabólicos y lisis de la membrana citoplasmática.⁹⁻¹⁴

Tanto por su mecanismo de acción como por su efecto, las glicoproteínas fusogénicas se perfilan como excelentes candidatas para su aplicación en terapia génica,¹⁵ especialmente en lo relacionado a la destrucción de tejidos tumorales. A la fecha, se han descrito algunas posibles aplicaciones de este tipo de proteínas, principalmente en relación a tratamientos contra el cáncer.¹⁶ Algunas de estas aplicaciones incluyen la expresión de la proteína G del rabdovirus de la estomatitis vesicular (VSV), una combinación de las proteínas F y H del virus del sarampión, o la proteína fusogénica del virus de la leucemia de gibones (GALV), las cuales, al demostrarse su potente efecto citotóxico, pueden ser explotadas para su aplicación en terapia.

* Facultad de Ciencias Químicas, UANL.

** Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona.

El mecanismo molecular por el cual las proteínas fusogénicas inducen la formación de sincitios polinucleados no se ha establecido por completo, y al mismo tiempo distintos autores reportan que la muerte celular es de tipo no apoptótico para las pruebas hechas en algunas líneas celulares, mientras que los ensayos en gliomas muestran claras evidencias de muerte por apoptosis.^{17,18}

Otro aspecto que es importante señalar respecto a las proteínas fusogénicas de membrana, y que las hace ideales para su aplicación en terapia génica, es que presentan un potente efecto *bystander*. Este efecto se define como la capacidad de inducir la muerte, o bien, el resultado de la expresión del gen introducido, no sólo en la célula transducida, sino en las células de alrededor. Rasgo que incluso abre la posibilidad de romper una de las principales limitaciones *per se* de la terapia génica. Aunque muchas de las expectativas que en sus inicios se tenían de la terapia génica no se han materializado aún,^{19,20} existe en la actualidad la necesidad de descubrir nuevos genes cuyas aplicaciones resulten benéficas en el diseño de nuevos tratamientos terapéuticos.

El virus SV5 pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, y su proteína F es parte indispensable en el mecanismo de entrada del virus en la célula blanco, el cual se lleva a cabo a pH neutro; si bien su mecanismo molecular no se ha descrito con exactitud, es capaz de inducir el proceso de fusión aun en ausencia de proteínas homotípicas de tipo hemaglutinina.²¹

En el presente estudio reportamos que la expresión del gen que codifica para la glicoproteína fusogénica de membrana del virus SV5, mediada por un vector adenoviral no replicativo, induce la fusión y la formación de sincitios en células tumorales, además presenta un potente efecto *bystander* comparable al del sistema convencional ganciclovir/timidina quinasa (GCV/TK). Asimismo, se presentan resultados de los estudios de ultraestructura de las células que expresan la proteína F.

Materiales y métodos

Líneas celulares y medios de cultivo

Para evaluar el efecto citotóxico de la glicoproteína F del paramyxovirus SV5 se utilizaron las siguientes líneas celulares (ATCC) humanas, cultivadas como se indica: células A-431 (carcinoma vulvar), BT-474 (adenocarcinoma de mama) y HeLa (adenocarci-

noma de cervix). Las células A-431 se mantuvieron en medio DMEM/Ham's F12 1:1 (v/v) adicionado con 10% de suero bovino fetal (SBF). Las células BT-474 se cultivaron en el mismo medio suplementado con 10% de SBF, 300 mg/l de L-glutamina y 10 mg/ml de insulina humana. Se hizo lo propio con las células HeLa, en medio MEM adicionado con 10% de SBF.

Construcción de vectores virales y transducción de células tumorales

Los cDNAs de la glicoproteína F del paramyxovirus SV5, la timidina quinasa (tk) del virus de herpes simple y la β -galactosidasa de *E. coli* (lacZ), fueron ligados a una señal de poliadenilación del Simian virus 40 y clonados *downstream* al promotor de citomegalovirus (CMV) en un plásmido pACCMVpLpA. Mediante cotransfección del plásmido pJM17 con sales de calcio en células 293 se generaron adenovirus recombinantes delecionados en la región E1.²² Una vez generadas las placas distintivas de adenovirus, su presencia se confirmó mediante PCR y análisis de restricción enzimática. Se amplificó cada una de éstas y se purificaron mediante ultracentrifugación en gradientes de cloruro de cesio. Para designarlas, a cada una se aplicó la técnica de titulación en placa con células 293. Los vectores generados se designaron con el prefijo Ad (adenovirus) y las siglas correspondientes a cada cDNA.

Para llevar a cabo la transducción de las líneas tumorales, se dispusieron células en placa y 24 horas después se expusieron al adenovirus correspondiente durante cuatro horas en medio libre de SBF a 37°C. Posteriormente, este medio se removió y se reemplazó con un medio adecuado para cultivo. La multiplicidad de infección (m.o.i.), es decir, el número de partículas víricas por célula, se determinó mediante infección con AdlacZ y tinción con 5-bromo-4-cloro-3-indoilo- β -D-galactopiranosido (X-gal).

Citotoxicidad

Las líneas celulares se dispusieron en placas de 24 pozos, 48 horas después se expusieron a los adenovirus AdF, Adtk o AdlacZ a 75 m.o.i., en preparaciones por cuadruplicado. A las 24 horas postransducción, las células infectadas con Adtk se incubaron en medio de cultivo con 5 μ g/ml de GCV. La viabilidad celular se determinó mediante el mé-

todo de exclusión con azul de tripano a los cinco días postransducción. La toxicidad mediada por F se llevó a cabo monitorizando el *time-course* en células A-431. Para este propósito, las células se infectaron con AdF o AdlacZ, como se describe anteriormente y se determinó la viabilidad celular por el mismo método durante diez días.

Efecto bystander

El efecto *bystander* se estableció mediante la viabilidad celular de poblaciones de células constituidas por diferentes porcentajes de células transducidas o no con AdF (75 m.o.i.). El efecto citotóxico de las células que expresaban F se comparó con el del sistema Adtk/GCV (75 m.o.i./5 µg/ml). Se utilizó el mismo modelo con AdlacZ para excluir citotoxicidad por la presencia del virus. Las células A-431 control se mezclaron con células transducidas en proporciones de 1:1, 10:1 y 100:1, respectivamente. Una vez hechas las mezclas, las células se dispusieron en placas de 24 pozos a una densidad que permitiera el contacto entre las mismas (3×10^5 células/pozo). Finalmente se determinó la viabilidad celular a los cinco días mediante el método de exclusión con azul de tripano.

Análisis de fusión celular mediante microscopía de fluorescencia y confocal

Para detectar la expresión de la glicoproteína F mediada por el adenovirus construido, se cultivaron células sobre cubreobjetos en placas de 24 pozos y las monocapas cerca de la confluencia se infectaron con AdF o AdlacZ (75 m.o.i.). La incubación se suspendió tres días después para fijar las células y practicar la inmunodetección correspondiente con un anticuerpo monoclonal (anti-F), según Gómez Treviño *et al.*²³ Debido a que los núcleos de las células fusionadas se aglomeran en el interior del sincitio, para evidenciarlos se llevó a cabo un comarcaje con yoduro de propidio (IP) y un tratamiento posterior con RNasa (10 mg/ml) a 37°C durante 15 minutos. Finalmente, las preparaciones se montaron en solución de Mowiol (Calbiochem). Se capturaron imágenes de doble fluorescencia y contraste de fases con CCD acoplado a un microscopio Leica DMRB con objetivo Plan Achromatic 63X/NA1.3. La digitalización y análisis de imágenes se hizo con el programa Metamorph (Universal Imaging, PA, USA).

Las muestras se analizaron también con un microscopio confocal Leica, con un objetivo HCX Plan Achromatic 63X/NA1.3. La excitación para Cy2 se llevó a cabo a 488 nm con láser de Ar modulado al 30%, con un filtro óptico ajustable Acousto (AOTF). Para el IP se empleó excitación a 543 nm con láser de He:Ne modulado al 50% con AOTF. La detección del espectro se determinó a 500-535 nm para Cy2 y 560-650 nm para el IP.

Se analizaron las monocapas al completo para cuantificar la formación de sincitios. Se contabilizaron células y núcleos para determinar el índice de fusión, el cual se calculó como sigue: $1 - (\text{número de células/número de núcleos})$.²⁴ Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Análisis por microscopía electrónica de transmisión e inmunomarcaje con oro de crio-secciones ultrafinas

Para el análisis por microscopía electrónica se prepararon células A-431 infectadas a 75 m.o.i. con AdF, AdlacZ, o bien, sin infectar, y se mantuvieron en cultivo durante tres días. A continuación se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en buffer PB 0.1 M (pH 7.4) a 4°C durante dos horas, después fueron sometidas a posfijación durante una noche con tetraóxido de osmio al 0.1% y ferricianuro de potasio al 0.8% en el mismo buffer. Posteriormente, las muestras se enfrentaron a gradientes de acetona para, finalmente, proceder a su montaje en resina Spurr. Se obtuvieron secciones ultrafinas con un ultramicrotomo Ultracut E (Reichert-Jung), mismas que se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Para su análisis se utilizó un microscopio electrónico de transmisión (H-800, Hitachi) operado a 100 KV.

Para llevar a cabo el marcaje de las crio-secciones, las monocapas se fijaron con una mezcla de paraformaldehído 2% y glutaraldehído 0.1% en PB a 4°C. Posteriormente, se lavaron con PB-Glicina 50 mM y embebidas en gelatina, inyectadas con sacarosa 2.3 M y congeladas en propano líquido. Para su conservación se mantuvieron en nitrógeno líquido. Las secciones para análisis se obtuvieron con un ultracriomicrotomo (Leica EM FCS, Viena, Austria) operando a -120°C. Las muestras obtenidas se recogieron en metil-celulosa al 2% y sacarosa 2.3 M.²³⁻²⁵ El inmunomarcaje con oro se practicó de acuerdo a Raposo *et al.*²⁶ Se utilizó un anticuerpo monoclonal (anti-F) como anticuerpo

primario (1:100) y uno *antimouse* (1:200, Dako) en *bridging* a proteína A acoplada a partículas de oro de 10 nm. Este material de análisis se contrastó en soporte de metil-celulosa con acetato de uranilo, y se observó en un microscopio electrónico Hitachi 600AB.

Resultados

Producción de vectores adenovirales

El método utilizado para la producción de los vectores fue compatible con la capacidad de la proteína F de SV5 para inducir la formación de sincitios. Las primeras placas virales aparecieron entre los cuatro y cinco días posteriores a la transfección. De manera previa al proceso de recombinación, los cultivos se monitorizaron a diario, y no se observó efecto tóxico alguno inducido por la expresión de la proteína F. Las placas virales se identificaron por el efecto característico de un adenovirus en un cultivo de células 293. El efecto citopático no sufrió bloqueo alguno, y finalmente se extendió por toda la monocapa de cultivo. Una vez comprobada la presencia del gen F en el vector generado, se amplificó este mismo en la línea celular 293, alcanzando títulos de 3.9×10^9 pfu/ml.

Expresión de la proteína F en células tumorales

Se demostró gran eficiencia en la infección de células tumorales utilizando el vector adenoviral AdF. Al emplear el virus AdlacZ como indicador, se reveló

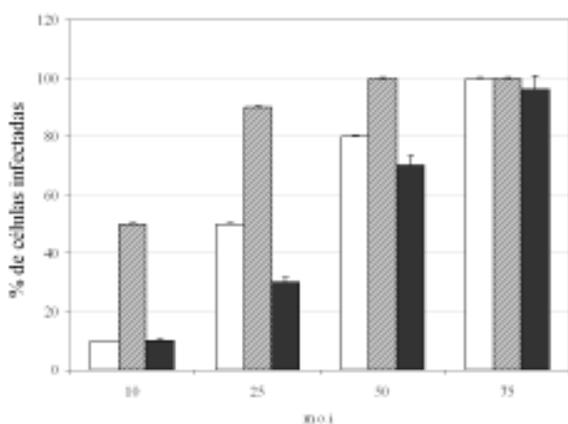


Fig. 1. Representación gráfica de la infectividad alcanzada con AdlacZ en cuatro horas de exposición de las líneas celulares tumorales a 10, 25, 50 y 75 m.o.i. Células HeLa (□), A-431 (■), BT-474 (■).

que un 90% de las células eran transducidas al aplicar 75 m.o.i., no mostrando efecto tóxico alguno la sola presencia del vector.

El análisis de inmunofluorescencia reveló que las células tumorales expresaban y transportaban F en la membrana celular, la que fue posible detectar a partir de las ocho horas posinfección (figura 2C). Se observaron extensas áreas de células fluorescentes a las 48 horas, mismas que progresaron a lo largo de la incubación para dar lugar a una sola célula fusionada (figura 2D). Esto se confirmó mediante tinción simultánea con IP. No se detectó señal de fluorescencia de fondo en los cultivos control ni en los tratados con AdlacZ (figuras 2A y 2B).

Formación de sincitios en células A-431

Para estudiar la formación de sincitios se realizó un doble marcaje, inmunofluorescencia indirecta e IP, en células A-431 a los tres días posinfección. Las figuras 3Ae y 3Af muestran las células por contraste de fases e IP, infectadas con AdF (75 m.o.i.). La expresión de la proteína F provocó la aparición de abundantes sincitios y un marcado efecto de fusión en esta línea celular. Las áreas con abundante aglomeración de núcleos respondió de manera positiva al marcaje con Anti-F Mab (figuras 3Ag y 3Ah). La exploración microscópica de la monocapa reveló

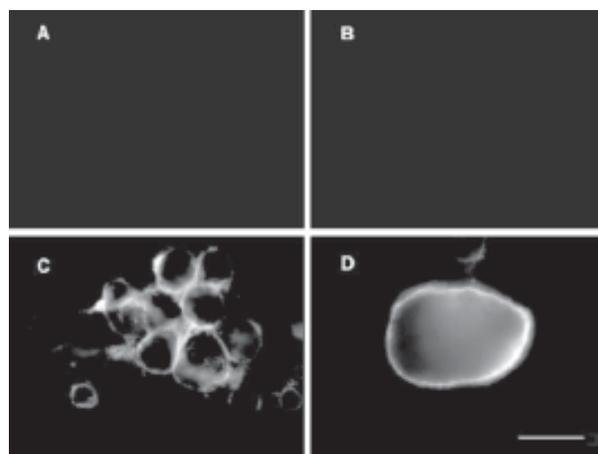


Fig. 2. Inmunofluorescencia de células A-431 transducidas con AdF y AdlacZ a 75 m.o.i. Las células se fijaron con PFA 3% y se marcaron con anticuerpo monoclonal anti-F y anticuerpo secundario acoplado a C y 2. Las imágenes fueron captadas con microscopio DMRB-Metamorph. A) Células control, B) células transducidas con AdlacZ, C y D) células transducidas con AdF a las ocho y 48 horas posinfección, respectivamente. Barra en D, 20 µm.

la presencia de abundantes zonas teñidas con cinco o más núcleos en el centro, incrementando con ello el índice de fusión que llegó a un máximo de 0.43 al tercer día de la infección (figura 3C).

Por el contrario, no se observaron sincitios y los núcleos presentaron siempre una distribución uniforme en las células infectadas con AdlacZ, que respondieron negativamente al enfrentarlas con el anticuerpo específico (figuras 3Aa-3Ad). Se obtuvieron los mismos resultados con las células control (no se muestran datos). Para confirmar la fusión de membranas mediadas por F, se analizaron células con el doble marcaje mediante microscopía confocal. La figura 3B ilustra una selección de secciones ópticas en planos xy y xz de un sincitio inducido en células A-431 mediante transducción con AdF. Se pudieron observar numerosas áreas con policariocitosis rodeadas por una membrana de intensa fluorescencia, correspondiendo a lo que se designa como sincitio, formado por células fusionadas.

No se observaron indicios de membranas entre los núcleos al observar estas zonas fusionadas mediante contraste de fases, a diferencia de lo evidente que resulta la división entre células confluentes no fusionadas. Las células control y las tratadas con AdlacZ tampoco mostraron respuesta al marcaje específico ni presentaron policariocitosis al ser analizadas con el microscopio confocal.

Citotoxicidad de la proteína F de SV5 y comparación con el sistema GCV/tk

La citotoxicidad de la proteína F se estableció mediante la viabilidad celular en cultivos de células A-431 tratados con AdF a 75 m.o.i. Los recuentos de viabilidad se llevaron a cabo durante diez días, y los resultados se compararon con los obtenidos con células control y células tratadas a la misma multiplicidad de infección con AdlacZ (figura 4A). La expresión de F provocó la aparición de sincitios durante las primeras 48 horas, llegando a su máximo a los tres días posinfección. Con ello, los sincitios progresivamente se desprendieron de la placa de cultivo. Además, se observaron células redondeadas no asociadas a sincitios que gradualmente perdieron viabilidad.

Finalmente, la muerte del total de las células del cultivo se comprobó a los diez días posinfección. Para establecer la potencia de la citotoxicidad de F en células tumorales, se comparó el efecto de su

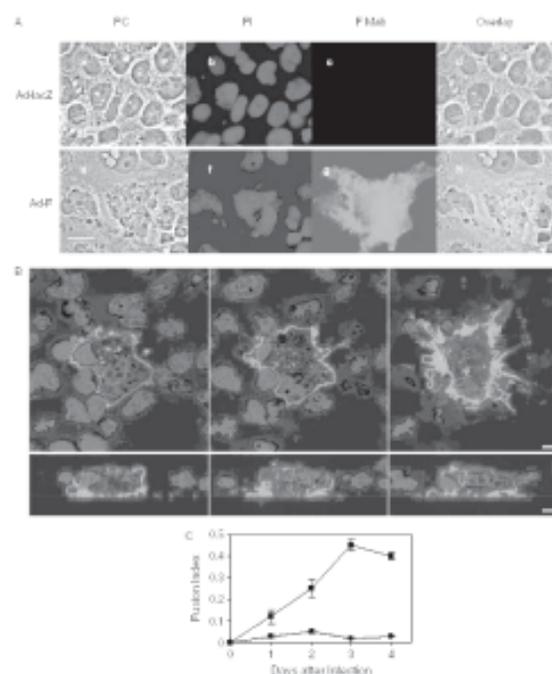


Fig. 3. Análisis del efecto de fusión mediante microscopía de fluorescencia y confocal. A) Imágenes de contraste de fases (PC), tinción con ioduro de propidio (PI), inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo específico (F Mab) y lámina de superposición, tomadas a los tres días posinfección a 75 m.o.i., de células A-431 tratadas con AdlacZ (a-d) o AdF (e-h). Barra en A, 20 μ m. B) Microscopía confocal de células A-431 transducidas con AdF (75 m.o.i.) a tres días posinfección. Se muestran una selección de tres secciones ópticas xy ($z = 1 \mu$ m) o xz ($y = 4 \mu$ m) de células con doble marcaje F Mab/PI. Barra en B, 10 μ m. C) Representación gráfica del índice de fusión para células A-431 transducidas con AdF (■) o (○).

expresión con el tratamiento basado en el sistema GCV/tk (figuras 4B-4D). De manera previa se determinó el efecto de la expresión de tk mediada por adenovirus en las líneas celulares elegidas, seleccionando una concentración de 5 μ g/ml de GCV y 75 m.o.i., como valores óptimos para la comparación de ambos métodos.

No se presentó efecto tóxico en ninguno de los cultivos tratados con AdlacZ. En contraste, la expresión de la proteína F de SV5 presentó un efecto tóxico remarcable en las tres líneas celulares ensayadas, mostrando una disminución de 90% en la viabilidad para las células A-431, 80% para las células BT-474 y 75% para las células HeLa. El tratamiento con GCV/tk para las mismas líneas celulares tuvo un efecto de disminución en la viabilidad de 95, 90 y 80%, respectivamente.

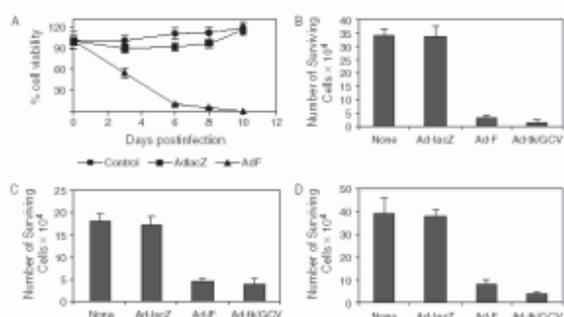


Fig. 4. Efecto citotóxico inducido por la expresión de la glicoproteína F de SV5. A) *Time-course* con células A-431 control, transducidas a 75 m.o.i., con AdF o AdlacZ. B, C y D) Citotoxicidad sobre células A-431, HeLa y BT-474, respectivamente; y comparación con el sistema GCV/tk a los cinco días post-infección.

Microscopía electrónica de células

Para analizar los cambios en la ultraestructura de células que expresaban la proteína F, se observaron más de una docena de secciones ultrafinas de células A-431 tratadas con 75 m.o.i. de AdF. Los cambios observados se contrastaron con las imágenes de células tratadas con AdlacZ y células control. Se realizaron tres experimentos de cada preparación, y las muestras se trataron de manera idéntica y simultáneamente para evitar artefactos. Las imágenes obtenidas revelan policariocitosis, confirmando lo observado previamente en el análisis por microscopía confocal. Es importante señalar que las células tratadas con AdF muestran una clara perturbación de la membrana citoplasmática en forma de continuas interrupciones en la integridad de la misma (figuras 5A y 5B). Lo anterior no se observó en las preparaciones utilizadas como controles, en las cuales la membrana aparece intacta (figuras 5C y 5D).

Las inmunodetecciones acopladas a partículas de oro en criosecciones se utilizaron para localizar la glicoproteína F en las células transducidas, del mismo modo se observó que solamente la membrana citoplasmática se presenta "decorada" con partículas de oro, especialmente en áreas de evidente discontinuidad (figura 5E). Las células utilizadas como controles no presentaron marcaje alguno (figura 5F), además de mostrar una completa integridad de la membrana citoplasmática.

Estos cambios guardan relación con la permeabilidad de la célula a causa de la presencia de F en su membrana. Lo anterior se comprobó con medi-

ciones del enzima LDH, cuyas concentraciones eran claramente superiores en el medio de cultivo de las células tratadas con AdF (no se muestran datos). Aunque es evidente el gran efecto de daño sobre la membrana celular, no se observaron grandes cambios en los núcleos, los cuales sólo mostraron una

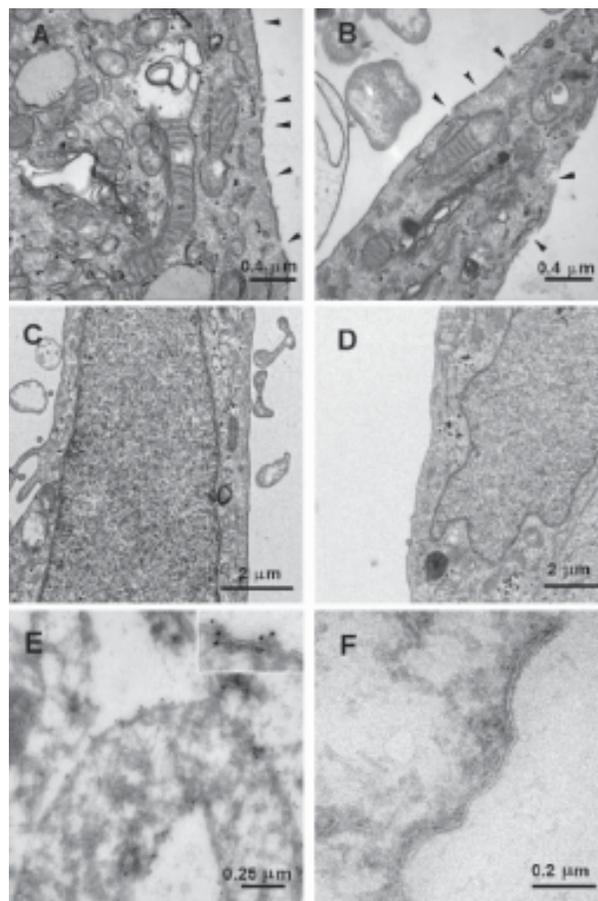


Fig. 5. Caracterización ultraestructural de células A-431 mediante microscopía electrónica. Las imágenes muestran los resultados de la observación de preparaciones ultrafinas de células tratadas con AdF a 75 m.o.i. (A y B), células control (C), y células tratadas con AdlacZ a 75 m.o.i. (D). Se puede apreciar una clara perturbación de la membrana citoplasmática que consiste en continuas interrupciones en la secuencia de la misma (flechas en A y B), para las células que expresan la proteína F. En contraste, las células no infectadas o tratadas con el virus control AdlacZ mantienen la integridad de la membrana. En el análisis de criopreparaciones con inmunomarcaje de partículas de oro de células A-431 que expresan F (E), y células tratadas con AdlacZ (F), se puede observar que las partículas de oro se detectan sólo en las células que expresan la glicoproteína fusogénica F. Lo anterior puede apreciarse con detalle en el recuadro amplificado en (E), contrastando con la total ausencia de marcaje en las células tratadas con el virus control AdlacZ.

ligera distorsión o deformación. Tampoco se detectaron células con señales de apoptosis.

Análisis del efecto *bystander*

La expresión de la proteína fusogénica F de SV5 mostró un marcado efecto *bystander* sobre células tumorales. Para ello se mezclaron en distintas proporciones células A-431 transducidas y no transducidas con AdF. Se dispusieron para su cultivo en una concentración tal que permitiera el contacto entre éstas. Entre 70-90% de las células murieron a razón de células F/células control de 1:1, 1:10 y 1:100, durante cinco días de contacto (figura 5A). El efecto *bystander* inducido por la proteína F fue similar al del sistema GCV/tk para la misma línea celular (figura 5B). Estos datos indican que la transducción del gen F mediada por un adenovirus no replicativo sobre una fracción de células es capaz de inducir la muerte en células no transducidas del entorno.

Discusión

En la actualidad existe gran interés por la búsqueda de nuevas drogas y terapias para el desarrollo de tratamientos efectivos contra el cáncer. Con este propósito se ha desarrollado en años recientes la aplicación de proteínas fusogénicas clonadas en vectores adecuados, todo ello con base en el efecto observado de estas mismas proteínas en los virus salvajes. Aun cuando su mecanismo molecular de acción no se haya descrito con exactitud, la aplica-

ción de proteínas fusogénicas o sus péptidos de fusión encuentran día con día nuevas posibilidades de aplicación.²⁷⁻²⁸

El presente estudio introduce por vez primera la aplicación de la glicoproteína fusogénica F del virus SV5 como agente citotóxico para eliminar células tumorales. Para la expresión de dicha proteína se generó un vector adenoviral recombinante no replicativo, el cual no presentó ningún efecto adverso en el proceso de recombinación debido a la capacidad fusogénica de la glicoproteína, obteniéndose además altos títulos en su amplificación. Lo anterior concuerda con lo reportado por Li y cols.,²⁹ quienes demostraron que la expresión de la glicoproteína fusogénica del HIV-1 es compatible con la replicación del adenovirus, además de incrementar la liberación de viriones generados en sincitios, si se le compara con los producidos en células normales. Se demostró que la expresión de la glicoproteína F de SV5 en la membrana celular es altamente citotóxica. Los cambios en las células, en cuanto a morfología y distribución, fueron evidentes a las 48 horas postransducción, y fue notoria la formación de sincitios que gradualmente perdieron viabilidad para, finalmente, desprenderse de la superficie de cultivo. La eficacia en la inducción de la muerte celular fue del mismo orden que la presentada por el sistema convencional GCV/tk, con la ventaja de no ser necesaria la adición de prodrogas. Aunque existen factores externos como el tipo de célula,³⁰ actividad de proteasas,⁷ y los receptores específicos en membrana,³¹ los cuales tienen un papel clave en la capacidad de fusión de las proteínas víricas F; la citotoxicidad observada fue similar en todas las líneas tumorales ensayadas. El efecto citotóxico se presentó siempre en mayor proporción a mediada que la densidad celular se incrementaba. Lo señalado anteriormente resulta comprensible si se piensa que es necesario el contacto entre células para que estas puedan fusionarse. La membrana de las células transducidas presentó marcadas interrupciones en su continuidad, progresando este efecto hasta una completa descomposición de la membrana citoplasmática. Se detectó además un incremento en la permeabilidad celular mediante mediciones de la pérdida del enzima LDH. Todo lo anterior coincide con el patrón general de comportamiento de las proteínas fusogénicas víricas y su capacidad para acumularse en la membrana formando agregados que promueven la formación de poros y la fusión. La sola

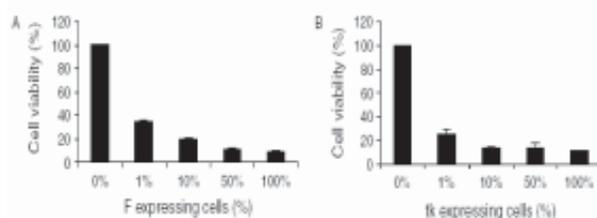


Fig. 6. Efecto *bystander* in vitro entre células A-431 transducidas y no transducidas con AdF (A), y comparación con el sistema convencional de terapia por activación de pro-droga GCV/tk. Para la evaluación en cada preparación se mezclaron células transducidas y no transducidas en las proporciones que se indican. El medio de cultivo de las células tratadas con Adtk se adicionó con GCV (5 µg/ml). La viabilidad celular se determinó a los cinco días posteriores a la preparación de las mezclas.

presencia de estos péptidos perturba la organización de la bicapa lipídica provocando pérdidas del contenido celular.³²⁻³⁵ Cuando la integridad de la membrana celular se ve comprometida se desencadenan numerosos cambios bioquímicos en las células que expresan F, lo que hace difícil el atribuir la muerte celular a un solo evento en particular. En nuestros experimentos, ya sean los estudios de microscopía electrónica, o bien, los resultados del análisis del ciclo celular; no se registró evidencia alguna de eventos apoptóticos en células tratadas con AdF, lo cual concuerda con lo revelado por Bateman y cols.¹⁶ Estos autores han experimentado con la expresión de otras proteínas fusogénicas, tal como la proteína del virus GALV, para la cual reportan un mecanismo de muerte celular no apoptótico en distintas líneas celulares de origen neoplásico. Un evento de interés en señalar es el hecho que la misma proteína expresada en líneas celulares de glioma en cultivo provoca la muerte del sincitio, formado mediante un mecanismo predominantemente apoptótico.¹⁸ Además, la sobreexpresión de la proteína F de SV5 provocó un aumento del número de células en la fase G₂ al hacer estudios del ciclo celular (no se muestran datos). Esta observación es congruente con el arresto en G₂ reportado para la glicoproteína de la envuelta del HIV, la cual induce la fusión del virus con la membrana celular.³⁶ Ambos eventos, necrosis y apoptosis, se han propuesto para explicar la muerte celular provocada por la expresión de las proteínas fusogénicas víricas, y aunque un factor importante a considerar es el tipo de línea celular, todo nos lleva a pensar que son necesarios más estudios enfocados a definirlos de manera detallada.

Además del efecto citotóxico, fue posible observar un efecto *bystander in vitro* sin decremento en la eficacia del mismo hasta en razón de células F/células control no menor de 1:10. El hecho de no haber utilizado un adenovirus replicativo prueba que el efecto no es debido a la diseminación del vector, sino al efecto fusogénico de la proteína F. La muerte de células de los alrededores no transducidas puede deberse a la incorporación de éstas en un sincitio inducido por una célula que expresa F, y a la acción de enzimas líticos liberados cuando la membrana celular y los orgánulos en el citoplasma se trastocan por efecto de la expresión de la glicoproteína F. Posiblemente, en opinión de algunos, el término efecto *bystander* no pueda ser del todo aplicable en este caso, pues generalmente se

utiliza en terapias del tipo suicida, donde se depende de la difusión de metabolitos tóxicos hacia células no transducidas con el gen de interés. Pero en el caso particular de las proteínas fusogénicas, se considera la formación de poros y el efecto de fusión como un efecto intrínseco, tal como se demuestra en los resultados de nuestros experimentos donde se requiere transducir sólo el 10% de las células para provocar la muerte de casi el total de la población celular.

Si bien no se exploran en este estudio, la proteína fusogénica de SV5 posee otros rasgos que incrementan su potencial como candidata para su aplicación en terapia génica. Uno de estos rasgos es que funciona como determinante antigénico,³⁷ de manera que su aplicación en el tratamiento de tumores podría tener un efecto altamente inmunoestimulador. Bateman y cols.,¹⁶ demostraron que la transducción de glicoproteínas fusogénicas está asociada al incremento en la aparición de signos de inmunoestimulación, y que la propia proteína se comporta como un potente inmunógeno. Con ello es posible que se presente además un cierto grado de especificidad por parte de algunas líneas tumorales en cuanto a la activación de la forma precursora (F₀). Este precursor se activa en la red *trans* del complejo de Golgi mediante proteasas, principalmente de tipo furina, para dar paso a la forma activa que consiste en las subunidades F₁ y F₂ unidas por un puente disulfuro. Las furinas se expresan a muy bajos niveles en tejidos humanos normales, a diferencia de los tejidos tumorales en los que se han detectado grandes cantidades de mRNAs de furina,³⁸⁻⁴⁰ lo cual podría contribuir a una mayor activación de las proteínas fusogénicas en los tumores ricos en este tipo de proteasas. Asimismo, la activación selectiva en tumores podría lograrse mediante modificaciones en la secuencia del sitio de corte, haciéndole susceptible además al ataque de otras proteasas, de manera que la actividad fusogénica sea dirigida a tipos específicos de células en ambientes tumorales en los que se encuentren las proteasas requeridas.^{41,42}

Todavía quedan muchas cuestiones por resolver antes de que sea factible la aplicación de la proteína fusogénica F del virus SV5 en la eliminación de células tumorales en humanos. Aún así, su demostrado efecto citotóxico y su potente efecto *bystander* sirven de base firme para dirigir estudios encaminados a modificar su selectividad, combinar sus efectos con la quimioterapia convencional, o bien, em-

plearle de manera conjunta con terapias suicidas de activación de prodrugs para incrementar la difusión de metabolitos tóxicos.

Resumen

La glicoproteína fusogénica (F) del paramyxovirus SV5 media la entrada del mismo en la célula huésped y provoca la fusión de ésta con las células de alrededor. Este proceso desencadena la aparición de masas de células fusionadas, denominadas sincitios, que conducen finalmente a la muerte celular a causa de trastornos metabólicos y lisis de la membrana citoplasmática.

Se construyeron vectores adenovirales no replicativos para expresar la glicoproteína F de SV5 en distintas líneas celulares de origen tumoral en cultivo. Los resultados de los ensayos muestran una alta citotoxicidad por parte de la glicoproteína F, comparable a la del sistema de terapia suicida GCV/tk. La inducción a la formación de sincitios se observa a las 48 horas posinfección, los cuales pierden viabilidad progresivamente. Se demostró también que la expresión de esta glicoproteína posee un potente efecto *bystander* hasta en razón de 1:100 sobre células no transducidas. Los estudios de microscopía confocal y electrónica muestran cambios morfológicos en las células transducidas que incluyen: vacuolización de mitocondrias, rarefacción del citoplasma, además de importantes daños en la membrana citoplasmática, mientras se preserva la estructura nuclear.

Estos resultados indican que la sobreexpresión de la glicoproteína F del paramyxovirus SV5 induce la muerte celular por alteración de la estructura de la membrana celular y la formación de sincitios no viables, lo cual puede utilizarse en la eliminación de células tumorales.

Palabras clave: Proteína fusogénica, SV5, Paramyxovirus, Citotoxicidad, Sincitio, Efecto *bystander*, Células tumorales, Membrana celular.

Abstract

The fusogenic (F) membrane glycoprotein of the paramyxovirus SV5 allows this virus to enter host cells and mediates fusion between neighboring cells, leading to cell death. F glycoprotein is synthesized as an inactive precursor (F_0) that is cleaved by cellular protease furine to form the active heterodimer F_1 - F_2 .

The active protein can induce syncytium formation in absence of another integral glycoprotein (HN), a property that appears to be unique among paramyxoviruses. We constructed a non-replicative adenovirus to express the SV5 F protein in tumor cells. Its fusion capacity was analyzed by fluorescent and confocal microscopy. The cell viability and bystander effect were compared with the thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapy. The structure of F-expressing cells was studied using electron microscopy. F glycoprotein expression induced syncytium formation in a maximum time of 48 hours, after which syncytia progressively lost viability and detached. The cell membrane was disrupted while the nuclear structure was preserved. Over-expression of the SV5 F protein in tumor cells led to high cytotoxicity comparable with that associated with the thymidine kinase/ganciclovir. A potent bystander killing effect was detected with a ratio of F-transduced to non-transduced cells of up to 1:100. These results indicate that the fusogenic glycoprotein of the paramyxovirus SV5 could be used to eliminate tumor cells and may encourage studies aimed at modifying its selectivity and combining its expression with other cytotoxic strategies to improve their efficiency.

Keywords: Fusogenic Glycoprotein, SV5, Paramyxovirus, Cytotoxicity, Tumor cell, Syncytia, Cell membrane, Bystander effect.

Referencias

1. Deng R, Wang Z, Mirza AM, Iorio RM. Localization of a domain on the paramyxovirus attachment protein required for the promotion of cellular fusion by its homologous fusion protein spike. *Virology*. 1995; 209: 457–469.
2. Horvath CM, Paterson RG, Shaughnessy MA, Wood R, Lamb RA. Biological activity of paramyxovirus fusion proteins: factors influencing formation of syncytia. *J Virol* 1992; 66: 4564–4569.
3. Hu X, Ray R, Compans RW. Functional interactions between the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza viruses. *J Virol* 1992; 66: 1528–1534.
4. Tanabayashi K, Takeuchi K, Okazaki K, Hishiyama M, Yamada A. Expression of mumps virus glycoproteins in mammalian cells from

- cloned cDNAs: both F and HN proteins are required for cell fusion. *Virology* 1992; 187: 801–804.
5. Tong S, Compans RW. Alternative mechanisms of interaction between homotypic and heterotypic parainfluenza virus HN and F proteins. *J Gen Virol* 1999; 80: 107–115.
 6. Wild TF, Malvoisin E, Buckland R. Measles virus: both the hemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J Gen Virol* 1991; 72: 439–442.
 7. Klenk HD, Garten W. Activation cleavage of viral spike proteins by host proteases. In *Cellular Receptors for Animal Viruses*, Wimmer E (ed.). NT: Cold Spring Harbor, 1994; 241–280.
 8. Lamb RA, Kolakofsky D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds). Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, 1996.
 9. Martin I, Ruyschaert JM. Common properties of fusion peptides from diverse systems. *Biosci Reports* 2000; 20: 483–500.
 10. LeDuc DL, Shin Y-K. Insights into a structured-based mechanisms of viral membrane fusion. *Biosci Reports* 2000; 20: 557–570.
 11. Melikyan GB, Chernomordik LV. Membrane rearrangements in fusion mediated by viral proteins. *Trends Microbiol* 1997; 5:349–355.
 12. PeuvotJ, SchanckA, LinsL, BrasseursR. Are the fusion processesinvolved in birth, life and death of the cell depending on tilted insertion of peptides into membranes? *J Theor Biol* 1999; 198: 173–181.
 13. Skehel JJ, Wiley DC. Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell* 1998; 95: 871–874.
 14. Lamb RA. Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology* 1993; 197: 1–11.
 15. Dzau VJ, Mann MJ, Morishita R, Kaneda Y. Fusigenic viral liposome for gene therapy in cardiovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 11 421–11 425.
 16. Bateman A, Bullough F, Murphy S, et al. Fusogenic membrane glycoproteins as a novel class of genes for the local and immune-mediated control of tumor growth. *Cancer Res* 2000; 60: 1492–1497.
 17. Higuchi H, Bronk SF, Bateman A, Harrington K, Vile RG, Gores GJ. Viral fusogenic membrane glycoprotein expression causes syncytia formation with bioenergetic cell death: implications for gene therapy. *Cancer Res* 2000; 60: 6396–6402.
 18. Galanis E, Bateman A, Johnson K, et al. Use of viral fusogenic membrane glycoproteins as novel therapeutic transgene in gliomas. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 811–821.
 19. Gómez J, Curiel DT, Douglas JT. Gene therapy for cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35: 867–885.
 20. Vile RG, Russell SJ, Lemoine NR. Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene Ther* 2000; 7: 2–8.
 21. Baker K, Dutch RE, Lamb RA, Jardetzky TS. Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion. *Mol Cell* 1999; 3: 309–319.
 22. Becker TC, Noel RJ, Coats WS, et al. Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. *Methods Cell Biol* 1994; 5: 161–189.
 23. Gómez-Treviño A, Castel S, López-Iglesias C, Cortadellas N, Comas-Riu J, Mercadé M. Effects of adenovirus-mediated SV5 fusogenic glycoprotein expression on tumour cells. *The Journal of Gene Medicine* 2003. 5 (6):483–492.
 24. Frey S, Marsh M, Gunther S, et al. Temperature dependence of cell-cell fusion induced by the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1995; 69: 1462–1472.
 25. Liou W, Geuze HJ, Slot JW. Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem Cell Biol* 1996; 106: 41–58.
 26. Raposo G, Kleijmeer MJ, Posthuma G, Slot JW, Geuze HJ. Immunolabeling of ultrathin cryosections: application in immunology. In *Handbook of Experimental Immunology*, vol. 4, Herzenberg LA, Weir D, Blackwell C (eds). Blackwell Science: Cambridge, MA, 1997; 1–11.
 27. Russell SJ. Replicating vectors for gene therapy of cancer: risks, limitations and prospects. *Eur J Cancer* 1994; 30A: 1165–1171.
 28. Dutch RE, Jardetzky TS, Lamb RA. Virus membrane fusion proteins: biological machines that undergo a metamorphosis. *Biosci Reports* 2000; 20: 597–612.
 29. Li H, Haviv YS, Derdeyn CA, et al. Human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation is compatible with adenovirus replication and facilitates efficient

- dispersion of viral gene products and *de novo* synthesized virus particles. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 2155–2165.
30. Kemble GW, Danieli T, White JM. Lipid-anchored influenza hemagglutinin promotes hemifusion, not complete fusion. *Cell* 1994; 76: 383–391.
 31. Kinnunen PKJ, Holopainen JM. Mechanisms of initiation of membrane fusion: role of lipids. *Biosci Reports* 2000; 20:465–482.
 32. Epand RM. Lipid polymorphism and protein lipid interactions. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1376: 353–368.
 33. Kruijtz JAW, Liskamp RMJ, de Kruijff B, Killian A. Sensitivity of single membrane-spanning R-helical peptides to hydrophobic mismatch with a lipid bilayer: effects on backbone structure, orientation and extent of membrane incorporation. *Biochemistry* 2001; 40: 5000–5010.
 34. Nir S, Nieva JL. Interactions of peptides with liposomes: pore formation and fusion. *Prog Lipid Res* 2000; 39: 181–206.
 35. Rinia A, Kik RA, Demel RA, *et al.* Visualization of highly ordered striated domains induced by transmembrane peptides in supported phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry* 2000; 39: 5852–5858.
 36. Kolesnitchenko V, Wahl LM, Tian H, *et al.* Human immunodeficiency virus 1 envelope-initiated G2-phase programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 11 889–11 893.
 37. Paterson RG, Lamb RA, Moss B, Murphy BR. Comparison of the relative roles of the F and HN surface glycoproteins of the paramyxovirus Simian virus 5 in inducing protective immunity. *J Virol* 1987; 61: 1972–1977.
 38. Mbaky M, Sirois F, Yao J, Seidah NG, Chretien M. Comparative analysis of expression of the protein convertases furin, PACE4, PC1 and PC2, in human lung tumours. *Br J Cancer* 1997; 75: 1509–1514.
 39. Cheng M, Watson PH, Paterson JA, Seidah N, Chretien M, Shiu R. Pro-protein convertase gene expression in human breast cancer. *Int J Cancer* 1997; 71: 966–971.
 40. Schalke JA, Roebroek JM, qomen PPCA, *et al.* Fur gene expression as a discriminating marker for small cell and nonsmall cell lung carcinomas. *J Clin Invest* 1987; 80:1545–1549.
 41. Nilson BH, Morling FJ, Cosset FL, Russell SJ. Targeting of retroviral vectors through protease-substrate interactions. *Gene Ther* 1996; 3:280–286.
 42. Peng KW, Vile R, Cosset FL, Russell SJ. Selective transduction of protease-rich tumors by matrix-metalloproteinase-targeted retroviral vectors. *Gene Ther* 1999; 6: 1552–1557.