



FORMACIÓN DE PORO EN MEMBRANA CELULAR POR MEDIO DE LA PEQUEÑA GLICOPROTEÍNA DE SECRECIÓN DEL VIRUS DE EBOLA ZAIRE

Nury Esperanza Vargas-Alejo¹; Clara Andrea Rincón-Cortés¹;
Edgar Antonio Reyes-Montaño²

¹ Facultad de Ciencias y Educación, Proyecto Curricular de Licenciatura en Química,
KR 3 N° 26-40, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá D.C.

² Facultad de Ciencias, Departamento de Bioquímica y Nutrición, Grupo de Investigación Bioquímica
Computacional y Estructural, Pontificia Universidad Javeriana
Cra. 7ª N° 42-27, Bogotá D.C.

ereyes@javeriana.edu.co; rinconc@javeriana.edu.co

RESUMEN

Uno de los patógenos capaces de inducir fiebres hemorrágicas es el virus de Ebola, clasificado en la familia filoviridae con cuatro subtipos, de los cuales el más analizado es el subtipo de Ebola Zaire, identificando en su genoma siete proteínas estructurales y una de secreción denominada pequeña glicoproteína de secreción del virus de Ebola Zaire.

Utilizando las herramientas de bioinformática y los diferentes estudios realizados al virus de Ebola Zaire a escala estructural y funcional, se logró predecir la estructura terciaria de su pequeña glicoproteína de secreción (SSGP EBO-Z). Basados en esta estructura se generó un posible modelo del mecanismo de entrada del virus de Ebola Zaire a la célula huésped, donde juegan un papel importante los receptores y ligandos de la membrana celular; permitiendo a la vez explicar los daños patológicos encontrados en los pacientes.

Palabras clave: bioinformática, célula, estructura, glicoproteína, ligando, proteína, receptores, virus

ABSTRACT

One of the pathogens able to produce haemorrhagic fevers is Ebola virus, classified in the Filoviridae family, which has four sub-types, the most analyzed of which is the Zaire sub-type. The genome of this virus contains the information of seven structural proteins and one non-structural glycoprotein called Small Secretion Glycoprotein of the Ebola Zaire virus (SSGP). Using bioinformatic tools and previous studies about the Ebola virus, we predicted the tertiary structure of the small secretion glycoprotein (SSGP EBO-Z), and based on that, we generated a model to explain the mechanism by which the virus enters host cells, where receptors of the cell surface play an important role. This provided an explanation for the symptoms and pathological damage found in patients.

Key words: bioinformatics, cell, glycoprotein, protein, receivers, structure, tiing, virus

INTRODUCCIÓN

Las fiebres hemorrágicas son producidas por varios patógenos virales, uno de estos

es el virus de Ebola (EBO); clasificado en la familia Filoviridae, con un solo género Filovirus, perteneciente al orden Mononegaviral. De este virus se han esta-

blecido cuatro subespecies: Ebola Sudan, Ebola Reston, Ebola Zaire y Ebola Tai (Caddell *et al.*, 1997).

Estos virus producen una enfermedad que se ha encontrado en humanos y primates, presentando una mortalidad entre el 50 y 90% de las personas infectadas (Volchkov *et al.*, 1998).

El genoma del virus de Ebola consiste en una cadena negativa de RNA simple no segmentada (NNS-RNA) no poliadenilada, con un arreglo lineal de genes y con ocurrencia de solapamientos. El orden del genoma es: 3'-región sin traducir, Nucleoproteína (NP), Proteína Viral estructural VP35, VP40, Glicoproteína (GP), VP30, VP24, Polimerasa L, 5'- región sin traducir. Con respecto a su GP, se caracteriza por ser una proteína de superficie, sintetizada como una molécula precursora que está unida a dos subunidades, la GP₁ y la GP₂ probablemente asociadas por enlace disulfuro, su gen es el cuarto (de siete) presentando dos marcos abiertos de lectura (ORFs); el cual produce una proteína de secreción, denominándose "Pequeña Glicoproteína de Secreción no Estructural del virus de Ebola (SSGP)" reportada por Sánchez con el número accession AAC57990 (Sánchez *et al.*, 1998).

La estructura secundaria y posible función de la SSGP se logró establecer en el año de 1999 cuando Reyes y Lareo de la Pontificia Universidad Javeriana de Colombia utilizaron las herramientas de Biología Molecular Computacional, para la identificación de las características de la SSGP.

METODOLOGÍA

Una de las necesidades primordiales para el desarrollo de este trabajo es hallar la secuencia de aminoácidos o estructura primaria de la SSGP-EBOZ, la cual se obtiene por medio de su código de accession

AAC57990. Una vez obtenida la secuencia correspondiente de la SSGP-EBOZ realizar el alineamiento por medio de BLASTP, determinando las secuencias de aminoácidos proteínas con mayor similaridad a SSGP-EBOZ. Posteriormente con base a los resultados obtenidos en BLASTP predecir características estructurales como el peso molecular, punto isoeléctrico, péptido señal, su comportamiento hidrofóbico y accesible y los motivos funcionales (Print y Block) tanto para la SSGP-EBOZ como para sus proteínas similares determinadas anteriormente, por medio de ExPasy y Motif respectivamente, seleccionando las proteínas con mayor similaridad a la SSGP-EBOZ.

Posteriormente con ayuda de las proteínas más similares al SSGP-EBOZ, predecir su estructura tridimensional, identificando los dominios que posean interacciones con los receptores de membrana celular, y así generar y/o plantear un posible mecanismo de entrada y posterior infección del virus Ebola - Zaire a la célula huésped, destacando el papel de la SSGP-EBOZ.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La secuencia usada de la Pequeña Glicoproteína de Secreción del Virus de Ebola Zaire en esta investigación es la reportada por Anthony Sánchez, la cual consta de 364 aminoácidos, identificando el péptido señal, para obtener la proteína madura que consta de 338 aminoácidos, con un peso molecular de 38KDa, un punto isoeléctrico de 8,98 y mostrando diferentes comportamientos de hidrofobicidad y accesibilidad a lo largo de su estructura.

El siguiente paso fue la determinación de bloques y prints, posteriormente se realizó una selección de las proteínas con mayor similaridad a SSGP-EBO-Z, teniendo en cuenta, la cantidad de aminoácidos, pesos moleculares, puntos isoeléctrico,

hidrofobicidad, accesibilidad, alineamiento en Laling, bloques y dominios de cada una de las proteínas.

En el diseño de la posible estructura tridimensional de la SSGP EBO-Z se realizó con la búsqueda de la estructura tridimensional de cada uno de los segmentos más similares por medio de Swiss Model. Posteriormente se realizaron mutaciones correspondientes a cada uno de estos segmentos a través de SwisPDB-Viwer, en el cual también se logró unir cada segmento hasta obtener la estructura tridimensional de la SSGP EBO-Z completa (figura 1).

Teniendo como base la posible estructura tridimensional (3D) de SSGP EBO-Z, se puede observar cómo se conservan las propiedades de accesibilidad e hidrofobicidad confirmándose en la estructura 3D ya que en esta región se observan hélices alfa explicando este comportamiento. Mientras que los aminoácidos más accesibles son predominantemente expuestas al medio, confirmándose que su estructura 3D es principalmente en los extremos hojas beta y Vueltas al Azar. Reafirmando la predicción de la estructura secundaria, donde la mayor parte de las secuencias tiene tendencia a hojas beta y en la parte central hélices alfa (Reyes *et al.*, 1999).

Con base en la posible estructura 3D de SSGP EBO-Z se puede predecir un mecanismo de entrada del virus de Ebola Zaire a célula huésped mediado por esta glicoproteína, debido a que en su estructura se presentan varios dominios o segmentos que ayudan al mecanismo de la interacción con membrana, los cuales son (figura 2):

1. Reconocimiento, unión al receptor de la matriz extracelular e inactivación del factor de crecimiento endotelial por parte del dominio de desintegrina.
 2. Formación del complejo CTLA-4, el cual desvía e inhibe la respuesta inmune de la célula huésped.
 3. Interacción de los dominios de integrina con los receptores de la membrana celular permitiendo la desestabilización de la laminina.
 4. Perforación de la membrana celular por parte del dominio de citolisina.
 5. Una vez abierto el poro se permite la entrada del virus y la fácil movilización dentro de la célula por la desestabilización de la laminina.
 6. Activación del factor de crecimiento endotelial, y posterior cierre del poro por parte del dominio de desintegrina.
 7. Llegada del virus al sitio de replicación uniéndose al RNA mensajero del huésped por interacción con los extremos cohesivos.
 8. Se producen varias copias del virus, el cual utiliza la membrana celular del huésped para poder infectar otras células sin ser atacado por el sistema inmune del huésped, ayudado por las interacciones celulares en el tejido.
 9. Separación celular por medio del descenso en el nivel de cadherina y grave daño al tejido, debido a la alteración de los receptores celulares modificando así el mecanismo de coagulación sanguínea.
 10. Manifestaciones clínicas. Reflejándose con hemorragia, fiebre, epidermolosis ampollosa, daño hepático, renal, vascular y en la retina ocular, debido a la separación celular en los tejidos.
- Según las funciones establecidas para cada dominio presente en la posible estructura tridimensional de SSGP EBO-Z se puede comprobar su acción: como *desintegrina* al separar las células entre sí, como una

citolisina al encontrar células “fantasmas” y espacios sin ninguna célula en un campo visual (foto 1), su acción sobre cualquier tipo de célula sin ser específica (Reyes *et al.*, 1999), puede interactuar con el sistema inmune a un nivel celular y humoral, donde los anticuerpos de alta afinidad son dirigidos contra la porción NH₂-Terminal de la GP (Sánchez *et al.*, 1996).

CONCLUSIÓN

Cada uno de los dominios pertenecientes a la estructura tridimensional de la SSGP EBO-Z, desempeñan conjuntamente funciones específicas que permiten la entrada del virus a la célula huésped y la posterior infección ya que funcionan como integrinas, citolisinas, desintegrina, factor de crecimiento y su capacidad de formar un complejo con los linfocitos citotóxicos T, por lo cual las manifestaciones clínicas debido a la infección por este virus pueden ser ocasionadas por su proteína de secreción.

AGRADECIMIENTOS

A Leonardo Lareo, por la colaboración prestada durante el desarrollo del trabajo, igualmente el grupo de investigación Bioquímica Estructural Computacional y Bioinformática de la Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, por su interés frente al tema, por último al proyecto curricular de Licenciatura en Química de la Facultad de Ciencias y Educación, por capacitarnos y llevar a cabo este trabajo en la Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

LITERATURA CITADA

CADDELL, A. 1997. Ebola WHO Press Release. Health Communications and Public

Relations. follows; McPheat; Minshull; Moore; Paupit; Rowsell; Stacey; Stanway; Taylor and Abbott. *Biochemistry Journal*, 359: 427-434.

REYES, E.; LAREO L. 1999. *Predicción de estructura y función de la pequeña glicoproteína de secreción del virus de Ebola*. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

SÁNCHEZ, K.; HOLLOWAY, A. 1993. Sequence analysis of the Ebola virus Genome: Organization, genetic elements and comparison with the genome of Marburg virus. *Virus res.* 2: 215-240.

SÁNCHEZ, A.; KILEY, M.; HOLLOWAY, B.; AUPEPIN, D. 1998. Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus. *Virus Research.* 29: 215-240.

SÁNCHEZ, A.; YANG, Z.; XU, L.; NABEL, G.; CREWS, T.; PETERS, C. 1998. Biochemical Analysis of the Secreted and Virion Glycoproteins of Ebola Virus. *Journal of Virology.* 72: 6442-6447.

VOLCHKOV, V.; SLENCZKA, K. 1998. Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5762-5767.

VOLCHKOV, V.; VOLCHKOVA, V.; SLENCZKA, W.; KLENK, H.; FELDMANN, H. 1998. Release of Viral Glycoproteins during Ebola Virus Infection. *Virology.* Volumen. 245: 110-119.

Recibido: 17-09-2004

Aceptado: 18-08-2004



FIGURA 1. Primera estructura tridimensional propuesta de la SSGP EBO-Z.

Color negro indica las hojas beta, color gris las hélices alfa, gris y negro intercalado indican las vueltas al azar

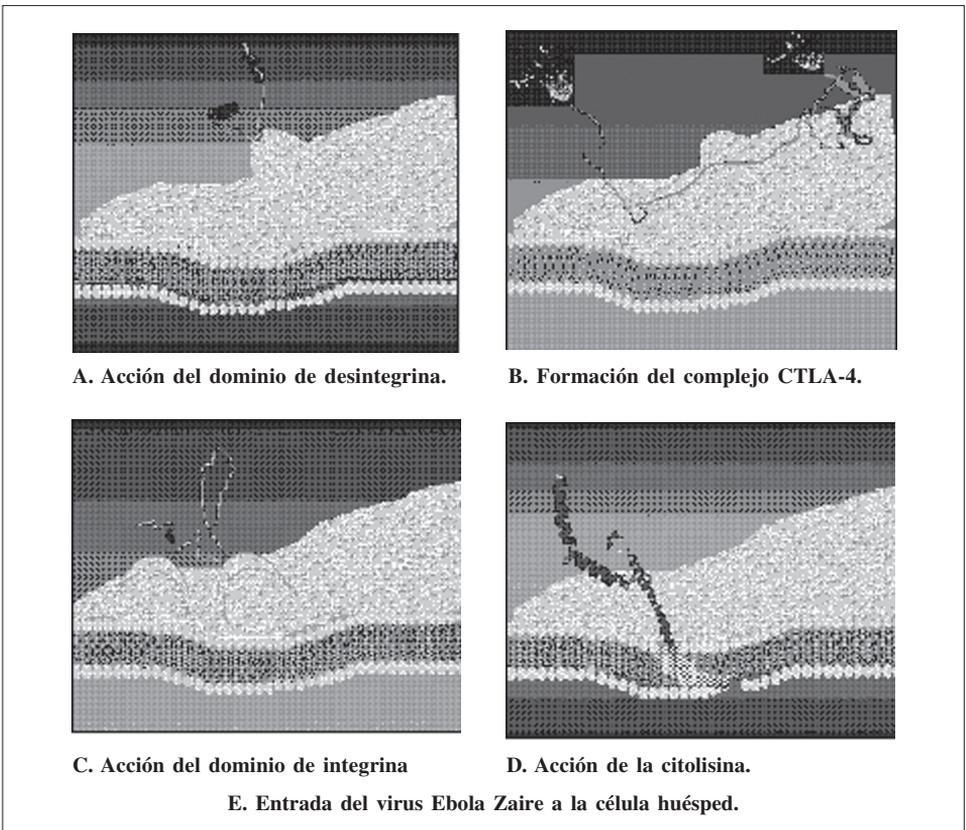


FIGURA 2. Mecanismo de entrada del virus de Ebola Zaire a célula huésped, mediado por la SSGP BO-Z.

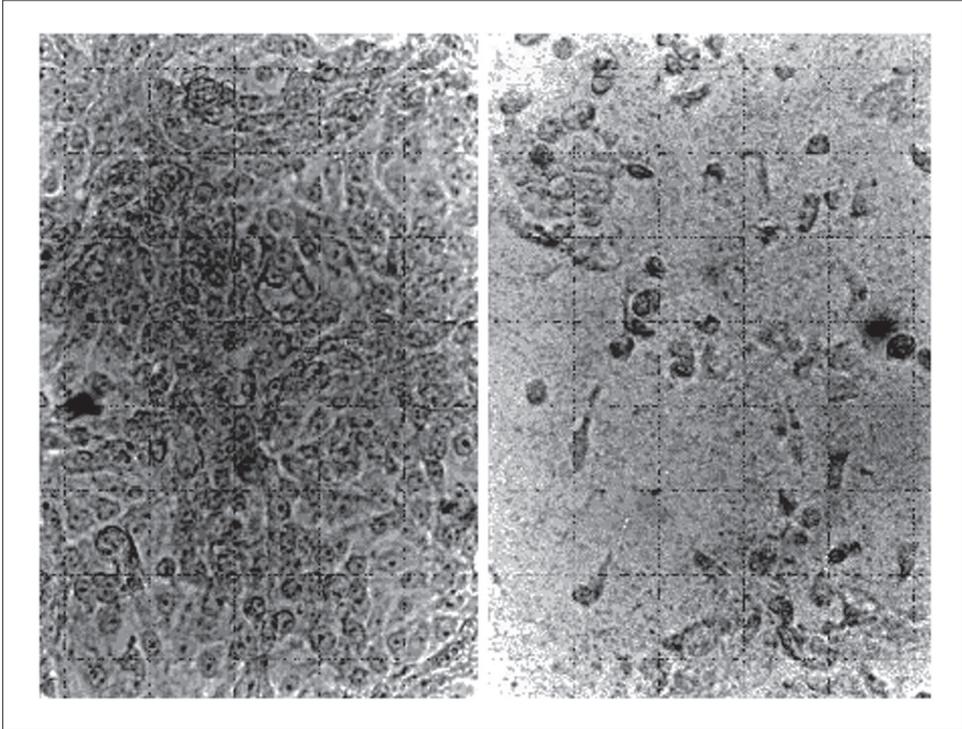


Foto 1. Acción sobre la SSGP EBO-Z sobre cultivos celulares En la foto se muestra cultivo celular VERO, procedente de riñón mono verde africano. Izquierda se observa un cultivo celular sin la expresión de la proteína y a la derecha el efecto producido por la proteína en el cultivo. (Reyes et al., 1999).