



TESE DE DOUTORAMENTO

**ESTUDIO DE LAS  
MODIFICACIONES POST-  
TRADUCCIONALES DE LA  
PROTEÍNA  $\mu$ NS DEL  
REOVIRUS AVIAR**

Fdo.: \_\_\_\_\_

Javier Rodríguez Grille

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOXÍA MOLECULAR

CENTRO SINGULAR DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA

BIOLÓXICA E MATERIAIS MOLECULARES (CIQUS)

SANTIAGO DE COMPOSTELA 2015

El Dr. Francisco Javier Benavente Martínez, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMA:

Que el trabajo de Tesis Doctoral titulado “Estudio de las modificaciones post-traduccionales de la proteína muNS del reovirus aviar” que presenta Javier Rodríguez Grille para optar al grado de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular, ha sido realizado en este departamento bajo mi dirección y la del Dr. José Manuel Martínez Costas y, considerando que se haya concluido, autorizo su presentación para que pueda ser evaluada por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo el presente informe:

Fdo.: Francisco Javier Benavente Martínez

Fdo.: José Manuel Martínez Costas

Fdo.: Javier Rodríguez Grille

Santiago de Compostela, 15 de Junio de 2015.



El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela bajo la dirección de los doctores Francisco Javier Benavente Martínez y José Manuel Martínez Costas.

Javier Rodríguez Grille ha sido contratado con fondos a cargo de los proyectos BFU2004-05641 y BFU2007-61330 del plan nacional de I+D+i del Ministerio de educación y ciencia en el período 2005-2011.

# Agradecimientos

Unha vez chegado ó final deste camino gustárame darlle as gracias a quen me axudou a percorrelo..

Ó Dr. Javier Benavente, o meu director, por haberme dado a oportunidade de traballar no seu laboratorio, por haber tido sempre a porta aberta e pola súa paciencia. Ó Dr. José Manuel Martínez Costas, co-director, por haberme animado en todo momento, por todo o que puiden aprender del e haber sido sempre unha voz de ánimo e esperanza.

A meus pais, o meu irmán e a Marta, polo seu cariño e apoio en todo momento, e porque sen eles isto non tería lugar nin sentido.

Ós meus compañeiros de laboratorio, que foron tantos que casi da vergoña enumeralos, a todos, Celina, Gus, Patricia e Lisa que son quen máis tempo tiveron que perder ensinándome, a Lorena, Rebeca, Alberto, Irene, Leticia, Salva e Marcelo, os que máis temos compartido dentro do laboratorio todo o que en si significa e moito do que non. Ós compañeiros da sección holandesa Mark, Patricia, Lois, Pablo e José Otero. Ós *okupas* de orgánica, Juan Bautista, Cecilia, Olalla e Mateo que compartir radiactividade acaba unindo cun brillo especial e, *last but not least* ás que quedan ó pe do cañón Natalia e Zaira.

E por si chegan a leelo, tamén lle teño moito que agradecer a moita xente sen a que non houbera chegado aquí sen un capirote na cabeza e unha camisa de forza redor dos meus brazos, ós compañeiros da facultade como Manu, Julio, Eva, Amparo, “As Mariás”, Peixe, María, Abe, Rubén, Chus, Seixas (como se fose) e algún máis. Á loxia e sobre todo ó seu círculo interno que tanto honra a Peter st. Dennis e moita outra xente desperdigada como Sara, Patrick, Mariña, Miguel, Víctor, Cereijo, Mosteiro, Raquel, Borja, Jano, Laura, Carla, Ary, David, Pablo e Raquel, as irmás Botana, e Jara.



## **ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE LA PROTEÍNA muNS DEL REOVIRUS AVIAR.**

### **RESUMO**

Os reovirus aviarios son virus sen envoltura lipídica e xenoma de ARN bicatenario que infectan a aves, causando enfermidades coma a artrite infecciosa ou a síndrome de malabsorción. Durante o seu ciclo replicativo a proteína non estrutural muNS xoga un papel clave levando a cabo a función de formar e organizar os viroplasmas e atraer ós mesmos a algunhas proteínas virais. Durante a infección do virus homólogo de mamíferos (MRV) exprésanse dúas isoformas de muNS que se diferencian no extremo amino da súa secuencia, onde se atopan secuencias responsables da interacción con outras proteínas virais. Neste traballo demostramos que durante a infección de células aviarias (CEF) co reovirus aviario (ARV) tamén se expresan dúas isoformas de muNS diferentes no seu extremo amino pero, a diferenza de MRV, onde a isoforma menor da proteína muNS se orixina por un mecanismo de iniciación alternativo da tradución, a isoforma pequena da muNS de ARV xenérase por procesamento proteolítico da proteína muNS precursora entre os residuos aspartato-154 e alanina-155. Desta maneira en células infectadas con ARV están presentes 3 isoformas de muNS, a muNS enteira e os dous produtos muNSN e muNSC. A diferenza de muNS, a proteína muNSC do ARV non interacciona coas proteínas estruturais lambdaA e lambdaC nin coa non estrutural sigmaNS. O procesamento de muNS é catalizado por unha caspasa de tipo 3 activada como consecuencia da apoptose que induce a infección viral. Neste traballo tamén demostramos que a activación da apoptose sérvelle o virus para aumentar a súa saída da célula e diseminación a células veciñas. Por outra banda, tamén demostramos que a proteína muNS de orixe aviario sofre fosforilacións múltiples, fundamentalmente en residuos de serina, inda que tamén en treoninas, e que a fosforilación de muNS é un proceso reversible.

### **PALABRAS CLAVE**

Virus, reovirus aviario, factorías virais, procesamento proteolítico, apoptose, caspasa, fosforilación.

### **RESUMEN**

Los reovirus aviares son virus sin envoltura lipídica y genoma de ARN bicatenario que infectan la aves, causando enfermedades como la artritis infecciosa o el síndrome de malabsorción. La proteína no estructural muNS juega un papel clave en su ciclo infectivo, llevando a cabo la función de formar y organizar los viroplasmas y atraer a los mismos a algunas proteínas virales. Durante la infección del virus homólogo de mamíferos (MRV) se expresan dos isoformas que se diferencian en su extremo amino, donde se encuentran secuencias responsables de la interacción con otras proteínas virales. En este trabajo demostramos que durante la infección de células aviares (CEF) por el reovirus aviar (ARV) también se expresan dos isoformas de muNS diferentes en su extremo amino pero, a diferencia de la muNS de MRV, donde la isoforma menor se genera por un mecanismo de iniciación alternativo de la traducción, en el caso de ARV la isoforma pequeña de muNS se genera por procesamiento proteolítico de la proteína muNS entre los residuos aspartato-154 y alanina-155. De esta manera en células infectadas con ARV se detectan 3 isoformas de la proteína muNS, muNS entera y los dos productos muNSN y muNSC. A diferencia de la proteína muNS, la proteína muNSC de ARV no interacciona con las proteínas estructurales lambdaA y lambdaC, ni con la no estructural sigmaNS. El procesamiento de muNS lo cataliza una caspasa de tipo 3 que se activa como consecuencia del desencadenamiento de la apoptosis inducida por la infección viral. En este trabajo también demostramos que la activación de la apoptosis le sirve al virus para aumentar su capacidad para salir de la célula y diseminarse a células vecinas. Finalmente, también demostramos que la proteína muNS de ARV sufre fosforilaciones

múltiples, fundamentalmente en residuos de serina, y en menor grado en treoninas, y que la fosforilación de muNS es un proceso reversible.

#### **PALABRAS CLAVE**

Virus, reovirus aviar, factorías virales, procesamiento proteolítico, apoptosis, caspasa, fosforilación.

#### **ABSTRACT**

Avian reoviruses (ARVs) are nonenveloped viruses with a segmented double-stranded RNA genome that infect birds, causing infectious diseases such as arthritis or malabsorption syndrome. The ARV nonstructural muNS protein plays a key role in the virus replication cycle by forming the matrix of the viral factories and by recruiting some viral proteins to these structures. Two muNS isoforms are present in cells infected with mammalian reoviruses (MRVs). The smaller isoform was designated muNSC because it belongs to the C-terminus of muNS. The aminoterminal sequences that are missing in muNSC are responsible for interacting with other viral proteins. In this work we show that two muNS isoforms are also expressed in avian cells (CEF) infected with ARV, but unlike the MRV situation, where a mechanism of alternative initiation of translation is responsible for muNSC formation, in the case of ARV the smaller isoform is generated by proteolytic processing of muNS between residues aspartate-154 and alanine-155. Thus, there are three different muNS isoforms in cells infected with ARV, full-length muNS and the two products muNSC and muNSN. In contrast with muNS, ARV muNSC does not interact with the structural proteins lambdaA and lambdaC or with the non-structural protein sigmaNS. The processing of ARV muNS is catalyzed by a caspase-3 type enzyme, which is activated by the viral infection. In this work we also show that viral-induced apoptosis increase virus exit from the cell and its spread to neighboring cells. Moreover, we also show that ARV muNS is phosphorylated, in a reversible manner, on several serine residues, although threonine phosphorylation was also detected.

#### **KEYWORDS**

Virus, avian reovirus, viral factories, proteolytic cleavage, apoptosis, caspase, phosphorylation



## **INDICE**



## Contenido

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>XV</b>
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>XIX</b>
1.- LA FAMILIA REOVIRIDAE.....	21
2.- EL GÉNERO ORTHOREOVIRUS.....	21
3.- LOS REOVIRUS AVIARES (ARVs).....	23
3.1.- <i>Patología e importancia de los ARVs</i> .....	23
3.2.- <i>La partícula reoviral</i> .....	23
3.3.- <i>El genoma del ARV</i> .....	25
3.4.- <i>Las proteínas virales</i> .....	28
3.5.- <i>Ciclo replicativo</i> .....	35
4.- INTERACCIÓN VIRUS-CÉLULA.....	38
4.1.- <i>Apoptosis</i> .....	38
4.2.- <i>Fusión célula-célula</i> .....	38
4.3.- <i>Permeabilización de membrana</i> .....	39
4.4.- <i>Resistencia al interferón</i> .....	39
5.- FACTORÍAS VIRALES.....	40
6.- LAS PROTEÍNA MUNS DE MRV Y ARV.....	41
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
1.- MATERIALES.....	51
1.1.- <i>Material biológico</i> .....	51
1.2.- <i>Plásmidos parentales</i> .....	52
1.3.- <i>Plásmidos recombinantes</i> .....	52
1.4.- <i>Anticuerpos</i> .....	53
1.5.- <i>Material no biológico</i> .....	54
2.- MÉTODOS.....	56
2.1.- <i>Manipulación de células bacterianas</i> .....	56
2.2.- <i>Manipulación de ácidos nucleicos</i> .....	57
2.3.- <i>Expresión y manipulación de proteínas</i> .....	62
2.4.- <i>Manipulación de cultivos celulares y virus</i> .....	64
2.5.- <i>Técnicas inmunológicas</i> .....	67
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>69</b>
1.- ESTUDIO DE LAS ISOFORMAS DE MUNS.....	71
1.1.- <i>Identificación de las isoformas de la proteína muNS expresadas por ARV y MRV en células infectadas</i> .....	72
1.2.- <i>La isoforma pequeña de la proteína muNS de MRV, pero no la de ARV, se genera por iniciación de la traducción en un codón interno del mRNA</i> .....	73
1.3.- <i>Un corte proteolítico en la proteína muNS de ARV genera dos polipéptidos de 17 y 55 kDa</i> .....	77
1.4.- <i>El procesamiento proteolítico de la proteína muNS de ASRV es inducido por la infección</i> .....	82
1.5.- <i>La activación de la apoptosis inducida por la infección con ARV provoca el procesamiento de muNS</i> .....	84
1.6.- <i>Identificación del punto de corte de muNS</i> .....	92
1.7.- <i>Una caspasa del tipo de la caspasa 3 cataliza el procesamiento de muNS</i> .....	96

1.8.-	<i>Propiedades distintivas de las isoformas de muNS.....</i>	<i>97</i>
1.9.-	<i>Efecto de la inhibición de las caspasas sobre el comportamiento del virus.....</i>	<i>100</i>
2.-	<b>ESTUDIO DE LA FOSFORILACIÓN DE MUNS.....</b>	<b>103</b>
2.1.-	<i>Las proteínas muNS y muNSC se fosforilan en células infectadas. ....</i>	<i>103</i>
2.2.-	<i>La proteína muNS se fosforila en residuos de serina fundamentalmente. ....</i>	<i>105</i>
2.3.-	<i>La proteína muNS se fosforila en varias posiciones.....</i>	<i>106</i>
2.4.-	<i>La proteína muNS se fosforila de forma reversible.....</i>	<i>109</i>
2.5.-	<i>Efecto de la fosforilación de la proteína muNS sobre su procesamiento.....</i>	<i>110</i>
2.6.-	<i>Efecto de la fosforilación sobre la capacidad de muNS para asociarse con las factorías virales. ....</i>	<i>114</i>
	<b>DISCUSION.....</b>	<b>119</b>
	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>133</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>137</b>





## **ABREVIATURAS**



ARV- Reovirus aviar  
ATP – Adenosina 5' trifosfato.  
BSA – Albúmina de suero bovino.  
BRV – Reovirus de babuino.  
bp. – Pares de bases.  
CEF – Fibroblastos embrionarios de pollo  
DAPI – 4', 6-diamino-2-fenilindol  
DC-Chol – Colesteril 3 $\beta$ -N-(dimetilaminoetil)  
DF1 – Línea celular inmortalizada de fibroblastos embrionarios de pollo  
D-MEM – Medio de Eagle modificado por Dulbecco  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DOPE – L- $\alpha$ -Fosfatidiletanolamina, dioleoil  
dsRNA – RNA de doble cadena  
FAST – *Fusion Associated Small-Transmembrane*  
FBS – Suero bovino fetal  
hpi – horas post-infección  
GFP – Proteína fluorescente verde.  
IP – Inmunoprecipitación  
kDa – kilodalton  
MOI – Multiplicidad de infección  
mRNA – RNA mensajero  
MRV – Reovirus de mamífero  
NBV – *Nelson Bay Virus*.  
NLS – Señal de localización nuclear.  
ORF – Pauta abierta de lectura  
PBS – Solución tamponada de fosfato.  
pfu – Unidad formadora de placas.  
PCR – Reacción en cadena de la polimerasa.  
RLU – Unidades relativas de luz.  
RNA – Ácido ribonucleico  
SDS – Dodecil sulfato sódico  
SDS-PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.  
UTR – *Untranslated regions*.  
WB – *Western Blot*.





## **INTRODUCCION**



## 1.-La familia Reoviridae.

La familia *Reoviridae* engloba a una serie de virus que infectan a un amplio espectro de huéspedes incluyendo humanos, mamíferos, peces, insectos, reptiles, hongos y plantas. Los virus de esta familia se caracterizan por:

- i) Poseer un genoma formado por 10-12 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA).
- ii) Carecer de envoltura lipídica.
- iii) Replicar en el citoplasma de la célula infectada.
- iv) Contener una cápside de geometría icosaédrica compuesta por dos o tres cubiertas proteicas concéntricas.
- v) Utilizar estrategias similares para la replicación y expresión de sus genomas.

Las manifestaciones clínicas que inducen estos virus son tan variadas como el número de organismos a los que infectan, pudiendo ser desde asintomáticas hasta fatales. El prefijo reo (Respiratory Enteric Orphan) fue propuesto inicialmente por A. Sabin (1959) para agrupar a una serie de virus que habían sido aislados de los tractos respiratorio y gastrointestinal de individuos aparentemente sanos (de ahí el término “orphan”) y que previamente habían sido incluidos dentro de la familia de los *Echovirus* (*Picornaviridae*). Los miembros de esta familia se han agrupado en doce géneros diferentes en base a las características estructurales de los viriones, el número de segmentos genómicos y las estrategias de su ciclo replicativo. A su vez, estos géneros se distribuyen en dos subfamilias en base a la presencia o ausencia de unas estructuras con forma de torreta en algunos vértices de su cápside. (Tabla 1) (Condit, 2007; Dixon et al., 2012; Mertens, 2004).

## 2.-El género Orthoreovirus.

El género *Orthoreovirus*, al que comúnmente se denomina reovirus, es el prototipo de la familia. Este género engloba a aquellos miembros de la familia *Reoviridae* que poseen diez segmentos genómicos encerrados en el interior de una doble cubierta proteica de 70-90 nm de diámetro externo (Jordan and Mayor, 1962). Su distribución en la naturaleza es muy amplia, habiéndose detectado su presencia en mamíferos, aves, reptiles e insectos. En los últimos años el número de cepas aisladas se ha visto incrementado notablemente, y se han dividido en 5 grupos específicos atendiendo a: i) su rango de huésped; ii) su capacidad para formar sincitios en las células infectadas; iii) su capacidad para hemaglutinar eritrocitos; y iv) la organización de sus segmentos genómicos pequeños.

El primer grupo, que infecta a mamíferos, contiene el aislado prototipo del género *Orthoreovirus*, debido a que fueron los primeros virus de este género que se aislaron (dando nombre a toda la familia) y los estudiados más exhaustivamente. Los

reovirus de mamífero (MRVs) son los únicos miembros de este género y se caracterizan por poseer actividad hemaglutinante y por no inducir la formación de sincitios. Otro grupo importante lo constituyen los reovirus aviares (ARVs), los cuales comparten muchas características morfológicas y fisicoquímica con los MRVs. (Bodelón et al., 2001; Condit, 2007; Duncan and Sullivan, 1998; Schnitzer, 1985; Spandidos and Graham, 1976; Sterner et al., 1989). El tercer grupo está formado por tres aislados denominados colectivamente Nelson Bay Virus (NBV), los cuales infectan a murciélagos, son fusogénicos y poseen una organización genómica similar a la de los ARVs. De los otros dos grupos restantes, uno está constituido por un único aislado de babuino que todavía no ha sido localizado en la naturaleza (BRV), y el otro por varios aislados obtenidos en diferentes reptiles (RRVs) (Condit, 2007; Mertens, 2004).

Tabla 1: Miembros de la familia <i>Reoviridae</i>				
Género	segmentos	Tamaño Virión	Huésped	Representante
<b>Subfamilia <i>Spinareovirinae</i></b>				
<i>Aquareovirus</i>	11	75	Peces, crustáceos	Aquareovirus C "Golden shinner reovirus"
<i>Coltivirus</i>	12	80	Humanos, roedores	Virus de la fiebre del Colorado por garrapatas (Colorado tick fever)
<i>Cypovirus</i>	10	65	Insectos	Virus de la polihedrosis citoplasmática (CPV-1)
<i>Dinovernavirus</i>	9	50	No comprobado, replica en células de insecto	<i>Aedes pseudoscutellaris</i> reovirus (APRV)
<i>Fijivirus</i>	10	70	Plantas, Insectos (sólo Vector)	Virus de la enfermedad de Fiji (FDV)
<i>Idnoreovirus</i>	10-11	70	Himenópteros	<i>Diadromus pulchellus idnoreovirus</i> 1 (DpIRV-1)
<i>Mycoreovirus</i>	11-12	80	Hongos	Mycoreovirus 1 (MYRV1)
<i>Orthoreovirus</i>	10	80	Vertebrados	Reovirus de mamífero Tipo 3 "Dearing" (T3D)
<i>Oryzavirus</i>	10	70	Plantas	Virus de la aspereza infecciosa del arroz (RRSV)
<b>Subfamilia <i>Sedovirinae</i></b>				
<i>Cardoreovirus</i>	12	55	Cangrejos	Reovirus del cangrejo de Shanghái ( <i>Eriocheir sinensis</i> reovirus)
<i>Mimoreovirus</i>	11	95	<i>Micromonas</i> (Alga verde unicelular)	<i>Micromonas pusilla</i> reovirus (MpRV)
<i>Orbivirus</i>	10	80	Vertebrados e insectos (vector)	Virus de la lengua azul (BTV)
<i>Phytoreovirus</i>	12	70	Plantas, insectos (vector)	Virus del arroz enano (rice dwarf virus) (WTV)
<i>Rotavirus</i>	11	80	Humanos y vertebrados	Rotavirus A (Simian rotavirus A SA11-H96)
<i>Seadornavirus</i>	12	70	Vertebrados e insectos	Banna virus (BAV) y Kadapiro virus (KDV)

### **3.-Los reovirus aviare (ARVs).**

#### **3.1.-Patología e importancia de los ARVs.**

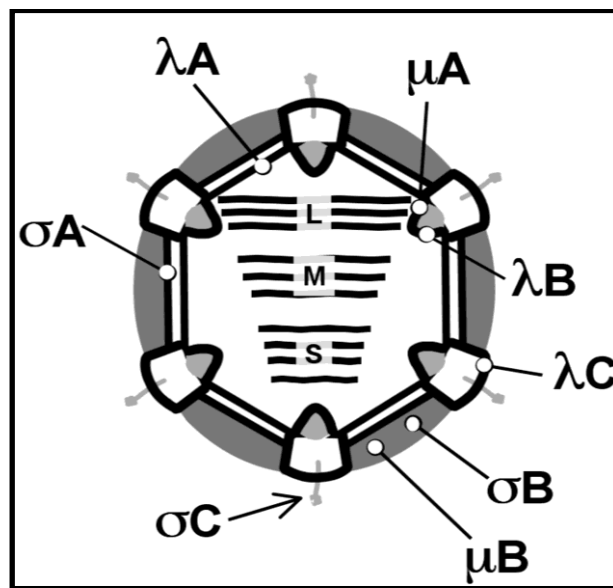
Los ARVs son agentes patógenos que causan importantes pérdidas económicas en la industria avícola. Estos virus, que infectan a todo tipo de aves, son ubicuos entre las aves de corral, aunque a menudo sus infecciones son asintomáticas y sólo algunos aislados altamente patogénicos causan un alto índice de mortalidad (Rosenberger et al., 1989). Las cepas más virulentas son responsables de varios síndromes infecciosos, de los cuales el más importante es la artritis aviar o tenosinovitis infecciosa (Olson, 1978), la cual se caracteriza por presentar lesiones en las vainas tendinosas y en las membranas sinoviales de las articulaciones, muy similares a las que presenta la artritis reumatoide humana. El ARV también parece ser el agente causante de algunas enfermedades intestinales en pollos y de la enfermedad de la cresta azul en pavos. También se ha observado que en infecciones experimentales los ARVs son capaces de inducir miocarditis y hepatitis en pollos. Otra de las enfermedades en las que se ha involucrado al ARV es el síndrome de malabsorción, una virosis entérica que bloquea el proceso de absorción del alimento, por lo que las aves infectadas sufren retraso en el crecimiento, presentan diarreas de tipo mucoide, desarrollan alteraciones óseas y presentan niveles bajos de caroteno. A pesar de que este síndrome ha sido asociado con varios agentes etiológicos diferentes, se ha demostrado que las cepas de ARV 1733 y 2408 son capaces de inducir esta enfermedad en infecciones experimentales de aves de corral. Al parecer, la susceptibilidad a las infecciones por ARVs está relacionada con la edad, siendo las aves de mayor edad las más resistentes. La vía de transmisión principal es la fecal oral, aunque también se han reportado casos de infecciones por vía respiratoria y a través del huevo (revisado en Robertson and Wilcox, 1986; Jones 2000; van der Heide 2000). El método principal de lucha contra las enfermedades causadas por los ARVs consiste en vacunar a las aves jóvenes con vacunas atenuadas y administrar después virus inactivados a las aves reproductoras para que los pollos queden protegidos por los anticuerpos maternos. Muchas de las vacunas utilizadas en la actualidad se han preparado a partir de la cepa S1133 aislada por van der Heide (van der Heide et al., 1983), aunque esas vacunas son poco efectivas contra algunas variantes antigénicas (Jones, 2000).

#### **3.2.-La partícula reoviral.**

Los reoviriones aviare son partículas icosaédricas de 85 nm de diámetro y una densidad de 1,37 g/mL (Spandidos and Graham, 1976; Zhang et al., 2005). En su interior se encuentran los 10 segmentos de dsRNA que componen el genoma, así como

una serie de pequeños oligonucleótidos de cadena simple ricos en adenina, de los que todavía se desconoce su función (Spandidos and Graham, 1976).

Los resultados de varios estudios permitieron conocer la distribución de las proteínas reovirales en el reovirión (Fig. 1) (Martínez-Costas et al., 1997; Schnitzer et al., 1982). Así, las proteínas muB, muBC, muBN, sigmaB y sigmaC son componentes de la cápside externa, mientras que lambdaA, lambdaB, muA y sigmaA son proteínas del core o cápside interna. La proteína lambdaC es un componente de las dos capas, ya que se extiende desde el core hasta la cápside externa, formando las 12 “torres” pentaméricas a través de las cuales salen al exterior los transcritos producidos en el interior de la partícula y reciben el cap en su posición 5' (Figura 1).

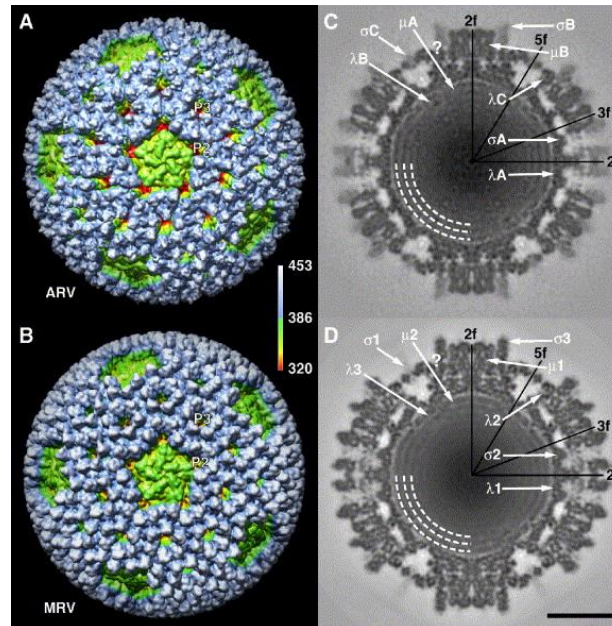


**Figura 1. Representación esquemática de la distribución de las proteínas de ARV en el reovirión maduro** (Martínez-Costas et al., 1997).

El tratamiento de reoviriones con proteasas permite generar *in vitro* dos tipos de partículas subvirales; las partículas subvirales intermedias (ISVPs), que carecen de las proteínas de la cápside externa sigmaB y muB pero conservan la proteína sigmaC, y los cores que también carecen de esta proteína. Las ISVPs son infecciosas y transcripcionalmente inactivas, al contrario que los cores. (Grande and Benavente, 2000; Martínez-Costas et al., 1995; Martínez-Costas et al., 1997).

La estructura del reovirión se ha estudiado mediante criomicroscopía electrónica y reconstrucción de imágenes (Zhang et al., 2005). Los resultados que se muestran en la Fig. 2 indican que los ARVs son muy similares estructuralmente a los MRVs. El diámetro externo del reovirión aviar es de 85,7 nm y el de su cápside interna de 53,6 nm. En el interior de la partícula se encuentra el genoma así como los complejos de transcripción formados por la polimerasa lambdaB y el cofactor muA, que se disponen alrededor de los ejes quínticos (de rotación 5f). La cápside interna está formada por la proteína lambdaA y sobre su superficie está la proteína sigmaA, la cual

se encarga de dar estabilidad y sellar esta cápside. Además, 12 torres pentaméricas compuestas por la proteína lambdaC se proyectan hacia el exterior de la partícula, alrededor de sus 12 ejes quinarios. Por su parte, la cápside externa la componen oligómeros de las proteínas muB y sigmaB, localizados sobre sigmaA y en contacto también con las torres de lambdaC. Finalmente, sobre cada torre de lambdaC se sitúa un trímero de la proteína sigmaC.

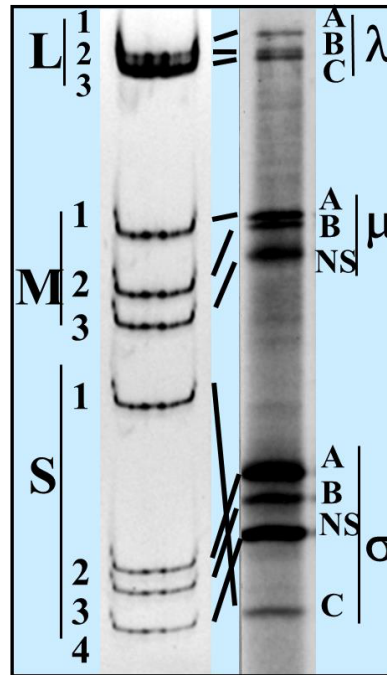


**Figura 2. Reconstrucción tridimensional y foto de criomicroscopía electrónica de los viriones de ARV (A y C; cepa 138) y MRV (B y D; T3D).** En A y B podemos ver la superficie de los viriones maduros, nótese que en esta configuración las torretas de lambdaC forman unas depresiones. En C y D podemos ver secciones de los viriones. En las fotos se han indicado las posiciones de las proteínas, así como de los ejes de simetría binarios (2f) ternarios (3f) y quinarios (5f) (Zhang et al., 2005).

### 3.3.-El genoma del ARV.

El genoma del ARV está formado por diez segmentos de dsRNA. Atendiendo a su tamaño se dividen en tres clases: tres de la clase L (Large o grande), tres de la clase M (Medium o mediana) y cuatro de la S (Small o pequeña) (Spandidos and Graham, 1976; Varela and Benavente, 1994). Con excepción del segmento S1, que es tricistrónico, todos los demás genes parecen ser monocistrónicos (Bodelón et al., 2001) (Fig. 3). La cadena positiva de cada segmento genómico, que es idéntica a la del mRNA que transcribe, contiene un cap de tipo 1 en su extremo 5', mientras que la cadena negativa contiene un grupo pirofosfato en esa posición (Martínez-Costas et al., 1995). Los extremos de los genes contienen regiones que no se traducen, conocidas como UTRs (por sus siglas en inglés, UnTranslated Region). Los primeros siete nucleótidos del extremo 5' (GCUUUUU) y los últimos cinco del extremo 3' (UCAUC) de la cadena

positiva están conservados en todos los segmentos genómicos de los ARVs que han sido secuenciados. La secuencia del resto de la región UTR varía entre las diferentes cepas, aunque algunas posiciones si presentan cierta conservación, lo que sugiere que estos extremos podrían actuar como señales de transcripción, replicación y/o encapsidación de los transcritos virales.



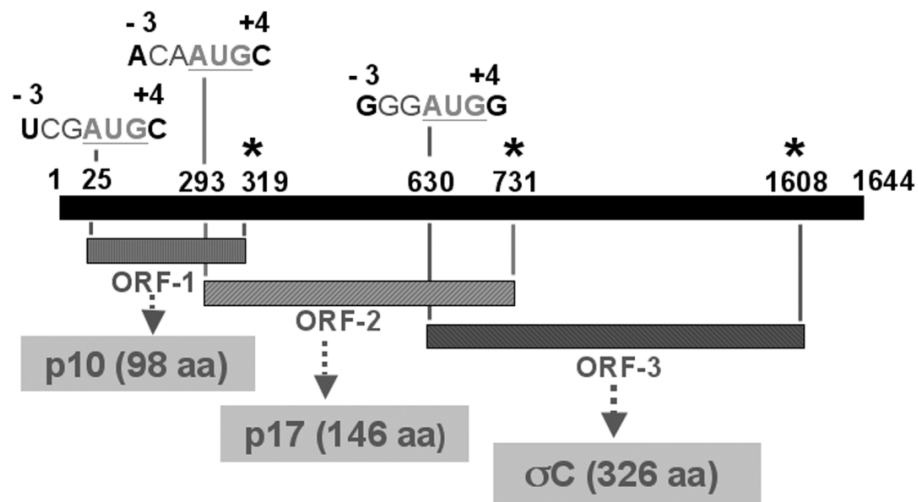
**Figura 3. Relación entre los segmentos genómicos del ARV S1133 y las proteínas que codifican.** Las proteínas p10 y p17, debido a su pequeño tamaño, no aparecen en la figura (Varela and Benavente, 1994).

Como ocurre con otros miembros de la familia *Reoviridae*, la co-infección de células aviares con dos cepas reovirales distintas genera virus híbridos que contienen segmentos genómicos de ambos virus parentales. Este fenómeno, que se denomina reordenamiento (“reassortment”) ha sido muy utilizado para asociar propiedades fenotípicas a segmentos genómicos individuales.

El genoma del ARV codifica al menos 12 productos primarios de traducción. La relación entre cada uno de los polipéptidos y el segmento genómico que lo codifica se ha determinado por traducción *in vitro* de segmentos genómicos individuales desnaturalizados (Varela and Benavente, 1994). Los resultados demuestran que existe una correlación directa entre el tamaño del gen y el de la proteína que codifica, exceptuando el gen S1, que siendo el más grande de los genes de la clase S, codifica para la proteína estructural más pequeña, sigmaC (Fig. 3).

### 3.3.1.-El gen S1 y su organización tricistrónica.

La secuenciación del gen S1 del reovirus aviar S1133 puso de manifiesto que posee tres pautas abiertas de lectura (ORF), parcialmente solapadas y fuera de fase (Shapouri et al., 1996). Posteriormente se encontró que todos los genes S1 secuenciados de otras cepas de ARVs tenían esa misma organización tricistrónica. Un estudio realizado en nuestro laboratorio demostró que el gen S1 del ARV S1133 es funcionalmente tricistrónico, ya que en células infectadas expresa, además de la proteína estructural sigmaC, dos proteínas no estructurales denominadas p10 y p17 (Bodelón et al., 2001). La organización cistrónica de este mensajero es muy peculiar y no tiene parangón en todo el dominio eucariota (Fig. 4). El estudio de las secuencias de nucleótidos que rodean los codones de iniciación del mRNA s1 reveló que, mientras que el codón de iniciación del primer cistrón posee un contexto débil, por carecer de purinas en las posiciones -3 y +4, el codón de iniciación AUG del tercer cistrón tiene purinas en estas posiciones, por lo que tiene un contexto fuerte (Fig. 4). El codón de iniciación del segundo cistrón tiene una A en -3 y una pirimidina en +4, aunque estudios recientes indican que la presencia de un nucleótido de adenina en posición -3 es suficiente para que el codón AUG sea considerado de contexto fuerte (Kozak, 2002). Sorprendentemente, la proteína que se expresa en mayor cantidad es sigmaC, la que está codificada por el tercer cistrón. Con esta organización, la expresión de los dos primeros cistrones podría explicarse por el mecanismo conocido como *leaky scanning*, ya que el pobre contexto del codón de iniciación del primer cistrón permitiría que un gran porcentaje de los ribosomas no tradujesen ese cistrón e iniciasen la traducción del segundo cistrón, el que expresa p17. Esto parece que es así, ya que cuando se mejora el contexto del codón de iniciación del primer cistrón se reduce la expresión de la proteína p17 (Racine et al., 2007). Sin embargo, la eficiencia de expresión de la proteína sigmaC parece que no está influenciada por el contexto de los codones de iniciación de los dos primeros cistrones, por lo que la traducción del tercer cistrón se debe producir por un mecanismo diferente al de *leaky scanning*, aunque este mecanismo es dependiente de un cap funcional y de la presencia de una secuencia de unos 27 nucleótidos aguas arriba del codón de iniciación de sigmaC. Esta secuencia presenta dos motivos de 6 nucleótidos complementarios a una región del RNA ribosómico 18S. Se ha postulado que esta región serviría para atraer la subunidad ribosomal 40S al codón de iniciación del tercer cistrón, saltándose los codones de iniciación de los dos primeros cistrones, mediante un mecanismo que recordaría, aunque con ligeras diferencias al *ribosome shunting* propuesto para la traducción de cistrones de mRNAs policistrónicos de virus de plantas y adenovirus (Racine and Duncan, 2010).



**Figura 4. Organización cistronica del gen S1 de los ARVs.** En la figura se muestra el contexto del codón de iniciación de cada uno de los tres cistrones, señalándose con los números -3 y +4 las posiciones que, según Kozak (1991b) son importantes para la eficiencia de la iniciación de la traducción. En la parte superior del gen se indican las posiciones de los codones de iniciación y de terminación, mientras que las de los de terminación se marcaron con un asterisco. En la parte inferior se indica el nombre de la proteína codificada por cada uno de los cistrones y el número de residuos aminoacídicos que deberían tener cada una de ellas (Bodelón et al., 2001).

### 3.4.-Las proteínas virales.

El genoma de ARV expresa al menos 12 productos primarios de traducción, de los cuales 8 son proteínas estructurales que forman parte del virión, y las otras 4 son no estructurales (NS), ya que se expresan en células infectadas, pero no forman parte de los reoviriones maduros (Bodelón et al., 2001; Martínez-Costas et al., 1997; Varela and Benavente, 1994). Las proteínas codificadas por los genes de la clase L se denominan lambda, las codificadas por los de la clase M, mu y las codificadas por los de la clase S, sigma (Tabla 2 y Fig. 3).

A las proteínas estructurales de cada clase se les ha asignado un sufijo alfabético (lambdaA, lambdaB, etc.) según su movilidad electroforética, para distinguirlas de las de los reovirus de mamífero a las que se les había asignado un sufijo numérico (lambda1, lambda2, etc.). El reovirión aviar contiene al menos 10 proteínas estructurales diferentes, 8 de las cuales (lambdaA, lambdaB, lambdaC, muA, muB, sigmaA, sigmaB y sigmaC) son productos primarios de la traducción de sus respectivos mRNAs, mientras que las otras dos, muBN y muBC, se originan por procesamiento proteolítico parcial del precursor muB (Martínez-Costas et al., 1997; Schnitzer et al., 1982).

Tabla 2: Proteínas del reovirus aviar				
Gen	Proteína	Homólogo mamífero	Distribución en reovirión	Función/Propiedades
L1	LambdaA	lambda1	Cápside interna	Andamiaje básico cápside interna
L2	LambdaB	lambda3	Cápside Interna	Transcriptasa
L3	LambdaC	lambda2	Torretas	Guanililtransferasa
M1	muA	mu2	Cápside interna	Nucleotidasa; Co-factor de la transcriptasa
M2	{ muB, muBN, muBC	mu1	Cápside externa	Penetración del core a través de la membrana endosómica
M3	{ muNS, muNSC	muNS	No estructural	Formación de las factorías virales y reclutamiento de componentes virales
S1	sigmaC	sigma1	Cápside externa	Unión al receptor; pro-apoptótica
	p10		No estructural	Fusogénica y permeabilizante/Transmembrana
	p17	sigma1s	No estructural	Desconocida/Nuclear
S2	sigmaA	sigma2	Core Interno	Anti-interferón/Une dsRNA; nuclear
S3	sigmaB	sigma3	Cápside externa	Estructural
S4	sigmaNS	sigmaNS	No estructural	Recluta componentes virales/Une ssRNA

El genoma de ARV también expresa 4 proteínas no estructurales. De estas, las mayoritarias son muNS y sigmaNS que están codificadas por los genes M3 y S4, respectivamente, mientras que las minoritarias, p10 y p17 están codificadas por los dos primeros cistrones del gen tricistrónico S1 (Fig. 4) (Bodelón et al., 2001). Además, se ha demostrado recientemente que el gen M3 de ARV y MRV expresa dos isoformas proteicas, las proteínas muNS y muNSC (Schnitzer, 1985; Varela and Benavente, 1994; Tourís-Otero et al., 2004b).

En la Tabla 2 se expone una relación de las actividades y propiedades conocidas de las proteínas virales, así como la localización de las proteínas estructurales en la partícula viral.

**La proteína lambdaA** es la proteína viral de mayor tamaño y está codificada por el gen L1. Forma parte de la cara interna del core (Fig. 2) y se incorpora rápidamente a las factorías virales de células infectadas. En células transfectadas se

distribuye por todo el citoplasma, pero se asocia con inclusiones cuando se co-expresa con muNS. (Tourís-Otero et al., 2004a).

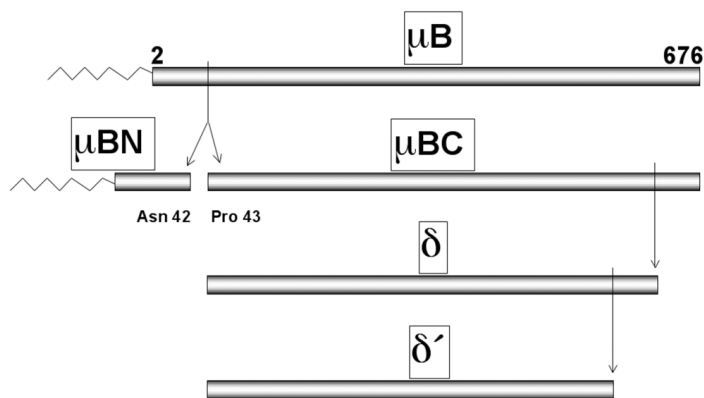
**La proteína lambdaB**, está codificada por el gen L2 y es un componente minoritario del core viral (Fig. 2). Su secuencia y tamaño, su número de copias en la partícula viral y su localización en el interior del core, sugieren que debe tratarse de la RNA polimerasa viral (Martínez-Costas et al., 1997).

**La proteína lambdaC**, esta codificada por el gen L3 y se extiende desde el interior del core hasta la superficie de la cápside externa (Fig. 1) (Martínez-Costas et al., 1997; Reinisch et al., 2000). Pentámeros de la proteína lambdaC forman las torretas que se proyectan desde cada uno de los 12 ejes de simetría de orden 5 del core (Zhang et al., 2005). Esta proteína es la guanililtransferasa viral, la enzima que cataliza la formación del cap en el extremo 5' de los mRNAs del virus (Martínez-Costas et al., 1995). Estudios realizados con una proteína lambdaC recombinante expresada en células de insecto demostraron que la actividad de autoguanililación radica en una región de 42 kDa de su extremo N-terminal (Hsiao et al., 2002).

**La proteína muA**, codificada por el gen M1, es un componente minoritario del core (Fig. 2), (Martínez-Costas et al., 1997). Se ha sugerido que tiene actividad de nucleotidasa (Su et al., 2007). Su homóloga en MRV, mu2, además de ser el cofactor de la RNA polimerasa, hace de puente entre la proteína muNS que forma las factorías virales, y los microtúbulos, lo que hace que las factorías virales de los MRVs adopten una forma fibrosa y colocalicen con los microtúbulos (Parker et al., 2002).

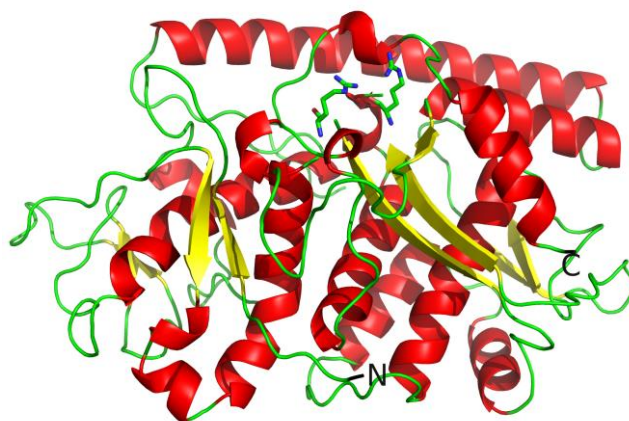
**La proteína muB** es el producto primario de traducción del gen M2 (Varela and Benavente, 1994). Esta proteína está miristoilada en su extremo amino, donde se ha identificado una secuencia consenso de miristoilación (Varela et al., 1996). Una gran parte de las moléculas de muB sintetizadas en células infectadas sufren un corte proteolítico cerca de su extremo N-terminal, generando un pequeño péptido miristoilado denominado muBN y un polipéptido de mayor tamaño denominado muBC (Fig. 5). Tanto muB, como muBN y muBC forman parte de la cubierta externa del reovirión (Martínez-Costas et al., 1997) (Fig. 2). Además de formar parte de la estructura del virión, muBC parece cumplir un rol importante en la entrada del ARV a la célula huésped. El desensamblaje del reovirión va acompañado de dos cortes secuenciales cerca del extremo carboxilo de muBC, que generan los polipéptidos  $\delta$  y  $\delta'$ , y este procesamiento es necesario para promover la interacción de la partícula viral con la membrana lisosomal y permitir así el paso del core desde el endosoma hasta el citoplasma (Fig. 5) (Duncan, 1996; Danthi et al., 2008a; Danthi et al., 2008b).

**La proteína muNS**, es una proteína no estructural codificada por el gen M3 del ARV y tiene un peso molecular de 70 kDa (Tourís-Otero et al., 2004b; Varela and Benavente, 1994). Dado que esta proteína es el objetivo fundamental de esta tesis, se describirá más adelante con detalle lo que se conocía de esta proteína al comienzo de la realización de este trabajo.



**Figura 5. Esquema de la proteína muB y de su procesamiento.** La proteína muB se encuentra miristoilada en su extremo amino y sufre un corte proteolítico entre los residuos aminoácídicos Asn-42 y Pro-43 que da origen a muBN y muBC. Durante la entrada del virus en la célula, muBC sufre dos cortes proteolíticos cerca de su extremo carboxilo generando los polipéptidos  $\delta$  y  $\delta'$

**La proteína sigmaA**, codificada por el gen S2, es uno de los componentes mayoritarios de la cápside interna del ARV (Figura 2) (Martínez-Costas et al., 1997). Esta proteína se une muy fuertemente a dsRNA independientemente de la secuencia nucleotídica (Martínez-Costas et al., 2000). Estudios preliminares sugieren que la proteína sigmaA es capaz de revertir el estado antiviral inducido por el interferón, al prevenir la activación de la proteína quinasa dependiente de RNA de doble cadena (PKR). Se cree que la capacidad de sigmaA para unir y secuestrar dsRNA desempeña un papel fundamental en la resistencia de los ARVs frente a la actividad antiviral del interferón (Martínez-Costas et al., 2000; Gonzalez-Lopez et al., 2003). En nuestro laboratorio se demostró recientemente que la proteína sigmaA se acumula en el nucleolo y citoplasma de células aviarias y que la presencia de sigmaA en el nucleolo es independiente de factores virales (Vázquez-Iglesias et al., 2009). Ensayos realizados en células permeabilizadas con digitonina indicaron que la proteína sigmaA penetra en el nucleolo por un mecanismo de transporte dependiente de las nucleoporinas del poro nuclear, pero independiente de factores citosólicos y de fuente de energía (Vázquez-Iglesias et al., 2009). Además, el grupo del Dr. Mark van Raaij, con el que colaboramos, ha conseguido cristalizar y determinar la estructura espacial de esta proteína (Guardado-Calvo et al., 2008; Hermo-Parrado et al., 2007) (Fig. 6). La estructura tridimensional de sigmaA reveló que se trata de una proteína globular compuesta mayoritariamente por hélices alfa, y permitió identificar una posible región de unión a dsRNA, ya que mutaciones puntuales de las argininas R155 y R273 de esa región eliminan su capacidad para unir dsRNA (Fig. 6). Los datos estructurales, junto con ensayos de retardo en gel, microscopía electrónica y estudios de la velocidad de sedimentación de los complejos sigmaA-dsRNA sugirieron que la unión de sigmaA con dsRNA es cooperativa y que la longitud mínima del dsRNA que se requiere para que se le una sigmaA está comprendida entre 14 y 18 bp.

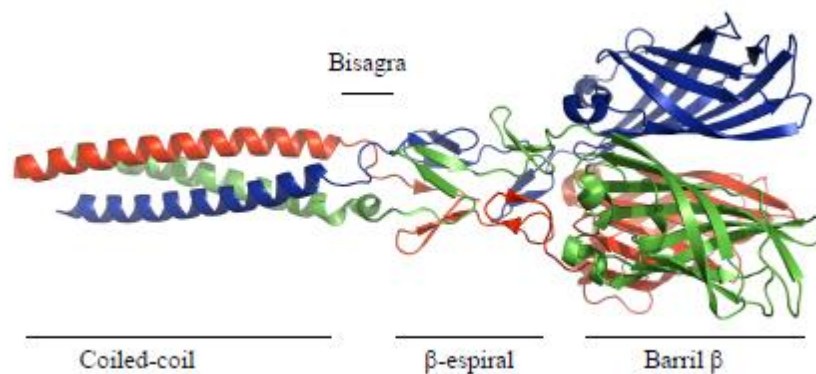


**Figura 6. Estructura tridimensional de la proteína sigmaA.** Estructura tridimensional de la proteína sigmaA donde se muestran los residuos de argininas R155 y R273 que están muy expuestos sobre la superficie y muy próximos entre sí en la estructura espacial (Guardado-Calvo et al., 2008).

**La proteína sigmaB** está codificada por el gen S3 y es un componente mayoritario de la cápside externa del virus (Martínez-Costas et al., 1997; Varela and Benavente, 1994) (Fig. 1). En el citosol de células infectadas, la proteína sigmaB se asocia espontánea y rápidamente con muBN y muBC, para formar complejos ternarios hetero-oligoméricos, que contienen cantidades estequiométricas de las tres proteínas virales. Sin embargo, al contrario que su homóloga de MRV, esta proteína no une dsRNA en solución (Tourís-Otero et al., 2004b).

**La proteína sigmaC** está codificada por el tercer cistrón del gen S1 y es una proteína minoritaria de la cápside externa (Fig. 2). Esta proteína es la responsable de la unión del virus a los receptores de la célula huésped, ya que es la única proteína viral presente en extractos de células infectadas que es capaz de unirse a células aviares, y esa unión se inhibe cuando se preincuban las células con virus purificado (Martínez-Costas et al., 1997). La proteína sigmaC es un homotrímero en estado nativo y se ha demostrado que sólo la forma oligomérica se une a los receptores de células aviares (Grande et al., 2002). El grupo del Dr. Van Raaij ha cristalizado un fragmento C-terminal de sigmaC (residuos 117-326), que contiene el dominio globular de unión al receptor (Guardado Calvo et al., 2005; Hermo-Parrado et al., 2007; van Raaij et al., 2005) (Fig. 7). Gracias a los datos obtenidos por difracción de rayos X y a la comparación de su secuencia con la de su homóloga de MRV, la proteína sigmaC se ha podido dividir en cuatro regiones, tres de las cuales se observan en la estructura resuelta: i) la primera comprende los residuos 1-50 y posee una gran similitud de secuencia con su homóloga de MRV sigma1 (38% de identidad); es la región de unión a la partícula viral; ii) la segunda región, que está comprendida entre los aminoácidos 51 y 156, consta de un triple “coiled-coil” conectado a la tercera región a través de una región que contiene Zn y que podría actuar funcionalmente como una región “bisagra”; iii) la tercera región, que comprende los residuos 160-191, contiene dos repeticiones en triple

beta espiral; iv) la cuarta región, residuos 196-326, es la cabeza globular de la proteína, donde cada monómero forma un barril beta que contacta con los otros dos para formar la zona globular por donde, presumiblemente, la proteína interacciona con los receptores celulares. Se ha propuesto que esta región es la responsable de iniciar la trimerización y la correcta formación del trímero, aunque en estos procesos también podría desempeñar un papel importante la región “coiled-coil” del extremo amino (Guardado-Calvo et al., 2005; Guardado-Calvo et al., 2009). Otros estudios sugieren que la expresión de sigmaC en células de mamífero transfectadas induce la activación de apoptosis (Shih et al., 2004), por lo que la expresión de esta proteína en células infectadas pudiera contribuir a la activación de la apoptosis que se detecta en células infectadas con ARV.

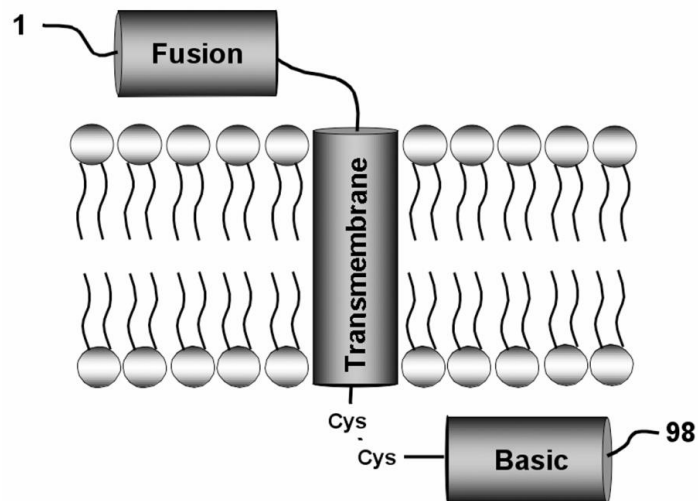


**Figura 7 . Estructura de la región 117-326 de la proteína sigmaC a una resolución de 3Å.** Se indican las diferentes estructuras presentes en esta región de sigmaC (Guardado-Calvo et al., 2009).

**La proteína p10**, es una proteína no estructural de 10,3 kDa codificada por el primer cistron del gen S1. La expresión de esta proteína induce fusión celular y altera la permeabilidad de la membrana (Bodelón et al., 2001; Bodelón et al., 2002; Shmulevitz and Duncan, 2000). Es una proteína transmembrana de tipo 1, con un dominio central hidrofóbico que atraviesa la membrana y que separa dos dominios de tamaños similares (Fig. 8). El dominio aminoterminal queda fuera de la célula y posee un subdominio denominado parche hidrofóbico (*Hydrophobic patch*) que está estabilizado por un puente disulfuro palmitoilado y que es fundamental para la actividad fusionante de esta proteína. Otras viroporinas de virus envueltos presentan un dominio muy similar, que induce la desestabilización de las membranas que se van a fusionar, cuando éstas están lo suficientemente cerca una de la otra para provocar su fusión (Bodelón et al., 2001; Shmulevitz et al., 2003; Shmulevitz et al., 2004; Shmulevitz and Duncan, 2000).

El dominio transmembrana que comprende los residuos 38-57, contiene muchos residuos básicos y al menos un motivo de triglicinas. Este dominio también es imprescindible para la actividad fusogénica de la proteína, lo que sugiere que la fusión debe llevarse a cabo por interacción coordinada entre los dominios aminoterminal y

transmembrana de p10 (Shmulevitz et al., 2003). Finalmente, el dominio carboxiterminal se encuentra en el interior de la célula y, junto con el dominio transmembrana posee actividad permeabilizante tanto en células eucariotas como en bacterias (Bodelón et al., 2002; Top et al., 2009).



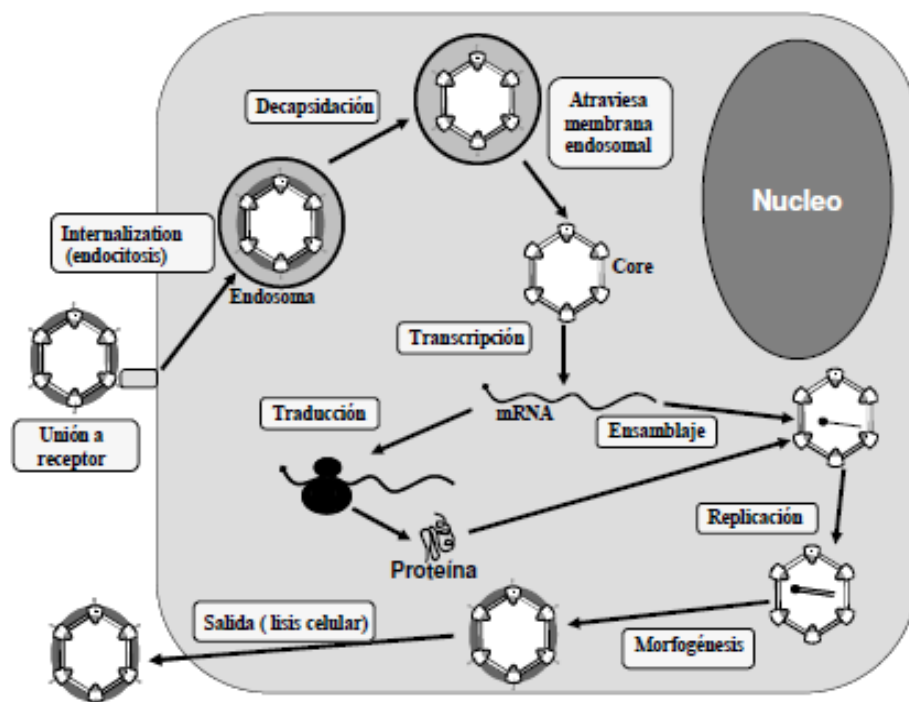
**Figura 8. Esquema de los dominios de la proteína p10.** La proteína p10 posee tres principales dominios; un dominio N-terminal extracelular de fusión y un dominio C-terminal intracelular básico, ambos separados por un dominio central transmembrana. Entre los dominios transmembrana y básico se localizan dos residuos de cisteína que están palmitoilados y que son fundamentales para la actividad fusogénica de p10 (Shmulevitz and Duncan, 2000).

**La proteína p17** está codificada por la segunda pauta de lectura del gen S1 y hasta la fecha no se han detectado homólogas con ninguna otra proteína conocida, ya sea viral o celular. Investigaciones realizadas en nuestro laboratorio han revelado que p17 se acumula en el núcleo de células infectadas y transfectadas. Experimentos de mutagénesis han demostrado que su localización nuclear se debe a una señal de localización nuclear funcional (NLS, “nuclear localization signal”) ubicada cerca de su extremo C-terminal (Costas et al. 2005). En estos estudios también se demostró que p17 es una proteína recirculante, que se desplaza desde el núcleo al citoplasma y que su presencia en el núcleo es dependiente del estado transcripcional de la célula. En otros trabajos se ha propuesto que la expresión de p17 en células de mamífero produce el arresto del ciclo celular en su fase G2/M dependiente de la actividad de p53, sin causar apoptosis ni muerte celular (Liu et al., 2005). Los mismos autores, en un trabajo más reciente sugieren que p17 es capaz de activar rutas autofágicas en la célula y que la activación de esas rutas favorece la replicación viral (Chi et al., 2013).

**La proteína sigmaNS** es una proteína no estructural codificada por el gen S4 del ARV (Schnitzer, 1985; Varela and Benavente, 1994). Se ha confirmado que esta proteína tiene capacidad de unión a RNA de cadena sencilla (ssRNA) independiente de la secuencia nucleotídica (Tourís-Otero et al., 2005; Yin and Lee, 1998). Esta proteína se encuentra formando grandes complejos ribonucleoproteicos en el citoplasma de las células infectadas; al eliminar el RNA de los complejos, sigmaNS se encuentra en forma

de homodímeros y homotrímeros. También se ha demostrado que la proteína sigmaNS es reclutada hacia los viroplasmos por asociación directa con muNS (Tourís-Otero et al., 2004b). Esto, y el hecho de que presenta afinidad por ssRNA, sugieren que sigmaNS podría desempeñar un papel importante en el empaquetamiento y replicación del RNA viral, aunque se deberán realizar más estudios para demostrar esta hipótesis.

### 3.5.-Ciclo replicativo.



**Figura 9. Modelo propuesto para la replicación del ARV (Benavente and Martínez-Costas, 2007)**

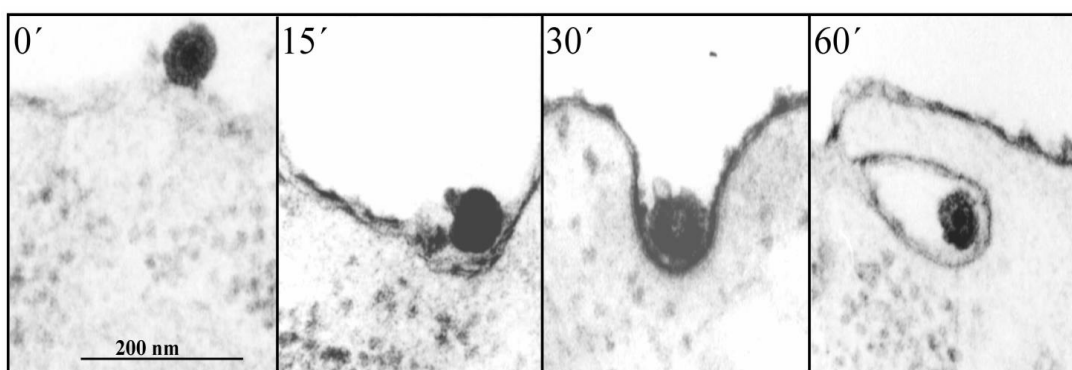
El modelo propuesto para el ciclo infeccioso del ARV se puede observar en la Fig. 9, y los detalles se comentan a continuación.

#### 3.5.1.-Entrada y desenvoltura de la cápside externa.

La unión extracelular del ARV a la célula huésped está mediada por interacciones específicas entre la proteína viral de la cápside externa sigmaC y algún receptor de la superficie celular (Grande et al., 2000; Shapouri et al., 1996). Se desconoce la identidad del receptor para los ARVs, pero resultados no publicados de

nuestro laboratorio sugieren que debe ser una proteína no conjugada, debido a que la infección con reoviriones purificados no se inhibe al tratar las células con glicosidasas, lipasas, EDTA o peryodato sódico, pero sí con proteasas. Esta situación es diferente a la publicada para los MRVs, los cuales unen ácido siálico junto con su receptor, la proteína JAM-A (Barton et al., 2001; Connolly et al., 2001). El hecho de que los MRVs no se unan a las células aviares sugiere que los ARVs y MRVs unen diferentes receptores en sus células diana (Barton et al., 2001). Por otra parte, el hecho de que los ARVs sean capaces de unirse y replicar, no sólo en células aviares, sino también en células de mamífero, sugiere que el receptor del ARV es una proteína ubicua de la superficie celular (Robertson and Wilcox, 1986).

La observación al microscopio electrónico de células infectadas con el ARV S1133 muestra que el virus penetra en fibroblastos embrionarios de pollo por endocitosis mediada por receptor (Fig. 10). La desvoltura tiene lugar dentro de endosomas secundarios y depende en gran medida del procesamiento proteolítico de la proteína de la cápside externa  $\mu$ BC, que genera los productos específicos  $\delta$  y  $\delta'$  (Fig. 5) (Duncan, 1996). La acidificación de los endosomas y la actividad de las proteasas lisosomales son necesarias para la desvoltura y la replicación intracelular del virus. Sin embargo, el mecanismo por el cual los cores son capaces de atravesar la membrana de los endosomas y llegar al citoplasma celular es uno de los pasos menos conocidos del ciclo replicativo de los ARVs.



**Figura 10. Observación al microscopio electrónico de la entrada del ARV** (Benavente and Martínez-Costas, 2006).

### 3.5.2.-Expresión del genoma viral.

La expresión del genoma del ARV comienza con la síntesis de los 10 mRNAs virales, un proceso catalizado por la RNA polimerasa viral. Este enzima usa la cadena negativa de los segmentos genómicos como molde para la síntesis de los mRNAs, un proceso que tiene lugar en el interior de la partícula viral (Martínez-Costas et al., 1995). Se cree que el centro activo de la RNA polimerasa de los ARVs radica en la proteína  $\lambda$ B. Los transcritos generados son idénticos a la cadena positiva de sus genomas, poseen un cap de tipo 1 en sus extremos 5' y carecen de cola de poli(A) en sus extremos 3' (Martínez-Costas et al., 1995). Estos mRNAs se denominan igual que los segmentos

genómicos que los expresan, pero utilizando letras minúsculas en vez de mayúsculas. El mRNA viral se sintetiza en el interior del core y adquiere el cap cuando sale a través de las torretas formadas por pentámeros de la proteína lambdaC, la guaniltransferasa viral (Zhang et al., 2005).

A pesar de que en las células infectadas con ARV hay niveles similares de los diferentes mRNAs virales, los niveles intracelulares de las proteínas virales varían considerablemente. Así, muBC, sigmaB y sigmaNS son las proteínas más abundantes, mientras que lambdaB, muA y las tres proteínas codificadas por el gen S1 son las más escasas. Esto sugiere que la expresión del genoma viral está regulada fundamentalmente a nivel de traducción. Por otra parte, la infección con ARV de fibroblastos de pollo produce una gran inhibición en la síntesis de proteínas celulares (conocida como “shut-off”), situación que no ocurre durante las infecciones con MRVs de células en cultivo. Los mecanismos que producen esta inhibición no se conocen.

### **3.5.3.-Morfogénesis y salida.**

Todos los miembros de la familia *Reoviridae* se ensamblan en unas inclusiones globulares citoplasmáticas densas al microscopio, denominadas factorías virales o viroplasmatas. Estas estructuras, que carecen de membranas y orgánulos celulares, contienen proteínas estructurales y no estructurales, así como partículas virales parcial o completamente ensambladas (Fields, 1971; Rhim et al., 1962; Silverstein et al., 1972). La expresión individual de proteínas virales en células transfectadas reveló que muNS es la única proteína de ARV capaz de formar inclusiones cuando se expresa en ausencia de otros factores virales. Además, las inclusiones que forma esta proteína son muy similares en apariencia a las factorías virales de células infectadas. Todo ello hace pensar que muNS es el factor viral mínimo necesario para formar los viroplasmatas en células infectadas con ARV (Tourís-Otero et al., 2004b). El análisis mediante microscopía de fluorescencia de células transfectadas que coexpresan muNS y otras proteínas virales reveló que muNS recluta a la proteína no estructural sigmaNS y a la proteína del core lambdaA a las inclusiones virales. Por contra, sigmaC no se incorpora a las inclusiones cuando se coexpresa con muNS, indicando que el reclutamiento de proteínas virales a los viroplasmatas es específico, y que algunas proteínas deben incorporarse a las factorías virales por un mecanismo independiente de muNS (Tourís-Otero et al., 2004a). Otros resultados revelaron que la incorporación de proteínas virales a las factorías y a las partículas virales en formación, es un proceso controlado, secuencial y selectivo, y que la morfogénesis viral se lleva a cabo exclusivamente dentro de las factorías virales (Tourís-Otero et al., 2004 a). Se cree que la incorporación secuencial de proteínas a las inclusiones impide la encapsidación prematura de las proteínas de la cápside externa, lo que sellaría las partículas hijas antes del empaquetamiento de los mRNAs virales, lo que generaría viriones vacíos no infectivos.

Aunque hasta el momento no se han realizado estudios para dilucidar los mecanismos moleculares que permiten la salida de las partículas virales hijas de las

células infectadas, se cree que la proteína no estructural p10 debe jugar un papel importante en la salida y diseminación de los reoviriones de la progenie, por sus actividades permeabilizante y fusogénica. Esto facilitaría el paso del virus de células infectadas a células no infectadas sin quedar expuesto al sistema inmune del hospedador. La lisis celular también puede contribuir a la diseminación del virus, al igual que ocurre con los reovirus no fusogénicos.

## **4.-Interacción Virus-Célula.**

Desde el momento en que el virus contacta con su receptor en la membrana celular, se desencadenan una serie de cambios en la célula infectada. Los cambios conocidos que inducen los reovirus aviares se exponen a continuación.

### **4.1.-Apoptosis.**

Como ocurre con muchos otros virus, la infección de células en cultivo con ARVs produce la activación del programa apoptótico de la célula huésped. La activación se produce a tiempos tempranos de infección y no requiere la expresión de genes virales, aunque se bloquea por agentes que impiden la desenvolvura intraendosomal del virus. Estos resultados sugieren que la apoptosis es inducida por las partículas subvirales que se originan tras la decapsidación de los reoviriones parentales. (Labrada et al., 2002). También se ha publicado que la expresión de las proteínas del ARV sigmaC y p17 induce apoptosis (Chulu et al., 2007; Shih et al., 2004), por lo que la expresión de estas proteínas en células infectadas con ARV podría contribuir a la actividad pro-apoptótica de este virus.

### **4.2.-Fusión célula-célula.**

Los virus envueltos presentan en su membrana proteínas o complejos proteicos que se encargan de fusionar la membrana del virus con la de la célula huésped, como paso necesario para introducir el genoma viral al interior de la célula (White et al., 2008). Por el contrario, los virus desnudos no suelen inducir fusión de membranas por lo que sus genomas no suelen expresar proteínas fusogénicas. Sin embargo, la mayoría de los miembros del género *Orthoreovirus*, con la salvedad del grupo específico de mamífero o MRV, son capaces de alterar la permeabilidad de la membrana plasmática de las células infectadas e inducir la formación de sincitios. Este fenotipo se debe a que sus genomas expresan una pequeña proteína transmembrana que produce poros y fusión entre membranas. Todas ellas se han englobado en una nueva familia de proteínas denominada proteínas FAST (Fusion-Associated Small Transmembrane protein), debido a que son muy diferentes a las proteínas de fusión de los virus envueltos

conocidas hasta el momento (Bodelón et al., 2002; Dawe and Duncan, 2002; Duncan and Sullivan, 1998; Shmulevitz and Duncan, 2000).

Todas las proteínas FAST comparten una organización estructural muy similar: i) un extremo amino orientado hacia el exterior, el cual contiene un submotivo hidrofóbico que interviene en la rotura de la estabilidad de las membranas para que se fusionen y que puede llevar modificaciones post-traduccionales como la miristoilación de su extremo y puentes disulfuro estabilizando el motivo hidrofóbico; ii) un dominio transmembrana que también es activo en la sincitiotogénesis; y iii) un dominio carboxilo intracelular, que colabora con los otros dominios en la fusión de membranas pero que también parece tener un rol en la formación de poros estables en la membrana de las células infectadas. Este último dominio está separado proteolíticamente del resto de la proteína en los reovirus de reptil y Nelson-Bay, aunque sigue actuando en el crecimiento y estabilización de los poros (Boutillier and Duncan, 2011).

### **4.3.-Permeabilización de membrana.**

La mayoría de los virus citolíticos alteran la permeabilidad de la membrana plasmática de la célula huésped (Carrasco, 1995). Dicha permeabilización puede ocurrir a tiempos tempranos de infección, durante la entrada del virus en la célula, o a tiempos tardíos, después del inicio de la expresión de los genes virales. La infección por ARV produce un aumento en la permeabilidad de la membrana a tiempos tardíos de infección (Bodelón et al., 2002) y la actividad permeabilizante se ha asociado al gen S1. La expresión en células procariotas y eucariotas de las proteínas codificadas por este gen puso de manifiesto que sólo la proteína p10, pero no p17 o sigmaC, es capaz de incrementar la permeabilidad de la membrana. Esta propiedad se encuentra reducida al endodominio (residuos 62-98) de p10. Además, la proteína sufre un procesamiento proteolítico que libera en el citosol el endodominio, que es funcional por sí mismo y colabora con la proteína entera en la formación de los poros (Bodelón et al., 2002; Top et al., 2009).

### **4.4.-Resistencia al interferón.**

Los interferones son unas citoquinas que utilizan los organismos como sistema de defensa contra las infecciones virales, aunque estas proteínas también ejercen otras actividades biológicas (Goodbourn et al., 2000; Haller et al., 2006; Sen, 2001). La mayoría de las células infectadas por virus producen y secretan interferón, el cual al interaccionar con receptores de la propia célula o de células vecinas dispara un sistema de transmisión de señales que conduce al aumento de la expresión de una serie de proteínas, muchas de las cuales poseen actividad antiviral. Dos de esas proteínas son la 2'-5'-oligoadenilato sintetasa (OAS) y la proteína quinasa activada por dsRNA (PKR), las cuales juegan un papel importante en la regulación de la síntesis de proteínas en

células infectadas (Clemens, 1997; Rebouillat and Hovanessian, 1999). La expresión de estos enzimas se induce por interferón, pero se sintetizan de forma latente y su activación se produce cuando entran en contacto con bajas concentraciones de dsRNA, el cual se genera en muchas células infectadas con virus. Desde muy temprano se comprobó que los ARVs son altamente resistentes a la acción antiviral del interferón de pollo (Ellis et al., 1983) por lo que se supone que estos virus utilizan estrategias para contrarrestar la acción antiviral del interferón. Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio revelaron que el tratamiento de células CEF con interferón recombinante de pollo induce un fuerte estado antiviral capaz de inhibir la replicación de algunos virus, como el virus de la estomatitis vesicular o el virus vaccinia, pero apenas inhibe la replicación del ARV (Martínez-Costas et al., 2000). También se ha descrito que los lisados de células infectadas contienen factores que previenen la inhibición de la traducción que induce el dsRNA en lisados de reticulocito (Martínez-Costas et al., 2000). El hecho de que la proteína sigmaA se una fuertemente a dsRNA sugiere que esta proteína tiene capacidad para secuestrar el dsRNA activador que se pudiera producir durante la infección y prevenir así la activación de PKR y OAS (Guardado-Calvo et al., 2009). Resultados preliminares pusieron de manifiesto que la proteína sigmaA desempeña un papel importante en la resistencia de los reovirus aviares hacia el interferón, al prevenir la activación de PKR (González-López et al., 2003).

## 5.-Factorías virales.

La mayoría de los virus replican dentro de compartimentos celulares denominados viroplasmos o factorías virales, la integridad de los cuales se mantiene mediante interacciones entre proteínas. Se cree que la principal función de estos compartimentos es concentrar los componentes virales necesarios para aumentar la eficacia de la replicación viral (Netherton et al., 2007). Las factorías que forman los virus citoplasmáticos suelen ser grandes inclusiones que normalmente se localizan en zonas pericentriolares próximas al centro organizador de los microtúbulos (MTOC, “microtubule organizing center”) y que se parecen en gran medida a los agregomas que se forman en respuesta a la agregación de proteínas mal plegadas (Kopito, 2000; Wileman, 2006, 2007). La replicación y ensamblaje de los miembros de la familia *Reoviridae* también se lleva a cabo en factorías virales (Condit, 2007). Se ha demostrado que la formación de viroplasmos corre a cargo de proteínas no estructurales específicas, como la proteína muNS de los MRVs y ARVs, la NSP5 y NSP2 de rotavirus o la NS2 del virus de la lengua azul (Mohan et al., 2003; Parker et al., 2002; Thomas et al., 1990). Numerosas observaciones sugieren que en el caso del género *Orthoreovirus* la proteína no estructural muNS es el factor viral mínimo necesario para formar las factorías virales, ya que es la única proteína viral capaz de formar este tipo de estructuras cuando se expresa de forma individual en células transfectadas (Parker et al., 2002; Tourís-Otero et al., 2004b).

La mayoría de las cepas de MRV forman factorías con aspecto filamentosas, y solamente la cepa T3DN produce factorías de aspecto globular (Parker et al., 2002). Se ha demostrado que el fenotipo filamentosas está relacionado con la proteína estructural del core  $\mu 2$ , la cual interacciona con los microtúbulos y con la proteína  $\mu NS$ , y se piensa que estas interacciones son las responsables de anclar las factorías virales a los microtúbulos y contribuir así a su apariencia filamentosas. Por otra parte, la formación de factorías de MRV en células infectadas es dependiente de los microtúbulos, sin importar si las factorías son globulares o filamentosas.

En el caso de los ARVs, el análisis mediante microscopía de fluorescencia de células infectadas demostró que forman factorías de morfología globular no asociadas a microtúbulos. Además, al igual que ocurre con los MRVs, la proteína  $\mu NS$  de ARV es el factor viral mínimo necesario para formar los viroplasmos en células infectadas (Tourís-Otero et al., 2004a, 2004b). También se ha demostrado que la morfogénesis de los ARVs se lleva a cabo exclusivamente dentro de las factorías virales de células infectadas.

## 6.-Las proteínas $\mu NS$ de MRV y ARV.

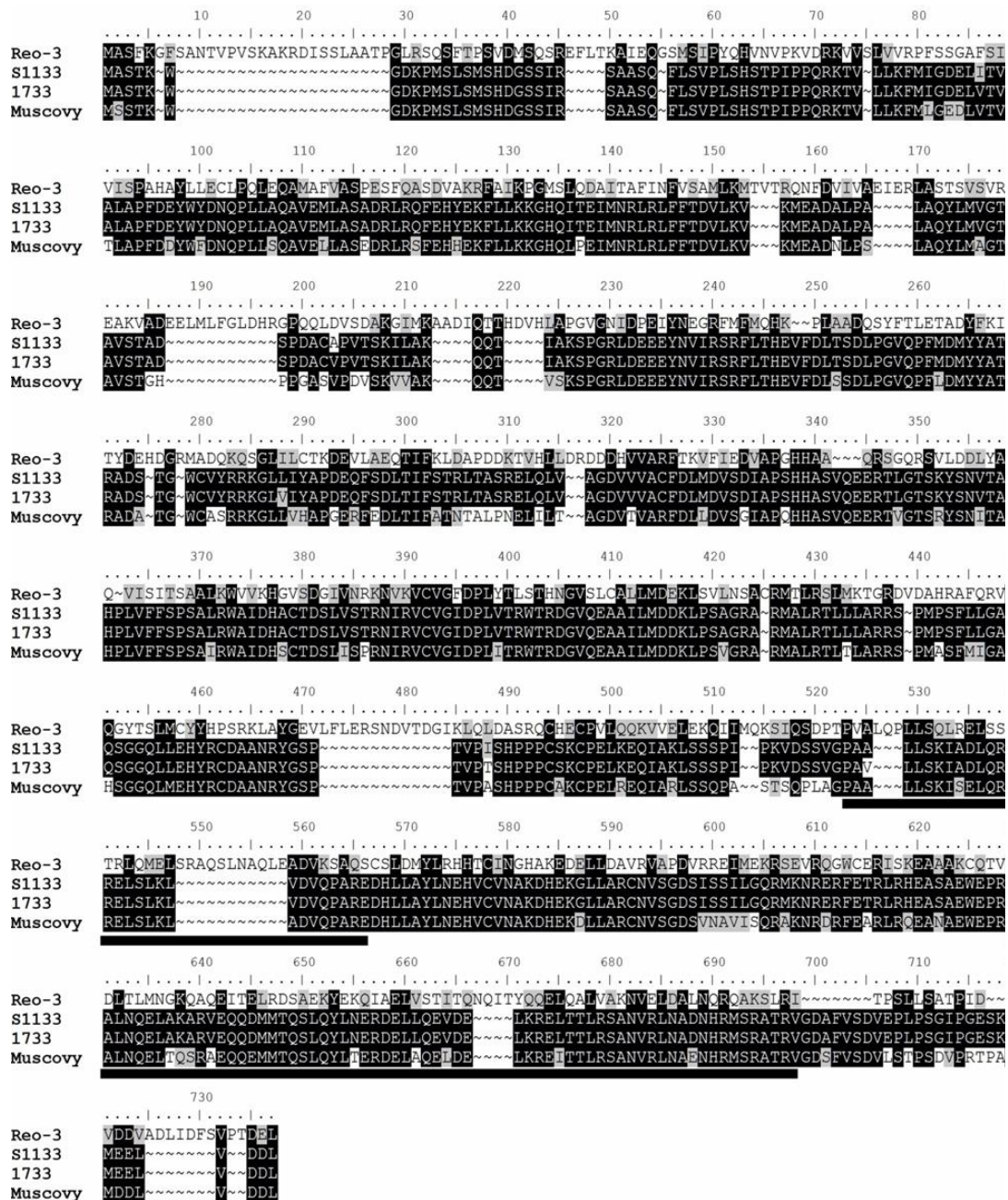
Los genes M3 de los *Orthoreovirus* expresan unas proteínas no estructurales denominadas  $\mu NS$ , que son las encargadas de formar las factorías virales que se observan en células infectadas. La proteína  $\mu NS$  de los MRVs ha sido ampliamente estudiada. Esta proteína es la encargada de reclutar a la proteína no estructural  $\sigma NS$  a las inclusiones, y dicha asociación requiere la presencia de los 13 primeros aminoácidos de  $\mu NS$ . También parece que esa asociación es parcialmente dependiente de la capacidad de  $\sigma NS$  de unir ssRNA, ya que  $\mu NS$  se une con menos eficiencia a un mutante de  $\sigma NS$  sin capacidad para unir RNA, y el tratamiento de coimmunoprecipitados de  $\sigma NS$  con RNAasa libera gran cantidad de  $\mu NS$  (Miller et al., 2003). También se ha descrito que la proteína  $\mu NS$  del MRV es la responsable de incorporar a las inclusiones virales a las proteínas del core  $\lambda 1$   $\lambda 2$  y  $\sigma 2$  (Broering et al., 2004).

El MRV expresa en células infectadas dos isoformas de  $\mu NS$  de 80 y 75 kDa, las cuales son reconocidas por anticuerpos anti- $\mu NS$  (Wiener et al., 1989). La isoforma mayor, denominada  $\mu NS$ , es la que se genera cuando la traducción del mRNA m3 se inicia en el codón AUG más próximo al extremo 5', ya que este codón abre una pauta de lectura que se extiende hasta cerca del extremo 3' del mRNA. Una serie de resultados obtenidos en diferentes laboratorios demostraron que la proteína  $\mu NS$  de MRV se origina por iniciación de la traducción en un codón interno del mRNA m3 de ARV: i) No se pudo demostrar una relación precursor producto entre  $\mu NS$  y  $\mu NS$  al realizar experimentos de pulso radiactivo y caza (Wiener et al., 1989); ii) las dos isoformas de  $\mu NS$  que se detectan en células infectadas con MRV también se detectan cuando el mRNA m3 de MRV se traduce en lisados de reticulocitos

de conejo (Kobayashi et al., 2006; Wiener et al., 1989); iii) los extremos amino-terminales de muNS y muNSC están bloqueados, lo que sugiere que ambas proteínas son productos primarios de traducción (Wiener et al., 1989); iv) sólo se genera muNSC cuando se muta el codón de iniciación de muNS, el que está más próximo al extremo 5' del mRNA m3 de MRV (Arnold et al., 2008; Kobayashi et al., 2006); y v) si la isoforma muNSC se originase por iniciación interna de la traducción a esta proteína le faltarían residuos del extremo amino de muNS, lo que se pudo demostrar experimentalmente mediante mapeo peptídico de las dos isoformas con N-cloro-succinimida que corta a las proteínas en residuos de triptófano (Wiener et al., 1989). Por esta razón a la isoforma más pequeña se la denominó muNSC, para indicar que se solapa con el extremo carboxilo del precursor muNS.

Se ha demostrado que una región de 250 residuos (posiciones 471-721) del extremo C-terminal de la proteína muNS de ARV es suficiente para formar inclusiones cuando se expresa individualmente en células transfectadas. En esta región mínima se han identificado cinco dominios, que ordenados desde el extremo amino al carboxilo serían: i) un dominio cabeza de 50 residuos; ii) un dominio con estructura tipo coiled-coil; iii) un dominio “intercoil” de 50 residuos; iv) un segundo dominio coiled-coil; y v) una cola de 120 residuos (Brandariz-Nuñez et al., 2010c). Se cree que las inclusiones se forman mediante interacciones proteína-proteína promovidas por los dos dominios coiled-coil. Mediante el bloqueo de la replicación viral usando RNAs interferentes contra diferentes proteínas del MRV se ha demostrado que la proteína muNS juega un papel clave en la morfogénesis viral. Estos experimentos también pusieron de manifiesto que la capacidad de muNS para formar inclusiones es necesaria pero no suficiente para promover la replicación viral (Arnold et al., 2008; Kobayashi et al., 2006).

Recientemente, se ha descrito un sistema, basado en la capacidad para formar inclusiones de la proteína muNS de los MRVs, para detectar interacciones proteína-proteína en el citoplasma de células de mamífero (Miller et al., 2007) y que ha sido adaptado para usarse en levaduras (Schmitz et al., 2009). En dicho sistema una proteína A se fusiona al extremo amino de la región mínima de muNS (residuos 471-721) para que la proteína de fusión genere inclusiones citoplasmáticas. Si una proteína B interacciona con A será reclutada a las inclusiones que forma la proteína de fusión A-muNS, mientras que si no interacciona adoptará su distribución normal en el interior de la célula. Los autores sugieren que en levaduras este sistema es superior al del doble híbrido, tanto en el número como en el tipo de interacciones detectadas, al menos con las proteínas ensayadas en su estudio (Schmitz et al., 2009).



**Figura 11. Comparación de la secuencia de la proteína muNS del MRV Reo-3 con la de las muNS de los ARVs 1733 y S1133 y con la del reovirus de pato *muscovy*.** Están subrayadas las zonas con predicción de estructura “coiled-coil” para la proteína muNS del ARV S1133. Para el alineamiento de secuencias se usó el ClustalW (Thompson et al., 1994).

El gen M3 de los ARVs tiene 1996 bp y una sola pauta abierta de lectura que codifica la proteína no estructural de 635 aminoácidos muNS, con un peso molecular de 70,8 kDa (Tourís-Otero et al., 2004a, 2004b; Varela and Benavente, 1994). Esta proteína es 86 residuos más corta que su homóloga de MRV y la secuencia aminoacídica de ambas proteínas difiere mucho, ya que sólo poseen un 28,3% de

similitud en sus secuencias (Figura 10) (Tourís-Otero et al. 2004b). Sin embargo, las dos proteínas poseen en sus extremos carboxilo dos regiones con elevada probabilidad de formar estructuras "coiled-coil" (McCutcheon et al., 1999; Tourís-Otero et al., 2004 b). Este tipo de estructuras están implicadas en la oligomerización de muchas proteínas, como la paramiosina (Landa et al., 1993; Mühlischlegel et al., 1993), la cadena pesada de la miosina (Dibb et al., 1989; Ketchum et al., 1990; Yanagisawa et al., 1987), o la proteína B parecida a kinesina (Mitsui et al., 1994). En nuestro laboratorio se ha comprobado que, al igual que el gen M3 de los MRVs, el gen M3 del ARV expresa dos isoformas de la proteína muNS, con pesos moleculares de 70 y 55 kDa (Tourís-Otero et al., 2004 b). La isoforma de menor tamaño se ha denominado muNSC para respetar la terminología que se ha utilizado con el MRV, aunque en el momento de iniciarse esta tesis se desconocía el mecanismo que originaba su formación y también se desconocía su localización en la proteína precursora.

Los estudios previos que se habían realizado sobre la proteína muNS del ARV habían demostrado que, además de ser la proteína responsable de formar las factorías virales, también está implicada en el reclutamiento de las proteínas sigmaNS, lambdaA, lambdaC y muA a esas estructuras (Tourís-Otero et al., 2004a). La capacidad de muNS para formar inclusiones ha sido ampliamente estudiada en nuestro laboratorio. Se ha podido demostrar que, al contrario que su homóloga del MRV, las inclusiones que forma la muNS de ARV no están asociadas a microtúbulos y se forman básicamente por la propia muNS sin participación de otros factores celulares o virales (Brandariz-Nuñez et al., 2010a). También se encontró que la región mínima de muNS capaz de formar inclusiones comprende los residuos 448-635, por lo que a esa región la hemos llamado muNS-Mi. Estas inclusiones, sin embargo, son más pequeñas que las que genera la proteína completa y tienen una forma más regular (Brandariz-Nuñez et al., 2010b; Brandariz-Nuñez et al., 2010c). La proteína muNS-Mi contiene dos regiones *coiled-coil* (residuos 448-477 y 539-605), las cuales están unidas por un segmento denominado IC (*Intercoil*), y una cola C-terminal (llamada C-Tail). El primer *coil* cumple una función de dimerización, pues puede ser sustituido por dominios diméricos de otras proteínas. El C-Tail es el encargado de orientar la interacción entre los monómeros de muNS. La región denominada IC, posee una enorme afinidad por las inclusiones de muNS y de muNS-Mi y en nuestro laboratorio se ha aprovechado esta característica para diseñar un sistema de etiquetado molecular que puede ser utilizado para purificar proteínas (Brandariz-Nuñez et al., 2010a) y para detectar interacciones entre proteínas, tanto en el citoplasma como en el núcleo de células vivas (Brandariz-Nuñez et al., 2010b). Las proteínas contenidas en las inclusiones de muNS pueden sufrir modificaciones post-traduccionales y son capaces de realizar interacciones y reacciones complejas (Brandariz-Nuñez et al., 2011).



## **OBJETIVOS**



En este trabajo hemos estudiado las modificaciones post-traduccionales que sufre la proteína muNS del reovirus aviar y las implicaciones que estas modificaciones pudieran tener en la replicación viral. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

1.- Comparar los mecanismos moleculares que dan origen a las diferentes isoformas de las proteínas muNS de MRV y ARV.

2.-Estudiar y caracterizar las modificaciones post-traduccionales que sufre la proteína muNS de ARV e investigar qué implicaciones pueden tener esas modificaciones en la replicación del virus.







# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1.-Materiales.

### 1.1.-Material biológico.

#### 1.1.1.-Células eucariotas.

**Fibroblastos embrionarios de pollo (CEF):** Cultivo primario de fibroblastos obtenidos a partir de embriones de pollo de 9-10 días de incubación, tal como se describe en la sección de Métodos.

**HeLa:** Línea celular humana aislada de un adenocarcinoma de cérvix de una paciente en 1951.

**Vero:** Línea celular epitelial transformada aislada de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*).

**L929:** Línea celular establecida de fibroblastos de ratón (*Mus musculus*).

**DF1:** Línea celular transformada de forma espontánea de fibroblastos de pollo (*Gallus gallus*).

**MCF-7:** Línea celular obtenida de un adenocarcinoma de glándula mamaria de una paciente humana.

**Sf9:** Línea celular estable procedente del ovario de la oruga de la acelga (*Spodoptera frugiperda*).

#### 1.1.2.-Virus.

##### 1.1.2.1.- Reovirus.

**S1133:** es una cepa poco patogénica de reovirus aviar que se ha utilizado mucho para generar vacunas (van der Heide and Kalbac, 1975)

**1733:** Cepa de reovirus aviar muy patogénica, que induce enfermedades en animales de experimentación (Rosenberger et al., 1989)

**Reo 3:** Reovirus de mamífero tipo 3 Dearing, cepa utilizada como modelo de reovirus de mamífero.

##### 1.1.2.2.- Baculovirus.

**Bac-WT (wild-type):** es una cepa de baculovirus que ha sido desprovista de los genes de polihedrina y P10, y que no expresa proteínas foráneas.

**Bac-muNS:** es un baculovirus recombinante que expresa la proteína no estructural muNS del reovirus aviar S1133 bajo el control del promotor de P10 (Tourís-Otero et al., 2004b).

### 1.1.3.-Células procariotas.

**DH5- $\alpha$ :** Cepa bacteriana de *E. coli* utilizada para el crecimiento y purificación de plásmidos, cuyo genotipo es: supE44, ElacU169(G80lacZEM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1 (Hanahan, 1983).

**XL1-Blue:** Cepa bacteriana de *E. coli* usada para el crecimiento y purificación de plásmidos, cuyo genotipo es: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'proAB lacIqZEM15 Tn10 (Tetr)] (Stratagene, La Jolla, California).

### 1.2.- Plásmidos parentales.

**pCDNA3.1/Zeo** (Invitrogen, Barcelona, España): vector de expresión eucariota que permite la expresión transitoria de genes clonados bajo el promotor temprano de citomegalovirus.

**pEGFP-N1** (Clontech, Saint Germain en Laye, Francia): vector de expresión eucariota para expresar proteínas fusionadas al extremo amino de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP), bajo el promotor temprano de citomegalovirus.

**pEGFP-C1** (Clontech, Saint Germain en Laye, Francia): vector de expresión eucariota para expresar proteínas fusionadas al extremo carboxilo de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP), bajo el promotor temprano de citomegalovirus.

**pCINeo** (Promega, Madrid, España): vector de expresión eucariota que permite la expresión transitoria de genes clonados bajo el promotor temprano de citomegalovirus.

### 1.3.-Plásmidos recombinantes.

**pCINeo-muNS:** Plásmido que contiene el ORF del gen M3 de la cepa S1133 de reovirus aviar (Tourís-Otero et al., 2004b).

**pEGFP-C1-muNS:** Plásmido que contiene el ORF del gen de M3 de la cepa S1133 de reovirus aviar fusionado al extremo 3' del ORF de EGFP (Tourís-Otero et al., 2004b).

**pCINeo-sigmaNS:** Plásmido que contiene el ORF del gen S4 de la cepa S1133 de reovirus aviar (Tourís-Otero et al., 2004b).

**pCINeo-L1:** Plásmido que contiene el gen L1 de la cepa S1133 de reovirus aviar (Tourís-Otero et al. 2004a)

**pcDNA3.1-L3:** Plásmido que contiene el gen L3 de la cepa S1133 del ARV (clonado en nuestro laboratorio por el doctor Alberto Brandariz Núñez).

**pCINeo-M1-HA:** Plásmido que contiene el ORF del gen M1 y al que se le ha fusionado en su extremo 3' el DNA que expresa la etiqueta HA para facilitar la detección por inmunofluorescencia de la proteína expresada en células eucariotas

## 1.4.-Anticuerpos.

### 1.4.1.- Anticuerpos primarios.

**Anti-muNS ( $\alpha$ -muNS):** Antisuero generado en conejos contra la proteína muNS del ARV S1133, utilizando como inmunógeno la proteína desnaturalizada y extraída de un gel de SDS-PAGE (Tourís-Otero et al., 2004b). Se usó en Western blot a diluciones entre 1:5000 y 1:20000 y en inmunofluorescencia a diluciones entre 1:1000 y 1:5000.

**Anti-GFP ( $\alpha$ -GFP):** Anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína fluorescente verde (GFP) de *Aequorea victoria* (Roche, #11814460001). Se usó en Western blot a una dilución 1:1000.

**Anti-HA ( $\alpha$ -HA):** Anticuerpo monoclonal de ratón específico contra el epitopo de la hemaglutinina del virus influenza (Sigma-Aldrich, #H-3663). Se usó 1:1000 en inmunofluorescencia.

**Anti-alfa-tubulina ( $\alpha$ - $\gamma$ -Tub):** Anticuerpo monoclonal contra la alfa-tubulina de pollo (clon DM1A) (Sigma-Aldrich, #T-9026). Se usó 1:1000 en Western blot.

**Anti-actina ( $\alpha$ -Actin):** Anticuerpo policlonal de conejo contra una región del extremo carboxilo de la actina humana. (Santa Cruz Biotechnology #sc-1616). Se usó 1:10000 en Western blot

### 1.4.2.-Anticuerpos secundarios.

- **Para Western blot:** Anticuerpos de cabra contra las IgGs de conejo y de ratón o anticuerpos de conejo contra la IgG de cabra conjugados con peroxidasa (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se usaron a diluciones entre 1:1000 y 1:4000

- **Para inmunofluorescencia:** Anticuerpos de cabra contra las IgGs de conejo y de ratón, o anticuerpos de conejo contra la IgG de cabra, conjugados con diversos fluorocromos: CY3 (Sigma, Madrid, España), Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Barcelona, España) (Wang y Taylor, 1989; Herman y Lemasters, 1993). Todos ellos se utilizaron en diluciones que variaron entre 1:1000 y 1:5000.

## 1.5.-Material no biológico.

### 1.5.1.-Medios de cultivo.

Los fibroblastos embrionarios de pollo (CEF) se cultivaron en medio 199 con sales de Earle (Invitrogen, #31150-030), suplementado con suero fetal de ternera (Invitrogen, #F7524-500ML) al 5%, 2 mM de L-glutamina (Invitrogen, G-7513), 100 U/mL de penicilina (Invitrogen, #P7794-100MU) y 100 µg/mL de estreptomina (Invitrogen, #S9137-500G), 10% de caldo de triptosa fosfato (TPB) (Gibco, #18050-039) y 0,25 µg/mL de fungizona (Invitrogen, # 15290-026).

Las diferentes líneas celulares se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM), que contenía 3,7 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 4,5 g/L de glucosa, y 110 mg/L piruvato (Invitrogen, #D6429). Al medio se le añadió suero bovino fetal (FBS) al 10%, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 2 mM de L-glutamina.

Las células Sf9 de insecto se cultivaron en medio SF900II SFM (Invitrogen, #10902-153) suplementado con 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina.

El crecimiento de *E. coli* se realizó en medio de Luria-Bertani (LB). Para el crecimiento de bacterias transformadas con plásmidos, el medio se suplementó con los antibióticos ampicilina (100 µg/mL) (Fluka # 10044), gentamicina (7 µg/mL) (Sigma, #G1397), tetraciclina (10 µg/mL) (Sigma, #T3383) o kanamicina (50 µg/mL) (Sigma, #K-1377), según el método de selección para cada plásmido. Los cultivos de colonias en medio sólido se realizaron en el mismo medio conteniendo 1,5% bacto-agar (DIFCO #0140-01) y antibióticos a las concentraciones indicadas anteriormente. La composición de estos medios se describe de forma detallada en el manual de protocolos de Sambrook and Russell (2001).

### 1.5.2.-Disoluciones y tampones.

**Mezcla de liposomas para transfección:** 1 mg DOPE (di-oleoil-L- $\alpha$ -phosphatidiletanolamina) (Sigma #P1223) y 1,5 mg DC-Chol [Colesteril 3 $\beta$ -N-(dimetil-aminoetil) carbamato hidroclicloridrato] (Sigma #C2832). Se disuelve cada uno de los lípidos en 12 mL de cloroformo, se mezclan bien y se deja evaporar todo el cloroformo en una campana a 40°C. El precipitado resultante se resuspende en 32 mL de agua milliQ estéril y se sonica 15 min con ciclos de 30 s a máxima potencia para que se formen los liposomas. Posteriormente se esteriliza por filtración y se preparan alícuotas que se guardan a -20°C hasta su uso.

**PBS:** 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH: 7,4

**PBST:** PBS + 0,05% Tween-20.

**PBST-leche:** PBS+0,05% Tween-20 + 4% de leche desnatada en polvo.

**PBS-BSA:** PBS + 2% BSA.

**PBS-BSA-Triton:** PBS+ 2% BSA + 0,5% Triton-X100.

**PBS-paraformaldehído:** PBS + 4% paraformaldehído despolimerizado.

**Medio de montaje:** 6 g glicerol; 2,4 g mowiol (Calbiochem, Madrid, España); 6 mL H<sub>2</sub>O y 12 mL 0,2 M Tris-HCl, pH: 8,5.

**Tampón de electroforesis para SDS-PAGE 1X (Tris-glicina-SDS):** 25 mM Tris-HCl, pH: 8,3; 192 mM glicina y 0,1 % SDS.

**Tampón de muestra para DNA (6X):** 0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol y 30% glicerol.

**Tampón de muestra de Laemmli (3X):** 60 mM Tris-HCl, pH: 6,8; 2% SDS; 5% 2-mercaptoetanol; 10% glicerol y 0,024% azul de bromofenol.

**Tampón de transferencia:** 25 mM Tris-HCl, pH: 8,3; 192 mM glicina y 20% metanol.

**Tampón Tris-EDTA (TE):** 10 mM Tris-HCl pH: 8,0 y 1 mM EDTA.

**Tampón Tris-acetato-EDTA (TAE):** 4 mM Tris-acetato pH: 8,3 y 1 mM EDTA.

**Tampón RIPA:** 50 mM Tris-HCl, pH: 8,0; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 0,5% deoxicolato sódico y 0,1% SDS.

**Tampón hipotónico:** 10 mM Hepes pH 7,9; 10 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

**Tampón TSS:** 10% PEG 4000; 5% DMSO; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 10% glicerol y 80% LB

**Disolución de DAPI:** preparado a 100 µg/mL en agua estéril y esterilizado a través de un filtro de 0,22 µm.

**Tampón C:** 20 mM Hepes, pH: 7,4; 100 mM NaCl y 0,05% NP-40.

**Tampón TX:** 10 mM Pipes pH: 6,8, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 300 mM sacarosa, 1 % (v/v) Tritón X-100.

### **1.5.3.-Isótopos radiactivos.**

**L-[<sup>35</sup>S]metionina-cisteina labelling mix:** (1000 Ci/mmol) (Hartmann Analytic #IS-103, Hartmann Analytic GmbH, Alemania, Braunschweig)

**L-[<sup>35</sup>S]metionina translation grade:** (1000 Ci/mmol) (Hartmann Analytic #KSM-01)

**[<sup>32</sup>P]ortofosfato:** (100 mCi/mmol) (Hartmann Analytic #ARP-103)

#### **1.5.4.-Otros productos químicos.**

**Actinomicina D:** Disuelto en DMSO a 1mg/mL (Sigma #A 1410)

**Bisindoleil-maleimida I, hidrocloreto:** Disuelto en DMSO a 25 mM (Calbiochem #203291)

**Cóctel inhibidor de proteasas cOmplete:** (Roche # 11697498001)

**DAPI (Dilactato 4',6-Diamidino-2-Phenilindol):** Sigma #D-9542)

**Q-VD-OPh, Insolution, no-O-metilado:** (Calbiochem #551476)

**Ro-31-8425:** Preparado en DMSO a 10 mg/mL (Calbiochem #557514)

**Estaurosporina:** Disuelto en etanol a 1 mM (Sigma #S4400)

**Z-VAD-FMK (inhibidor general de caspasas IV):** Disuelto a 100 mM en DMSO (Calbiochem #219007)

## **2.-Métodos.**

### **2.1.-Manipulación de células bacterianas.**

#### **2.1.1.-Crecimiento y mantenimiento de bacterias.**

Las bacterias se crecieron con agitación a 37°C en medio LB con ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, Madrid, España), gentamicina (7 µg/mL) (Sigma-Aldrich, Madrid, España), tetraciclina (10 µg/mL) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) o kanamicina (50 µg/mL) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) según el método de selección para cada plásmido. Se conservaron congeladas a -80°C en el mismo medio suplementado con 20% de glicerol.

#### **2.1.2.-Obtención de bacterias competentes y transformación.**

La cepa bacteriana correspondiente se creció en medio LB a 37°C durante toda la noche y el cultivo se diluyó 1/100 en el mismo medio precalentado. Se las dejó crecer hasta alcanzar un valor de absorbancia a 600 nm de 0,3. A continuación, se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min a 4°C (Beckman GPR Centrifuge) y se resuspendieron en 1/10 de su volumen original en tampón de transformación TSS previamente enfriado en hielo (Chung et al., 1989). Las células se guardaron congeladas a -80°C hasta su uso.

Para su transformación, las bacterias competentes se descongelaron en hielo y se mezcló una alícuota de 100 µl con el DNA transformante (1-10 ng). Después de

incubar en hielo durante 30 min, se realizó un choque térmico a 42°C durante 1 min. Tras mantenerlas de nuevo en hielo durante 2 min, se añadió 1 mL de LB y se incubaron a 37°C durante 1 h con agitación. Por último se recogieron por centrifugación y se esparcieron en una placa de LB-agar suplementada con el antibiótico correspondiente.

## **2.2.-Manipulación de ácidos nucleicos.**

### **2.2.1.-Purificación de DNA plasmídico.**

La purificación de DNA a pequeña escala, para el análisis de transformantes u otros usos, se realizó usando el sistema DNA Wizard™ Minipreps (Promega, #A1460) a partir de 3 mL de cultivo bacteriano. Para la obtención de DNA a mayor escala y pureza, para el uso rutinario en transfección o como molde para la obtención de mensajeros *in vitro*, se aisló el plásmido a partir de 100 mL de cultivo bacteriano usando el sistema PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega, #A2495), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

### **2.2.2.-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Las reacciones estándar se llevaron a cabo manteniendo constantes las concentraciones de los reactivos y los ciclos de amplificación, a excepción de la temperatura de hibridación y el tiempo de extensión, que variaba en función de los oligonucleótidos cebadores empleados y del tamaño del DNA utilizado como molde. Generalmente se utilizó como programa de amplificación: 1 ciclo (2 min a 95°C), 30 ciclos (1 min a 94°C, 30 s a la T<sub>m</sub> adecuada y 1 min/Kb a 72°C) y un ciclo final de 10 min a 72°C. En todos los casos la reacción de amplificación contenía 5 unidades de Taq polimerasa (Ecotaq (Fermentas, EP0401) o Pfu-polimerasa, (Promega, #M7741) y 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 μM de cada cebador y 1 ng de DNA molde.

### **2.2.3.-Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).**

Todas las reacciones se realizaron con el kit SuperScript™ One Step RT-PCR System con Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen, #12574-018) que incluye el tampón de reacción 2X (conteniendo 0,4 mM de cada dNTP y 3,2 mM MgSO<sub>4</sub>). Las reacciones se llevaron a cabo manteniendo constantes las concentraciones de los reactivos y los ciclos de amplificación, a excepción de la temperatura de hibridación, que varió dependiendo de los oligonucleótidos cebadores empleados en cada reacción. Generalmente se utilizó como programa de transcripción reversa: 1 ciclo (5 min a 100°C)

donde están presentes sólo el RNA y los cebadores, 1 ciclo (5 min a 0°C), 1 ciclo (30 min a 55°C) donde se añade previamente la mezcla de reacción 2X y las enzimas. Para la amplificación del DNA se utilizaron las siguientes condiciones: 1 ciclo (2 min a 94°C), 29 ciclos (1 min a 94°C, 1 min a la T<sub>m</sub> adecuada y 1 min a 68°C por cada kb) y un ciclo final de 15 min a 68°C. En todos los casos la reacción de amplificación se realizó con 1U de SuperScript™ III/Platinum® Taq Mix, 1X de tampón de reacción e incluyó 0,4 µM de cada cebador y 1 µg de RNA.

#### **2.2.4.-Aislamiento y purificación de fragmentos de DNA.**

Los fragmentos de DNA procedentes de reacciones de PCR o de digestiones con enzimas de restricción se separaron mediante electroforesis en geles de 0,8-2% de agarosa en TAE 1X en presencia de 0,5 µg/mL de bromuro de etidio (Sambrook and Russell, 2001). La banda de DNA se cortó del gel con una cuchilla, se transfirió a un tubo y el DNA se purificó mediante el kit comercial "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (GE Healthcare, #28-9034-71), siguiendo las instrucciones del proveedor.

#### **2.2.5.-Corte y unión de fragmentos de DNA.**

Las digestiones de DNA con enzimas de restricción (Promega, Madrid, España) se llevaron a cabo en los tampones suministrados, según las instrucciones del proveedor y a la temperatura óptima para cada caso. Las reacciones de ligación se realizaron a temperatura ambiente con la DNA ligasa del fago T4 (Promega, #M1801) y con una relación molar entre vector e inserto de 1:5.

#### **2.2.6.-Mutaciones puntuales del DNA.**

Para generar mutaciones puntuales se utilizó el sistema QuikChange™ para mutagénesis dirigidas de (Stratagene #200519), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para introducir mutaciones en la proteína muNS de ARV se usó como molde el plásmido pCINeo-muNS clonado por Tourís-Otero et al., (2004b) y los cebadores que se indican a continuación (en la secuencia de cada cebador se subraya el nucleótido mutado):

Para la obtención de pCINeo-muNS D154A se utilizó como cebador positivo:

5' CCACCGCTGATTCCCCGCTGCCTGCGTCCCAGTCACC 3'

y como cebador negativo:

5' GGTGACTGGGACGCAGGCAGCGGGGAATCAGCGGTGG 3'

Para la obtención de pCINeo-muNS-D200A se utilizó como cebador positivo:

5' CGTCTTCTCACGCATGAAGTCTTCGAGTTAACGTCCGATTTACCCGG 3'.

y como cebador negativo:

5' CCGGGTAAACCGGACGTTAACTCGAAGACTTCATGCGTGAGAAGACG 3'

Para introducir mutaciones en las posiciones 152 y 173 de la proteína muNS de ARV se utilizaron los siguientes cebadores:

Para cambiar la serina 152 por una alanina se usó como cebador positivo:

5' TTCCACCGCTGATGCCCCCGATGCCTG 3'

y el cebador negativo:

5' CAGGCATCGGGGGCATCAGCGGTGGAA 3'

Para cambiar la serina 152 a ácido glutámico, el cebador positivo fue:

5' GTTTCCACCGCTGATGAACCCGATGCCTGCGTC 3'

y el cebador negativo:

5' GACGCAGGCATCGGGTTCATCAGCGGTGGAAAC 3'

Para mutar la serina 173 por una alanina el cebador positivo fue:

5' GCAGACTATTGCTAAGGCTCCTGGACGTCTCGAC 3'

y el cebador negativo:

5' GTCGAGACGTCCAGGAGCCTTAGCAATAGTCTGC 3'

Para mutar la serina 173 por un ácido glutámico el cebador positivo fue:

5' AGCAGCAGACTATTGCTAAGGACCTGGACGTCTCGACGAGGA 3'

y el cebador negativo:

5' TCCTCGTCGAGACGTCCAGGTCCTTAGCAATAGTCTGCTGCT 3'

Para mutar las metioninas de la proteína muNS de MRV se utilizó como molde el pCINeo-MRV-M3 que contiene el gen M3 entero.

Para reemplazar la metionina del extremo amino de la muNS entera por leucina se utilizó el cebador positivo (pCINeo-MRV-M3-M1L):

5' GTGACCGTGGTCTTGGCTTCATTCAAGGGATTC 3'

y como negativo:

5'GAATCCCTTGAATGAAGCCAAGACCACGGTCAC 3'

Para la obtención de pCINeo-MRV-M3-M41L se utilizó el cebador positivo:

5' ACTCCGTCTGTGGATTTGTCTCAATCGCGTG 3'

y el cebador negativo:

5'CACGCGATTGAGACAAATCCACACAGACGGAGT 3'

Finalmente, para la generación de pCINeo-MRV-M3-M57L el cebador positivo fue:

5' AATTGAGCAAGGGTCCTTGTCTATACCTTATCA 3'

y el cebador negativo:

5' TGATAAGGTATAGACAAGGACCCTTGCTCAATT 3'

Todas las mutaciones generadas se comprobaron por análisis de restricción y por secuenciación directa de los plásmidos (Sistemas Genómicos SL, Valencia, España).

### **2.2.7.-Construcciones de plásmidos recombinante.**

Para generar el plásmido que expresa la proteína muNS del MRV, se amplificó por RT-PCR el RNA total extraído de células L929 infectadas con la cepa Reo3 del MRV, usando el cebador positivo:

5'-GCTTCCCATATTCCGCTCGAGGCTAAAGTGACCGTGGTCATG-3'

y el cebador negativo:

5'-GCTAAAGGAAAATTGCGGCCGCTGATGAATGGGGGTCG-3'.

Estos cebadores añaden las dianas de XhoI y NotI, respectivamente, las cuales se muestran subrayadas. El producto resultante se digirió con las enzimas de restricción y se insertó en el vector pCINeo digerido con las mismas enzimas, para generar el vector recombinante pCINeo-M3-MRV.

Para generar versiones de la proteína muNS de MRV que utilizaran las metioninas 41 y 55 de la muNS completa como inicio de la traducción, se amplificó por PCR el gen usando como molde el plásmido recombinante pCINeo-M3-MRV, y como cebadores positivos:

Para la delección hasta la posición 40:

5'-GCTTCCCATATTCCGCTCGAGATGTCAATCGC-3' (diana de XhoI subrayada)

Para la delección hasta la posición 56:

5'-GCTTCCCATATTCCGCTCGAGATGTCT- ATACCTTATCAG-3' (diana de XhoI subrayada)

En ambos casos el cebador reverso fue el que se usó para clonar el gen entero. El plásmido pCINeo vacío también se digirió con las mismas enzimas para generar los extremos cohesivos necesarios para ligar el inserto y generar así los plásmidos recombinantes pCINeo-M3-MRV-DeltaN40 y pCINeo-M3-MRV-DeltaN56.

El plásmido pCINeo-muNS-ARV ya ha sido descrito en (Tourís-Otero et al., 2004b), así como las delecciones del extremo amino de la proteína o las versiones fusionadas a GFP (Brandariz-Nuñez et al., 2010c).

Todas las construcciones se verificaron mediante secuenciación (Sistemas Genómicos SL, Valencia, España) y análisis por Western blot, usando los anticuerpos correspondientes.

### **2.2.8.-Extracción de RNA de células infectadas.**

Para extraer el RNA total de células infectadas, células CEF se infectaron con 10 pfu/célula del ARV S1133 durante 18 h a 37°C. Las células se lavaron 2 veces con PBS y se suplementaron con 1 mL de Trizol (Invitrogen #15596-026) por cada  $1 \times 10^7$  células de cultivo, después se siguieron las indicaciones del fabricante. Finalmente el RNA se precipitó para después disolverlo en H<sub>2</sub>O a una concentración de 1mg/mL y se guardó a -20 en alícuotas de uso.

### **2.2.9.-Transcripción *In vitro*.**

Los plásmidos recombinantes se incubaron con Not I durante 4 h para linearizar el molde. El DNA linearizado se desproteinizó por extracción con fenol/cloroformo, se precipitó con etanol y se resuspendió en H<sub>2</sub>O a 1mg/mL. Para la transcripción *in vitro* se usó el kit RiboMAX Large Scale RNA Production System (Promega #P1320), según las instrucciones del fabricante. Se prepararon reacciones de 5-10  $\mu$ L conteniendo 5-10  $\mu$ g de DNA molde y se incubaron 30 min a 37°C. El RNA resultante se diluyó 1/10 en H<sub>2</sub>O milliQ esterilizada y se guardó en alícuotas a -80°C.

### **2.2.10.-Traducción *In vitro*.**

Para la traducción *in vitro* se utilizó el kit Rabbit Reticulocyte Lysate System nuclease-treated (Promega # L4960) según las instrucciones del fabricante. El mRNA se descongeló, se incubó 3 min a 70°C para impedir la formación de estructuras secundarias, y se añadió a la reacción a 50 mg/mL. La reacción también contenía 0,4 mCi/mL de [<sup>35</sup>S]metionina (Hartmann analytic #KSM-01).

### **2.2.11.-Generación *in vitro* de mensajeros virales con idénticas regiones no traducidas.**

Para generar *in vitro* mensajeros del gen MRV-M3 que tuviesen exactamente la misma secuencia que el mRNA m3 de ARV, diseñamos cebadores que hibriden en los

extremos no codificantes del gen para amplificar una copia de DNA de la secuencia completa del gen. Además, el cebador positivo llevaba en posición 5' a la secuencia del gen la secuencia del promotor de T7, a modo de adaptador. De tal manera, obtenemos un fragmento de DNA de doble cadena que puede ser reconocido por la RNA polimerasa T7 y que inicia su polimerización en el primer nucleótido del gen MRV-M3.

Cebador positivo:

5'TAATACGACTCACTATAGGCTAAAGTGACCGTGTCATG 3'

Cebador negativo: 5' GATGAATGGGGGTCGGGAAG 3'

## **2.3.-Expresión y manipulación de proteínas.**

### **2.3.1.-Análisis por electroforesis en geles SDS-PAGE.**

La electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) se llevó a cabo por el procedimiento de Laemmli (1970). Las concentraciones de poliactilamida empleadas para el gel separador fueron del 10%, 12,5% o 15% y para el gel concentrador del 4%. Para visualizar las bandas radiactivas por autorradiografía, el gel se secó previamente calentándolo a 80°C en vacío durante 1 h.

Para el análisis de polipéptidos de bajo peso molecular (en el rango por debajo de los 20 kDa) se utilizaron geles discontinuos de Tricina-SDS-poliacrilamida (Tricina-SDS-PAGE) siguiendo el protocolo de Schägger and von Jagow (1987). Las concentraciones de acrilamida utilizadas fueron del 10% para el gel separador, 10% para el espaciador y 4% para el concentrador.

### **2.3.2.-Purificación de la muNS expresada en baculovirus.**

Tres días después de la infección con el correspondiente baculovirus, las células se centrifugaron durante 10 min a 1000 x g. El pellet se resuspendió en 10 mL de tampón hipotónico y se puso en hielo durante 15 min para facilitar el lisado de las células. El extracto celular se centrifugó durante 10 min a 2000 x g, y el pellet resultante se resuspendió en 10 mL de tampón hipotónico, el cual se centrifugó a 2000 x g durante 10 min y se lavó dos veces con 10 mL de tampón hipotónico. El pellet resultante se resuspendió en el mismo volumen de tampón hipotónico y se sonicó (45 ciclos con pulsos de 30 segundos de sonicado seguido de 30 segundos de reposo en hielo, con los selectores a 0,5 ciclos y amplitud 50), para romper los núcleos celulares y fragmentar el DNA. El extracto sonicado se centrifugó nuevamente a 200 x g durante 5 min. El pellet se resuspendió en 5 mL de tampón hipotónico y se lavó 5 veces en el mismo volumen de tampón hipotónico y se centrifugó (200 x g durante 5 min). El pellet final se resuspendió en 1 mL de tampón hipotónico.

### 2.3.3.-Ensayo de corte de muNS *in vitro*.

Para evaluar la capacidad de los extractos de células infectadas de cortar a muNS,  $2 \times 10^7$  células CEF sin infectar o infectadas con 0,1 pfu/mL de S1133 en presencia o ausencia de 10  $\mu$ M del inhibidor de caspasas Q-VD-OPh se incubaron durante 24 h a 37°C. Posteriormente, se lavaron 2 veces con PBS y se les añadió 1 mL de tampón C (20 mM Hepes, pH: 7,4; 100 mM NaCl; 0,05% NP-40). Finalmente, las células se recogieron con un rascador y se lisaron por congelación/descongelación. A continuación, la proteína muNS marcada radiactivamente con  $^{35}\text{S}$  se incubó durante 2 h a 37°C con 5  $\mu$ L de extracto celular y 5  $\mu$ L de lisado de reticulocito. La muestra resultante se hirvió durante 5 min a 100°C en tampón Laemmli y se analizó por SDS-PAGE y autorradiografía.

Para evaluar la capacidad de las caspasas 3 y 7 para cortar a muNS se utilizó un ensayo parecido. El lisado de reticulocito se diluyó 1:2 en tampón C y se suplementó con 1 U de la caspasa recombinante correspondiente. Cuando se evaluó la muNS producida en baculovirus con este sistema 1  $\mu$ g de la proteína muNS purificada a partir de células de insecto infectadas con baculovirus se diluyó 1:10 en tampón C y se incubó durante con 1 U de enzima. En ambos casos la incubación se realizó durante 1 h a 37°C y las muestras resultantes se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía, en el caso de la proteína radiactiva, o por Western blot para la proteína de origen baculoviral.

### 2.3.4.-Análisis de fosfoaminoácidos

El análisis se realizó por el método de Cooper et al. (1983). Células CEF infectadas con ARV se incubaron con ortofosfato radiactivo, se lisaron y los extractos resultantes se inmunoprecipitaron con suero anti-muNS. Las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Las bandas proteicas radiactivas de la membrana se visualizaron por autorradiografía. Un fragmento de la membrana conteniendo la banda radiactiva de muNS se cortó y se incubó con 6 M HCl a 110°C durante 2 h en atmósfera de nitrógeno. Los productos de hidrólisis se secaron a vacío y se disolvieron en tampón pH: 1,9 (ácido fórmico-ácido acético glacial- $\text{H}_2\text{O}$ , 44,4-156-1800). Las muestras resultantes se mezclaron con 3  $\mu$ g de cada uno de los fosfoaminoácidos estándar fosfo-serina, fosfo-treonina y fosfo-tirosina, se cargaron sobre placas de capa fina de celulosa de 10 x 20 cm y se sometieron a electroforesis en tampón pH 1,9 a 1200 V durante 25 min. La placa se secó y se sometió a electroforesis en una segunda dimensión en tampón pH 3,5 (piridina-ácido acético glacial- $\text{H}_2\text{O}$ , 10-100-1890) a 2000 V durante 40 min. Al acabar la electroforesis de la segunda dimensión, la placa se secó, se tiñó con ninhidrina y se expuso a un gel de rayos X para autorradiografía.

### **2.3.5.-Fraccionamiento celular.**

Para llevar a cabo el fraccionamiento celular que separase la fracción asociada al citoesqueleto (TX-insoluble) de la fracción soluble seguimos el protocolo descrito previamente (Mora et al., 1987; Tourís-Otero et al., 2004a). Brevemente, células infectadas durante 16 h se lavaron 3 veces con PBS frío y se lisaron en la placa con el tampón de lisis TX durante 5 min en hielo. El sobrenadante constituye la fracción citosólica (fracción TX-soluble). Tras lavar una vez con el tampón de lisis, se rascó la placa y el pellet se resuspendió en tampón RIPA.

## **2.4.-Manipulación de cultivos celulares y virus.**

### **2.4.1.-Condiciones de manipulación.**

La manipulación de los materiales biológicos (líneas celulares y preparaciones virales) se realizó en condiciones estériles en el interior de una cabina de flujo laminar vertical. Las líneas celulares y los cultivos primarios se mantuvieron en el interior de un incubador Napco a 37°C, con una humedad relativa del 95% y una presión parcial de CO<sub>2</sub> del 5%. El material desechable se esterilizó en la autoclave antes de su eliminación definitiva.

Las células de insecto se mantuvieron en monocapa o en suspensión (120 rpm) en el interior de un incubador Sanyo o Innova, respectivamente, a una temperatura de 28°C, con humedad ambiental y sin CO<sub>2</sub>.

### **2.4.2.-Propagación y conservación de líneas celulares.**

Para congelar células, monocapas de células confluentes se tripsinizaron y se centrifugaron durante 5 min a 600 x g. Las células sedimentadas se resuspendieron en 500 µL de medio de cultivo y se le añadieron 500 µL de medio de congelación (D-MEM o medio 199 suplementado con 40% de FBS y 20% de dimetilsulfóxido). Las suspensiones celulares se dispensaron en alícuotas de 1 mL en criotubos estériles. Los viales se mantuvieron 5 min a 4°C, 24 h a -80°C y finalmente se transfirieron a una cántara de nitrógeno líquido

La descongelación de las células se realizó de forma rápida, sumergiendo los viales en un baño de agua a 37°C. Posteriormente, el contenido del vial se transfirió a tubos que contenían medio de cultivo completo precalentado a 37°C, y se centrifugaron durante 5 min a 600 x g para eliminar el medio de congelación. A continuación, las células sedimentadas se resuspendieron en medio de cultivo, se transfirieron a frascos de cultivo celular con medio y se incubaron a 37°C.

### **2.4.3.-Obtención de fibroblastos embrionarios de pollo (CEF).**

Los cultivos primarios se obtuvieron a partir de embriones de pollo de 9 a 10 días de incubación, cedidos por laboratorios MSD (Salamanca). La cáscara se lavó con etanol y se colocó sobre un soporte con el polo más ancho hacia arriba. Con pinzas estériles se abrió el cascarón y se rompió la membrana corialantoidea para penetrar en la cavidad amniótica. El embrión extraído del huevo se decapitó y evisceró. El tejido resultante se resuspendió en un volumen de 250 mL de PBS precalentado a 37°C y se troceó mecánicamente con ayuda de unas tijeras. Los fragmentos de tejido se incubaron con tripsina (10 mL de tripsina al 0,25 % en PBS/embrión) a 37°C durante 1 h, tras lo cual la suspensión se filtró a través de una rejilla metálica y se centrifugó a 1500 x g durante 35 min. El pellet celular obtenido se resuspendió en un volumen adecuado de medio 199 precalentado a 37°C y suplementado con 10% TPB, 5% de suero, antibióticos y fungizona, y se sembró finalmente en placas que se incubaron a 37°C en un incubador de CO<sub>2</sub>.

### **2.4.4.-Crecimiento y titulación de virus.**

Para la preparación de stocks del reovirus aviar S1133, monocapas confluentes de CEF, sembradas en placas de 150 mm de diámetro, se incubaron a 37°C durante 24 h con virus a una multiplicidad de infección de 0,1 pfu/célula en medio 199 suplementado con 2% FBS. Las células se recogieron en un pequeño volumen de medio de infección. El medio se congeló y descongeló tres veces y se centrifugó a 1500 x g durante 15 min. El sobrenadante se almacenó a -80° C hasta su utilización.

Las titulaciones virales se realizaron mediante el método de ensayo en placa, sobre monocapas confluentes de CEF. Se prepararon diluciones seriadas en PBS de las suspensiones virales, las cuales se usaron para infectar monocapas de células en placas de 6 pocillos (0,2 mL por pocillo de cada dilución). Tras 4 h de adsorción se retiró el inóculo y se añadieron 4 mL del medio adecuado para cada tipo de cultivo, suplementado con 1% de agar, 4% de FBS, 2% de glutamina y 1% de antibióticos. Tras 10 min a temperatura ambiente para permitir la solidificación del medio, las placas se incubaron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> hasta la aparición de calvas de lisis (aproximadamente 3 días). Las monocapas se tiñeron con 1 mL de 0,25 mg/mL de rojo neutro en PBS y se calculó el título viral a partir del número de calvas formadas en cada dilución.

### **2.4.5.-Transfección de células eucariotas con plásmidos para expresión transitoria.**

Se crecieron monocapas subconfluentes de células (aproximadamente 70% de confluencia) en placas de 12 pocillos. La transfección se llevó a cabo con complejos de

DNA-liposomas empleando una mezcla de 0,5 mg DOPE (di-oleoil-L- $\alpha$ -phosphatidiletanolamina) y 0,75 mg DC-Chol (Colesteril 3 $\beta$ -N-(dimetil-aminoetil) carbamato hidroc loridrato) por mL de volumen de mezcla de liposomas a preparar, siguiendo el protocolo estándar. Para ello, 1  $\mu$ g de DNA se mezcló con 50  $\mu$ L de medio sin suero y, por otra parte, 6  $\mu$ L de mezcla liposómica se mezclaron con 50  $\mu$ L de medio sin suero. Se juntaron las dos fracciones y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min para dejar que se formasen los liposomas y que incorporasen el DNA en su interior. Las células a transfectar se lavaron con PBS 5 veces, para eliminar los restos de suero, y se suplementaron con 400  $\mu$ L de medio sin suero y con los 100  $\mu$ L de la mezcla de DNA-liposomas. Las células transfectadas se mantuvieron a 37°C durante 4-5 h. Al cabo de ese tiempo, se retiró la mezcla de transfección y se añadió medio suplementado con 10% FBS para incubar las células un mínimo de otras 16 h.

#### **2.4.6.-Expresión de proteínas con baculovirus.**

Un frasco con células Sf9 en suspensión ( $1,5 \times 10^6$  células/mL con una viabilidad superior al 99%) se infectó con 5 pfu/célula de baculovirus. Las células se mantuvieron tres días a 28°C con agitación a 120 rpm, punto en el cual la expresión de proteínas bajo el promotor de la polihedrina suele alcanzar el máximo.

#### **2.4.7.-Marcaje metabólico de proteínas celulares y virales.**

En el caso del marcaje de proteínas con [ $^{35}$ S]metionina-cisteína, las células se lavaron 2 veces con PBS, después se les añadió el medio de marcaje, sin metionina ni cisteína, conteniendo 100  $\mu$ Ci/mL de [ $^{35}$ S]metionina-cisteína y se marcaron durante los tiempos indicados en cada experimento a 37°C. A continuación, se recogieron las células y se lisaron en tampón RIPA.

Para el marcaje con  $^{32}$ P, dos horas antes del marcaje, se lavaron las células 2 veces con PBS y se preincubaron 2 horas a 37°C en medio de marcaje sin fosfato (periodo de *starving*). A continuación, se incubaron las células durante los tiempos indicados en medio sin fosfato, conteniendo 10  $\mu$ Ci/mL de [ $^{32}$ P]ortofosfato. Finalmente, se retiró el medio radiactivo, se recogieron las células y se lisaron en tampón RIPA.

#### **2.4.8.-Determinación de la actividad caspasa intracelular.**

La actividad intracelular de caspasa 3/7 se determinó usando el kit Caspase-Glo 3/7 de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante. Réplicas de cada experimento por triplicado se realizaron sobre  $3 \times 10^4$  células en pocillos de una placa de 96 pocillos. A la hora de lisar las células para su análisis a cada pocillo se le añadió igual volumen de tampón de lisis y se incubó 45 min a temperatura ambiente.

Posteriormente se midió la luminancia de cada muestra usando un Luminoskan-ascent luminometer (Thermo, Waltham, Massachusetts, USA). Las medidas se ofrecen como media de los tres replicados y en unidades relativas de luz (R.L.U.)

## **2.5.-Técnicas inmunológicas.**

### **2.5.1.-Transferencia de proteínas e inmunodetección por Western-blot.**

Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana PVDF/Inmobilon-P (Millipore, #IPVH00010) en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina y 20% metanol), durante 1 h a 100 voltios. Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con 5% de leche desnatada en PBST (PBS conteniendo 0,05% Tween 20). La inmunodetección se realizó con los anticuerpos diluidos en PBST con incubaciones de 60 min y lavados con PBST para retirar los anticuerpos no unidos específicamente. Los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron mediante el kit “Immobilon Western chemiluminiscent HRP substrate” (Millipore #WBKL S0500).

### **2.5.2.-Inmunofluorescencia.**

En el caso de inmunofluorescencia indirecta, las células se fijaron con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 15 min, o con 4% paraformaldehído (Sigma, Madrid, España) a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. A continuación se lavaron con PBS, y en el caso de la fijación con paraformaldehído se permeabilizaron con 0,5% Tritón X-100 en PBS durante 5 min. Se lavaron con PBS y se incubaron en presencia de 2% BSA en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con una solución del anticuerpo primario diluido en 2% BSA en PBS durante 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Tras dos lavados con PBS, se incubaron con una solución del anticuerpo secundario y DAPI 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (tinción nuclear) diluidos en 2% BSA en PBS durante 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Las células se lavaron tres veces con PBS y se montaron sobre una gota de medio de montaje (ver soluciones y tampones) en un portaobjetos, para su observación con el microscopio de fluorescencia.

Las fotografías de las inmunofluorescencias de este trabajo muestran datos representativos. Cada experimento se reprodujo al menos tres veces y las células mostradas son representativas de los efectos mayoritarios observados para las condiciones ensayadas.

Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital Olympus DP-71 montada sobre un microscopio de fluorescencia Olympus BX51. Las fotos obtenidas se procesaron con Adobe Photoshop (Adobe Systems, California, USA).

### **2.5.3.-Inmunoprecipitación.**

Se lavaron las células con PBS y se lisaron en con RIPA sobre hielo durante 10 min, tras lo cual se clareó el extracto centrifugándolo 10 min a 13000 x g. A continuación, Se incubaron 30  $\mu$ L de ese extracto con 1-5  $\mu$ L del anticuerpo correspondiente y otros 30  $\mu$ L de proteína A-Sepharosa, resuspendida previamente al 50% y equilibrada en tampón RIPA, durante 2 h con agitación suave a 4°C. El sobrenadante no retenido se recuperó por centrifugación a 3000 x g durante 1 min, se lavó abundantemente con RIPA 5 veces más y finalmente, para recuperar la fracción retenida, el pellet final se resuspendió en 30  $\mu$ L de tampón de Laemmli 1,5 x y se hirvió, antes de analizar la muestra mediante SDS-PAGE y autorradiografía.

### **2.5.4.-Tratamiento bioinformático de las secuencias.**

Para el análisis básico de las secuencias obtenidas (sitios de restricción, secuencia que codifican las pautas de lectura, pesos moleculares teóricos, diseño de cebadores, etc.) se utilizó el programa Serial Cloner 2.6 (Frank Pérez, SerialBasics)

Las secuencias de las proteínas se compararon con las de otras proteínas conocidas usando el programa BLAST (Altschul et al., 1997), contra secuencias almacenadas en el GenBank (NCBI, USA). El alineamiento de secuencias de proteínas se llevó a cabo con el programa ClustalW (Thompson et al., 1994). La predicción de los dominios coiled-coil se hizo con el programa Coils (Lupas et al., 1991; Lupas, 1996).



## **RESULTADOS**

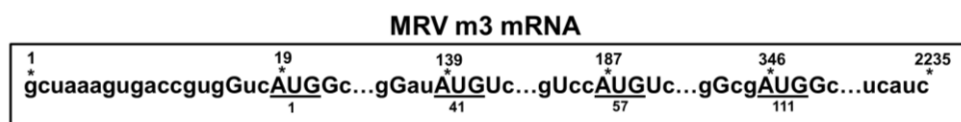


## 1.-Estudio de las isoformas de muNS.

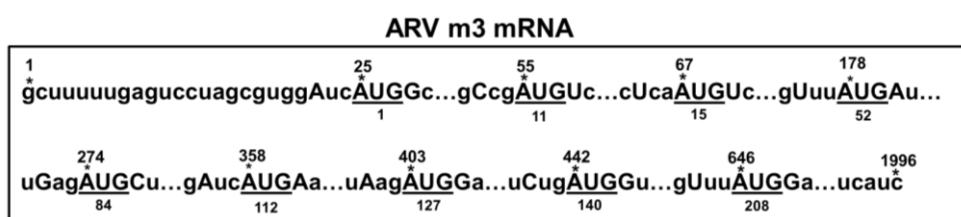
Al inicio de la realización de este trabajo se sabía que los genes M3 de los reovirus ARV y MRV expresaban dos isoformas proteicas en células infectadas. Las isoformas de mayor tamaño (la de MRV de 80 kDa y la de ARV de 70 kDa) se denominaron muNS, porque se suponía que estas isoformas se originaban por traducción de los cistrones más largos de sus respectivos mRNAs m3, los cuales se inician en el codón AUG más próximo al cap y se extienden hasta cerca del extremo 3' del mensajero (Tourís-Otero et al., 2004b; Wiener et al., 1989).

Resultados obtenidos en diferentes laboratorios habían demostrado que la isoforma de menor tamaño que expresa el gen M3 de MRV (75 kDa) se originaba por iniciación de la traducción en un codón interno del mRNA m3. La diferencia de migración electroforética entre las dos isoformas de MRV sugiere que tienen una diferencia en masa de unos 5 kDa, por lo que la iniciación de la traducción de la isoforma pequeña debería tener lugar en un codón AUG interno de m3 en fase con el AUG de iniciación de muNS y que debería estar localizado unos 40-70 codones más abajo. El análisis de la secuencia del mRNA m3 de MRV reveló la presencia de dos codones AUG que cumplían esos requisitos, los codones 41 y 57 (Fig. 12, panel A), por lo que en este trabajo nos propusimos averiguar cuál de esos dos codones es el que inicia la traducción de la isoforma pequeña de MRV.

### A



### B



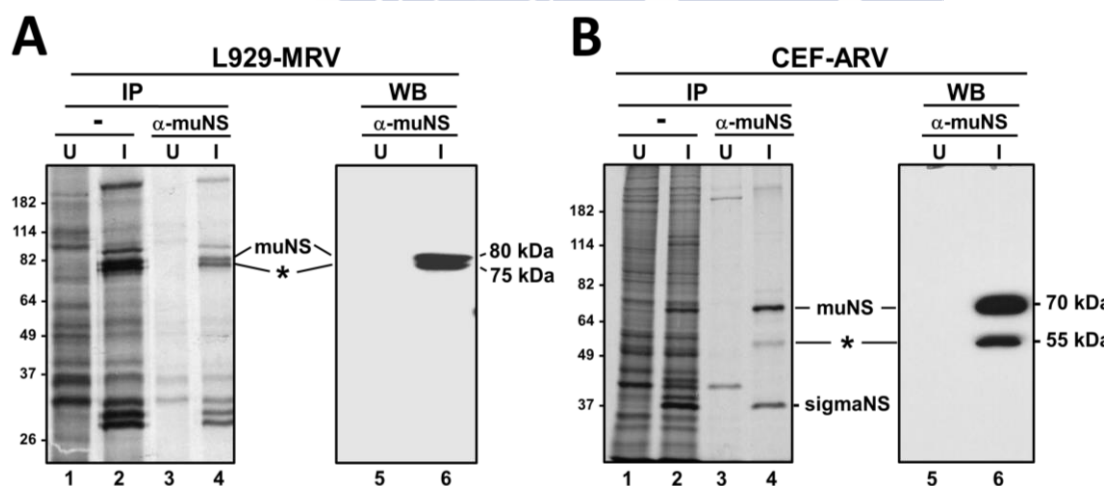
**Figura 12. Secuencias de los mRNAs m3 de MRV (A) y de ARV (B).** Los codones AUG que podrían servir como lugares de iniciación de la traducción, así como las bases de las posiciones -3 y +4 de sus contextos de Kozak, están representadas con letras mayúsculas. Por encima se señalan las posiciones en la secuencia nucleotídica del primer nucleótido del codón AUG. Por debajo hemos subrayado y numerado los codones AUG que están en fase con el codón de iniciación de muNS.

En cuanto a la isoforma pequeña de ARV (55 kDa), al comienzo de la realización de esta tesis no se sabía nada sobre el mecanismo de su formación, por lo que esta proteína podría originarse tanto por iniciación interna de la traducción como por corte proteolítico del precursor muNS. La diferencia de migración electroforética de las dos isoformas de muNS de ARV sugiere que tienen una diferencia en masa de unos

15 kDa, por lo que, en el caso de que la isoforma pequeña se originase por iniciación interna de la traducción, su codón de iniciación debería estar localizado unos 120-150 codones más abajo que el codón de iniciación de muNS. El análisis de la secuencia del mRNA m3 de ARV reveló la presencia de dos codones AUG internos (127 y 140) que están en fase con el codón de iniciación de la traducción de muNS (Fig. 12; panel B), por lo que podrían actuar como codones de iniciación de la traducción de la isoforma pequeña de ARV.

### 1.1.-Identificación de las isoformas de la proteína muNS expresadas por ARV y MRV en células infectadas.

Para identificar las isoformas proteicas expresadas por los segmentos genómicos M3 de ARV y MRV, extractos de células infectadas con cada uno de los dos virus se analizaron mediante inmunoprecipitación y Western blot con anticuerpos específicos contra cada una de las proteínas muNS. Los resultados que se muestran en la Fig. 13 revelaron que el suero anti-muNS de MRV inmunoprecipita varias proteínas virales presentes en los extractos de células infectadas con MRV (Fig. 13, panel A, carril 4). Sin embargo, sólo dos de esas proteínas, las de 80 y 75 kDa, fueron reconocidas por el antisuero en un ensayo de Western-blot (Fig. 13, panel A, carril 6), lo que indica que sólo esas dos proteínas son isoformas de muNS, mientras que las otras son proteínas que co-inmunoprecipitan con muNS.

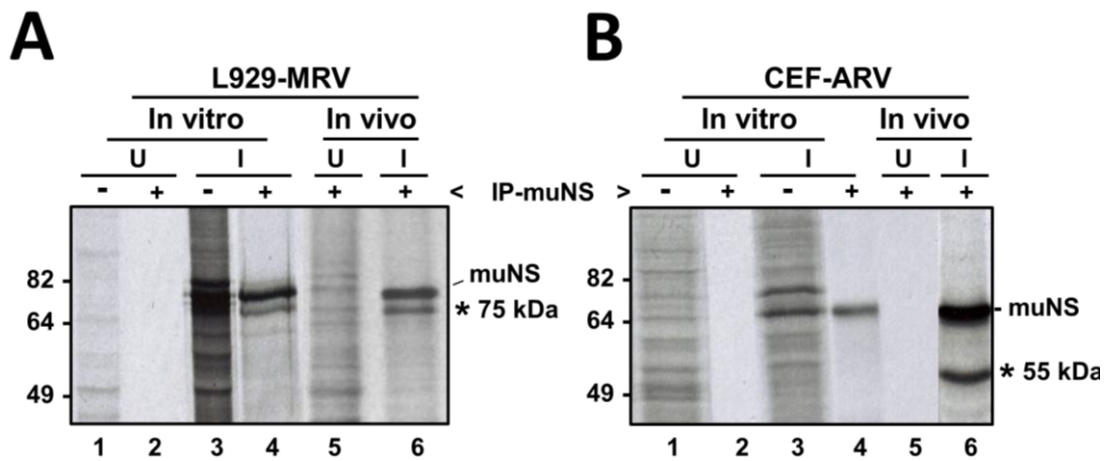


**Figura 13. Identificación de las isoformas de muNS que expresan los reovirus MRV y ARV.** Células L929 de ratón (A) y células CEF (B) sin infectar (U) o infectadas (I) con MRV (A) o ARV (B) se marcaron radiactivamente con [<sup>35</sup>S]metionina/cisteína. (carriles 1- 4) durante 2 h a las 12 hpi, o bien se analizaron mediante Western blot (carriles 5 y 6) a las 14 hpi. Las células radiactivas se lisaron con RIPA y los extractos radiactivos, antes (carriles 1 y 2) o después (carriles 3 y 4) de inmunoprecipitarlos con suero anti-muNS, se analizaron mediante 10% SDS-PAGE y autorradiografía. Las posiciones y tamaños de los marcadores (en kDa) se indican a la izquierda. La posición y masa molecular de las dos isoformas de muNS se indican a la derecha de las figuras.

Por su parte, el antisuero contra la proteína muNS de ARV inmunoprecipitó únicamente tres proteínas (Fig. 13, panel B, carril 4), de las que sólo dos, las de 70 y 55 kDa, fueron reconocidas por el suero anti-muNS en un ensayo de Western blot (Fig. 13, panel B, carril 6), indicando que son dos isoformas de muNS. La banda de 37 kDa que se observa en el extracto inmunoprecipitado, corresponde a la proteína viral sigmaNS, la cual interacciona con muNS, tal como habíamos demostrado previamente en nuestro laboratorio (Tourís-Otero et al., 2004a).

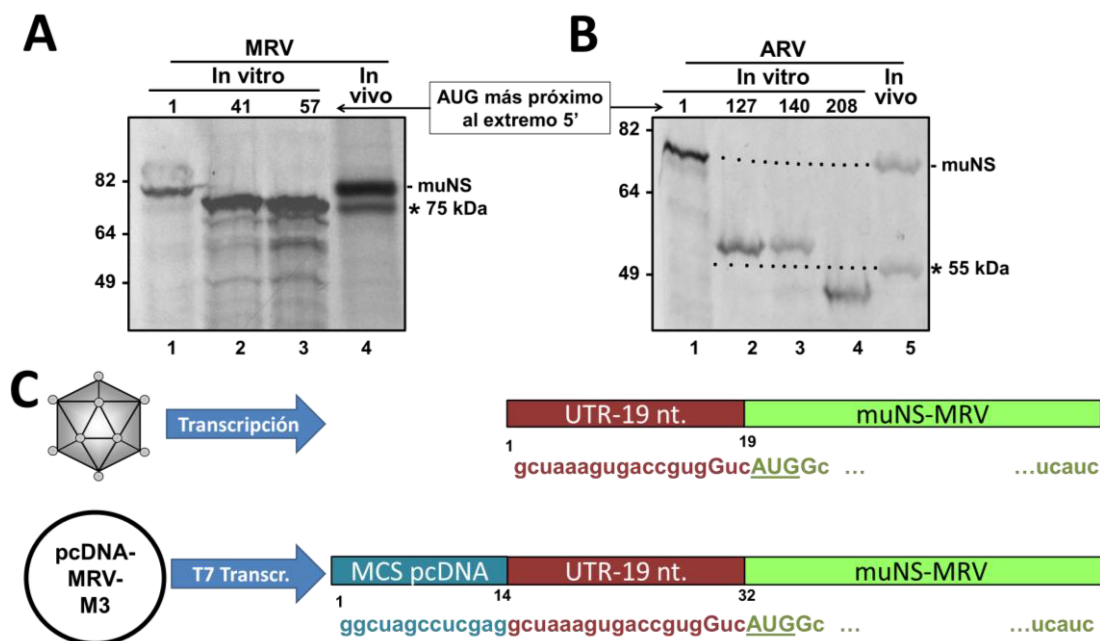
## **1.2.-La isoforma pequeña de la proteína muNS de MRV, pero no la de ARV, se genera por iniciación de la traducción en un codón interno del mRNA.**

Una vez identificadas las dos isoformas proteicas que expresan los genes M3 de los virus MRV y ARV, a continuación decidimos investigar los mecanismos que dan origen a la formación de las isoformas pequeñas de la proteína muNS. Las isoformas pequeñas podrían originarse por iniciación de la traducción en un codón AUG interno del mRNA m3 o por procesamiento proteolítico del precursor muNS. Para investigar la posibilidad de que las isoformas pequeñas se originasen por iniciación interna de la traducción realizamos dos tipos de experimentos. En el primero, el RNA total aislado de células infectadas se tradujo en extractos de reticulocitos de conejo y los productos de traducción se inmunoprecipitaron con anticuerpos contra muNS. Los resultados que se muestran en la Fig. 14 indican que, mientras que el mRNA m3 de MRV es capaz de programar in vitro la síntesis de las dos isoformas de muNS (comparar carriles 4 y 6 del panel A), el de ARV sólo es capaz de dirigir la síntesis de la isoforma mayor (comparar carriles 4 y 6 del panel B). Este resultado sugiere que la isoforma pequeña de MRV, pero no la de ARV, es un producto primario de traducción.



**Figura 14. Comparación de la expresión de los genes M3 in vivo e in vitro.** Análisis electroforético de las proteínas radiactivas sintetizadas en células (In vivo) y las generadas por traducción de RNAs en extractos de reticulocitos de conejo (In vitro). En el panel A, células L929 de ratón se infectaron con MRV (I), mientras que en el panel B células CEF se infectaron con ARV (I). U: células sin infectar. En los carriles 1 y 2 se tradujo el RNA total aislado de células sin infectar, mientras que en los carriles 3 y 4 se tradujo el RNA total aislado de células infectadas. Las muestras se analizaron por 10% SDS-PAGE, antes (-) o después (+) de inmunoprecipitarlas con sueros anti-muNS. A la izquierda de los paneles se indican las posiciones de los marcadores de peso molecular (kDa) y a la derecha las de las isoformas de muNS. La isoforma menor está marcada con un asterisco.

Tal y como se comentó anteriormente, en el caso de que la muNSC de MRV se originase por iniciación de la traducción en un codón AUG interno, las diferencias de masas entre las isoformas sugiere que dicho codón de iniciación debería ser el que ocupa la posición 41 o 57, mientras que en el caso de ARV el codón interno de iniciación debería ser el 127 o 140. Para ver cuál de estos codones podría actuar como iniciador de la traducción de la isoforma pequeña, generamos plásmidos que expresaban in vitro y bajo el promotor de la polimerasa de T7 el mRNA m3 de MRV entero o versiones truncadas en 5' de forma que el codón AUG más próximo al extremo 5' del mRNA fuese el codón 41 o 57. También generamos plásmidos que expresaban el mRNA m3 de ARV entero o versiones truncadas para que el codón AUG más próximo al extremo 5' fuesen los codones 127, 140 o 208. Esos plásmidos se utilizaron para realizar transcripción y traducción in vitro y la migración electroforética de los productos de traducción in vitro se comparó con la migración de las isoformas de muNS sintetizadas en células infectadas. Los resultados que se muestran en la Fig. 15 indicaron que las proteínas que traducen los mRNAs enteros generados in vitro tienen las mismas movilidades electroforéticas que las proteínas muNS sintetizadas en células infectadas (comparar los carriles 1 y 4 del panel A, y los carriles 1 y 5 del panel B), lo que confirma que las proteínas muNS se generan por traducción de la pauta abierta de lectura más larga de los mRNAs m3, las cuales comienzan en el codón AUG que está más próximo al cap.

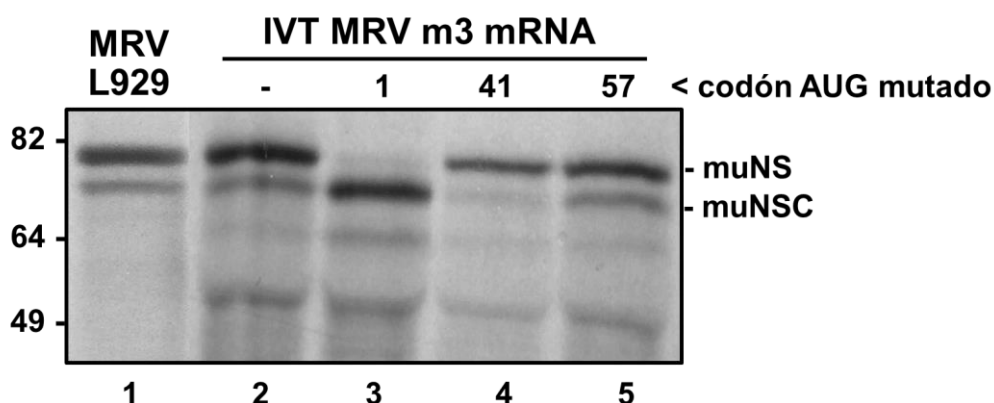


**Figura 15. Análisis electroforético de las isoformas de muNS generadas por la iniciación de la traducción en diferentes codones AUG de los mRNAs.** Traducción de versiones de los mRNAs m3 de MRV (panel A) y ARV (panel B) que contienen la secuencia íntegra del mRNA (carriles 1) o de versiones truncadas en 5', para que quede como codón AUG más próximo al extremo 5' del mRNA el que ocupa la posición que se indica en la parte de arriba. En los carriles de la derecha se analizaron las isoformas de las proteínas muNS sintetizadas in vivo. A la izquierda se indican las posiciones de los marcadores de peso molecular y a la derecha las de las isoformas de muNS. **C)** Representación esquemática de los transcritos generados por transcripción de cores de MRV en células infectadas o mediante transcripción in vitro del gen M3 de MRV clonado en el plásmido pcDNA. Como se puede observar en la figura, el mRNA expresado in vitro contiene 14 nucleótidos más en el extremo 5' que el expresado por el virus.

El análisis electroforético que se muestra en el panel A de la Fig. 15 revela que las pautas de lectura que inician la traducción en los codones 41 y 57 del mRNA de MRV expresan polipéptidos con migraciones electroforéticas similares a la de la isoforma pequeña de muNS (Fig. 15, panel A, comparar carriles 2 y 3 con el carril 4), por lo que cualquiera de esos dos codones podría actuar como iniciador de la traducción de la isoforma pequeña de MRV. Por el contrario, ninguna de las proteínas que expresaron las versiones truncadas del mRNA m3 de ARV presentan una migración electroforética similar a la de la isoforma pequeña de ARV (Fig. 15, panel B, comparar carriles 2-4 con carril 5), lo que de nuevo sugiere que esta proteína no es un producto primario de traducción. El hecho de que la isoforma pequeña de MRV se genere por iniciación de la traducción en un codón AUG interno, implica que dicha isoforma está situada hacia el extremo carboxilo de muNS, por lo que, de aquí en adelante, a la isoforma menor de MRV la denominaremos muNSC.

Sorprendentemente, encontramos que la traducción en extractos de reticulocitos del mRNA m3 de MRV generado in vitro solo produjo la proteína muNS

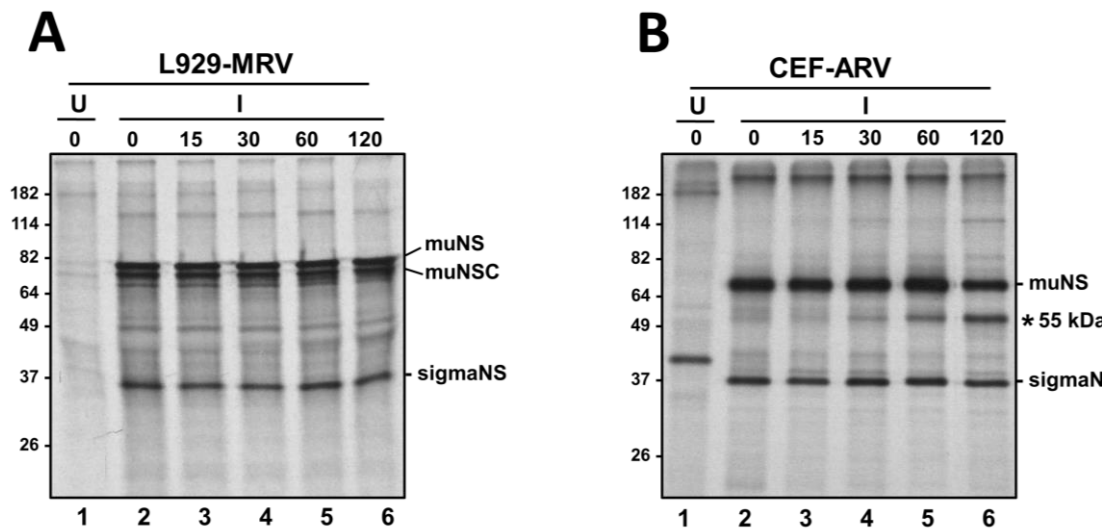
(Fig. 15 carril 1 del panel A), mientras que la traducción in vitro del mRNA m3 aislado de células infectadas generó muNS y muNSC (Fig. 14, carril 4 del panel A). Si se tiene en cuenta que el mRNA m3 de MRV generado in vitro posee 14 nucleótidos más en su extremo 5' que el mRNA auténtico viral, nuestros resultados sugieren que la causa de que el mRNA m3 de MRV exprese dos proteínas se debe a que su secuencia 5' UTR es muy corta (19 nucleótidos), lo que hace que una fracción de los ribosomas no inicie la traducción en el AUG que está más próximo al cap y se desplace hacia el extremo 3' para iniciar la traducción en otro AUG interno, una situación similar a la ya descrita para la traducción de otros RNA mensajeros (Felgenhauer et al., 1990; Kozak, 1991). Para comprobar esta hipótesis y para dilucidar si la traducción de la proteína muNSC de MRV se inicia en el codón AUG 41 o 57, generamos in vitro una versión del mRNA m3 de MRV que contiene regiones no codificantes idénticas a las del mRNA expresado por el virus, y también generamos versiones mutadas de este mRNA en que los codones AUG de las posiciones 1, 41 o 57 se mutaron a UUG, de forma que esos codones, en vez de expresar metioninas, pasasen a expresar leucinas, con lo que ya no podían actuar como codones de inicio. Estos mRNAs generados in vitro se tradujeron en extractos de reticulocitos de conejo en presencia de metionina radiactiva y las proteínas resultantes se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía. Los resultados que se muestran en la Fig. 16 indican que el mRNA m3 sin ninguna mutación y el mutado en el codón 57 expresan las mismas isoformas de muNS que las detectadas en células infectadas (comparar carriles 2 y 5 con carril 1). Este resultado sugiere por una parte, que el codón AUG 57 no debe ser el codón de iniciación de muNSC, y por otra, que una fracción de los ribosomas no inicia la traducción en el AUG que está más próximo al cap posiblemente porque la distancia entre ese codón y el cap del mRNA es muy corta. Los resultados también mostraron que la traducción del mRNA que tenía mutado el primer AUG sólo generó muNSC (Fig. 16, carril 3), mientras que el que tenía mutado el codón AUG 41 sólo expresó muNS (Fig. 16, carril 4). El hecho de que no se genere muNSC cuando se muta el codón AUG de la posición 41, pero sí cuando se muta el de la posición 57, indica que muNSC se origina por iniciación de la traducción en el codón AUG 41 del mRNA m3 de MRV.



**Figura 16. Traducción del mRNA m3 auténtico de MRV y de mRNAs con un cap de tipo 1 en sus extremos 5'.** Los mRNAs conteniendo los mismos extremos que el mRNA m3 auténtico de MRV y que posee un cap de tipo 1 en sus extremos 5', se generaron por transcripción *in vitro* y se tradujeron en extractos de reticulocitos de conejo en presencia de metionina radiactiva (carriles 2-5). En el carril 1 se muestran las isoformas radiactivas de muNS generadas en células L929 infectadas con MRV.

### 1.3.-Un corte proteolítico en la proteína muNS de ARV genera dos polipéptidos de 17 y 55 kDa.

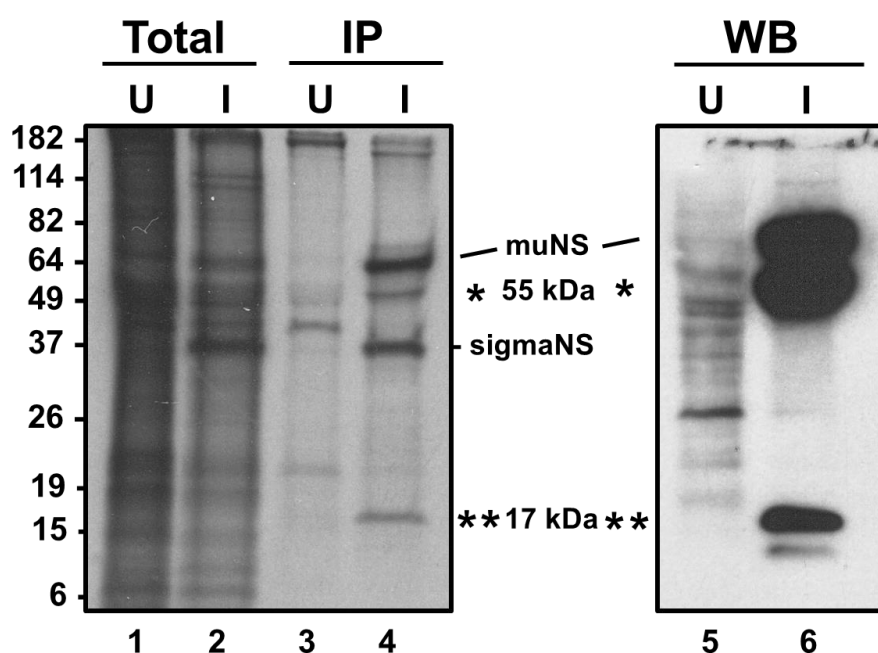
Para averiguar si la isoforma pequeña de la proteína muNS de ARV se origina por procesamiento proteolítico, y para descartar definitivamente que éste sea el mecanismo que genera la proteína muNSC de MRV, realizamos experimentos de pulso radiactivo y seguimiento en células infectadas. Para ello, células infectadas con MRV o con ARV se marcaron radiactivamente durante 10 min con [<sup>35</sup>S]metionina/cisteína a las 16 hpi. Las células se lisaron inmediatamente o después de incubarlas diferentes periodos de tiempo en medio sin radiactividad pero conteniendo un gran exceso de metionina y cisteína no radiactivas. Los extractos celulares resultantes se inmunoprecipitaron con anticuerpos contra las proteínas muNS y se analizaron por 10% SDS-PAGE y autorradiografía. Los resultados que se muestran en el panel A de la Fig. 17 indican que las bandas radiactivas correspondientes a las dos isoformas de la proteína muNS de MRV ya están presentes en las células infectadas a la finalización del pulso radiactivo (carril 2), y que las intensidades relativas de las dos bandas no varían significativamente durante los diferentes periodos de seguimiento (comparar carriles 2-6). Por el contrario, la banda correspondiente a la isoforma pequeña de ARV apenas es visible tras el pulso radiactivo (Fig. 17, panel B, carril 2), y su intensidad aumenta progresivamente durante el tiempo de seguimiento en ausencia de radiactividad (Fig. 17, panel B, comparar carriles 2-6). Estos resultados demuestran que la isoforma pequeña de ARV, pero no la de MRV, se origina por procesamiento proteolítico de muNS.



**Figura 17. Análisis de la conversión de muNS en muNSC por pulso y seguimiento.**

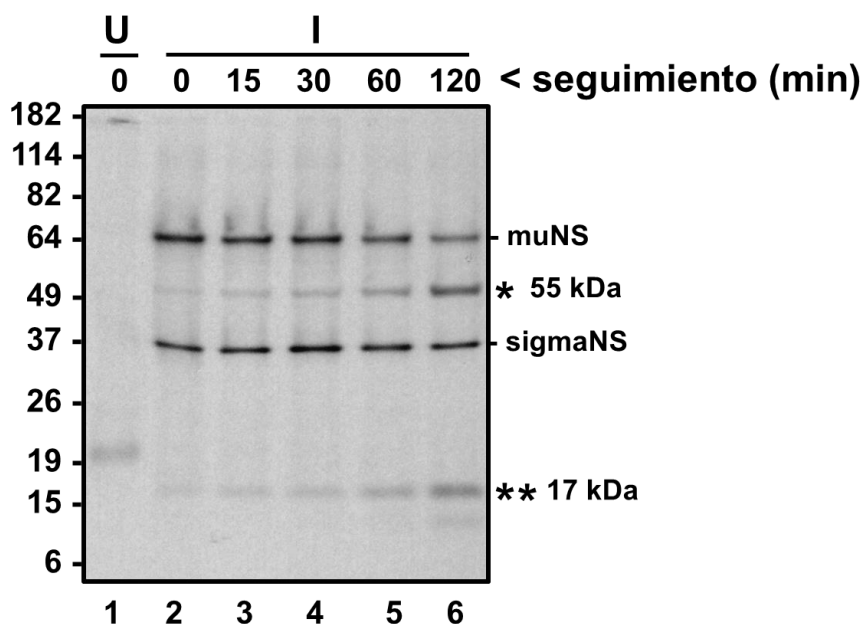
A) Células L929 infectadas con MRV; B) Células CEF infectadas con ARV. Células sin infectar (U) o infectadas (I) se marcaron con [<sup>35</sup>S]metionina/cisteína durante 10 min a las 16 hpi y posteriormente se incubaron con medio no radiactivo, conteniendo un exceso de metionina y cisteína no radiactivas, durante los tiempos de seguimiento indicados. Las células se lisaron en RIPA y se inmunoprecipitaron con los correspondientes sueros anti-muNS. Las proteínas radiactivas inmunoprecipitadas se analizaron por 10% SDS-PAGE y autorradiografía. A la izquierda se indican las posiciones de los marcadores de peso molecular y a la derecha se marcan las posiciones de la proteína sigmaNS y de las isoformas de muNS.

Si la proteína muNSC de ARV (55 kDa) se origina por corte proteolítico de muNS (70 kDa), ese mismo corte proteolítico debería generar también un polipéptido complementario de unos 15 kDa. Para tratar de detectar la presencia de este polipéptido en células infectadas, extractos de células CEF infectadas con ARV y marcadas con radiactividad se inmunoprecipitaron con suero anti-muNS y las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron por electroforesis en un gel de tricina (10% Tricina-SDS-PAGE); diseñado para resolver mejor entre polipéptidos de pequeño tamaño (Schägger and von Jagow, 1987). El autorradiograma que se muestra en la Fig. 18 reveló que el suero anti-muNS inmunoprecipitó en extractos de células infectadas con ARV a las proteínas muNS, sigmaNS, la isoforma de muNS de 55 kDa y un polipéptido de ~17 kDa (carril 4). Además, ninguno de esos polipéptidos se detectó cuando el antisuero se incubó con extractos de células sin infectar (carril 3). El polipéptido de ~17 kDa también fue reconocido por el antisuero cuando los extractos de células CEF infectadas con ARV se analizaron por Western blot (Fig. 18, carril 6). Estos resultados sugieren que el polipéptido de ~17 kDa debe ser la isoforma de muNS complementaria a muNSC, y que esas isoformas se generan mediante un único corte proteolítico del precursor muNS. El análisis por Western blot también reveló que el suero anti-muNS reconoce una banda minoritaria correspondiente a un polipéptido de unos 15 kDa, cuyo origen está siendo objeto de investigación en estos momentos (ver apartado 2.5 de Resultados).



**Figura 18. Identificación de la isoforma de muNS de ARV de 17 kDa.** Células CEF sin infectar (U) o infectadas con ARV (I) se marcaron con [<sup>35</sup>S]metionina/cisteína durante 2 h a las 12 hpi, y a continuación se lisaron con RIPA. Los lisados totales (Total) y los inmunoprecipitados con el suero anti-muNS (IP) se analizaron en geles de 10% tricina-SDS-PAGE (carriles 1-4). Células CEF sin infectar (carril 5) o infectadas durante 16 h con ARV (carril 6) se lisaron en RIPA y los extractos resultantes se resolvieron por electroforesis en geles de 10% tricina-SDS-PAGE. Los geles se analizaron por Western blot con el suero anti-muNS. A la izquierda se indican las posiciones de los marcadores de peso molecular y a la derecha las de sigmaNS y de las isoformas de muNS.

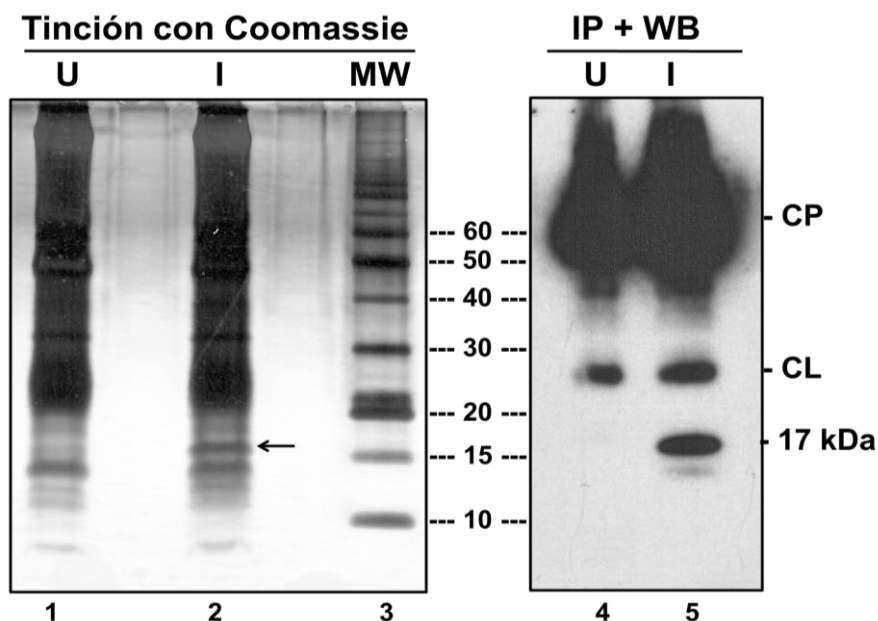
Para confirmar que las isoformas de 55 y 17 kDa se originan por un corte proteolítico de muNS, realizamos un nuevo experimento de pulso y seguimiento en células CEF infectadas con ARV, pero esta vez los polipéptidos radiactivos se resolvieron en un gel de tricina. El autorradiograma que se muestra en la Fig.19 reveló que las bandas de 55 y 17 kDa apenas son detectables a la finalización del pulso radiactivo (carril 2) y que sus intensidades aumentan progresivamente con el tiempo de seguimiento (carriles 2-6). Además, el aumento progresivo de la intensidad de estas bandas va acompañado por una disminución gradual de la intensidad de la banda de muNS (carriles 2-6). Estos resultados demuestran que los polipéptidos de 17 y 55 kDa se originan por corte proteolítico de la proteína muNS de ARV. El corte se produce en ~30% de las proteínas muNS, por lo que en células infectadas con ARV se encuentra tanto el precursor muNS como los dos productos del corte proteolítico, muNSN y muNSC.



**Figura 19. Análisis por pulso y seguimiento de la conversión de la proteína muNS de ARV en dos isoformas de 55 y 17 kDa.** Células CEF sin infectar (U) o infectadas con ARV se sometieron a análisis de pulso y seguimiento como en la Fig. 17. Las células se lisaron en RIPA y se inmunoprecipitaron con el suero anti-muNS. Las proteínas radiactivas inmunoprecipitadas se resolvieron en un gel de 10% tricina-SDS-PAGE y se visualizaron por autorradiografía. A la izquierda se indican las posiciones de los marcadores de peso molecular y a la derecha las de sigmaNS y las isoformas de muNS.

El tamaño de los productos de proteólisis de muNS (55 y 17 kDa) indica que el corte debe producirse cerca de uno de los extremos del precursor. Para poder situar la posición de los productos proteolíticos en el precursor, decidimos identificar secuencias aminoacídicas los polipéptidos de 55 y 17 kDa. Para ello, las proteínas presentes en células CEF infectadas con ARV se inmunoprecipitaron con suero anti-muNS y las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron en un gel de tricina y se visualizaron por tinción con azul de Coomassie. Como se puede observar en la Fig. 20, el suero anti-muNS inmunoprecipitó en células infectadas (carril 2), pero no en las sin infectar (carril 1), un polipéptido de unos 17 kDa (marcado con una flecha en el carril 2) en un ensayo de Western blot (Fig. 20, carril 5). Un fragmento que contenía la banda de 17 kDa se extrajo del gel que había sido teñido con Coomassie, se digirió con tripsina y se sometió a análisis por espectrometría de masas. Dicho análisis reveló que el polipéptido de 17 kDa contenía dos fragmentos tripticos cuyas secuencias de aminoácidos se corresponden con las de las regiones 24-45 y 91-99 de la proteína muNS (Fig. 21). Este resultado demuestra que el polipéptido de 17 kDa está situado hacia el extremo amino de muNS, por lo que lo hemos denominado muNSN. De acuerdo con esto, el polipéptido complementario de 55 kDa se correspondería con el extremo carboxilo de muNS, y, por lo tanto se denominó muNSC. Utilizando esta misma estrategia quisimos extraer la proteína muNSC del gel teñido con Coomassie para determinar la secuencia de su extremo amino por degradación de Edman, lo que nos permitiría identificar el

lugar donde se produce el corte proteolítico de muNS. Desafortunadamente muNSC presenta una migración electroforética similar a la de la cadena pesada de la inmunoglobulina (Fig. 21, carril 5), lo que nos impidió aislar y secuenciar muNSC.



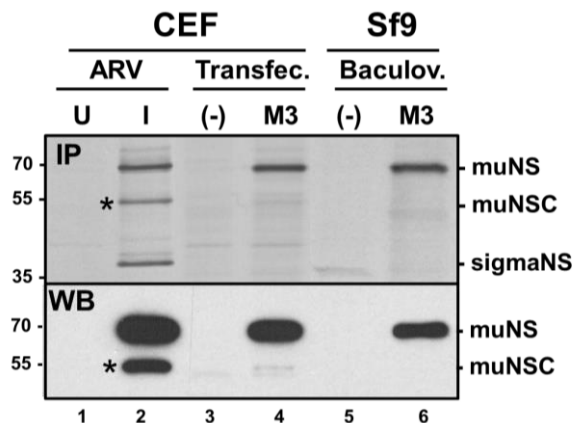
**Figura 20. Aislamiento de la isoforma de 17 kDa.** Extractos de células CEF sin infectar (U) o infectadas con ARV durante 12 h (I) se inmunoprecipitaron con suero anti-muNS y se desarrollaron en paralelo en dos geles de 10% de tricina-SDS-PAGE. Uno de los geles (carriles 1 y 2) se tiñó con azul de Coomassie G250 y el otro (carriles 4 y 5) se transfirió a una membrana de PVDF para su análisis por Western blot usando el suero anti-muNS. En el carril 3 se cargaron proteínas marcadoras de peso molecular. En el carril 2 se indica con una flecha la banda de 17 kDa que se cortó para ser analizada por espectrometría de masas. En el medio de los dos paneles se indican las posiciones de los marcadores de peso molecular. A la derecha se indican las posiciones de la cadena pesada (CP) y ligera (CL) del anticuerpo y del polipéptido de 17 kDa.

1	MASTKWGDKP	MSLSMSHDGS	SIRSAASQFL	SVPLSHSTPI	PPQRKTVLLK
51	FMIGDELVTV	QGALAPFDEY	WYDNQPLLAQ	AVEMLASADR	LRQFEHYEKF
101	LLKKGHQITE	IMNRLRLFFT	DVLKVKMEAD	ALPALAQYLM	VGTLEAVSTA
151	DSPDACVPVT	SKILAKQQT	AKSPGRLDEE	EYNVIRSRFL	THEVFDLTSD
201	LPGVQPFMDM	YYATVPRADS	TGWCVYRRKG	LLIYAPDEQF	SDLTIFSTRL
251	TASRELQLVA	GDVVVACFDL	MDVSDIAPSH	HASVQEERTL	GASKYSNVTA
301	NHPLVFFSP	SALRWAIHDA	CTDSLIVSTRN	IRVCVGIDPL	VTRWTRDGVQ
351	EAAIIMDDKL	PSAGRARMAL	RTLLLARRSP	MPSFLLGALK	QSGGQLLEHY
401	RCDAANRYGS	PTVPTSHPS	CSKCPGLKEQ	IAKLSSSPIP	KVDSSVGPVAV
451	LLSKIADLQR	ANRELSLKL	DVQPAREDHL	LAYLNEHVCV	NAKDHEKGLL
501	ARCNVSGDSV	SSILGQRMKN	RERFETRLRH	EASAEWEPRV	EALNQELAKA
551	RVEQQDMMTQ	SLQYLNERDE	LLQEVDELKR	ELTTLRSASV	RLNADNHRMS
601	RATRVGDAFV	SDVEPLPSGI	PGESKPSMEE	LVDDL	

**Figura 21. Determinación de la secuencia de péptidos tripticos de la isoforma de 17 kDa por espectrometría de masas.** Secuencia de la proteína muNS de ARV, donde se recuadran en rojo los fragmentos tripticos del polipéptido de 17 kDa que se secuenciaron por espectrometría de masas.

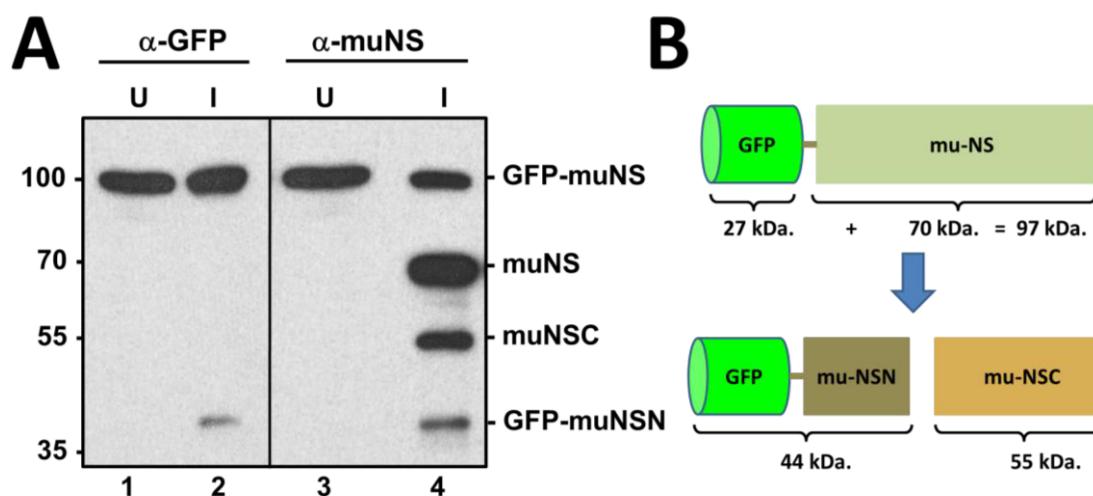
## 1.4.-El procesamiento proteolítico de la proteína muNS de ASRV es inducido por la infección.

Una vez demostrado que la proteína muNS de ARV sufre un corte proteolítico cerca de su extremo amino, decidimos investigar el mecanismo que da origen a ese procesamiento. En primer lugar investigamos si el corte es dependiente de la presencia de otras proteínas virales o es promovido por la infección viral. Para ello, comparamos el procesamiento de muNS en células infectadas con ARV con el que tiene lugar en dos sistemas donde muNS se expresa en ausencia de infección con ARV ni coexpresión con otras proteínas de ARV. Estos dos sistemas son células transfectadas con el gen que expresa muNS y células de insecto infectadas con un baculovirus recombinante que expresa muNS. Para ello, analizamos mediante inmunoprecipitación o Western blot extractos de células CEF sin infectar o infectadas con ARV y comparamos los resultados con los obtenidos a partir de células CEF transfectadas con el plásmido vacío pCINeo 3.1 o con el plásmido recombinante pCINeo-muNS, así como los obtenidos con células Sf9 de insecto infectadas con baculovirus salvaje o con el baculovirus recombinante Bac-muNS. Los resultados que se muestran en la Fig. 22 indicaron que la generación de muNSC sólo se observa claramente en las células infectadas con ARV (carril 2), pero no en las células transfectadas (carril 4), o en las infectadas con el baculovirus recombinante (carril 6). Estos resultados sugieren que el procesamiento de muNS está promovido por cambios inducidos en la célula por la infección reoviral o bien por la acción de proteínas de ARV.



**Figura 22. El procesamiento proteolítico de muNS tiene lugar en células infectadas con ARV, pero no en células transfectadas o infectadas con baculovirus.** Células CEF sin infectar (carril 1) o infectadas con 10 pfu/célula del ARV S1133 (carril 2) se incubaron durante 16 h. Por otra parte, células CEF se transfectaron con el plásmido vacío pCINeo 3.1 (carril 3) o con el plásmido pCINeo-muNS (carril 4) durante 24 h. Finalmente, células Sf9 de insecto se infectaron con baculovirus salvaje (carril 5) o con el baculovirus recombinante Bac-muNS (carril 6) durante 2 días. Las células del panel inferior se lisaron y los extractos se analizaron mediante Western-blot. Las del panel superior se marcaron durante 1 h con [<sup>35</sup>S]metionina/cisteína, se lisaron en RIPA y los extractos se inmunoprecipitaron con suero anti-muNS. Las muestras radiactivas se analizaron por 10% SDS-PAGE y autorradiografía. Las posiciones de muNSC se marcan con un asterisco en el carril 2.

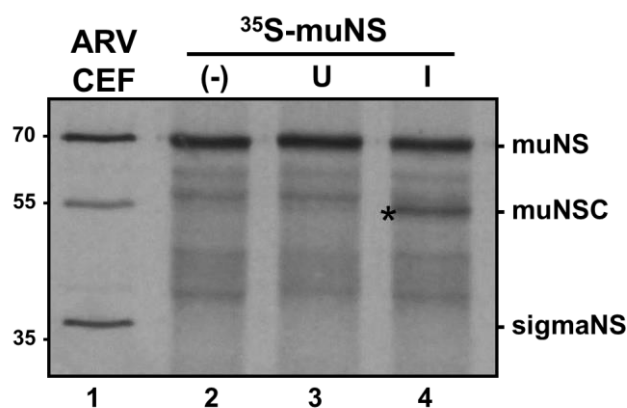
Para confirmar esta sugerencia realizamos otros dos experimentos. En el primero de ellos, transfectamos células CEF con un plásmido que expresa la proteína GFP fusionada al extremo amino de muNS, y 10 h más tarde la mitad de las células se infectaron con ARV durante 16 h y la otra mitad se mantuvieron sin infectar. A continuación, se lisaron las células y los extractos resultantes se analizaron por Western blot con anticuerpos contra muNS y contra GFP. Los resultados que se muestran en la Fig. 23 revelaron que, en células sin infectar, los anticuerpos anti-GFP sólo detectaron de una proteína de ~100 kDa, que debe corresponder a la proteína de fusión GFP-muNS (carril 1), mientras que en células infectadas con ARV detectaron dos bandas: la correspondiente a la banda de unos 100 kDa y la correspondiente a una proteína pequeña de unos 45 kDa (carril 2). Resultados similares se obtuvieron cuando el análisis por Western blot se realizó con anticuerpos contra muNS (carriles 3 y 4), salvo que en los experimentos con células infectadas el suero anti-muNS también reconoció a las proteínas muNS y muNSC expresadas por ARV (carril 4). El tamaño de la proteína pequeña (~45 kDa) y el hecho de que esta proteína sea reconocida por los anticuerpos contra muNS y contra GFP, sugiere que debe tratarse de la proteína de fusión GFP-muNSN. Además, este experimento confirma que el corte que sufre la proteína muNS-ARV tiene lugar cerca de su extremo amino.



**Figura 23. La proteína GFP-muNS se procesa en células infectadas con ARV, pero no en células sin infectar.** Dos placas de células CEF se transfectaron con el plásmido que expresa la proteína GFP-muNS y 10 h más tarde una placa se infectó con 10 pfu/célula del ARV S1133 durante 16 h (carriles 2 y 4), mientras que la otra placa se dejó sin infectar (carriles 1 y 3). Las células se lisaron y los extractos resultantes se analizaron por Western blot con anticuerpos anti-GFP (carriles 1 y 2) o anti-muNS (carriles 3 y 4). B) Representación esquemática de la proteína quimérica GFP-ARVmuNS con los tamaños de cada una de sus partes indicados y los polipéptidos a los que da lugar con su corte proteolítico.

En el segundo experimento, la proteína muNS radiactiva, generada por transcripción-traducción *in vitro* a partir de un plásmido que contenía el gen M3 de ARV, se incubó durante 2 h a 37°C con extractos de células sin infectar o de células infectadas con ARV. Las muestras resultantes, así como un extracto radiactivo de células CEF infectadas con ARV e inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-muNS, se

analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía. Los resultados que se muestran en la Fig. 24 revelaron que el procesamiento de muNS a muNSC sólo tiene lugar cuando la proteína muNS se incubó con extractos de células infectadas (carril 4), pero no cuando se incubó con los de células sin infectar (carril 3). En conjunto, estos resultados indican que el procesamiento de muNS está promovido por la infección con ARV.

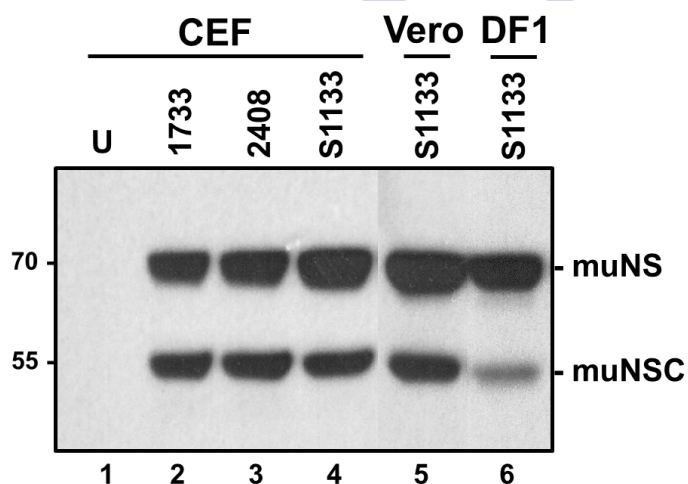


**Figura 24. Extractos de células infectadas promueven el procesamiento de la proteína muNS sintetizada in vitro.** La proteína muNS radiactiva sintetizada in vitro se incubó durante 2 h a 37°C con: ningún extracto (carril 2); con extractos de células CEF sin infectar (carril 3); o con extractos de células CEF infectadas con ARV durante 16 h (carril 4). En el carril 1 se analizó un extracto radiactivo de células CEF infectadas con ARV e inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-muNS. A la izquierda se indican las posiciones de los marcadores de peso molecular y a la derecha las posiciones de las proteínas virales.

## 1.5.-La activación de la apoptosis inducida por la infección con ARV provoca el procesamiento de muNS.

Los resultados expuestos hasta ahora demuestran que el procesamiento de muNS está promovido por la infección con ARV. Dado que todas las infecciones habían sido realizadas infectando células CEF con la cepa S1133 de ARV, decidimos investigar si el procesamiento de muNS es específico para este sistema célula-virus o si es una propiedad más general, para cualquier célula y para cualquier cepa de ARV. Los resultados que se muestran en la Fig. 25 indican que la conversión de muNS en muNSC también ocurre cuando las células CEF se infectan con otras cepas de reovirus aviar, como 1733 (carril 6) o 2408 (carril 7), lo que sugiere que el procesamiento es independiente de la cepa de ARV que se utilice para infectar las células. Por otra parte, el procesamiento también tiene lugar cuando el ARV S1133 infecta células de mamífero como células Vero, procedentes de riñón de mono verde africano (Fig. 25, carriles 2, 3 y 4), o células HeLa humanas (Figura 39, panel A, carril 2). Sorprendentemente, el procesamiento de muNS era mucho menor cuando el virus ARV S1133 infectaba a la línea celular DF1 (Fig. 25, carril 6), una línea celular aviar establecida espontáneamente a partir de células CEF libres de virus (Himly et al., 1998). Según un estudio reciente

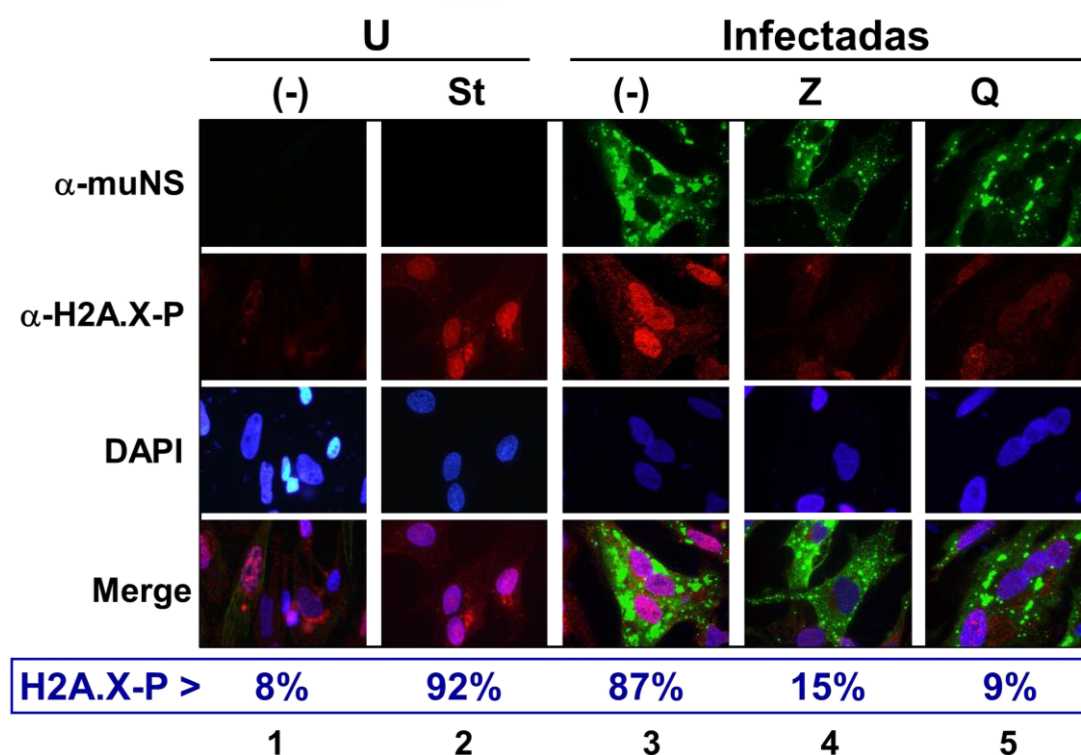
comparando el transcriptoma de la línea celular con el de células CEF, las células DF1 poseen un mayor grado de proliferación, una reducida actividad de caspasa 3 y una mayor capacidad de transporte de moléculas (Kong et al., 2011). Estos datos, y el hecho de que en nuestro laboratorio estudios anteriores habían demostrado que la infección de células CEF con ARV induce la activación del programa apoptótico celular desde tiempos tempranos de la infección (Labrada et al., 2002), nos hicieron sospechar que el procesamiento de la proteína muNS de ARV pudiese estar promovido de forma indirecta por la infección reoviral, mediante la inducción de apoptosis. Así, el bajo grado de procesamiento de la proteína muNS que se observa en células DF1 podría deberse a una reducida capacidad del ARV para inducir apoptosis en estas células. Esta posibilidad, estaría apoyada también por el hecho de que no hemos sido capaces de detectar procesamiento de muNS cuando esta proteína es expresada por un baculovirus recombinante en células de insecto (Fig. 22, carril 6), ya que está descrito que los baculovirus expresan factores antiapoptóticos que impiden la activación de las caspasas (Clem et al., 1991; Clem, 2007).



**Figura 25. Procesamiento de muNS en diferentes sistemas célula-virus.** Células CEF (carriles 1-4), Vero (5) y DF-1 (6) se infectaron durante 16 h con las cepas 1733, 2408 y S113, según se indica arriba. Las células Vero se infectaron con 50 pfu/célula, mientras que las CEF y las DF-1 a una MOI de 10 pfu/célula. El carril 1 se corresponde con extractos de CEF sin infectar. Los extractos se analizaron mediante Western blot usando el suero anti-muNS en el panel A y el suero anti-muNS junto con suero anti-actina.

Para averiguar si el procesamiento de la proteína muNS de ARV está relacionado con la actividad caspasa de la célula, examinamos el efecto que dos inhibidores de caspasas de amplio espectro ejercen sobre el procesamiento de muNS en células infectadas. Los inhibidores que hemos usado fueron Z-VAD-FMK y Q-VD-OPh. En primer lugar examinamos la capacidad de estos inhibidores para inhibir la apoptosis en las células infectadas con ARV. Para ello, determinamos el porcentaje de células que tienen su DNA dañado, analizando por inmunofluorescencia el grado de fosforilación de la histona H2AX (Bergink et al., 2006). Las células infectadas se fijaron y se tiñeron con un anticuerpo monoclonal contra la histona H2AX fosforilada y los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. Las células también se tiñeron con suero anti-

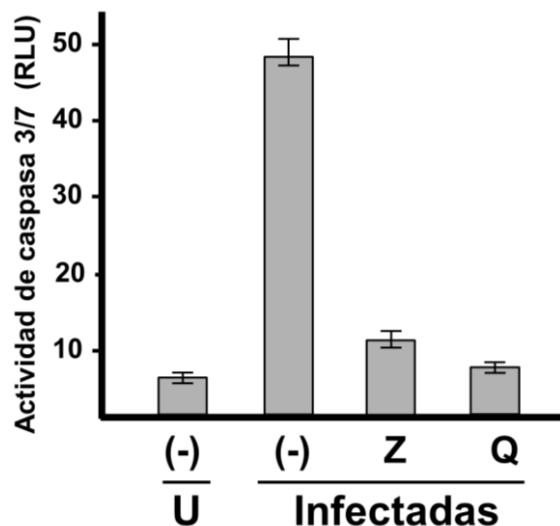
muNS para poder visualizar las células infectadas. Como control usamos células sin infectar y células sin infectar en las que se promovió la apoptosis con un agente químico como la estaurosporina (Jacobson et al., 1993; Tamaoki et al., 1986). Los resultados que se muestran en el panel A de la Fig. 26 muestran en primer lugar que el ensayo es fiable, ya que el porcentaje de células con histona H2AX fosforilada aumenta del 8 al 92% cuando las células CEF sin infectar se incuban durante 6 h en presencia de 0,5  $\mu$ M estaurosporina. Los resultados de esta figura también pusieron de manifiesto que un alto porcentaje de las células infectadas (87%) tienen dañado el DNA y que ese porcentaje se reduce al 15 y al 9% cuando esas células se incuban en presencia de 100  $\mu$ M Z-VAD-FMK y de 10  $\mu$ M Q-VD-OPh, respectivamente. Este resultado demuestra que cada uno de estos dos compuestos es capaz de prevenir la activación de apoptosis que induce la infección con ARV.



**Figura 26. Efecto de Z-VAD-FMK y Q-VD-OPh sobre la fosforilación de la histona H2AX.** Células CEF sin infectar (U), sin tratar (-) o tratadas durante 6 h con 0,5  $\mu$ M estaurosporina, así como células infectadas con 10 pfu/célula del ARV S1133 (carriles 3-5) e incubadas con 100  $\mu$ M de Z-VAD-FMK (carril 4) o con 10  $\mu$ M de Q-VD-OPh (carril 5) desde 1 h antes de la infección, se analizaron a las 16 hpi por inmunofluorescencia indirecta usando suero anti-muNS (conejo, verde) y un anticuerpo monoclonal contra la histona H2AX fosforilada (ratón, rojo), como anticuerpos primarios. Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. Los porcentajes de células cuyos núcleos se tiñeron con el anticuerpo anti-H2AX fosforilado son la media de 3 experimentos, y en cada experimento se contaron 100 células.

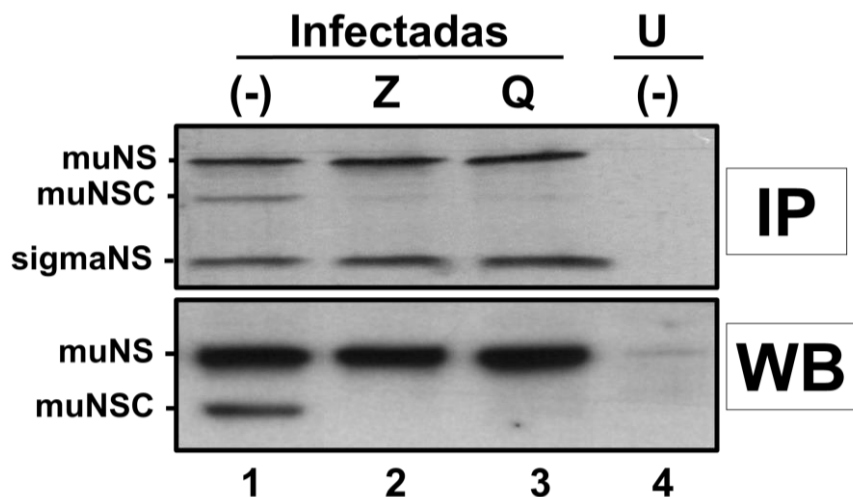
Esto se confirmó al cuantificar la actividad de las caspasas 3/7 en los extractos de células infectadas, utilizando el kit luminiscente Caspase-Glo 3/7 de Promega. Las células se lisaron en el tampón del kit que contienen el sustrato de las caspasas y la actividad proteolítica de las caspasas se expresó como unidades de luz relativas (RLU).

Los resultados que se muestran en el panel B de la Fig. 27 confirmaron que las células infectadas con ARV tienen una elevada actividad de caspasa y que esa actividad se reduce mucho cuando la infección se realiza en presencia de los inhibidores Z-VAD-FMK o Q-VD-Oph.

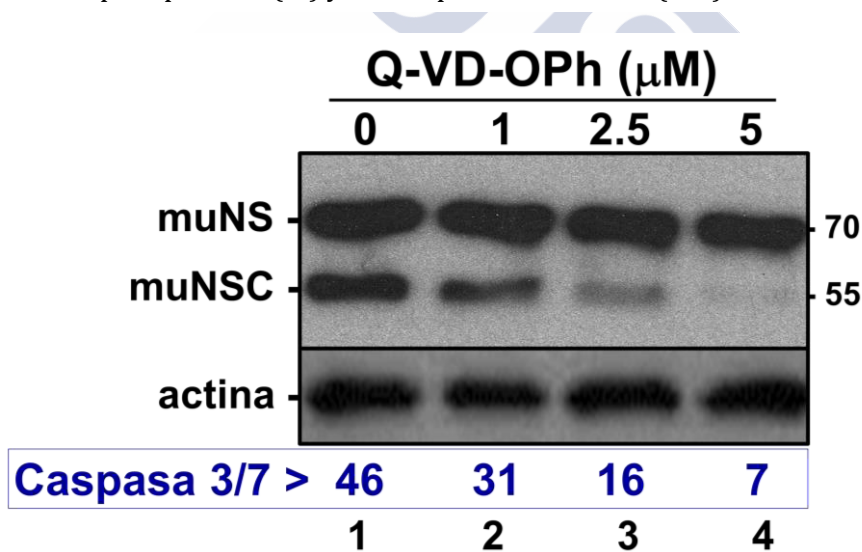


**Figura 27. Efecto de Z-VAD-FMK y Q-VD-Oph sobre la actividad caspasa 3/7.** Extractos de células CEF sin infectar (U), o infectadas con 10 pfu/célula del ARV S1133 se incubaron con 100  $\mu$ M de Z-VAD-FMK (Z) o 10  $\mu$ M de Q-VD-Oph (Q) desde 1 h antes de la infección y se lisaron a las 16 hpi. La actividad de caspasa de los extractos se determinó con el kit Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega). Los valores se expresan como unidades arbitrarias RLU. Los resultados son la media de cuatro experimentos independientes y las barras de error marcan la desviación estándar

Una vez demostrado que cada uno de los dos inhibidores es capaz de bloquear la apoptosis inducida por ARV, investigamos cómo afecta la presencia de estos inhibidores al procesamiento de muNS en células infectadas con ARV. Los resultados que se muestran en la Fig. 28 indican que la concentración intracelular de muNSC se reduce mucho cuando las células CEF infectadas con ARV se incuban en presencia de cualquiera de los dos inhibidores, lo que sugiere que estos compuestos son capaces de bloquear la conversión de muNS en muNSC. En experimentos posteriores hemos utilizado exclusivamente el inhibidor Q-VD-Oph porque este compuesto es capaz de prevenir la inducción de apoptosis a concentraciones muy bajas, porque no es tóxico para las células a esas concentraciones, y porque inhibe selectivamente la actividad de las caspasas, pero no de otras proteasas como la cathepsina (Caserta et al., 2003; Kuželová et al., 2011). La capacidad de este inhibidor para bloquear tanto la activación de caspasas como el procesamiento de muNS es dependiente de la dosis empleada y el compuesto es muy efectivo en prevenir la activación de caspasas y el procesamiento de muNS a una concentración de 5  $\mu$ M (Fig. 29).



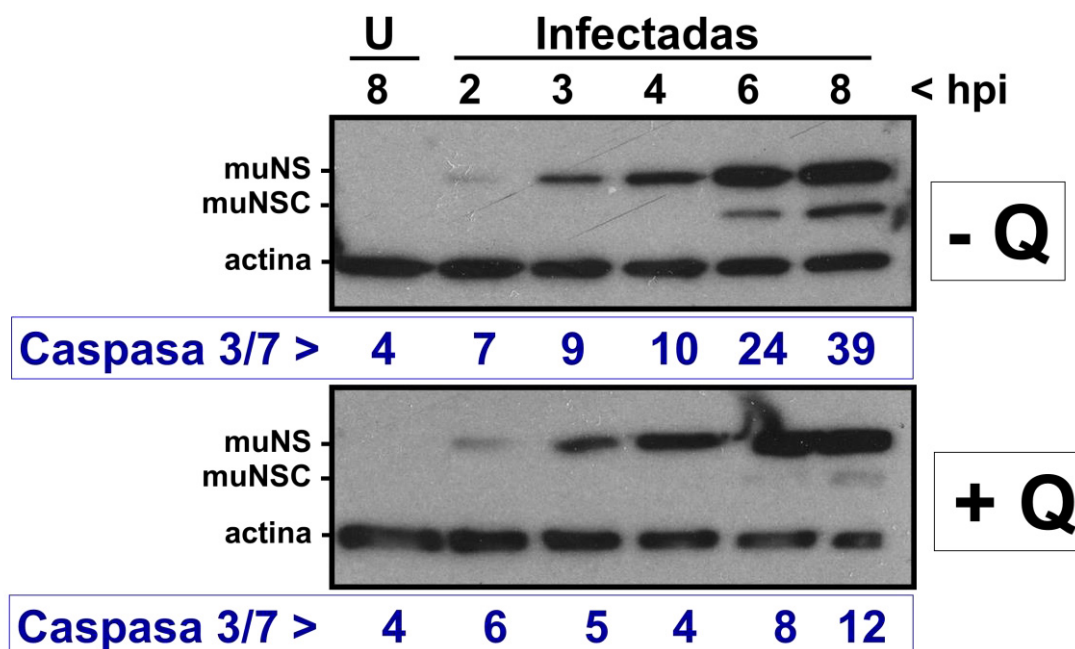
**Figura 28. Efecto de los inhibidores de apoptosis sobre el procesamiento de muNS.** Células CEF sin infectar (U) o infectadas con 10 pfu/célula de ARV se incubaron con 100  $\mu$ M Z-VAD-FMK (Z) o con 10  $\mu$ M Q-VD-Oph (Q) desde 1 h antes de comenzar la infección. Un set de células se marcaron con [<sup>35</sup>S]metionina/cisteína durante 1 h a las 15 hpi. A las 16 hpi las células se lisaron y un set de células se analizó por inmunoprecipitación (IP) y el otro por Western blot (WB).



**Figura 29: Efecto de diferentes concentraciones de Q-VD-Oph sobre el procesamiento de muNS.** Células CEF infectadas con 10 pfu/célula de ARV se incubaron con las concentraciones que se indican del inhibidor de apoptosis Q-VD-Oph (Q) desde 1 h antes de comenzar la infección. A las 16 hpi las células se lisaron y se analizaron por Western blot con suero anti-muNS (panel superior) o con anticuerpos contra actina (panel inferior). A los extractos también se le determinó la actividad de caspasa con el kit Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega).

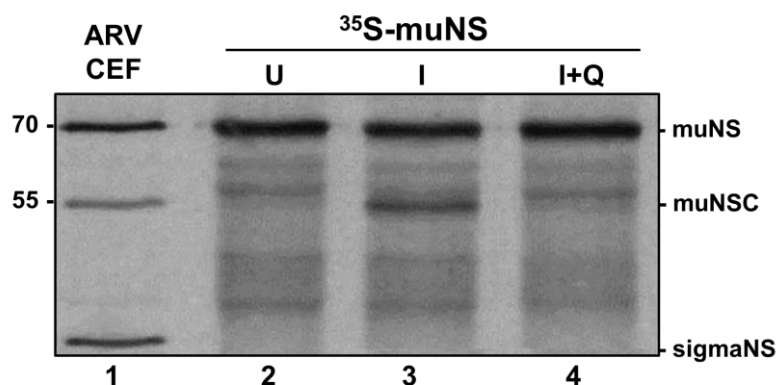
Un análisis de la activación de caspasas y del procesamiento de muNS en células infectadas durante las primeras horas de la infección en presencia y ausencia de Q-VD-Oph reveló que, aunque la presencia de muNS se empieza a detectar en células infectadas a las 3 hpi, la presencia de muNSC no se pudo detectar hasta las 6 hpi, coincidiendo con un incremento significativo de la actividad caspasa (Fig. 30; - Q). Sin embargo, ni el aumento en la actividad de caspasa ni el procesamiento de muNS se

detectaron a las 8 hpi cuando las células infectadas se cultivaron en presencia de Q-VD-OPh (Fig. 30; + Q). En conjunto, estos resultados sugieren que existe una estrecha relación entre la inducción de apoptosis y el procesamiento de muNS.



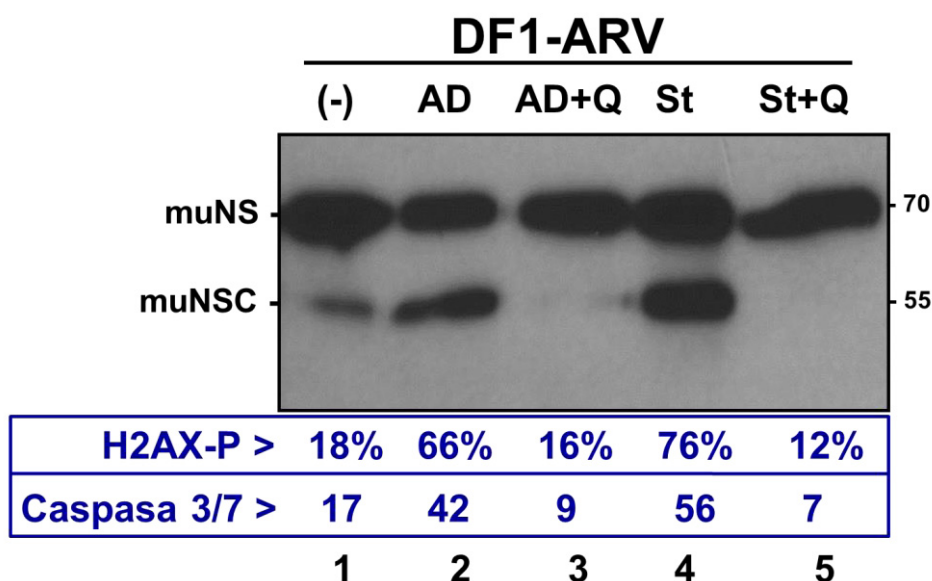
**Figura 30. Análisis del procesamiento de muNS a diferentes tiempos de infección en presencia y ausencia de Q-VD-OPh.** Células CEF sin infectar (U) o infectadas con 10 pfu/célula de ARV se incubaron en presencia (+Q) o ausencia (-Q) de 10  $\mu$ M Q-VD-OPh desde 1 h antes de comenzar la infección. A las hpi indicadas las células se lisaron y se analizaron por Western blot con suero anti-muNS y con anticuerpos contra actina. A los extractos también se le determinó la actividad de caspasa con el kit Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega). 16 hpi las células se lisaron y se analizaron por Western blot con suero anti-muNS (panel superior) o con anticuerpos contra actina (panel inferior). A los extractos también se le determinó la actividad de caspasa con el kit Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega).

Para confirmar que la actividad de las caspasas es responsable del procesamiento de la proteína muNS de ARV, realizamos experimentos adicionales. En primer lugar, demostramos que la capacidad que tienen los extractos de células infectadas para catalizar el procesamiento de muNS se reduce fuertemente cuando la infección se realiza en presencia de 10  $\mu$ M Q-VD-OPh (Fig. 30). Los extractos de células infectadas que habían sido incubadas en presencia del inhibidor tienen muy reducida su capacidad para procesar muNS (carril 3); el procesamiento es similar al que promueven los extractos de células sin infectar (carril 2).



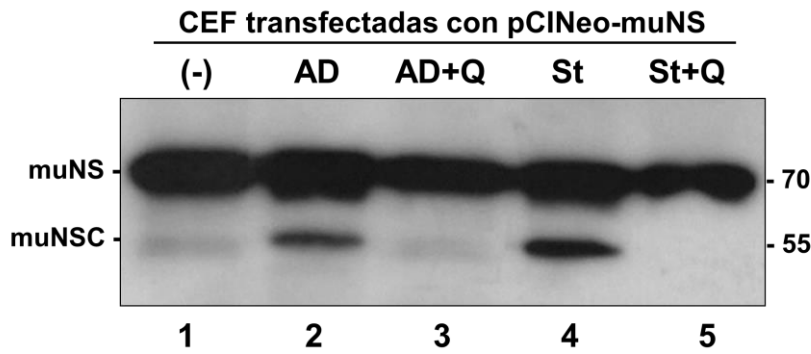
**Figura 31. Capacidad de diferentes extractos celulares para procesar a muNS. OPh.** La proteína muNS sintetizada *in vitro* y marcada radiactivamente con [<sup>35</sup>S] se incubó durante 4 h a 37°C con extractos de células CEF sin infectar (U), o infectadas con 10 pfu/célula de ARV S1133 durante 16 h, en ausencia (I) o presencia (I+Q) de 10 μM de Q-VD-OPh durante toda la infección. En el carril 1 se analizó una muestra de extractos radiactivos de células CEF infectadas con ARV, inmunoprecipitados previamente con suero anti-muNS. Las muestras se analizaron por 10% SDS-PAGE y autorradiografía.

Los resultados que habíamos mostrado en la Fig. 25 indicaban que muNS se procesa mucho menos cuando el virus ARV S1133 infecta a células DF1 que cuando infecta a células CEF. Esto y la observación que las células DF1 tienen menor actividad de caspasa que las células CEF, fueron pistas importantes que nos hicieron sospechar que el procesamiento de muNS estaba catalizado por caspasas. Para confirmar que la baja eficiencia del procesamiento de muNS en células DF1 infectadas con ARV se debe a su baja actividad de caspasa, analizamos la capacidad de dos agentes pro-apoptóticos, como actinomicina D y estaurosporina (Arima et al., 2005; Jacobson et al., 1993; Tamaoki et al., 1986), para estimular el procesamiento de muNS en células DF1 infectadas con ARV. En paralelo se determinó el grado de fosforilación de H2AX y la actividad de las caspasas 3/7. Los resultados que se muestran en la Fig. 32 indican que en células DF1 infectadas con ARV tanto el porcentaje de células que tienen histona H2AX fosforilada, como la actividad de caspasa 3/7, como el procesamiento de muNS, son muy bajos (carril 1). Sin embargo, el tratamiento de las células infectadas durante las últimas 6 h de infección con 1 μg/mL de actinomicina D o con 0,5 μM de estaurosporina indujo un gran incremento en todos estos procesos (comparar el carril 1 con los carriles 2 y 4). Sin embargo, la capacidad de los compuestos pro-apoptóticos para promover el procesamiento de muNS se bloqueó cuando las células infectadas se incubaron con el inhibidor de apoptosis Q-VD-OPh (comparar los carriles 2 y 4, con los carriles 3 y 5). Estos resultados sugieren que la baja eficiencia del ARV para promover el procesamiento de muNS en células DF1 se debe a la baja actividad de caspasa de estas células, lo que contribuye a confirmar que el procesamiento de muNS está catalizado por caspasas.



**Figura 32. Efecto de promotores de apoptosis sobre el procesamiento de muNS en células DF1 infectadas con ARV.** Células DF1 infectadas con 10 pfu/célula del ARV S1133 se incubaron de 10 a 16 hpi con 1 mg/mL actinomicina D (AD) o con 0,5  $\mu$ M estaurosporina. Las células de los carriles 3 y 5 también se incubaron con 10  $\mu$ M Q-VD-OPh desde 1 h antes de la infección. A las 16 hpi una alícuota de células se procesó para inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal contra la histona H2AX fosforilada (H2AX-P), mientras que otra alícuota de células se lisó y los extractos se utilizaron para analizar la actividad caspasa 3/7 y para monitorizar el procesamiento de muNS por Western blot.

Los resultados mostrados en la Fig. 22 indicaban que el procesamiento de muNS apenas tiene lugar cuando la proteína se expresaba de forma transitoria en células transfectadas. Para ver si la ausencia de procesamiento en esas células se debe a que no está activada la apoptosis, comparamos la producción de muNSC en células transfectadas con pCINeo-muNS, cuando esas células se tratan o no con agentes pro-apoptóticos. Los resultados que se muestran en la Fig. 33 demuestran que los compuestos pro-apoptóticos actinomicina D y estaurosporina promueven la conversión de muNS a muNSC (comparar el carril 1 con los carriles 2 y 4), y que esta capacidad para promover el procesamiento de muNS se anula cuando las células transfectadas se incuban en presencia del inhibidor de caspasas Q-VD-OPh (comparar los carriles 2 y 4 con los carriles 3 y 5). El hecho de que compuestos inhibidores de caspasas reduzcan el procesamiento de muNS en células infectadas con ARV y que compuestos pro-apoptóticos promuevan el procesamiento en células DF1 infectadas y en células CEF transfectadas indica que el procesamiento de muNS debe estar catalizado por una caspasa que se activa durante la infección con ARV.



**Figura 33. Efecto de promotores de apoptosis sobre el procesamiento de muNS en células transfectadas.** Células CEF se transfectaron con el plásmido pCINeo-muNS y 24 h más tarde las células se incubaron con los mismos compuestos que en la figura anterior. Tras 6 h de incubación con los compuestos pro-apoptóticos las células se lisaron y los extractos se analizaron por Western blot con suero anti-muNS.

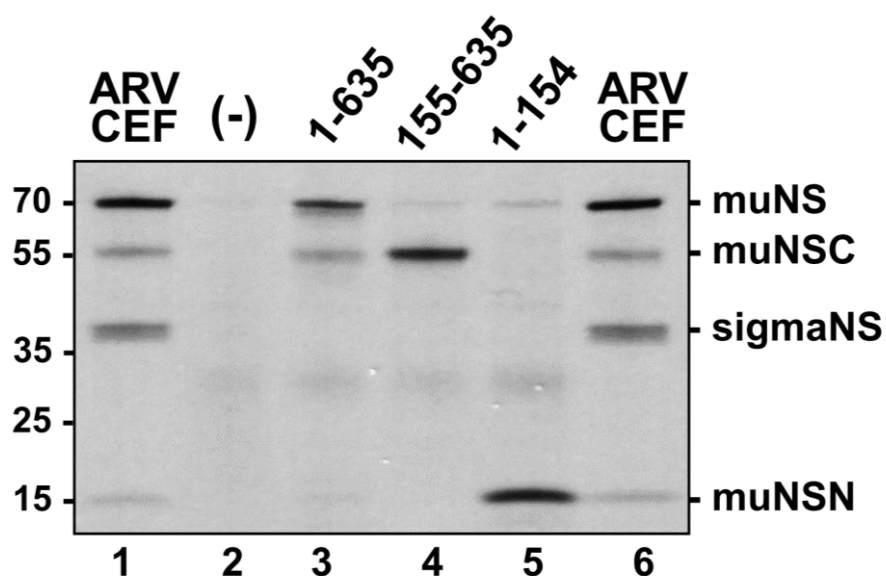
## 1.6.-Identificación del punto de corte de muNS.

Una vez que hemos descubierto que el procesamiento de muNS está catalizado por caspasas, realizamos experimentos para identificar la posición donde tiene lugar el corte de la proteína precursora. Los resultados que habíamos mostrado en la Fig. 15 indicaban que la proteína muNSC tenía un tamaño ligeramente inferior a la versión de muNS que inicia su traducción en el codón AUG 140 del mRNA m3 de ARV, pero superior a la que lo inicia en el codón 208. A la vista de estos resultados decidimos examinar la secuencia de la proteína muNS en la región que queda hacia el lado carboxilo del residuo de metionina 140 para ver si podíamos localizar una secuencia consenso de corte por caspasas. El análisis de la secuencia aminoacídica de esa región de muNS reveló la presencia de un pentapéptido que podría actuar como secuencia consenso de reconocimiento para las caspasas 3 y 7 ( $^{151}\text{DSPD}\downarrow\text{A}^{155}$ ; la flecha vertical señala el punto de corte en el motivo; véase Fig. 34), ya que las caspasas 3 y 7 reconocen la secuencia consenso ( $\text{DXXD}\downarrow\text{Y}$ ), siendo X cualquier aminoácido, mientras que Y puede ser un residuo de glicina, alanina, treonina, serina o asparagina. (Thornberry et al., 1997; Timmer y Salvesen, 2007). A la vista de esta observación, decidimos comprobar si el procesamiento de muNS ocurre realmente entre el Asp-154 y la Ala-155.

**140** MVGTL**EA**VSTAD**DSPDA**CAPVTSKILAKQQTIAKSPGRL**177**

**Figura 34. Secuencia aminoacídica de la región de muNS que comprende los residuos 140-177.** Una posible secuencia consenso que podría actuar como sustrato para las caspasas 3 y 7 se muestra en rojo, y el posible lugar de procesamiento se marca con una flecha.

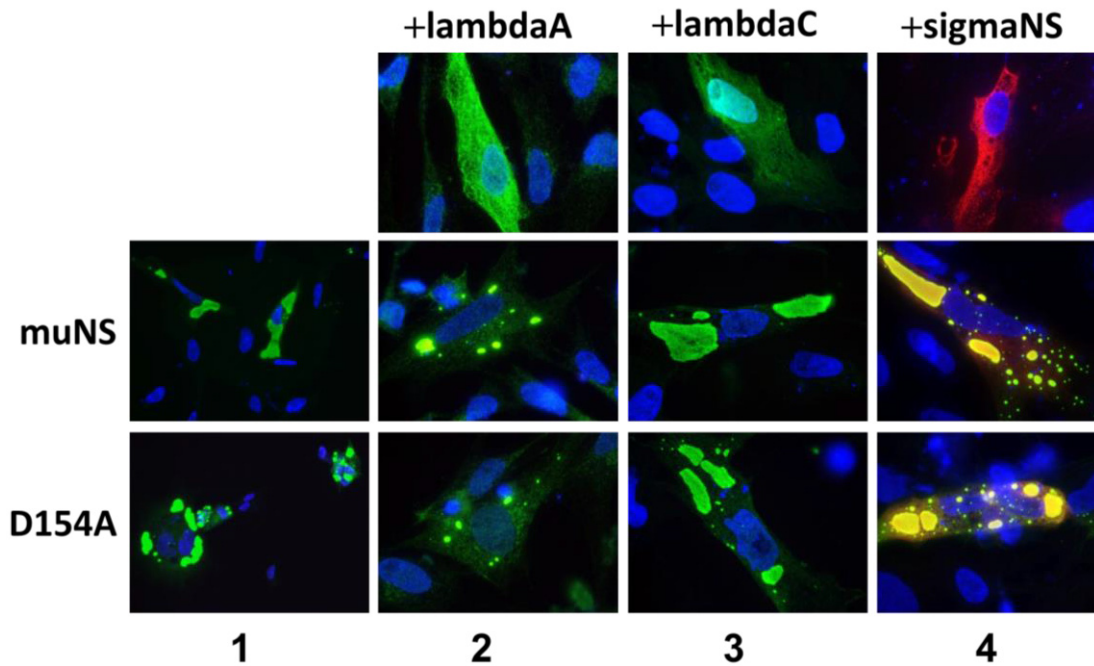
En primer lugar comprobamos si las proteínas que se generarían cuando muNS se corta entre los residuos 154 y 155 tendrían la misma movilidad electroforética que las proteínas muNSN y muNSC que se detectan en células infectadas con ARV. Para ello, generamos plásmidos que expresan la proteína muNS entera o las versiones truncadas que comprenden los residuos 1-154 y 155-635, transfectamos esos plásmidos a células CEF y comparamos las movilidades electroforéticas de las versiones así generadas con las de muNSC y muNSN producidas en células infectadas. Los resultados que se muestran en la Fig. 35 indican que la proteína que comprende los residuos de muNS 1-154 tiene la misma movilidad electroforética que muNSN (comparar carriles 5 y 6), y que la que comprende los residuos 155-635 tiene la misma movilidad que muNSC (comparar carriles 4 y 6). Sorprendentemente, detectamos un ligero procesamiento de la proteína muNS en células transfectadas (Fig. 35, carril 3), cuando anteriormente no habíamos sido capaces de detectar dicho procesamiento (Fig. 22, carril 4). Creemos que esta diferencia se debe a que en los experimentos de la Fig. 35 las células se mantuvieron durante más de 5 h en medio sin suero durante la lipofección, mientras que en los de la Fig. 22 sólo se mantuvieron 2 h. Es probable que se active la apoptosis en las células que se mantienen mucho tiempo en medio sin suero, lo que daría lugar al procesamiento de muNS.



**Figura 35. Análisis electroforético de versiones truncadas de muNS.** Células CEF fueron transfectadas con el plásmido vacío pCIneo (carril 2) o con plásmidos recombinantes que expresan versiones de muNS que comprenden los residuos indicados en la parte de arriba (carriles 3-5) y, 24 h más tarde, las células se marcaron radiactivamente durante 1 h con  $^{35}\text{S}$ metionina/cisteína y se lisaron. Los extractos de estas células y los de células infectadas con ARV (carriles 1 y 6) se inmunoprecipitaron con suero anti-muNS y las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron en gels de 10% tricina-SDS-PAGE.

Para averiguar si el corte proteolítico de muNS ocurre entre los residuos 154 y 155, generamos un plásmido que expresase una versión de muNS que tuviese el Asp-154 mutado a alanina (D154A), para ver si ese mutante es resistente al procesamiento.

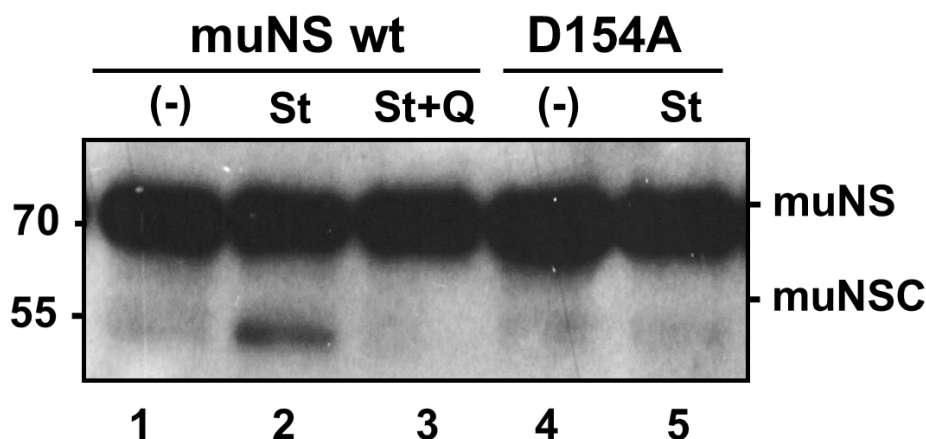
Antes de analizar su resistencia al procesamiento, comprobamos que la mutación no había afectado a la funcionalidad de la proteína, lo que indicaría que la proteína mutada se pliega correctamente. Un análisis por inmunofluorescencia de células transfectadas con el plásmido que expresa el mutante D154A reveló que dicho mutante sigue manteniendo la capacidad de la proteína muNS salvaje para formar inclusiones (Fig. 36, columna 1) y para reclutar a las inclusiones a las proteínas lambdaA, lambdaC y sigmaNS (Fig. 36, carriles 2 y 3). Estos resultados sugieren que la mutación no altera la conformación espacial ni la funcionalidad de la proteína muNS.



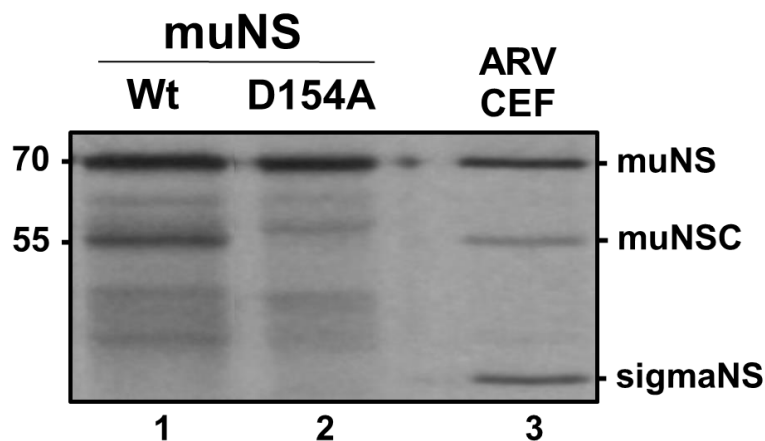
**Figura 36. Capacidad del mutante de muNS D154A para formar inclusiones y reclutar a lambdaA, lambdaC y sigmaNS.** Células CEF se transfectaron con plásmidos que expresan muNS o muNS-D154A, (carril 1), o con plásmidos que expresan lambdaA, lambdaC o sigmaNS (paneles de la fila superior). Células CEF se cotransfectaron con plásmidos que expresan muNS y las proteínas que se indican en la parte superior de la figura (carriles 2, 3 y 4 de los paneles de la fila del medio) o con plásmidos que expresan la versión de muNS D154A y las proteínas que se indican en la partes superior de la figura (carriles 2, 3 y 4 de los paneles de la fila de abajo). A las 24 h post-transfección las células se recogieron y se analizaron por inmunofluorescencia con sueros anti-muNS (carril1), anti-cores (carril2), anti-lambdaC (carril 3) y anti-sigmaNS (carril 4).

Una vez comprobado el correcto comportamiento de la proteína mutada, investigamos la capacidad del compuesto pro-apoptótico estaurosporina para promover el procesamiento de muNS y de su mutante D154A en células transfectadas. Los resultados que se muestran en la Fig. 37 indican que la estaurosporina si es capaz de promover el procesamiento de la proteína muNS salvaje en células transfectadas (comparar carriles 1 y 2), y que la acción de este compuesto se anula cuando las células se incubaban en presencia del inhibidor de apoptosis Q-VD-OPh (comparar carriles 2 y 3). Por el contrario, la estaurosporina no fue capaz de promover el procesamiento del mutante D154A (comparar carriles 4 y 5). Por otra parte, los extractos de células CEF

infectadas con ARV fueron capaces de inducir el procesamiento de la proteína muNS salvaje sintetizada in vitro, pero no el de su mutante D154A (Fig. 38). En conjunto, estos resultados indican que el procesamiento de la proteína muNS de ARV tiene lugar entre los residuos Asp-154 y Ala-155, los cuales están localizados en una secuencia que coincide con una secuencia consenso de reconocimiento para caspasas efectoras.



**Figura 37. El mutante de muNS D154A es resistente al procesamiento inducido por estaurosporina.** Células CEF se transfectaron con plásmidos que expresan la proteína muNS de ARV (carriles 1-3) o su mutante D154A (carriles 4 y 5). A las 18 h post-transfección las células de los carriles 2, 3 y 6 se trataron durante 6 h con 0,5  $\mu$ M estaurosporina y las células del carril 3 se incubaron también con 10  $\mu$ M Q-VD-OPh. A continuación, las células se lisaron en RIPA y se analizaron mediante Western blot con el suero anti-muNS.



**Figura 38. El mutante de muNS D154A es resistente al procesamiento inducido por extractos de células infectadas.** La proteína muNS radiactiva sintetizada in vitro (carril 1) y su mutante D154A (carril 2) se incubaron a 37°C durante 4 h con extractos de células infectadas con ARV. Las muestras resultantes y extractos radiactivos de células infectadas inmunoprecipitados con suero anti-muNS (carril 3) se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía por SDS-PAGE y autorradiografía.

## 1.7.-Una caspasa del tipo de la caspasa 3 cataliza el procesamiento de muNS.

Los resultados presentados hasta el momento sugieren que el corte de muNS está catalizado por una caspasa efectora y el hecho de que muNS se procese en células aviarias y de mamífero infectadas con ARV sugiere que esta proteína es sustrato para las caspasas aviarias y para las de mamífero. Por otra parte, nuestros resultados demostraron que en células CEF infectadas con ARV se activan las caspasas 3 y/o 7, por lo que una de estas caspasas podría ser la responsable del procesamiento de muNS. Para investigar el papel de la caspasa 3, comparamos el procesamiento de muNS en células humanas HeLa y MCF-7 infectadas con ARV. HeLa es una línea celular de origen humano que expresa caspasa 3, mientras que MCF-7 es una línea celular obtenida de cáncer de pecho que no expresa una caspasa 3 funcional debido a la pérdida de un fragmento de 125 bp en el exón 3 del gen de la caspasa 3 (Jänicke et al., 1998). El inmunoblot que se presenta en el panel A de la Fig. 39 reveló que muNS se procesa en las células HeLa infectadas con ARV (carril 2) y que dicho procesamiento se inhibe cuando la infección se realiza en presencia de Q-VD-OPh (carril 3). Sin embargo, en células MCF-7 infectadas con ARV, muNS no se procesa (carril 5) ni incluso cuando las células infectadas se incuban con el promotor de apoptosis estaurosporina (carril 6). Estos resultados sugieren que la caspasa 3, o una proteasa activada por esta caspasa, es la responsable de catalizar el procesamiento de muNS.

A continuación, investigamos si las caspasas 3 y 7 humanas recombinantes comerciales tienen la capacidad de procesar muNS en un ensayo *in vitro*. Para ello, purificamos la proteína muNS expresada en células de insecto infectadas con el baculovirus recombinante Bac-muNS, la proteína purificada se incubó con las caspasas comerciales en presencia o ausencia de Q-VD-OPh, y las muestras resultantes se analizaron por Western blot. Los resultados que se muestran en el panel B de la Fig. 39 indican que muNS es sustrato para la caspasa 3 (carril 3), pero no para la caspasa 7 (carril 5). Los resultados también indican que la capacidad de la caspasa 3 para catalizar el corte de muNS se bloquea cuando la incubación con la caspasa se realiza en presencia de Q-VD-OPh (comparar carriles 3 y 4). Estos resultados indican que muNS es sustrato de la caspasa 3 humana comercial, pero no para la caspasa 7, lo que sugiere que el enzima aviar que procesa a muNS debe ser también una proteasa homóloga del tipo de la caspasa 3 humana.

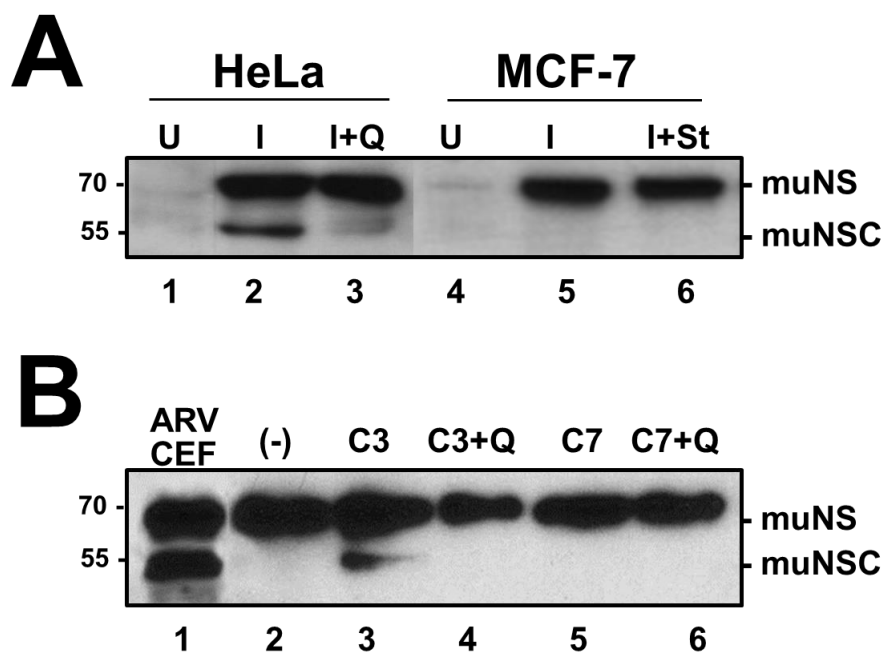
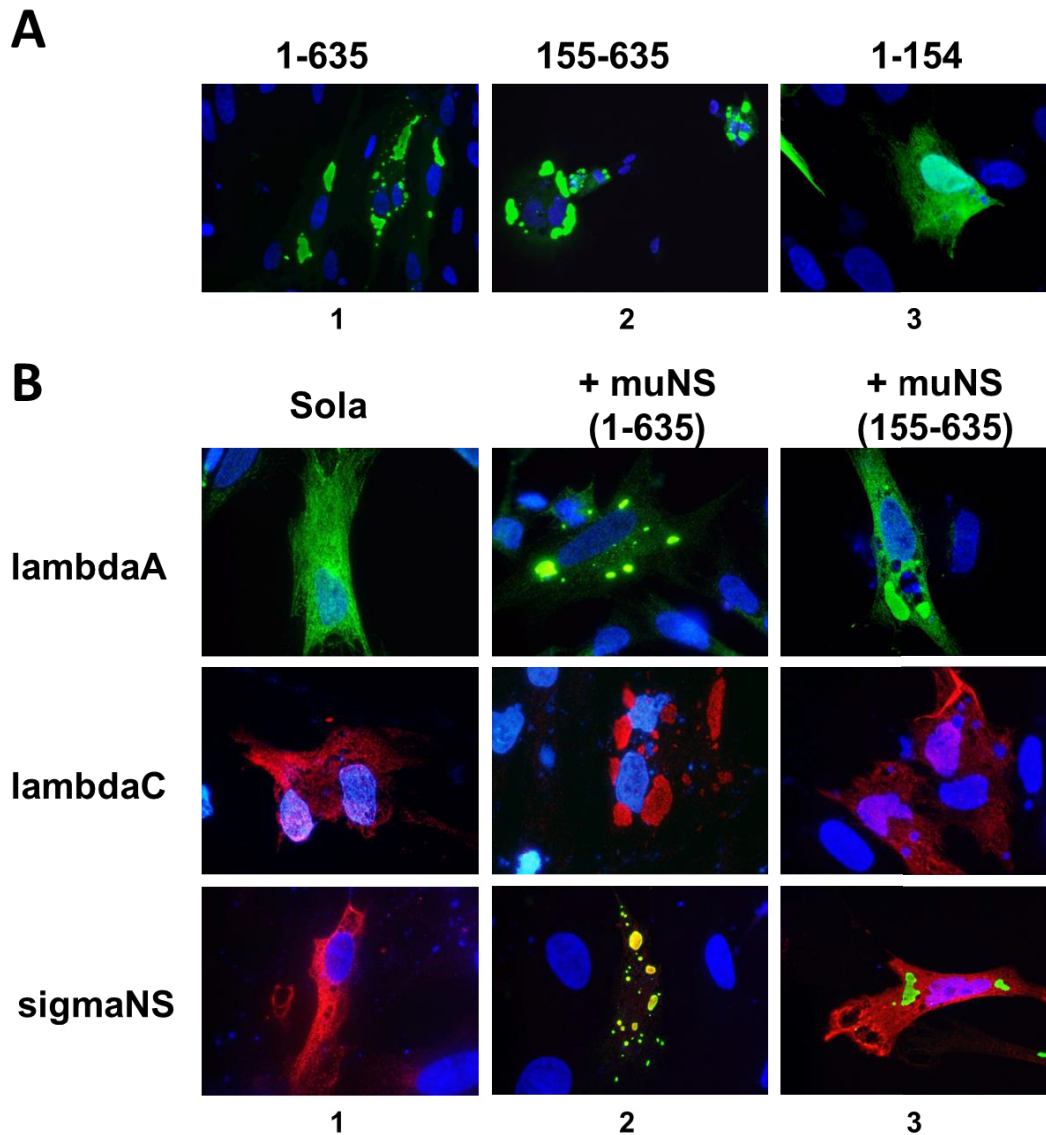


Figura 39.

**Identificación de la caspasa que cataliza el procesamiento de muNS.** **A)** Células HeLa (carriles 1-3) y células MCF-7 (carriles 4-6), sin infectar (carriles 1 y 4) o infectadas con 50 pfu/célula de ARV (carriles 2, 3, 5 y 6), sin tratar (carriles 2 y 5) o tratadas con 10  $\mu$ M Q-VD-Oph desde 1 h antes de ser infectadas (carril 3) o con 0,5  $\mu$ M de estaurosporina durante las últimas 6 h de infección (carril 6). A las 20 hpi se procesaron para su análisis por Western blot con suero anti-muNS. **B)** 1 mg de proteína muNS purificada de células Sf9 que habían sido infectadas con el baculovirus recombinante Bac-muNS (carriles 2-6), se incubó durante 4 h a 37°C con caspasa 3 (carriles 3 y 4) o con caspasa 7 (carriles 5 y 6), en ausencia (carriles 3 y 5) o presencia (carriles 4 y 6) de 10  $\mu$ M Q-VD-Oph. Las muestras resultantes, junto con un extracto de CEF infectadas (carril 1) se analizaron por Western blot con suero anti-muNS.

## 1.8.-Propiedades distintivas de las isoformas de muNS.

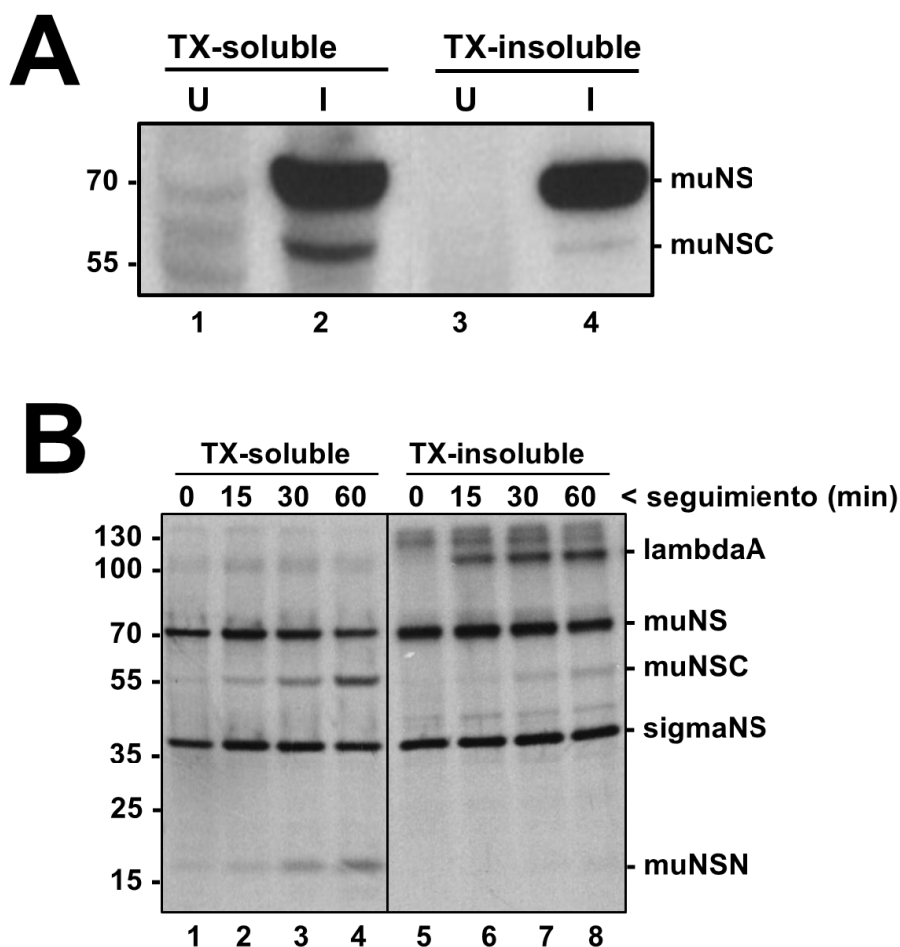
En un primer intento para analizar las propiedades distintivas de las isoformas de muNS, investigamos la capacidad de estas isoformas para formar inclusiones y para reclutar otras proteínas a esas estructuras. La proteína muNSC, pero no muNSN, mantiene la capacidad de muNS para formar inclusiones globulares citoplasmáticas cuando se expresa individualmente en células transfectadas (Fig. 40, panel A). Sin embargo, la proteína muNSC no mantiene la capacidad para reclutar a las proteínas lambdaA, lambdaC y sigmaNS a las inclusiones (Fig. 40, panel A, comparar carriles 2 y 3), lo que sugiere que deben existir dominios dentro de los 154 primeros residuos de muNS que son claves para su interacción con lambdaA, lambdaC y sigmaNS.



**Figura 40. Distribución intracelular de las isoformas de muNS.** **A)** Plásmidos que expresan versiones de muNS, que comprenden los residuos indicados en la parte superior, se lipofectaron a monocapas de células CEF. A las 20 h post-transfección las células se analizaron por inmunofluorescencia con suero anti-muNS en verde y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). **B)** Células CEF se transfectaron con plásmidos que expresan las proteínas de ARV que se indican a la izquierda (carril 1) o se co-transfectaron con estos plásmidos junto con el que expresa la proteína muNS entera (carril 2) o con el que expresa muNSC (carril 3). Las células se procesaron para inmunofluorescencia a las 20 h post-transfección con suero anti-cores (verde) para lambdaA (fila superior), suero anti-lambdaC (fila intermedia), o anti-sigmaNS en rojo y anti-muNS en verde (fila inferior).

A continuación comparamos la fortaleza con la que muNS y muNSC se asocian con las factorías virales. Para ello analizamos la capacidad de un tampón que contiene Tritón X-100 (TX) para extraer muNS y muNSC de células infectadas. Este tampón se había usado previamente con éxito para discriminar entre proteínas solubles y proteínas asociadas al citoesqueleto o a las factorías virales (Mora et al., 1987; Tourís-Otero et al., 2004a). En una primera aproximación, células CEF sin infectar, o células

infectadas con ARV se lisaron con el tampón TX y, a continuación, la fracción no soluble que permanecía asociada a la placa se extrajo posteriormente con tampón RIPA. Tanto la fracción que se extrajo con el tampón TX (fracción TX-soluble), como la que se extrajo con tampón RIPA (fracción TX-insoluble) se analizaron por Western blot con suero anti-muNS. Los resultados que se muestran en el panel A de la Fig. 41 indican que, mientras que muNS se reparte por igual entre las dos fracciones, muNSC se detecta casi exclusivamente en la fracción TX-soluble, lo que sugiere que muNSC se asocia a las inclusiones con menos fortaleza que muNS. En una segunda aproximación, células infectadas con ARV se sometieron a un análisis de pulso radiactivo y seguimiento, y las células se lisaron en tampón TX para obtener las fracciones soluble e insoluble. Las muestras se inmunoprecipitaron con suero anti-muNS y se resolvieron en un gel del 8% tricina-SDS-PAGE. El autorradiograma que se muestra en el panel B de la Fig. 41 muestra que las proteínas muNS y sigmaNS se distribuyen entre las dos fracciones tan pronto como se sintetizan, con una acumulación ligeramente superior en la fracción TX-insoluble. Por el contrario, la mayor parte de muNSC y prácticamente toda la muNSN se pudieron extraer con el tampón TX en cualquier periodo del seguimiento. La fiabilidad del procedimiento de extracción se puso de manifiesto cuando se observó que la proteína lambdaA co-inmunoprecipita con muNS exclusivamente en la fracción insoluble en cualquier periodo de seguimiento. Estos resultados indican que muNS, sigmaNS y lambdaA, se asocian con las inclusiones más fuertemente que muNSC, a pesar de que muNSC, pero no lambdaA ni sigmaNS, es capaz de formar inclusiones cuando se expresa individualmente en células transfectadas.

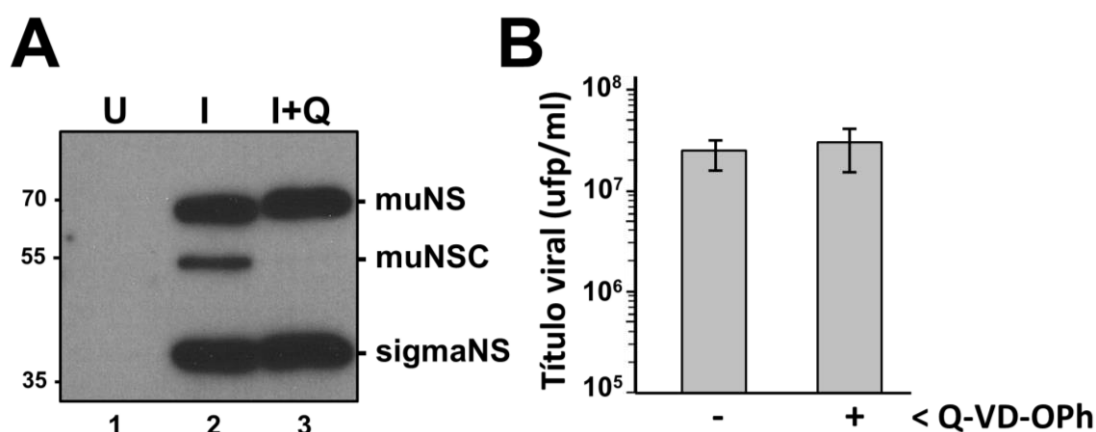


**Figura 41. Asociación de muNS y muNSC con las factorías virales. A)** Células CEF sin infectar (carriles 1 y 3) o infectadas con 10 pfu/célula de ARV durante 16 h (carriles 2 y 4), se lisaron en tampón TX y se incubaron 10 min en hielo. Se retiró el sobrenadante (fracción TX-soluble; carriles 1 y 2) y la fracción que quedaba pegada a la placa se solubilizó con tampón RIPA (fracción TX-insoluble; carriles 3 y 4). Las muestras resultantes se analizaron por Western blot con suero anti-muNS. **B)** Células CEF infectadas con ARV se marcaron durante 10 min con [<sup>35</sup>S]metionina/cisteína y después se incubaron en medio no radiactivo durante los tiempos de seguimiento que se indican. Las células se procesaron igual que las muestras del panel A y las fracciones TX-soluble y TX-insoluble resultantes se inmunoprecipitaron con suero anti-muNS y se analizaron por electroforesis en un gel del 8% tricina-SDS-PAGE. Las bandas proteicas se visualizaron por autorradiografía.

## 1.9.-Efecto de la inhibición de las caspasas sobre el comportamiento del virus.

Llegados a este punto, nos parecía muy interesante determinar la importancia que el procesamiento de muNS tiene en la replicación de ARV, para ello hubiera sido muy apropiado disponer de un virus ARV recombinante con un gen M3 que expresase una proteína muNS no procesable, como el mutante D154A. Sin embargo, hasta la

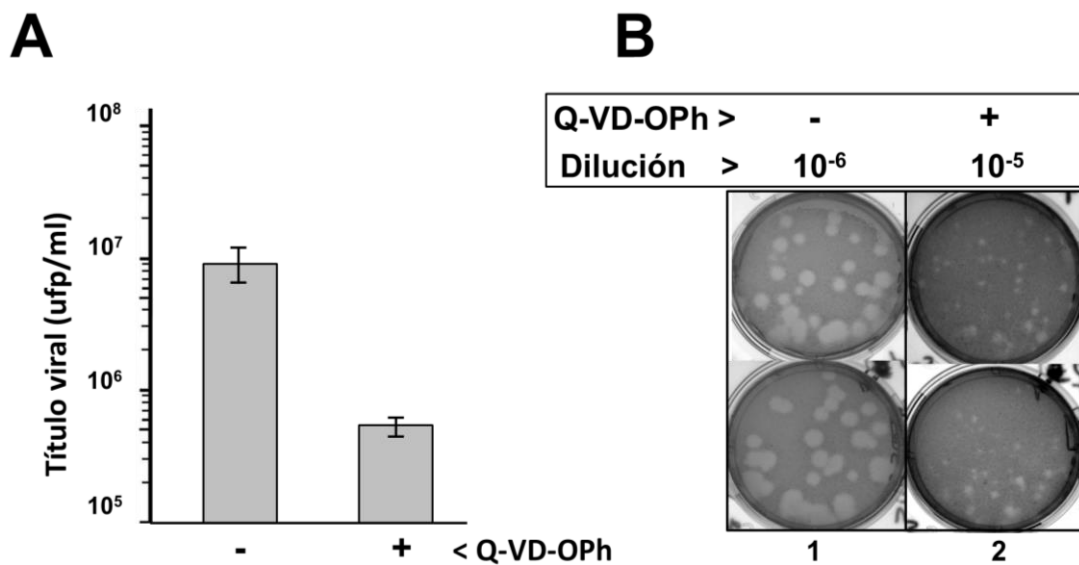
fecha no se ha podido establecer un sistema de genética reversa para ARV, por lo que no nos era posible generar ese virus recombinante. Como alternativa, examinamos el efecto que ejerce el inhibidor de apoptosis Q-VD-OPh sobre la replicación de ARV en células CEF, ya que hemos demostrado que dicho inhibidor bloquea la activación de apoptosis y el procesamiento de muNS en células infectadas con ARV. En primer lugar, examinamos el efecto del inhibidor sobre la producción intracelular de virus, mediante el análisis de los niveles intracelulares de las proteínas no estructurales muNS y sigmaNS y de la producción de partículas virales infecciosas. Los resultados que se muestran en la Fig. 42 demuestran que la presencia de 10  $\mu$ M Q-VD-OPh desde el comienzo de la infección inhibe completamente el procesamiento de muNS, pero no altera significativamente los niveles intracelulares de las proteínas muNS y sigmaNS (Fig. 42, panel A), lo que sugiere que ni la apoptosis ni el procesamiento de muNS afectan de forma significativa a la expresión de los genes de ARV ni a las etapas de la replicación viral anteriores a la expresión génica. Además, la presencia del inhibidor aumentó ligeramente la producción de partículas virales infecciosas, tal como demuestran los resultados del ensayo de titulación en placa que se muestran en el panel B de la Fig. 42.



**Figura 42. Efecto del Q-VD-OPh sobre la replicación reoviral.** **A)** Células CEF sin infectar (carril 1) o infectadas con 10 pfu/célula de ARV durante 16 h, en ausencia (carril 2), o presencia (carril 3) de 10  $\mu$ M Q-VD-OPh desde 1 h antes del comienzo de la infección, se lisaron y los extractos se analizaron por Western blot con una mezcla de sueros anti-muNS y anti-sigmaNS. **B)** Células CEF se infectaron con 0,1 pfu/célula de ARV y a las 24 hpi las células se recogieron en el medio de cultivo, se congelaron y descongelaron tres veces, se centrifugaron y la concentración de partículas virales infecciosas se determinó mediante un ensayo de titulación en placa sobre monocapas de células CEF.

A continuación, investigamos el efecto del inhibidor Q-VD-OPh sobre la liberación del virus al medio extracelular, mediante la titulación del virus presente en el medio de cultivo de células infectadas. Los resultados que se muestran en el panel A de la Fig. 43 indican que, en células incubadas en presencia de Q-VD-OPh se liberan al exterior de la célula menos del 10% de las partículas virales infecciosas que se liberan en ausencia del inhibidor ( $5 \times 10^5$  pfu/mL frente a  $6 \times 10^7$  pfu/mL), lo que sugiere que la apoptosis promueve la liberación del virus de las células infectadas. Tras este resultado

investigamos cual es el efecto de la presencia del inhibidor de apoptosis en un ensayo de titulación en placa de un stock viral. Dado que en este análisis la diseminación del virus de una célula infectada a sus vecinas es determinante para la formación de placas de lisis visibles quisimos comprobar si esa disminución de la capacidad de diseminación del virus podía hacerse patente en este ensayo. El resultado que se muestra en el panel B de la Fig. 43 demuestra que en presencia del inhibidor se obtuvieron menos placas y más pequeñas que en su ausencia, lo que sugiere que Q-VD-OPh reduce la diseminación célula-célula del virus durante las diferentes etapas de replicación, liberación y re-infección que tienen lugar durante la formación de una placa de lisis. Estos resultados sugieren que el virus ARV utiliza la apoptosis inducida durante la infección para favorecer la salida y diseminación del virus de la célula infectada a las células vecinas.

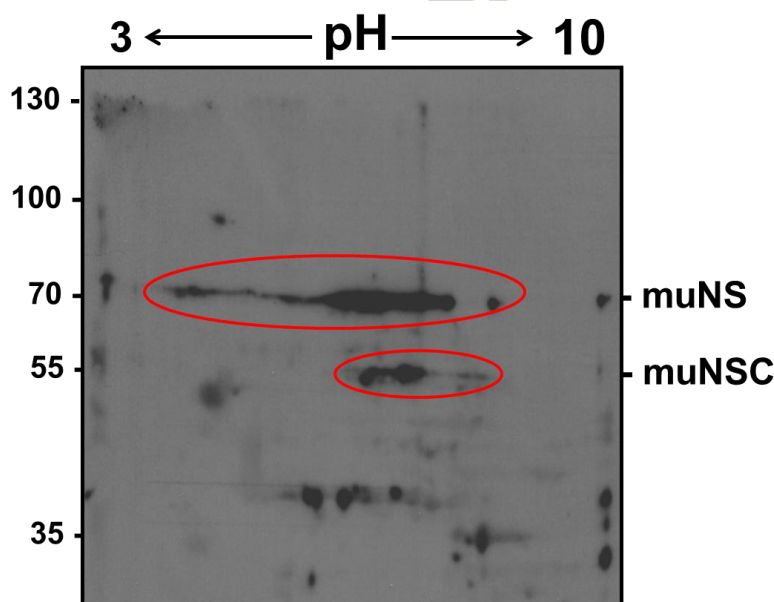


**Figura 43. Efecto del Q-VD-OPh sobre la diseminación de ARV. A)** Los sobrenadantes de las células de la Fig. 42 B, infectadas en ausencia (-) o presencia (+) de Q-VD-OPh, se centrifugaron y la concentración de partículas virales infectivas de los sobrenadantes se determinó mediante un ensayo en placa sobre monocapas de células CEF. **B)** Fotografías de placas que se obtuvieron al titular un stock de ARV S1133 sobre monocapas de CEF en ausencia (carril 1) o presencia (carril 2) de 10  $\mu$ M de Q-VD-OPh. Las fotos del carril 1 corresponden a una dilución del stock de 10<sup>-6</sup>, mientras que las del carril 2 corresponden a una de 10<sup>-5</sup>.

## 2.-Estudio de la fosforilación de muNS.

### 2.1.-Las proteínas muNS y muNSC se fosforilan en células infectadas.

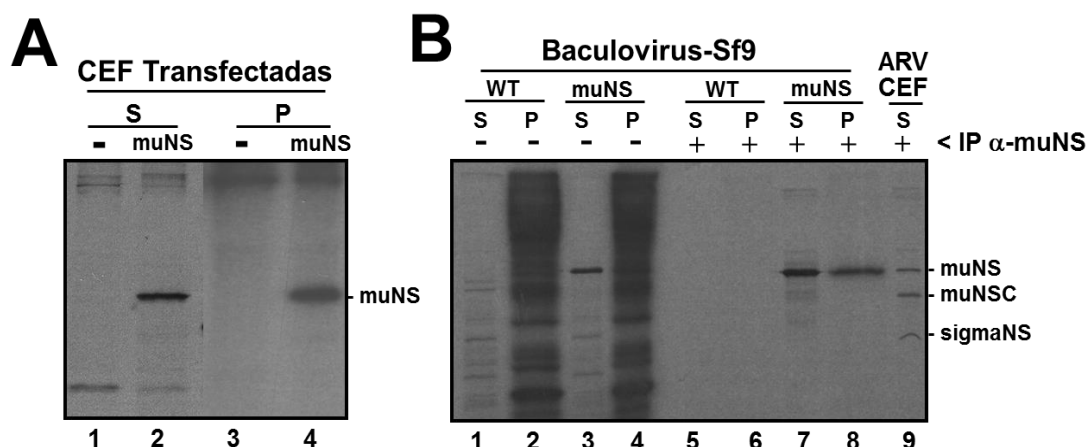
Para averiguar si la proteína muNS de ARV sufre alguna otra modificación post-traduccional, aparte de su procesamiento proteolítico, analizamos por electroforesis bidimensional y Western blot un extracto de células CEF infectadas con el ARV S1133, utilizando suero anti-muNS. El análisis que se muestra en la Fig. 44 reveló que tanto muNS como muNSC aparecen como isoformas proteicas del mismo tamaño pero con diferentes puntos isoeléctricos, lo que sugiere que ambas proteínas se modifican covalentemente con grupos cargados.



**Figura 44: Las proteínas muNS y muNSC de ARV poseen una variedad de puntos isoeléctricos.** Un extracto de células CEF infectadas con 5 pfu/célula de ARV durante 16 h se analizó mediante electroforesis bidimensional. La muestra se resolvió primero por isoelectroenfoque con un rango de pH de 3 a 10 y posteriormente por 10% SDS-PAGE. Finalmente, la posición de las isoformas de muNS y muNSC en el gel se visualizaron por Western blot con suero anti-muNS. Las isoformas de muNS y muNSC aparecen encuadradas en rojo.

Dado que se ha demostrado que un gran número de proteínas virales no estructurales son fosfoproteínas (Jakubiec y Jupin, 2007; Lenard, 1999) decidimos investigar si la proteína muNS se fosforila en células infectadas con ARV. Para ello, células CEF sin infectar o infectadas con ARV se marcaron radiactivamente con  $^{35}\text{S}$ -aminoácidos o con  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato desde las 12 hasta las 16 hpi. Las células se lisaron y los extractos resultantes se inmunoprecipitaron con sueros anti-muNS y anti-sigmaNS. Las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron por SDS-PAGE y se visualizaron por autorradiografía (Fig. 45 A). El análisis de las proteínas inmunoprecipitadas a partir de



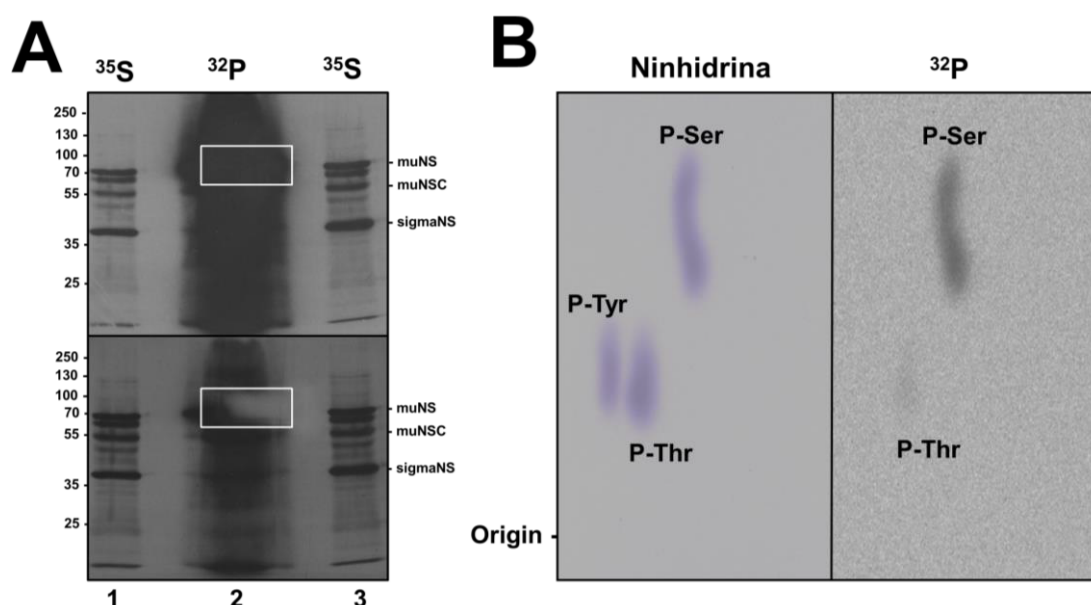


**Figura 46: La proteína muNS se fosforila en ausencia de infección reoviral. A)** Células CEF transfectadas con el plásmido vacío pCINeo 3.1 (-) o con el plásmido recombinante pCINeo-muNS (muNS) se marcaron radiactivamente a las 24 h post-transfección durante 4 h con [<sup>35</sup>S]metionina/cisteína (S) o con [<sup>32</sup>P]ortofosfato (P) y a continuación se lisaron. Los extractos resultantes se inmunoprecipitaron con suero anti-muNS y las proteínas radiactivas se resolvieron por 10% SDS-PAGE y se visualizaron por autorradiografía. **B)** Células Sf9 de insecto se infectaron con baculovirus salvaje (Wt) o con un baculovirus recombinante que expresa ARV-muNS (muNS). A las 24 hpi las células se marcaron radiactivamente durante 4 h con [<sup>35</sup>S]metionina/cisteína (S) o con [<sup>32</sup>P]ortofosfato (P) y a continuación se lisaron. Los extractos, así como un extracto de células CEF infectadas con ARV (carril 9), antes (-) o después (+) de inmunoprecipitarlos con suero anti-muNS, se analizaron como en el panel A.

## 2.2.-La proteína muNS se fosforila en residuos de serina fundamentalmente.

La mayoría de las fosfoproteínas tienen ortofosfato unido covalentemente a los grupos hidroxilo de cadenas laterales de residuos de serina, treonina y/o tirosina. La incorporación del ortofosfato está catalizado por proteína quinasas, las cuales se pueden agrupar en dos clases: serina/treonina quinasas y tirosina quinasas (Tarrant y Cole, 2009). Para identificar qué tipo de aminoácido de la proteína muNS se fosforila, células CEF infectadas con ARV se incubaron con ortofosfato radiactivo, se lisaron y los extractos resultantes se inmunoprecipitaron con suero anti-muNS. Las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Las bandas proteicas radiactivas de la membrana se visualizaron por autorradiografía. Un fragmento de la membrana conteniendo la banda radiactiva de muNS (encontrado en blanco en el carril 2 de la Fig. 46 A) se cortó y se incubó con 6 M HCl a 110°C durante 2 h en atmósfera de nitrógeno. Los productos de hidrólisis se mezclaron con 3 µg de cada uno de los fosfoaminoácidos estándar fosfo-serina, fosfo-treonina y fosfo-tirosina, las muestras se cargaron sobre placas de capa fina de celulosa y se analizaron por electroforesis dimensional, tal como se describe en Materiales y

Métodos. La placa se tiñó con ninhidrina (panel de la izquierda de la Fig. 46 B) y después se sometió a autorradiografía (panel de la derecha de la Fig. 46 B). Los resultados muestran que muNS se fosforila fundamentalmente en residuos de serina, aunque también hemos detectado algo de fosforilación en treonina. No se detectó ningún producto que migrase en la posición de fosfotirosina. Estos resultados sugieren que muNS es sustrato para las serina/treonina quinazas. Esta sugerencia también está apoyada por el hecho de que la incorporación de ortofosfato en la proteína muNS aumenta cuando células infectadas con ARV se incuban en presencia de ácido okadaico (Fig. 50), un inhibidor de las serina/treonina fosfatasa (Bialojan and Takai, 1988; Cohen et al., 1990).



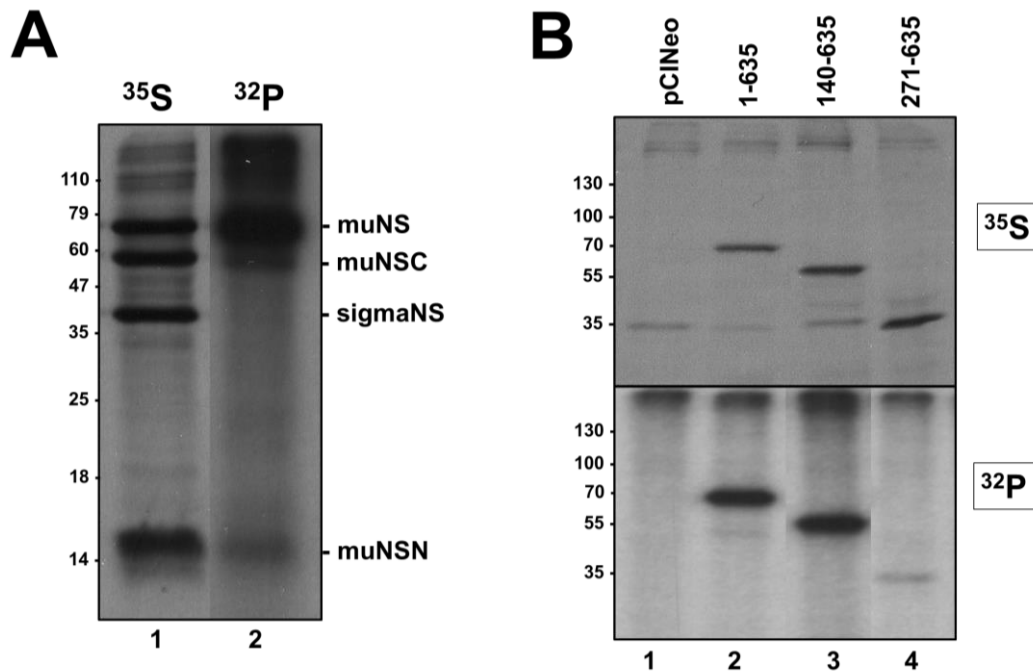
**Figura 47. La proteína muNS se fosforila fundamentalmente en residuos de serina.** **A)** Células CEF se infectaron con 10 pfu/célula de ARV y a las 16 hpi se marcaron radiactivamente durante 4 h con [<sup>35</sup>S]metionina/cisteína (<sup>35</sup>S) o con [<sup>32</sup>P]ortofosfato (<sup>32</sup>P). Posteriormente las células se lisaron, los extractos resultantes se inmunoprecipitaron con suero anti-muNS y las proteínas radiactivas se resolvieron por 10% SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. **B)** Un fragmento de la membrana conteniendo la banda radiactiva de muNS (encuadrado en blanco en el carril 2 del panel A) se cortó y se incubó con 6 M HCl a 110°C durante 2 h en atmósfera de nitrógeno. Los productos de hidrólisis se mezclaron con 3 µg de cada uno de los fosfoaminoácidos estándar, fosfo-serina, fosfo-treonina y fosfo-tirosina, las muestras se cargaron sobre una placa de capa fina de celulosa y se resolvieron por electroforesis bidimensional. En el panel de la izquierda el gel se tiñó con ninhidrina y en el de la derecha se sometió a autorradiografía.

### 2.3.-La proteína muNS se fosforila en varias posiciones.

Nuestros descubrimientos de que muNS se fosforila en residuos de serina y treonina, y de que la proteína se resuelve en electroforesis bidimensional como múltiples isoformas del mismo tamaño, pero diferentes puntos isoeléctricos, sugiere que

muNS se fosforila en más de un residuo. Para comprobarlo, en primer lugar decidimos averiguar si los productos proteolíticos de muNS, muNSC y muNSN, se fosforilan en células infectadas con ARV. Para ello, extractos de células CEF infectadas con ARV, que habían sido marcadas metabólicamente con  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato o con  $^{35}\text{S}$ -metionina/cisteína, se inmunoprecipitaron con suero anti-muNS y las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron por SDS-PAGE y se visualizaron por autorradiografía. Los resultados que se muestran en la Fig. 48 A demuestran claramente que muNS, muNSC y muNSN, pero no sigmaNS, han incorporado ortofosfato radiactivo, lo que demuestra que muNS se fosforila en dos regiones diferentes, la que comprende los residuos 1-154 (muNSN) y la que comprende los residuos 155-635 (muNSC).

Para identificar mejor las regiones fosforilables de muNS, expresamos transitoriamente versiones de muNS truncadas en su extremo amino y examinamos la capacidad de esas versiones para incorporar ortofosfato cuando se expresan en células transfectadas. Los resultados que se muestran en la Fig. 48 B indican que la incorporación de ortofosfato no se reduce significativamente cuando a la proteína muNS se le eliminan los primeros 139 residuos de su extremo amino (comparar carriles 2 y 3 del panel inferior), lo que sugiere que esta región no se fosforila, o que si lo hace debe ser de forma muy débil. Este resultado, junto con el hecho de que muNSN, que comprende los residuos 1-154 de muNS, sí se fosforila, sugiere que la región que comprende los residuos 140-154 debe contener residuos fosforilables. Los resultados que se muestran en la Fig. 48 B también revelaron que la capacidad de fosforilación de muNS se reduce drásticamente cuando a la proteína se le retira la región que comprende los residuos 1-270 (comparar carriles 2 y 4 del panel inferior) indicando que la región 140-270 debe contener la mayoría de los residuos fosforilables de muNS. Sin embargo también debe haber algún residuo fosforilable presente en la región 270-635, ya que se detecta algo de  $^{32}\text{P}$  asociado a la versión de muNS que comprende esa región (carril 4 del panel inferior).



**Figura 48. La proteína muNS se fosforila en varias posiciones. A)** Células CEF se infectaron con 10 pfu/célula de ARV y a las 16 hpi se marcaron radiactivamente durante 4 h con  $[^{35}\text{S}]$ metionina/cisteína ( $^{35}\text{S}$ ) o con  $[^{32}\text{P}]$ ortofosfato ( $^{32}\text{P}$ ). Tras el marcaje las células se lisaron y los extractos resultantes se inmunoprecipitaron con suero anti-muNS. Las proteínas radiactivas inmunoprecipitadas se resolvieron por 10% SDS-PAGE y se visualizaron por autorradiografía. **B)** Células CEF se transfectaron con el plásmido vacío pCINeo o con los plásmidos recombinantes que expresan versiones de muNS que comprenden los residuos que se indican en la parte superior. A las 24 h post-transfección las células se marcaron y se procesaron como se indica en A). El autorradiograma de las células marcadas con  $^{35}\text{S}$  se muestra en el panel superior y el de las marcadas con  $^{32}\text{P}$  en el inferior.

Para poder identificar residuos específicos de muNS que están fosforilados, purificamos la proteína muNS expresada en células de insecto infectadas con un baculovirus recombinante, ya que habíamos demostrado previamente que la proteína expresada en este sistema se fosforila (Fig. 46 B). La proteína muNS purificada se digirió con tripsina y los fosfopéptidos tripticos se enriquecieron por cromatografía en columnas de óxido de titanio. El análisis por cromatografía de masas de los péptidos seleccionados reveló la presencia de tres péptidos fosforilados, los que ocupan las posiciones 24-45, 127-162 y 173-187 (sus secuencias están representadas en rojo en la Fig. 49). En cada uno de esos péptidos se identificó un residuo de fosfoserina, los que ocupan las posiciones 35, 152 y 173 en la secuencia de muNS (representado en minúscula y subrayado). En estos momentos estamos tratando de confirmar estos resultados mediante marcaje metabólico con  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato y de identificar otros posibles residuos fosforilados de muNS.

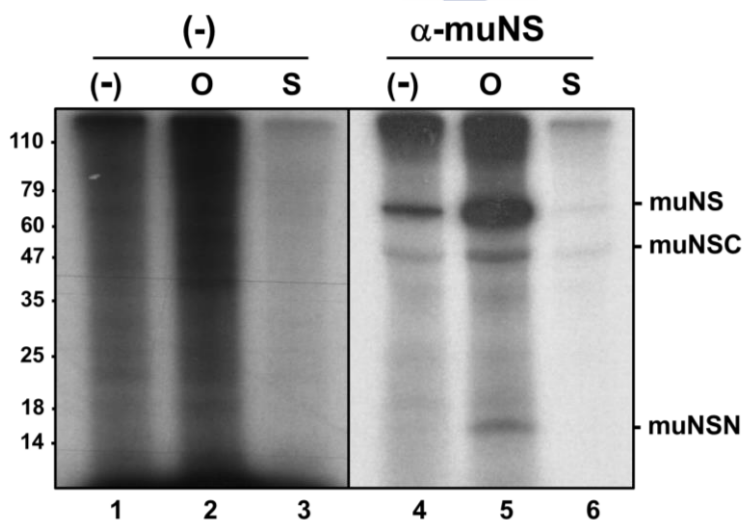
MASTKWGDKP	MSLSMSHDGS	SIRSAASQFL	SVPL <u>s</u> HSTPI	PPQRKTVLLK	(50)
FMIGDELVTV	QGALAPFDEY	WYDNQPLLAQ	AVEMLASADR	LRQFEHYEKF	(100)
LLKKGHQITE	IMNRLRLFFT	DVLKVKMEAD	ALPALAQYLM	VGTL <b>EA</b> VSTA	(150)
<b>D</b> <u>s</u> PDACVPVT	SKILAKQQTI	AK <u>s</u> PGRLDEE	EYNVIRSRFL	THEVFDLTS	(200)
LPGVQPFMDM	YYATVPRADS	TGWCVYRRKG	LVIYAPDEQF	SDLTIFSTRL	(250)
TASRELQLVA	GDVVVACFDL	MDVSDIAPSH	HASVQEERTL	GTSKYSNVTA	(300)
NDHPLVFFSP	SALRWAIIDHA	CTDSLVSSTRN	IRVCVGIDPL	VTRWTRDGVQ	(350)
EAAIIMDDKL	PSAGRARMAL	RTLLLARRSP	MPSFLLGALK	QSGGQLLEHY	(400)
RCDAANRYGS	PTVPTSHPPP	CSKCP <b>EL</b> KEQ	IAKLSSSPIP	KVDSSVGPVAV	(450)
LLSKIADLQR	ANRELSLKL	DVQPAREDHL	LAYLNEHVCV	NAKDHEKGLL	(500)
ARCNVSGDSI	SSILQRMKN	RERFETRLRH	EASAEWEPRV	EALNQELAKA	(550)
RVEQQDMMTQ	SLQYLNERDE	LLQEVD <b>EL</b> KR	ELTTLSANV	RLNADNHRMS	(600)
RATRVGDAFV	SDVEPLPSGI	PGESKPSMEE	LVDDL	(635)	

**Figura 49: Identificación de residuos fosforilados en la secuencia de la proteína muNS.** Se infectaron células Sf-9 con el baculovirus recombinante Bac-muNS durante 3 días. Las células se resuspendieron en tampón hipotónico, se incubaron en hielo 15 min, se centrifugaron y el pellet se lavó dos veces en el mismo tampón. El pellet final se resuspendió en el mismo tampón y se sonicó (10 ciclos de 1 min de sonicado y 30 s en hielo), tras lo cual se centrifugó, se lavó con tampón hipotónico 5 veces más, se resuspendió en tampón hipotónico sin magnesio y se incubó 4 h a 4°C. La muestra se centrifugó y se recogió el sobrenadante que contenía la proteína muNS purificada. Éste se envió congelado al laboratorio del Dr. Ignacio Casal para la identificación de fosfoaminoácidos por espectrometría de masas. En la secuencia de muNS se indican en rojo los fosfopéptidos detectados y en minúscula y subrayado se señalan los fosfoaminoácidos identificados.

## 2.4.-La proteína muNS se fosforila de forma reversible.

Las fosfoproteínas pueden fosforilarse de forma reversible o de forma irreversible. La fosforilación reversible de proteínas es un mecanismo que utilizan las células y organismos para activar/inactivar enzimas de forma muy rápida, y prácticamente todos y cada uno de los procesos que ocurren en el interior de las células están controlados, al menos en alguno de sus pasos, mediante fosforilación reversible, por la acción de quinasas y fosfatasa (Derouiche et al., 2012). Para averiguar si muNS se fosforila de forma reversible o irreversible, analizamos el efecto del ácido okadaico y de la estaurosporina sobre el grado de fosforilación de la proteína muNS presente en células infectadas. El ácido okadaico es un inhibidor específico de PP1A y PP2A serina/treonina fosfatasa (Bialojan and Takai, 1988), mientras que la estaurosporina es un inhibidor no selectivo de quinasas (Rüegg and Burgess, 1989). Células CEF infectadas con ARV se marcaron radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato en presencia o

ausencia de 250 nM ácido okadaico o de 500 nM estaurosporina. Las células se lisaron en tampón RIPA, una parte de los extractos se inmunoprecipitó con suero anti-muNS y las proteínas radiactivas se resolvieron por SDS-PAGE y se visualizaron por autorradiografía. Los resultados que se muestran en los carriles 1-3 de la Fig. 49 muestran que estos inhibidores funcionan en células aviares, ya que el ácido okadaico indujo un aumento en el grado de fosforilación de las proteínas celulares, mientras que la estaurosporina redujo drásticamente la incorporación de ortofosfato en dichas proteínas. Al analizar el efecto de estos inhibidores sobre la fosforilación de muNS encontramos que cuando las células infectadas se incuban en presencia de ácido okadaico aumenta mucho la incorporación de ortofosfato a las tres isoformas de muNS (comparar carriles 4 y 5), mientras que la presencia de estaurosporina se produce el efecto contrario (comparar carriles 4 y 6). Estos resultados demuestran que la proteína muNS se fosforila de forma reversible.



**Figura 50. Efecto del ácido okadaico y de la estaurosporina sobre el grado de fosforilación de muNS.** Células CEF infectadas con 10 pfu/célula se marcaron radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato desde las 12 hasta las 16 hpi. El marcaje se realizó en ausencia (-) o presencia de 250 nM ácido okadaico (O) o de 500 nM estaurosporina (S). Las células se lisaron en tampón RIPA, los extractos del panel de la derecha se inmunoprecipitaron con suero anti-muNS y las proteínas radiactivas, inmunoprecipitadas (carriles 4-6) o sin inmunoprecipitar (carriles 1-3), se resolvieron por SDS-PAGE y se visualizaron por autorradiografía.

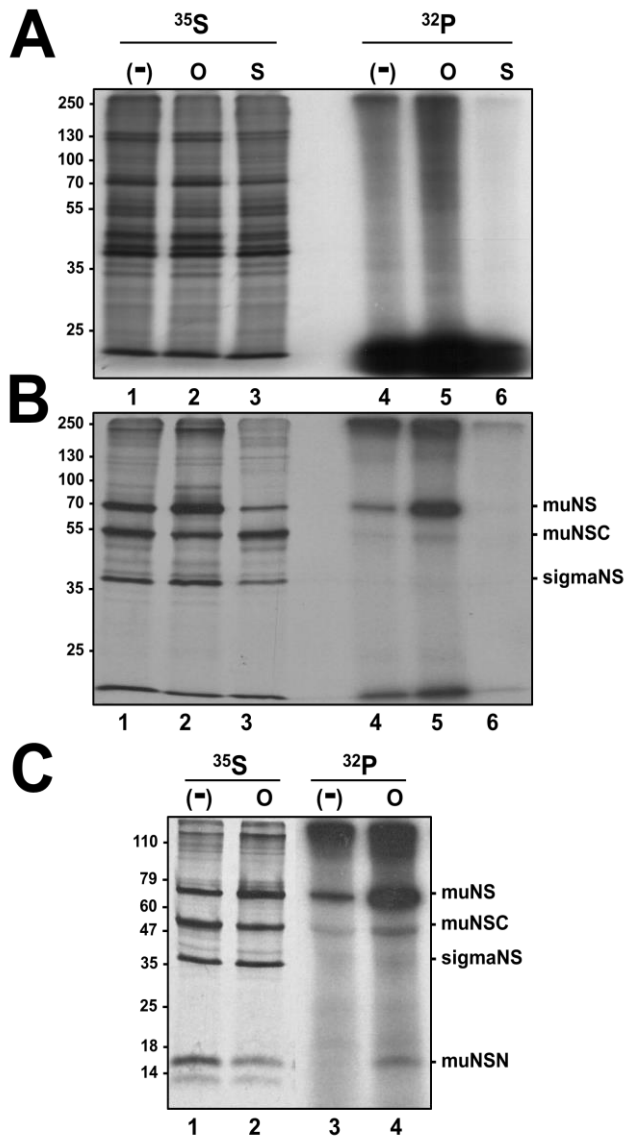
## 2.5.-Efecto de la fosforilación de la proteína muNS sobre su procesamiento.

Nuestros resultados habían demostrado que el procesamiento de la proteína muNS está catalizado por una caspasa efectora del tipo de la caspasa 3, la cual reconoce la secuencia  $^{151}\text{DSPDA}^{155}$  y corta a muNS entre el Asp-154 y la Ala-155. Nuestros resultados también sugieren que la Ser-152, localizada dentro de la secuencia de reconocimiento de la caspasa, se fosforila de forma reversible, por lo que el estado de

fosforilación de esa serina podría afectar al reconocimiento de la secuencia diana por parte de la caspasa y controlar así el procesamiento de la proteína muNS. Para intentar averiguar si existe una relación entre el grado de fosforilación de muNS y su procesamiento, células infectadas con ARV se marcaron radiactivamente con  $^{35}\text{S}$ -aminoácidos o con  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato desde las 12 a las 16 hpi. El marcaje se realizó en presencia o ausencia de 250 nM ácido okadaico o 500 nM estaurosporina. Las células se lisaron en tampón RIPA, una porción de los extractos se inmunoprecipitó con suero anti-muNS, mientras que el resto se analizó sin inmunoprecipitar, y las proteínas radiactivas se resolvieron por SDS-PAGE y se visualizaron por autorradiografía. Los resultados indican que los inhibidores ejercieron el efecto esperado sobre la fosforilación de las proteínas en general (Fig. 51 A, carriles 4-6) y sobre la de muNS en particular (Fig. 51 B, carriles 4-6). Sin embargo, la presencia de los inhibidores en el medio de cultivo no alteró significativamente la síntesis de proteínas celulares y virales en células infectadas (Fig. 51 A, carriles 1-3). Al examinar el efecto sobre el procesamiento de muNS, observamos que en presencia de ácido okadaico se produce una ligera reducción en el grado de conversión de muNS en muNSC (Fig. 51 B, comparar carriles 1 y 2). El efecto del ácido okadaico, aunque débil, es consistente, ya que lo hemos observado siempre que hemos incubado las células infectadas en presencia de este compuesto. Este resultado sugiere que al aumentar el grado de fosforilación de muNS disminuye su procesamiento. En presencia de ácido okadaico también se redujeron los niveles intracelulares de muNSN (Fig. 51 C, comparar carriles 1 y 2), lo que sugiere que aumentar el grado de fosforilación de muNS disminuye su procesamiento. Al examinar el efecto de la estaurosporina observamos que en presencia de este compuesto disminuyen mucho los niveles intracelulares de muNS y aumentan los de muNSC (Fig. 51 B, comparar carriles 1 y 3), como ya habíamos demostrado anteriormente la estaurosporina promueve el procesamiento de muNS (Figs. 32 y 33). Dado que en este estudio hemos demostrado que la estaurosporina es un inductor de apoptosis en células aviáres y un inhibidor de la quinasa que fosforila a muNS, no podemos saber si la capacidad de este compuesto para promover el procesamiento de muNS se debe exclusivamente a su actividad pro-apoptótica o si influye también su capacidad para inhibir la fosforilación de muNS.

En el autorradiograma que se muestra en la Fig. 51 C se pueden apreciar de nuevo que la proteína muNSN que se genera en células infectadas con ARV aparece como dos isoformas de diferente tamaño (carriles 1 y 2) como ya habíamos detectado anteriormente en análisis por Western blot (Figs. 18 y 20). El autorradiograma de la Fig. 51 C sugiere que sólo la isoforma de mayor tamaño está fosforilada (carril 5), lo que sugiere a su vez que la isoforma más pequeña de muNSN se origina por un corte proteolítico adicional que elimina un lugar importante de fosforilación presente en muNSN. Los resultados que habíamos mostrado en la Fig. 48 indicaban que la proteína muNSN se fosforila en las serinas de las posiciones 35 y 152. Teniendo en cuenta este dato y que la diferencia de tamaño entre las dos isoformas de muNSN es muy pequeña (máximo 2 kDa; unos 20 residuos aminoacídicos) este nuevo corte que origina la

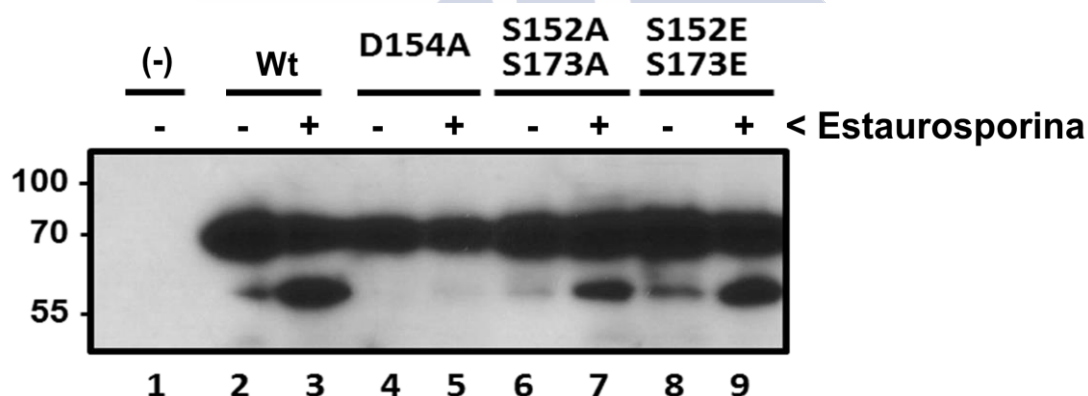
isoforma pequeña de muNSN debería producirse cerca del extremo C-terminal de muNSN, en la región que comprende los residuos 130-150 de muNSN.



**Figura 51: Efecto del grado de fosforilación de muNS sobre su procesamiento.** Células CEF infectadas con 10 pfu/célula se marcaron radiactivamente con <sup>35</sup>S-aminoácidos o con <sup>32</sup>P-ortofosfato desde las 12 hasta las 16 hpi. El marcaje se realizó en presencia o ausencia de 250 nM ácido okadaico (O) o de 500 nM estaurosporina (S). Las células se lisaron en tampón RIPA, los extractos del panel B se inmunoprecipitaron con suero anti-muNS y las proteínas radiactivas, inmunoprecipitadas (panel B) o sin inmunoprecipitar (panel A), se resolvieron por SDS-PAGE y se visualizaron por autorradiografía. **Panel C.** muestras inmunoprecipitadas de CEF infectas y marcadas en las mismas condiciones anteriores en presencia o ausencia de 250 nm de ácido okadaico se resolvieron en un gel tricina SDS-PAGE

En otro intento para examinar el efecto que la fosforilación de muNS ejerce sobre su procesamiento, decidimos examinar cómo afecta al procesamiento de esta proteína la mutación de aquellos residuos de serina que habíamos identificado como

residuos fosforilables, los de las posiciones 35, 152 y 173. Generamos plásmidos que expresasen versiones de muNS en que estas serinas estuviesen cambiadas por alaninas, ya que la alanina es un residuo no fosforilable. También generamos plásmidos que expresasen otra mutación de muNS, en este caso las serinas fueron sustituidas por glutamatos, ya que el glutamato debería mimetizar la forma fosforilada de la serina (Yu et al., 2005). Los plásmidos que expresan la proteína muNS sin mutar y los que expresan las proteínas muNS mutadas, así como el que expresa el mutante no procesable D154A, se transfectaron en células CEF y se analizó la capacidad del inductor de apoptosis estaurosporina para procesar a las proteínas expresadas. Desgraciadamente no fuimos capaces de expresar los plásmidos que tenían mutada la serina de la posición 35, por lo que nos centramos en los que expresaban muNS con mutaciones en las serinas 152 y 173. Los resultados que se muestran en la Fig. 52 indican que la estaurosporina funcionó bien en este experimento, ya que promovió el procesamiento de muNS (carril 3), pero no de su mutante D154A (carril 5). Los resultados también demostraron que las versiones de muNS que tenían mutadas los residuos de serina de las posiciones 152 y 173, tanto a alaninas, como a glutamatos, seguían procesándose normalmente cuando las células se incubaban con estaurosporina (carriles 7 y 9), lo que sugiere que la fosforilación de muNS en esas serinas no tiene efecto sobre su procesamiento. De todas formas habría que realizar experimentos adicionales para confirmar esta sugerencia.

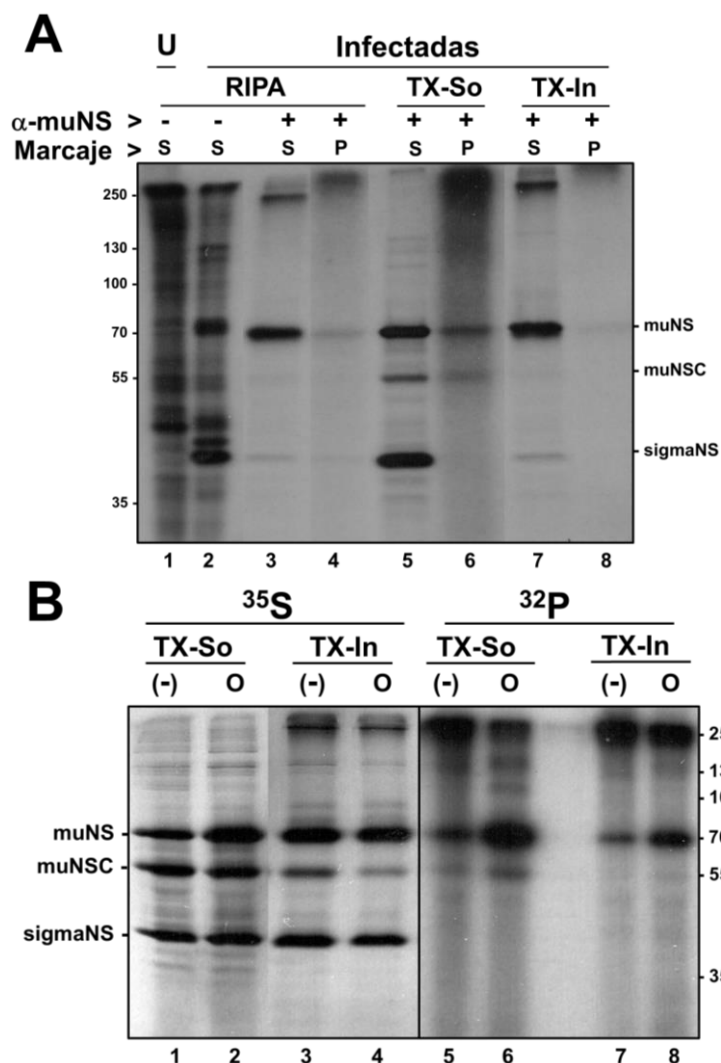


**Figura 52: Efecto de las mutaciones en las posiciones 152 y 173 sobre el procesamiento de muNS.** Células CEF se transfectaron con el plásmido pCINeo vacío (carril 1) o con los plásmidos recombinantes que expresan muNS (carriles 2 y 3) o los mutantes en que el residuo de ácido aspártico de la posición 154 se reemplazó por un residuo de alanina (carriles 4 y 5), en que los residuos de serina de las posiciones 152 y 173 se reemplazaron por alaninas (carriles 6 y 7), o en que esos mismos residuos se reemplazaron por glutamato (carriles 8 y 9). A las 18 h post-transfección las células de los carriles 3, 5, 7 y 9 se trataron durante 6 h con 0,5  $\mu$ M estaurosporina y a continuación todas las células se lisaron en RIPA y se analizaron mediante Western blot con suero anti-muNS.

## **2.6.-Efecto de la fosforilación sobre la capacidad de muNS para asociarse con las factorías virales.**

Para tratar de evaluar el efecto que la fosforilación puede ejercer sobre la capacidad de muNS para asociarse con las factorías virales, examinamos la capacidad del tampón TX para extraer a las formas de la proteína muNS que presentan diferente grado de fosforilación. Este tampón ya lo ya habíamos utilizado en el apartado 1.7 para comparar las afinidades de unión a las factorías virales de las proteínas muNS y muNSC. Los resultados que se muestran en la Fig. 52A revelaron que más del 50% de la proteína muNS sintetizada entre las 12 y las 16 hpi es resistente a la extracción con el tampón TX y que prácticamente el 100% de la proteína muNSC sintetizada en el mismo periodo se extrae con dicho tampón (Fig. 52 A, comparar carriles 5 y 7), lo que corrobora los resultados obtenidos anteriormente de que muNS se une a las factorías virales con mucha mayor fortaleza que muNSC (Fig. 41). Al examinar la capacidad del tampón TX para extraer a la proteína muNS fosforilada encontramos que el tampón TX es capaz de extraer un porcentaje muy elevado de la proteína muNS marcada con <sup>32</sup>P-ortofosfato (Fig. 52 A, comparar carriles 6 y 8), lo que sugiere que la fosforilación de muNS reduce su capacidad de asociación con las factorías virales o que la proteína muNS que se fosforila está más expuesta sobre la superficie de las factorías por lo que es más fácilmente extraíble con el tampón TX.

Para confirmar estos resultados realizamos un experimento similar, pero incluyendo muestras de células infectadas y tratadas con el inhibidor de fosfatasa ácido okadaico. Los resultados que se muestran en la Fig. 52 B indican que la proteína muNS que se sintetiza en células sin tratar tiene una ligera tendencia a acumularse en la fracción TX-insoluble (comparar carril 1 con carril 3, y carril 5 con carril 7), mientras que la proteína muNS que se sintetiza en células tratadas con ácido okadaico se acumula en mayor proporción en la fracción soluble (comparar carril 2 con carril 4 y carril 6 con carril 8). Además, la mayor parte de la proteína muNS fosforilada que se sintetiza tanto en presencia como en ausencia de ácido okadaico permanece asociada a la fracción soluble (Fig. 53 B, carriles 5 y 6 con carriles 7 y 8), lo que sugiere que la fosforilación reduce la capacidad de la proteína muNS para asociarse con las factorías virales.



**Figura 53. Efecto de la fosforilación sobre la capacidad de muNS para asociarse con las factorías virales.** **A)** Células CEF infectadas con 10 pfu/célula de ARV se marcaron radiativamente con <sup>35</sup>S-aminoácidos (S; carriles 1-3, 5 y 7) o con <sup>32</sup>P-ortofosfato (P; carriles 4, 6 y 8) desde las 12 hasta las 16 hpi. Las células se lisaron en tampón RIPA (carriles 1-4) o en tampón TX (carriles 5-8) y se incubaron 10 min en hielo. A las células lisadas en tampón TX se les retiró el sobrenadante (fracción TX-soluble; carriles 5 y 6) y la fracción que quedaba pegada a la placa se solubilizó con tampón RIPA (fracción TX-insoluble; carriles 7 y 8). Los extractos de los carriles 3-8 se inmunoprecipitaron con suero anti-muNS y las proteínas radiactivas se resolvieron por 10% SDS-PAGE y se visualizaron por autorradiografía. **B)** Se realizó un experimento similar al descrito para el panel A, pero durante el marcaje radiactivo la mitad de las células se incubaron en presencia de 200 nM ácido okadaico. En este caso todas las células se lisaron en tampón TX, los extractos se resolvieron entre fracción soluble e insoluble y se inmunoprecipitaron con suero anti-muNS.









## **DISCUSION**



Los virus utilizan una gran variedad de estrategias para conseguir maximizar la expresión de proteínas a partir de genomas con tamaños limitados. Las dos estrategias más utilizadas son iniciación de la traducción en codones alternativos y procesamiento proteolítico de productos primarios de traducción (Firth and Brierley, 2012; Richard and Tulasne, 2012). En este trabajo hemos demostrado que dos virus del género *Orthoreovirus*, MRV y ARV, utilizan diferentes estrategias para generar las isoformas de la proteína muNS. Así, mientras que la proteína muNSC de MRV se obtiene por iniciación de la traducción en el codón AUG-41 del mRNA m3, y es por tanto un producto primario de traducción, la proteína muNSC de ARV se genera mediante un corte proteolítico del producto primario de traducción. A pesar de que las dos proteínas muNSC se generan por dos mecanismos totalmente diferentes, a las dos proteínas les faltan secuencias del extremo amino de sus respectivas muNS precursoras. Este hecho, y las observaciones de que el codón ATG de iniciación de muNSC está presente en todos los genes M3 de MRV secuenciados, y que en este trabajo hemos demostrado que la muNS de tres aislados diferentes de ARV sufre corte proteolítico, sugiere que la proteína muNSC debe ser importante para la replicación de los reovirus. Sin embargo, diferentes estudios han demostrado que, aunque la proteína muNSC de MRV todavía mantiene la capacidad de muNS para formar inclusiones, no es capaz de promover el crecimiento de MRV en células que no expresan muNS (Arnold et al., 2008; Kobayashi et al., 2006, 2009). Este resultado sugiere que la capacidad que tiene muNS para formar inclusiones es una función importante, pero no suficiente como para que esta proteína pueda promover la replicación reoviral, lo que a su vez sugiere que actividades importantes para la replicación de los reovirus radican en aquella región aminoterminal de muNS que no está presente en muNSC. En este estudio y en trabajos previos, se ha demostrado que las regiones aminoterminal de las proteínas muNS de ARV y MRV que no están presentes en la proteínas muNSC son necesarias para el reclutamiento a las inclusiones de otras proteínas reovirales (Broering et al., 2005; Miller et al., 2010; Tourís-Otero, et al., 2004a). Así, se ha publicado que secuencias del extremo amino de la proteína muNS de MRV son necesarias para el reclutamiento de mu2 y sigmaNS (Broering et al., 2002; Miller et al., 2003, 2010), mientras que secuencias del extremo amino de la proteína muNS de ARV son necesarias para el reclutamiento a las inclusiones de algunas proteínas virales estructurales y no estructurales (Tourís-Otero et al., 2004a). Sin embargo existe una diferencia en la capacidad de reclutamiento de las proteínas muNSC de ambos virus. Así, mientras que la proteína muNSC de MRV mantiene la capacidad de su precursora para reclutar a la proteína lambda2, la proteína muNSC de ARV no es capaz de interaccionar con la proteína lambdaC, homóloga de lambda2. (Fig. 40). De lo expuesto anteriormente se deduce que la capacidad de muNS para llevar a otras proteínas virales a las inclusiones es imprescindible para la replicación reoviral. Por otra parte, se ha demostrado que el MRV mantiene su capacidad para replicar en células en cultivo cuando se bloquea la expresión de la proteína muNSC (Kobayashi et al., 2006), lo que sugiere que esta proteína no es estrictamente necesaria para la replicación reoviral. Sin embargo, muNSC pudiera ser importante para la replicación y/o diseminación del MRV en el interior de un organismo infectado, tal como se ha sugerido previamente (Danthi et al., 2008b). Una posibilidad es que el procesamiento de muNS favorezca la liberación y diseminación del virus hacia

células vecinas a la infectada, ya que en este estudio hemos demostrado que la activación de apoptosis en células infectadas con ARV promueve el procesamiento de muNS y la diseminación del virus. En este sentido, se ha publicado que la liberación de los astrovirus de células infectadas es dependiente del procesamiento de la proteína precursora de la cápside VP90 y de las actividades de las caspasas efectoras (Banos-Lara and Méndez, 2010). Sin embargo, el hecho de que la apoptosis también promueva la diseminación de las partículas de MRV, pero no el procesamiento de muNS (Marcato et al., 2007), pone en duda que el procesamiento de la proteína muNS de ARV pueda favorecer la liberación y diseminación del virus. Necesitaríamos disponer de un sistema de genética reversa para ARV, para poder generar un virus que contenga un gen M3 mutado que expresase una proteína no procesable, como la D154A, para poder examinar cómo afecta el procesamiento de muNS a la replicación reoviral y a las interacciones célula-virus.

Los resultados de diferentes laboratorios llevaron a la conclusión de que la proteína muNSC de MRV se genera por iniciación de la traducción en un codón AUG interno del mRNA m3, aunque no se había podido identificar si ese codón era el 41 o el 57. En este trabajo hemos podido demostrar que el codón de iniciación de muNSC es el 41 y no el 57. Los ribosomas podrían iniciar la traducción de este codón por dos mecanismos: i) unión directa del ribosoma al codón AUG-41, mediante un mecanismo independiente del cap; y ii) “leaky scanning” un mecanismo dependiente del cap, mediante el cual una fracción de los ribosomas que llegan desde el cap no reconocen al AUG más próximo al extremo 5' y se desplazan hacia el extremo 3' del mRNA para iniciar la traducción en un AUG interno situado más abajo (revisado en Firth and Brierley, 2012; Jackson, 2005; Sonenberg and Hinnebusch, 2009). El hecho de que la síntesis de muNSC se incrementa mucho cuando se muta el codón AUG que está más próximo al cap (Fig. 16) sugiere que muNSC se origina por un mecanismo de “leaky scanning” y no por unión directa del ribosoma al codón AUG-41. Este mismo mecanismo se había propuesto para la traducción de otros mensajeros reovirales que expresan más de una proteína, como es el caso del mRNA s1 de los virus MRV, ARV, Nelson Bay y Aquareovirus, o el mensajero s4 de los reovirus Muscovy Duck y BRV (babuino) (Bodelón et al., 2001; Kuntz-Simon et al., 2002; Shmulevitz et al., 2002). En todos estos casos la iniciación de la traducción de una segunda proteína en un codón AUG interno se justificó porque el AUG más próximo al cap posee un contexto de iniciación débil, de acuerdo con la regla de Kozak, ya que posee nucleótidos pirimidínicos en las posiciones -3 y +4 (Kozak, 1991; Kozak, 2002). Ello permitiría que una fracción de los ribosomas no se paren en ese AUG y continúen desplazándose para iniciar la traducción en otro codón AUG situado más abajo, con lo que ese mensajero programaría la síntesis de dos proteínas. Sin embargo, esta no debería ser la causa de que el mRNA m3 de MRV exprese dos proteínas, ya que el codón AUG más próximo al cap de este mRNA posee un contexto de iniciación fuerte (Fig. 12), ya que tiene nucleótidos de guanina en las posiciones -3 y +4, por lo que todos los ribosomas que llegan desde el cap deberían detenerse e iniciar la traducción en ese codón, impidiendo así el “leaky scanning”, con lo que este mRNA sólo debería expresar muNS. Sin embargo, se han descrito algunos casos de “leaky scanning” en mRNAs cuyo codón

AUG más próximo al cap posee un contexto fuerte. Esto suele ocurrir cuando la región 5' UTR es demasiado corta, lo que impide que el AUG más próximo al cap sea reconocido eficientemente por la subunidad ribosomal pequeña que se desliza desde el cap (Felgenhauer et al., 1990; Kozak, 1991; Ruan and Straney, 1994; Spiropoulou and Nichol, 1993). Dos datos experimentales sugieren que la bifuncionalidad del mRNA m3 de MRV se debe al corto tamaño de su región 5' UTR (19 nucleótidos): i) la síntesis de muNSC por iniciación de la traducción en el codón AUG-41 interno de este mRNA se reduce mucho cuando al mRNA m3 se le añaden 18 nucleótidos a su región 5' UTR (carril 1 de la Fig. 15); y ii) el mRNA m3 de ARV sólo expresa la proteína muNS y eso probablemente se deba a que tiene una región 5' UTR 6 nucleótidos más larga que la de su homólogo de MRV (Fig. 12).

A lo largo de este trabajo hemos demostrado que la proteína muNSC de ARV se origina por un único corte proteolítico de muNS cerca de su extremo amino, el cual también produce el péptido complementario de 17 kDa muNSN. De esta manera, el gen M3 de ARV expresa tres isoformas proteicas (muNS, muNSN y muNSC), mientras que el gen M3 de MRV expresa sólo dos (muNS y muNSC). Estudios anteriores habían identificado otras proteínas de ARV que también se generan por procesamiento proteolítico. Así, los productos primarios de traducción que expresan los genes M2 y S2 de ARV (muB y sigmaA) sufren cortes proteolíticos cerca de sus extremos amino para generar los péptidos amino-terminales muBN y sigmaAN y las proteínas carboxi-terminales muBC y sigmaAC (Ji et al., 2010; Varela and Martínez-Costas, 1996). Teniendo en cuenta que en este estudio se identificó por primera vez la presencia de la proteína muNSN en células infectadas con ARV, nuestros resultados permiten ampliar el repertorio proteico que expresa el genoma de ARV hasta alcanzar las 18 proteínas, de las cuales 12 son productos primarios de traducción, mientras que las otras 6 son productos de procesamiento proteolítico (Tabla 3).

**Tabla 3: Capacidad Codificadora del ARV**

Gen	Productos de traducción primario		Productos proteolíticos	
	Estructural	No estructural	Estructural	No estructural
L1	lambdaA			
L2	lambdaB			
L3	lambdaC			
M1	muA			
M2	muB		muBC, muBN	
M3		muNS		μNSN, μNSN
S1	sigmaC	p10,p17		
S2	sigmaA		sigmaAN, sigmaAC	
S3	sigmaB			
S4		sigmaNS		

Los resultados de este estudio pusieron de manifiesto que el procesamiento de la proteína muNS de ARV está promovido por la infección reoviral, ya que tiene lugar con mucha más eficiencia en células infectadas con ARV que en células donde la proteína muNS se expresa en ausencia de infección reoviral, como es el caso de células transfectadas o de células de insecto infectadas con baculovirus. Esta conclusión sugiere que la proteasa que cataliza el procesamiento de muNS puede ser una proteína viral o una proteasa celular que se activa durante la infección reoviral. El hecho de que el procesamiento de muNS sea mucho menos eficiente cuando ARV infecta a células DF1 que cuando infecta a células CEF nos puso sobre la pista de que la infección con ARV podría promover el procesamiento de muNS a través de la activación de caspasas, ya que las células DF1 tienen menos actividad caspasa que las células CEF (Kong et al., 2011). La implicación de caspasas en el procesamiento de muNS explicaría también el por qué muNS no se procesa cuando es expresada por un baculovirus recombinante en células de insecto, ya que se sabe que los baculovirus expresan factores anti-apoptóticos que previenen la activación de caspasas (Clem et al., 1991; Clem, 2007).

Los resultados de este estudio demostraron que el procesamiento de la proteína muNS de ARV está catalizado por una caspasa efectora. Así, el procesamiento de esta proteína en células infectadas con ARV se bloquea cuando la infección se realiza en presencia de inhibidores de caspasas, mientras que compuestos pro-apoptóticos, como la estaurosporina o la actinomicina D, promueven el procesamiento de muNS en células DF1 infectadas con ARV y en células transfectadas. La comparación de las movilidades electroforéticas de la proteína muNSC de ARV y de versiones de muNS truncadas en su extremo amino sugería que el procesamiento de muNS debería ocurrir cerca del residuo 140 y hacia el lado carboxílico de este residuo. Un análisis de la región comprendida entre los residuos 140 y 177 de muNS nos permitió identificar una secuencia ( $^{151}\text{DSPD}\downarrow\text{A}^{155}$ ) que podría actuar como secuencia consenso de reconocimiento y corte para las caspasas 3 y 7. Experimentos de mutagénesis puntual dirigida nos permitieron identificar que el corte de muNS realmente se produce entre el Asp-154 y la Ala-155, lo que sugiere que esta secuencia consenso está situada en una región flexible y expuesta de la proteína a la que pueden acceder las caspasas.

<b>REOVIRUS</b>	<b>Aislado</b>	<b>Secuencia aminoacídica de la región muNS 140-179</b>	<b>#Nº Accese</b>	
<b>AVIAR</b>	S1133-avian	140 MVGTLEAVSTAD <b>SPD</b> ACAPVTSKILAKQQTIAKSPGRLDE 179	AAT85608.1	
	1733-avian	140 MVGTLEAVSTAD <b>SPD</b> ACVPVTSKILAKQQTIAKSPGRLDE 179	AAQ81873.1	
	T-98-avian	140 MVGTLEAVSTAD <b>SPD</b> ACVPVTSKILAKQQTIAKSPGRLDE 179	ACC77964.1	
	2408-avian	140 MVGTLEAVSTAD <b>SPD</b> ACVPVTSKILAKQQTIAKSPGRLDE 179	AAS78990.1	
	916-SI-avian	140 MVGTLEAVSTAD <b>SPD</b> ACVPVTSKILAKQQTIAKSPGRLDE 179	AAS78995.1	
	C-98-avian	140 MVGTLEAVSTAD <b>SPD</b> ACVLVTSKILAKQQTIAKSPGRLDE 179	ACC77965.1	
	176-avian	140 MVGTLEAVSTAD <b>SPD</b> ACVPVTSKILAKQQTIAKSPGRLDE 179	AAT52027.1	
	T-6-avian	140 MVGTLEAVSTAD <b>SPD</b> ACVPVTSKILAKQQTIAKSPGRLDE 179	AAS78998.1	
	138-avian	140 MVGALEAVSTV <b>HSPD</b> ACVPDTAKILAKQQTIAKSPGRLDE 179	AAT52026.1	
	OS-161-avian	140 MVGTLEAVSTA <b>HSPD</b> VCVPVTSKIVAKQQTIAKSPGRLDE 179	AAS78996.1	
	750505-avian	140 MVGTLEAVSTA <b>HSPD</b> ACVPVPSKIIAKQQTIAKSPGRLDE 179	AAS78992.1	
	601-G-avian	140 MVGTLEAVSTA <b>HSPD</b> ACVPVPSKIIAKQQTIAKSPGRLDE 179	AAS78993.1	
	AVS-B-avian	140 MVGTLEAVSTA <b>HSPD</b> ACVPVTSKVVTKQQTIAKSPGRLDE 179	YP_0042265	
	AVS-B-2-avian	140 MVGTLEAVSTA <b>HEPD</b> ACVPVTSKVVTKQQTIAKSPGRLDE 179	CBX25028.1	
	918-avian	140 <b>MAGTLDA</b> VS <b>AVHEPD</b> ACVPVTSKIIAKQQTASKSPGRLDE 179	CBX25028.1	
	1017-1-avian	140 <b>MAGTLDA</b> VS <b>AVHEPD</b> ACVPVTSKIIAKQQTASKSPGRLDE 179	AAS78988.1	
	919-avian	140 <b>MAGTLDA</b> VS <b>AVHEPD</b> ACVPVTSKIIAKQQTASKSPGRLDE 179	AAS78997.1	
	091-avian	140 <b>MAGTMDA</b> VSTGHPPG <b>ASVPDV</b> SKVVAQQTISKSPGRLDE 179	AFV52262.1	
	<b>MUSCOVY DUCK</b>	J18-muscovyDuck	140 <b>MAGTMDA</b> VSTGHPPG <b>ASVPDV</b> SKVVAQQTISKSPGRLDE 179	AFV52274.1
		TH11-muscovyDuck	140 <b>MAGTMDA</b> VSTGHPPG <b>ASVPDV</b> SKVVAQQTISKSPGRLDV 179	AFU11110.1
89330-muscovyDuck		140 <b>MAGTMDA</b> VSTGHPPG <b>ASVPDV</b> SKVVAQQTISKSPGRLDE 179	CAC82380.1	
<b>GANSO</b>	03G-geese	140 <b>MAGTMDA</b> VSTGHPPG <b>ASVPDV</b> SKVVAQQTISKSPGRLDE 179	AFQ62083.1	

**Tabla 4. Alineamiento de secuencias aminoacídicas del fragmento 140-179 de las proteínas muNS de diferentes aislados del grupo específico aviar.** Secuencias obtenidas de la base de datos NCBI, se indican los números de acceso. Destacados en color rojo la secuencia de corte identificada en ARV S1133, en azul los cambios sobre la misma en aislados aviáres y en rosa las secuencias putativas de los aislados de patos criollos y ganso

Sorprendentemente, la secuencia de corte para caspasas 3/7 identificada en la proteína muNS del ARV S1133 no está totalmente conservada en todas las proteínas muNS de ARVs aislados de pollos, ya que sólo se encuentra en la mitad de los 17 ARVs examinados. Así, en la proteína muNS de cuatro aislados diferentes de ARVs el Asp-151 está reemplazado por un residuo de His, en otro también cambia la Ala-155 por una Val, un cambio de poca importancia para el reconocimiento de las caspasas, mientras que en la secuencia de otros 4 ARVs además del Asp por His, la Ser-152 está reemplazada por un residuo de glutamato (Tabla 4). Si el corte de muNS en estas proteínas también tuviese lugar entre los residuos 154 y 155, significaría que la accesibilidad es más importante que la presencia de aminoácidos específicos en las posiciones 151 y 152, lo que estaría de acuerdo con lo que se ha publicado por diferentes autores (Thornberry et al., 1997; Timmer and Salvesen, 2007). En estos estudios se analizó la influencia de los diferentes residuos en la secuencia consenso de corte para las diferentes caspasas, denominando P<sub>5</sub>P<sub>4</sub>P<sub>3</sub>P<sub>2</sub>P<sub>1</sub>↓P<sub>1</sub>' a las posiciones que normalmente son reconocidas por el centro activo de la enzima, produciéndose el corte entre las posiciones P<sub>1</sub> (ocupada generalmente por un aspartato) y P<sub>1</sub>' (Tabla 5). Como se observa en la Tabla 5, los residuos que ocupan las posiciones P<sub>1</sub>', P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, y P<sub>3</sub> ejercen muy poca influencia sobre la selectividad del tipo de caspasa que lleva a cabo el corte, dicha selectividad viene marcada fundamentalmente por el residuo que ocupa la posición P<sub>4</sub> que en el caso de las caspasas 3 y 7 tienen preferencia por un residuo de aspartato en esa posición. Un aspartato es el que ocupa la posición P<sub>4</sub> en la secuencia

consenso de la proteína muNS del ARV S1133 y de otras 7 cepas, mientras que en otras 9 cepas el aspartato está sustituido por un residuo de histidina (Tabla 4) Curiosamente, la proteína BCL-X<sub>L</sub> humana posee un residuo de histidina en la posición P<sub>4</sub> (HLAD↓S) y se ha demostrado que el procesamiento de esa proteína está catalizado por la caspasa 3 (Chae et al., 2000).

**Tabla 5. Secuencias consenso de la región de corte por diferentes caspasas**

Caspasa	P <sub>5</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>1</sub> '
1,4,5,14		W/Y	E	X	D	Φ
8,9,10		I/L	E	X	D	Φ
3,7	-	D	E	X	D	Φ
6		V	E	X	D	Φ
2	V/L	D	E	X	D	Φ

Las letras indican los aminoácidos preferidos, X puede ser cualquier aminoácido, mientras que Φ representa residuos no cargados (Timmer and Salvesen, 2007).

Curiosamente, las proteínas muNS que expresan los reovirus que infectan anátidas (pato criollo o *Cairina Maschata* y ganso) no poseen la secuencia consenso para las caspasa 3 y 7 entre los residuos 151 y 155, ya que el Asp-154 está sustituido por un residuo de glicina (Tabla 4). Sin embargo, esas proteínas muNS poseen dos posibles secuencias sustrato de caspasas, una que comprende los residuos 142-146 (<sup>142</sup>GTMDA<sup>146</sup>) y la otra que comprende los residuos 156-160 (<sup>156</sup>SVPDV<sup>160</sup>). Llama la atención que la primera secuencia también se encuentra, con una variación en la posición 144, Met por Leu, presente en la muNS de cuatro ARVs de pollo (Tabla 4). Sería interesante comprobar si los reovirus de pato y ganso inducen apoptosis, si sus proteínas muNS también se procesan por caspasas y si el procesamiento tiene lugar en alguna de las dos posibles secuencias consenso que hemos identificado. El análisis de las secuencias aminoacídicas que se exponen en la Tabla 4 también sugiere que la secuenciación de la región del gen M3 que codifica los residuos aminoacídicos 140-160 de la proteína muNS podría utilizarse para identificar si un reovirus de ave infecta a pollos/codornices o infecta a patos/gansos. Así, la proteína muNS de los reovirus que infectan a pollos y codornices tiene leucina en la posición 144, alanina o valina en la 150, aspartato en la 154 y cisteína en la 156, mientras que las de los reovirus que infectan a patos y gansos poseen metionina, glicina, glicina y serina en esas posiciones.

Los resultados que se muestran en la Fig. 39 demuestran que la proteína muNS de ARV es sustrato de la caspasa 3 de mamífero. Sin embargo, la ausencia tanto de líneas celulares de ave deficientes en caspasa 3 como de una caspasa 3 aviar purificada no nos ha permitido identificar la caspasa de pollo que cataliza el corte de muNS en células infectadas con ARV. Sin embargo, es muy probable que la proteasa que corta a muNS sea una caspasa del tipo 3, ya que tanto los genes de la caspasa 3 como las secuencias consenso de reconocimiento y corte de esta caspasa están muy conservadas en diferentes especies (Johnson and Bridgham, 2000; Sakamaki and Satou, 2009).

Además, nuestros resultados han demostrado que hay actividad de caspasas 3/7 en células aviares infectadas con ARV y que el procesamiento de muNS está promovido por la estaurosporina, un activador de la caspasa 3 (Chae et al., 2000).

En la bibliografía se encuentran varios ejemplos de proteínas virales no estructurales que son procesadas por caspasas, como la proteína NS1 del parvovirus “Aleutian mink disease”, la proteína NS5A del virus de la hepatitis C, la proteína NS1’ del virus de la encefalitis japonesa, y la proteína E1A del adenovirus 12 (Best et al., 2003; Grand et al., 2002; Satoh et al., 2000; Sun et al., 2012). Nuestros resultados también revelaron que una gran parte de la proteína muNS precursora (70%) permanece sin procesar, tanto en células infectadas como después de 6 h de incubación con la caspasa 3 recombinante humana, sugiriendo que el corte por caspasa de muNS es un proceso regulado, tal como se había propuesto para el procesamiento por caspasas de otras proteínas virales (Best et al., 2003; Chaudhry et al., 2011; Mashima et al., 1999; Sun et al., 2012; Wang et al., 2012). El procesamiento parcial de una proteína viral pudiera representar una forma de reducir la actividad de la proteína precursora, o pudiera ser una forma de incrementar el repertorio proteico que expresa el genoma de un virus, mediante la generación de productos de procesamiento con nuevas propiedades y/o actividades. También pudiera ocurrir que la caspasa que procesa a muNS sólo pueda actuar sobre las moléculas de proteína que están expuestas al exterior de las factorías virales, con lo que las moléculas de muNS que están orientadas hacia el interior de las inclusiones quedarían protegidas frente a la acción de las caspasas.

La activación de la apoptosis es uno de los primeros mecanismos de defensa que dispara el organismo huésped frente a la infección por un virus, para tratar de frenar la amplificación y diseminación de partículas virales. La activación de la apoptosis a tiempos tempranos de infección debería reducir el tiempo que tiene el virus para replicarse en la célula y limitar la maquinaria celular necesaria para la replicación viral. Por lo tanto, no es de extrañar que muchos virus traten de retardar o bloquear la activación de apoptosis mediante el uso de diferentes estrategias o la expresión de factores anti-apoptóticos (Galluzzi et al., 2010). Sin embargo, otros virus promueven la activación del programa apoptótico a tiempos tardíos de infección para facilitar así la salida y diseminación del virus sin inducir respuestas inflamatorias e inmunes significativas del organismo huésped (Teodoro and Branton, 1997). Los resultados de este estudio y los de un trabajo previo de nuestro laboratorio (Labrada et al., 2002) demuestran que la infección de células en cultivo con ARV induce la activación de la apoptosis a tiempos tempranos de infección, pero curiosamente, esa activación no tiene efectos negativos ni sobre la expresión de los genes virales ni sobre la producción de partículas virales infecciosas. Estos resultados, aparentemente contradictorios, se podrían reconciliar si tenemos en cuenta que el ARV tiene un ciclo replicativo muy corto, lo que permitiría que el virus realizase su ciclo infectivo y generase una producción viral satisfactoria antes de que la célula infectada muriese o estuviera seriamente dañada por la ejecución de la apoptosis.

La lista de virus que se sirven de la apoptosis para promover su propia replicación está en continuo aumento. Así, se ha publicado que virus tan diversos, como MRV, virus de la peste porcina africana, astrovirus humano, el virus de las paperas, circovirus porcino 2, herpesvirus bovino 1, coronavirus, virus de la gripe, y la cepa Moscú del virus Ectromelia, son capaces de usurpar la apoptosis para facilitar la liberación de partículas virales de las células infectadas (Best, 2008; Galluzzi et al., 2010). Los resultados de este estudio sugieren que el ARV debería de incluirse en esa lista, ya que este virus induce la activación de apoptosis y esa activación promueve la salida y diseminación de las partículas reovirales. Por otra parte, se ha demostrado que algunos virus que inducen apoptosis expresan proteínas que son procesadas por caspasas para generar productos con nuevas propiedades, que van, desde la inhibición de apoptosis hasta la potenciación o inhibición de la replicación viral (Richard and Tulasne, 2012). Sin embargo, sigue sin conocerse la relevancia funcional que tiene el procesamiento por caspasas de muchas proteínas virales, aunque el grado de conservación del lugar de reconocimiento y la estabilidad de los productos procesados sugiere que el corte por caspasas de polipéptidos virales puede constituir una ventaja evolutiva que favorezca la replicación viral.

La fosforilación reversible de proteínas es un sistema que utilizan los organismos eucariotas para el control de prácticamente todos los procesos celulares. Mediante este sistema se pueden regular las propiedades, actividades, estabilidad, localización subcelular o interacción con factores de diferentes proteínas. Es un sistema de control muy rápido y efectivo, ya que la proteína se encuentra presente en el interior de la célula y el cambio de sus propiedades/actividades se consigue por medio de una reacción enzimática que añade/retira grupos fosfatos a la proteína. Este sistema permite además controlar el nivel de actividad de la proteína, ya que su grado de fosforilación va a estar regulado por un balance entre las actividades de proteína quinasas y fosfoproteína fosfatasas (Hubbard et al., 1993). Las proteínas quinasas catalizan la transferencia del grupo fosfato gamma del ATP a residuos hidroxílicos de cadenas laterales de residuos aminoacídicos. Suelen ser más abundantes y específicas que las fosfatasas y se han dividido en dos grupos; las quinasas que fosforilan restos de serina/treonina, y las que fosforilan residuos de tirosina (Hunter 1987).

En nuestro laboratorio habíamos demostrado previamente que ninguna de las proteínas estructurales del ARV se fosforila durante la infección (Varela et al., 1996), una situación diferente a la de los MRVs, donde se había encontrado que la proteína de la cubierta externa mu1C es una fosfoproteína (Krystal et al., 1975). En este estudio hemos analizado la fosforilación de las proteínas no estructurales de ARV y encontramos que mientras que no se produce fosforilación de la proteína sigmaNS en células infectadas, la proteína muNS sí se fosforila. Mediante análisis por electroforesis dimensional y marcaje isotópico en células infectadas hemos demostrado que la proteína no estructural muNS de ARV es una fosfoproteína, que se fosforila fundamentalmente en residuos de serina, aunque hemos detectado también un grado pequeño de fosforilación en residuos de treonina. Por lo tanto la proteína quinasa que

cataliza la fosforilación de muNS debe encuadrarse dentro de la categoría de serina/treonina proteína quinasa. El hecho de que muNS también se fosforile cuando se expresa en células transfectadas o en células de insecto infectadas con un baculovirus recombinante sugiere que la quinasa que fosforila a muNS es de origen celular y no una proteína viral, aunque no se puede descartar la posibilidad de que muNS se autofosforile a sí misma. También podría darse el caso de que la proteína muNS active a una quinasa celular para su propia fosforilación, tal como se ha publicado para la proteína NSP5 de rotavirus, una proteína implicada, junto con NSP2, en la formación de las factorías virales (Eichwald et al., 2002). La fosforilación de muNS tiene lugar en varias posiciones de la proteína como lo demuestra la presencia de varias isoformas de diferente punto isoeléctrico en el análisis por electroforesis bidimensional, y también porque hemos detectado lugares de fosforilación tanto en muNSN como en muNSC. El marcaje metabólico de versiones de muNS truncadas en el extremo amino reveló que la fosforilación de esta proteína ocurre fundamentalmente en residuos de serina que se encuentran localizados en el extremo amino de la proteína, antes del residuo 270. Por otra parte, la secuenciación por espectrometría de masas de los fosfopéptidos trípticos permitió identificar fosforilaciones en los residuos de serinas de las posiciones 35, 152 y 173. Sin embargo, el grado de fosforilación de muNS debe de ser relativamente bajo, dado que hay que añadir cantidades elevadas de  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato al medio de cultivo para conseguir visualizar la proteína radiactiva, y dado que la movilidad electroforética de la proteína que se sintetiza en presencia del inhibidor de fosfatasa ácido okadaico es similar a la de la proteína que se sintetiza en presencia del inhibidor de quinasas estaurosporina y similar a la de la proteína que se sintetiza por traducción del mRNA m3 de ARV en extractos de reticulocitos de conejo (resultados no mostrados). Esta situación es diferente a la publicada para la proteína NSP5 de rotavirus, ya que NSP5 está presente en células infectadas en diferentes estados de fosforilación que generan isoformas de la proteína con pesos moleculares aparentes entre 26 y 35 kDa (Eichwald et al., 2002; Poncet et al., 1997).

El uso de inhibidores de quinasas y fosfatasa nos ha permitido demostrar que muNS se fosforila de manera reversible, lo que sugiere que esta modificación post-traduccional podría ser utilizada como un mecanismo para controlar la actividad y/o propiedades de esta proteína. Nuestros resultados habían demostrado que una caspasa efectora que se activa durante la infección con ARV cataliza el corte de muNS entre los residuos Asp-154 y Ala-155, los cuales se encuentran dentro de la secuencia consenso de reconocimiento para caspasas  $^{151}\text{DSPDA}^{155}$ . Curiosamente, uno de los residuos de muNS que hemos identificado como fosforilable es Ser-152, el cual también se encuentra dentro de esa secuencia consenso, por lo que existía la posibilidad de que el estado de fosforilación de ese residuo controlase el procesamiento de muNS. Para tratar de dilucidar el efecto que la fosforilación ejerce sobre el procesamiento de muNS, en primer lugar analizamos el efecto del ácido okadaico y la estaurosporina. Observamos una ligera reducción en el grado de procesamiento de muNS cuando se incubaron las células infectadas en presencia del inhibidor de fosfatasa, lo que sugiere que el procesamiento de la proteína disminuye al aumentar su grado de fosforilación. También

observamos que el procesamiento se incrementa cuando las células se incubaron en presencia de estaurosporina, pero dado que la estaurosporina también induce apoptosis, no podemos saber si el efecto de este compuesto sobre el procesamiento se debe a su actividad pro-apoptótica o a su capacidad para inhibir la fosforilación de muNS. Para confirmar si la fosforilación tiene efecto sobre el procesamiento de muNS mutamos las serinas fosforilables de las posiciones 152 y 173 a alaninas, para bloquear su fosforilación, o a glutamatos, para mimetizar la fosforilación. El hecho de que los dos mutantes se procesen de forma similar a como lo hace la proteína nativa cuando las células transfectadas se incubaron en presencia de estaurosporina sugiere que la fosforilación de esos residuos no tiene efecto sobre el procesamiento de muNS. De nuestros resultados se deduce que no está claro si la fosforilación de muNS tiene efecto sobre su procesamiento, y habría que hacer estudios adicionales para averiguarlo.

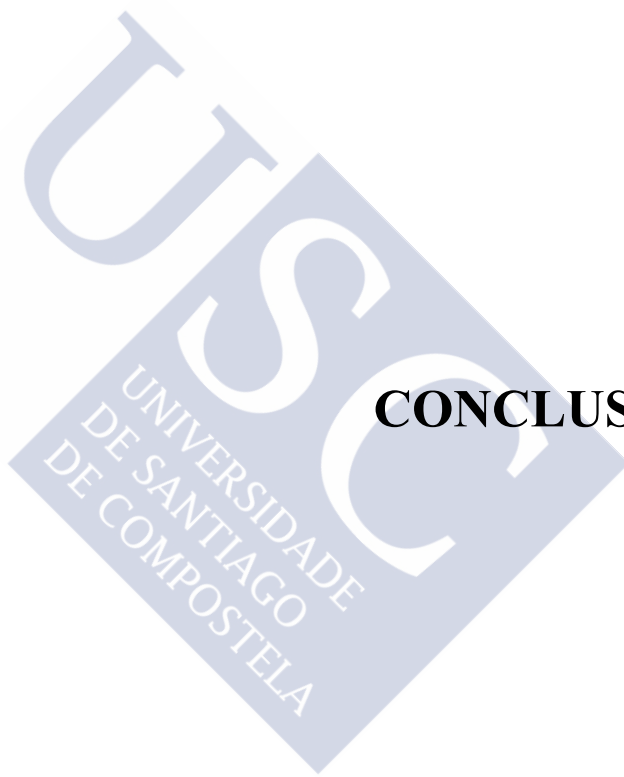
A pesar de que la proteína muNSC de ARV es capaz de formar inclusiones por sí sola y también cuando se co-expresa con muNS (Brandariz-Nuñez et al., 2010c), los experimentos de extracción con el tampón TX indicaron que esta proteína se asocia a las factorías virales más débilmente que las proteínas muNS, sigmaNS y lambdaA, a pesar de las dos últimas no son capaces de formar inclusiones por sí mismas. Estos resultados ponen de manifiesto que las factorías virales son estructuras muy complejas formadas por una complicada red de interacciones proteína-proteína y proteína-RNA, y que esas estructuras son mucho más complejas que las inclusiones que forman las proteínas muNS. Esto podría explicarse si se tiene en cuenta que la proteína muNS está formando las factorías virales y que sólo las moléculas de muNS que están expuestas hacia el exterior de estas factorías estarían expuestas a la acción de la caspasa que cataliza el corte de muNS, con lo que la proteína muNSC que se genera durante el procesamiento proteolítico estaría en la superficie de la factoría i sería fácilmente extraíble por el tampón TX. Esto explicaría también dos de los resultados obtenidos en este estudio: i) que la caspasa efectora sólo es capaz de procesar un porcentaje bajo (~ 30%) de la proteína muNS, ya que solo procesaría a las moléculas de muNS que están expuestas hacia el exterior de la factoría; y ii) el tampón TX extrae un porcentaje mucho mayor de la proteína muNS fosforilada que de la sin fosforilar, ya que sólo las moléculas de muNS que están orientadas hacia el exterior serían accesibles a la quinasa que fosforila a muNS. Sería interesante averiguar si la proteína muNS de MRV se fosforila y, en caso positivo, dilucidar si su fosforilación ejerce algún efecto sobre la capacidad de la proteína para asociarse con las inclusiones.

El hecho de que la mayoría de los residuos fosforilables de muNS están concentrados en su extremo amino sugiere que la fosforilación no debe afectar a la capacidad de la proteína para formar inclusiones, ya que dicha capacidad se sigue manteniendo cuando a muNS se le retiran sus primeros 447 residuos (Brandariz-Nuñez et al., 2010c). Sin embargo, el nivel de fosforilación de muNS podría afectar a la capacidad de la proteína para asociarse con las factorías virales de células infectadas con ARV. Así, en el caso de rotavirus se ha encontrado que el grado de fosforilación de las proteínas NSP5 y NSP2 se correlaciona con su capacidad para asociarse con las

factorías virales: i) la fosforilación de NSP5 favorece su incorporación a las factorías virales de células infectadas con rotavirus (Poncet et al., 1997); y ii) se han encontrado dos formas de NSP2 en células infectadas, una forma hipofosforilada que está dispersa por el citoplasma y que interacciona con la forma hipofosforilada de NSP5 para iniciar la formación de las factorías virales, y una forma hiperfosforilada de NSP2 que participa, junto con la forma hiperfosforilada de NSP5, en la maduración de las factorías virales (Criglar et al., 2014). También se ha encontrado que la proteína NS2 del virus de la lengua azul es una fosfoproteína, y que la fosforilación de esta proteína es fundamental para su capacidad de formar inclusiones, pero no para su capacidad de unir RNA o para interaccionar con la polimerasa viral VP1 (Modrof et al., 2005).







## **CONCLUSIONES**



De los resultados obtenidos a lo largo del presente trabajo hemos obtenido las siguientes conclusiones:

1.- El gen M3 de MRV expresa dos isoformas proteicas, muNS y muNSC, los cuales son productos primarios de traducción; la proteína muNS inicia su traducción en el AUG más próximo al extremo 5', mientras que muNSC la inicia en el codón AUG-41 que está en fase con el de iniciación de muNS.

2.- El gen M3 de ARV expresa un único producto primario de traducción, la proteína muNS, la cual durante la infección sufre un corte proteolítico parcial entre los residuos 154 y 155 para generar dos nuevas isoformas proteicas de 17 y 55 kDa, denominadas muNSN y muNSC, respectivamente.

3.- El procesamiento de ARV-muNS está catalizado por una caspasa de tipo 3 que se activa por el desencadenamiento de la apoptosis que induce la infección viral.

3.- La proteína muNSC de ARV ha perdido la capacidad de muNS para interactuar y atraer a las inclusiones a lambdaA, lambdaC y sigmaNS.

4.- La activación de las caspasas que induce la infección con ARV facilita la salida del virus de la célula y su diseminación a células vecinas.

5.- La proteína muNS de ARV se fosforila de forma reversible en diferentes residuos que se concentran fundamentalmente en su extremo amino (región 1-270).

6.- La fosforilación tiene lugar en residuos de serina fundamentalmente, aunque también hemos detectado una ligera fosforilación en treoninas.

7.- Hemos identificado fosforilación en los residuos de serina que ocupan las posiciones 35, 152 y 173.





## **BIBLIOGRAFÍA**



**Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-33402.

**Arima, Y., Nitta, M., Kuninaka, S., Zhang, D., Fujiwara, T., Taya, Y., Nakao, M., and Saya, H.** (2005). Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280, 19166-19176.

**Arnold, M. M., Murray, K. E., and Nibert, M. L.** (2008). Formation of the factory matrix is an important, though not a sufficient function of nonstructural protein mu NS during reovirus infection. *Virology*, 375, 412-423.

**Banos-Lara, M. R., and Méndez, E.** (2010). Role of individual caspases induced by astrovirus on the processing of its structural protein and its release from the cell through a non-lytic mechanism. *Virology* 401, 322-332.

**Barton, E. S., Forrest, J. C., Connolly, J. L., Chappell, J. D., Liu, Y., Schnell, F. J., Nusrat, A., Parkos, C. A., and Dermody, T. S.** (2001). Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell* 104, 441-451.

**Benavente, J., and Martínez-Costas, J.** (2007). Avian reovirus: structure and biology. *Virus Res.* 123, 105-119.

**Benavente, J., and Martínez-Costas, J.** (2006). Early steps in avian reovirus morphogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 309, 67-85.

**Bergink, S., Salomons, F. A., Hoogstraten, D., Groothuis, T. A. M., de Waard, H., Wu, J., Yuan, L., Citterio, E., Houtsmuller, A. B., Neefjes, J., Hoeijmakers, J. H. J., Vermeulen, W., and Dantuma, N. P.** (2006). DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A. *Genes Dev.* 20, 1343-1352.

**Best, S. M.** (2008). Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 171-192.

**Best, S. M., Shelton, J. F., Pompey, J.M., Wolfenbarger, J. B., and Bloom, M. E.** (2003). Caspase cleavage of the nonstructural protein NS1 mediates replication of Aleutian mink disease parvovirus. *J. Virol.* 77, 5305-5312.

**Bialojan, C., and Takai, A.** (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J.* 256, 283-290.

**Bodelón, G., Labrada, L., Martínez-Costas, J., and Benavente, J.** (2002). Modification of late membrane permeability in avian reovirus-infected cells: viroporin activity of the S1-encoded nonstructural p10 protein. *J. Biol. Chem.* 277, 17789-17796.

**Bodelón, G., Labrada, L., Martínez-Costas, J., and Benavente, J.** (2001). The avian reovirus genome segment S1 is a functionally tricistronic gene that expresses one structural and two nonstructural proteins in infected cells. *Virology* 191, 181-191.

**Boutillier, J., and Duncan, R.** (2011). The reovirus fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins: virus-encoded cellular fusogens. *Curr. Top. Membr.* 68, 107-40.

**Brandariz-Nuñez, A., Menaya-Vargas, R., Benavente, J., and Martínez-Costas, J.** (2010a). A versatile molecular tagging method for targeting proteins to avian reovirus muNS inclusions. Use in protein immobilization and purification. *PLoS One* 5, 13961.

**Brandariz-Nuñez, A., Menaya-Vargas, R., Benavente, J., and Martínez-Costas, J.** (2010b). IC-tagging and protein relocation to ARV muNS inclusions: a method to study protein-protein interactions in the cytoplasm or nucleus of living cells. *PLoS One* 5, 13785.

**Brandariz-Nuñez, A., Menaya-Vargas, R., Benavente, J., and Martínez-Costas, J.** (2010c). Avian reovirus microNS protein forms homo-oligomeric inclusions in a microtubule-independent fashion, which involves specific regions of its C-terminal domain. *J. Virol.* 84, 4289-4301.

**Brandariz-Nuñez, A., Otero-Romero, I., Benavente, J., and Martínez-Costas, J.** (2011). IC-tagged proteins are able to interact with each other and perform complex reactions when integrated into muNS-derived inclusions. *J. Biotechnol.* 155, 284-286.

**Broering, T. J., Arnold, M. M., Miller, C. L., Hurt, J. A., Joyce, P. L., and Nibert, M. L.** (2005). Carboxyl-proximal regions of reovirus nonstructural protein muNS necessary and sufficient for forming factory-like inclusions. *J. Virol.* 79, 6194-6206.

**Broering, T. J., Kim, J., Miller, C. L., Piggott, C. D. S., Dinoso, J. B., Nibert, M. L., and Parker, J. S. L.** (2004). Reovirus nonstructural protein mu NS recruits viral core surface proteins and entering core particles to factory-like inclusions. *J. Virol.* 78, 1882-1892.

**Carrasco, L.** (1995). Modification of membrane permeability by animal viruses. *Adv. Virus Res.* 45, 61-112.

**Caserta, T. M., Smith, A. N., Gultice, A. D., Reedy, M. A., and Brown, T. L.** (2003). Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis* 8, 345-352.

**Chae, H. J., Kang, J. S., Byun, J. O., Han, K. S., Kim, D. U., Oh, S. M., Kim, H. M., Chae, S. W., and Kim, H. R.** (2000). Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacol. Res.* 42, 373-381.

**Chaudhry, P., Singh, M., Parent, S., and Asselin, E.** (2011). Prostate apoptosis response 4 (Par-4), a novel substrate of caspase-3 during apoptosis activation. *Mol. Cell Biol.* 32, 826-839.

**Chi, P. I., Huang, W. R., Lai, I. H., Cheng, C. Y., and Liu, H. J.** (2013). The p17 nonstructural protein of avian reovirus triggers autophagy enhancing virus replication via activation of phosphatase and tensin deleted on chromosome 10 (PTEN) and AMP-activated protein kinase (AMPK), as well as dsRNA-dependent protein kinase (PKR). *J. Biol. Chem.* 288, 3571-3584.

**Chung, C. T., Niemela, S. L., and Miller, R. H.** (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 2172-2175.

**Clem, R. J.** (2007). Baculoviruses and apoptosis: a diversity of genes and responses. *Curr. Drug Targets* 8, 1069-1074.

**Clem, R. J., Fechheimer, M., and Miller, L. K.** (1991). Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 254, 1388-1390.

**Clemens, M. J.** (1997). PKR--a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 945-949.

**Cohen, P., Holmes, C. F., and Tsukitani, Y.** (1990). Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.* 15, 98-102.

**Condit, R. C.** (2007). Principles of Virology Ovid : Fields Virology. *Virology*, pp.1-48.

**Connolly, J. L., Barton, E. S., and Dermody, T. S.** (2001). Reovirus binding to cell surface sialic acid potentiates virus-induced apoptosis. *J. Virol.* 75, 4029-4039.

**Cooper, J. A., Sefton, B. M., and Hunter, T.** (1983). Detection and quantification of phosphotyrosine in proteins. *Methods Enzymol.* 99, 387-402.

**Costas, C., Martínez-Costas, J., Bodelón, G., and Benavente, J.** (2005). The second open reading frame of the avian reovirus S1 gene encodes a transcription-dependent and CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling protein. *J. Virol.* 79, 2141-2150.

**Criglar, J. M., Hu, L., Crawford, S. E., Hyser, J. M., Broughman, J. R., Prasad, B. V. V., and Estes, M. K.** (2014). A novel form of rotavirus NSP2 and phosphorylation-dependent NSP2-NSP5 interactions are associated with viroplasm assembly. *J. Virol.* 88, 786-798.

- Danthi, P., Coffey, C. M., Parker, J. S. L., Abel, T. W., and Dermody, T. S. (2008a).** Independent regulation of reovirus membrane penetration and apoptosis by the mu1 phi domain. *PLoS Pathog.* 4, 1000248.
- Danthi, P., Kobayashi, T., Holm, G. H., Hansberger, M. W., Abel, T. W., and Dermody, T. S. (2008b).** Reovirus apoptosis and virulence are regulated by host cell membrane penetration efficiency. *J. Virol.* 82, 161-172.
- Dawe, S., and Duncan, R. (2002).** The S4 genome segment of baboon reovirus is bicistronic and encodes a novel fusion-associated small transmembrane protein. *J. Virol.* 76, 2131-2140.
- Derouiche, A., Cousin, C., and Mijakovic, I. (2012).** Protein phosphorylation from the perspective of systems biology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 585-590.
- Dibb, N. J., Maruyama, I. N., Krause, M., and Karn, J. (1989).** Sequence analysis of the complete *Caenorhabditis elegans* myosin heavy chain gene family. *J. Mol. Biol.* 205, 603-613.
- Dixon, L. K., Alonso, C., Escribano, J. M., Martins, J. M., Revilla, Y., Salas, M. L., Takamatsu, H., and ICTV-Committee (2012).** ICTV Virus Taxonomy 2012. Disponible en: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- Duncan, R. (1996).** The low pH-dependent entry of avian reovirus is accompanied by two specific cleavages of the major outer capsid protein muB. *Virology* 219, 179-189.
- Duncan, R., and Sullivan, K. (1998).** Characterization of two avian reoviruses that exhibit strain-specific quantitative differences in their syncytium-inducing and pathogenic capabilities. *Virology* 250, 263-272.
- Eichwald, C., Vascotto, F., Fabbretti, E., and Burrone, O. R. (2002).** Rotavirus NSP5: mapping phosphorylation sites and kinase activation and viroplasm localization domains. *J. Virol.* 76, 3461-3470.
- Ellis, M. N., Eidson, C. S., Brown, J., and Kleven, S. H. (1983).** Studies on interferon induction and interferon sensitivity of avian reoviruses. *Avian Dis.* 27, 927-936.
- Felgenhauer, P., Sedman, J., Shostak, N., Timofeeva, M., Lind, A., and Bayev, A. (1990).** The 5'-flanking sequence of the loach oocyte 5S rRNA gene contains a signal for effective transcription. *Gene* 90, 243-248.
- Fields, B. N. (1971).** Temperature-sensitive mutants of reovirus type 3 features of genetic recombination. *Virology* 46, 142-148.

**Firth, A.E., and Brierley, I.** (2012). Non-canonical translation in RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 93, 1385-1409.

**Galluzzi, L., Kepp, O., Morselli, E., Vitale, I., Senovilla, L., Pinti, M., Zitvogel, L., and Kroemer, G.** (2010). Viral strategies for the evasion of immunogenic cell death. *J. Intern. Med.* 267, 526-542.

**González-López, C., Martínez-Costas, J., Esteban, M., and Benavente, J.** (2003). Evidence that avian reovirus sigmaA protein is an inhibitor of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J. Gen. Virol.* 84, 1629-1639.

**Goodbourn, S., Didcock, L., and Randall, R. E.** (2000). Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 81, 2341-2364.

**Grand, R. J. A., Schmeiser, K., Gordon, E. M., Zhang, X., Gallimore, P. H., and Turnell, A. S.** (2002). Caspase-mediated cleavage of adenovirus early region 1A proteins. *Virology* 301, 255-271.

**Grande, A., and Benavente, J.** (2000). Optimal conditions for the growth, purification and storage of the avian reovirus S1133. *J. Virol. Methods* 85, 43-54.

**Grande, A., Costas, C., and Benavente, J.** (2002). Subunit composition and conformational stability of the oligomeric form of the avian reovirus cell-attachment protein sigmaC. *J. Gen. Virol.* 83, 131-139.

**Grande, A., Rodriguez, E., Costas, C., Everitt, E., and Benavente, J.** (2000). Oligomerization and cell-binding properties of the avian reovirus cell-attachment protein sigmaC. *Virology* 274, 367-377.

**Guardado Calvo, P., Fox, G. C., Hermo Parrado, X. L., Llamas-Saiz, A. L., Costas, C., Martínez-Costas, J., Benavente, J., and van Raaij, M. J.** (2005). Structure of the carboxy-terminal receptor-binding domain of avian reovirus fibre sigmaC. *J. Mol. Biol.* 354, 137-149.

**Guardado-Calvo, P., Fox, G. C., Llamas-Saiz, A. L., and van Raaij, M. J.** (2009). Crystallographic structure of the alpha-helical triple coiled-coil domain of avian reovirus S1133 fibre. *J. Gen. Virol.* 90, 672-677.

**Guardado-Calvo, P., Vazquez-Iglesias, L., Martinez-Costas, J., Llamas-Saiz, A. L., Schoehn, G., Fox, G. C., Hermo-Parrado, X. L., Benavente, J., and van Raaij, M. J.** (2008). Crystal structure of the avian reovirus inner capsid protein sigmaA. *J. Virol.* 82, 11208-11216.

**Haller, O., Kochs, G., and Weber, F.** (2006). The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* 344, 119-130.

**Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.

**Hermo-Parrado, X. L., Guardado-Calvo, P., Llamas-Saiz, A. L., Fox, G. C., Vazquez-Iglesias, L., Martínez-Costas, J., Benavente, J., and van Raaij, M. J.** (2007). Crystallization of the avian reovirus double-stranded RNA-binding and core protein sigmaA. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 63, 426-942.

**Himly, M., Foster, D. N., Bottoli, I., Iacovoni, J. S., and Vogt, P. K.** (1998). The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses. *Virology* 248, 295-304.

**Hsiao, J., Martínez-Costas, J., Benavente, J., and Vakharia, V. N.** (2002). Cloning, expression, and characterization of avian reovirus guanylyltransferase. *Virology* 296, 288-299.

**Hubbard, M. J. and Cohen, P.** (1993). On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* 18, 172-177.

**Hunter, T.** (1987). A thousand and one protein kinases. *Cell* 50, 823-829.

**Jackson, R. J.** (2005). Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1231-1241.

**Jacobson, M. D., Burne, J. F., King, M. P., Miyashita, T., Reed, J. C., and Raff, M. C.** (1993). Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 361, 365-369.

**Jakubiec, A., and Jupin, I.** (2007). Regulation of positive-strand RNA virus replication: the emerging role of phosphorylation. *Virus Res.* 129, 73-79.

**Jänicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., and Porter, A. G.** (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 9357-9360.

**Ji, W. T., Lin, F. L., Wang, Y. C., Shih, W. L., Lee, L. H., and Liu, H. J.** (2010). Intracellular cleavage of sigmaA protein of avian reovirus. *Virus Res.* 149, 71-77.

**Johnson, A.L., and Bridgham, J. T.** (2000). Caspase-3 and -6 expression and enzyme activity in hen granulosa cells. *Biol. Reprod.* 62, 589-598.

**Jones, R. C.** (2000). Avian reovirus infections. *Rev. Sci. Tech.* 19, 614-625.

**Jordan, L. E., and Mayor, H. D.** (1962). The fine structure of reovirus, a new member of the icosahedral series. *Virology* 17, 597-599.

**Ketchum, A. S., Stewart, C. T., Stewart, M., and Kiehart, D. P.** (1990). Complete sequence of the *Drosophila* nonmuscle myosin heavy-chain transcript: conserved sequences in the myosin tail and differential splicing in the 5' untranslated sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 6316-6320.

**Kobayashi, T., Chappell, J. D., Danthi, P., and Dermody, T. S.** (2006). Gene-specific inhibition of reovirus replication by RNA interference. *J. Virol.* 80, 9053-9063.

**Kong, B.-W., Lee, J. Y., Bottje, W. G., Lassiter, K., Lee, J. and Foster, D. N.** (2011). Genome-wide differential gene expression in immortalized DF-1 chicken embryo fibroblast cell line. *BMC Genomics* 273, 9357-9360.

**Kopito, R. R.** (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* 10, 524-530.

**Kozak, M.** (1991). An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell Biol.* 115, 887-903.

**Kozak, M.** (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* 299, 1-34.

**Krystal, G., Winn, P., Millward, S., and Sakuma, S.** (1975). Evidence for phosphoproteins in reovirus. *Virology* 64, 505-512.

**Kuntz-Simon, G., Le Gall-Reculé, G., de Boisséson, C., and Jestin, V.** (2002). Muscovy duck reovirus sigmaC protein is atypically encoded by the smallest genome segment. *J. Gen. Virol.* 83, 1189-1200.

**Kuželová, K., Grebeňová, D., and Brodská, B.** (2011). Dose-dependent effects of the caspase inhibitor Q-VD-OPh on different apoptosis-related processes. *J. Cell. Biochem.* 112, 3334-3342.

**Labrada, L., Bodelón, G., Viñuela, J., and Benavente, J.** (2002). Avian reoviruses cause apoptosis in cultured cells: viral uncoating, but not viral gene expression, is required for apoptosis induction. *J. Virol.* 76, 7932-7941.

**Landa, A., Laclette, J. P., Nicholson-Weller, A., and Shoemaker, C. B.** (1993). cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Mol. Biochem. Parasitol.* 60, 343-347.

**Lenard, J.** (1999). Host cell protein kinases in nonsegmented negative-strand virus (mononegavirales) infection. *Pharmacol. Ther.* 83, 39-48.

**Liu, H.-J., Lin, P.-Y., Lee, J.-W., Hsu, H.-Y., and Shih, W.-L.** (2005). Retardation of cell growth by avian reovirus p17 through the activation of p53 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 709-715.

**Lupas, A.** (1996). Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods Enzymol.* 266, 513-525.

**Lupas, A., Van Dyke, M., and Stock, J.** (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252, 1162-1164.

**Marcato, P., Shmulevitz, M., Pan, D., Stoltz, D., and Lee, P. W.** (2007). Ras transformation mediates reovirus oncolysis by enhancing virus uncoating, particle infectivity, and apoptosis-dependent release. *Mol. Ther.* 15, 1522-1530.

**Martínez-Costas, J., González-López, C., Vakharia, V. N., and Benavente, J.** (2000a). Possible Involvement of the Double-Stranded RNA-Binding Core Protein  $\zeta$ A in the Resistance of Avian Reovirus to Interferon. *J. Virol.* 74, 1124-1131.

**Martínez-Costas, J., Grande, A., Varela, R., García-Martínez, C., and Benavente, J.** (1997). Protein architecture of avian reovirus S1133 and identification of the cell attachment protein. *J. Virol.* 71, 59-64.

**Martínez-Costas, J., Varela, R., and Benavente, J.** (1995). Endogenous Enzymatic Activities of the Avian Reovirus s1133: Identification of the Viral Capping Enzyme. *Virology* 206, 1017-26.

**Mashima, T., Naito, M., and Tsuruo, T.** (1999). Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. *Oncogene* 18, 2423-30.

**McCutcheon, A. M., Broering, T. J., and Nibert, M. L.** (1999). Mammalian reovirus M3 gene sequences and conservation of coiled-coil motifs near the carboxyl terminus of the microNS protein. *Virology* 264, 6-24.

**Mertens, P.** (2004). The dsRNA viruses. *Virus Res.* 101, 3-13.

**Miller, C. L., Arnold, M. M., Broering, T. J., Eichwald, C., Kim, J., Dinoso, J. B., and Nibert, M. L.** (2007). Virus-derived platforms for visualizing protein associations inside cells. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1027-1038.

**Miller, C. L., Arnold, M. M., Broering, T. J., Hastings, C. E., and Nibert, M. L.** (2010). Localization of mammalian orthoreovirus proteins to cytoplasmic factory-like structures via nonoverlapping regions of microNS. *J. Virol.* 84, 867-882.

**Miller, C. L., Broering, T. J., Parker, J. S. L., Arnold, M. M., and Nibert, M. L.** (2003). Reovirus sigma NS protein localizes to inclusions through an association requiring the mu NS amino terminus. *J. Virol.* 77, 4566-4576.

**Mitsui, H., Nakatani, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Nishikawa, K., and Takahashi, H.** (1994). Sequencing and characterization of the kinesin-related genes katB and katC of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 25, 865-876.

**Modrof, J., Lympelopoulou, K., and Roy, P.** (2005). Phosphorylation of bluetongue virus nonstructural protein 2 is essential for formation of viral inclusion bodies. *J. Virol.* 79, 10023-10031.

**Mohan, K. V. K., Muller, J., Som, I., and Atreya, C. D.** (2003). The N- and C-terminal regions of rotavirus NSP5 are the critical determinants for the formation of viroplasm-like structures independent of NSP2. *J. Virol.* 77, 12184-1292.

**Mora, M., Partin, K., Bhatia, M., Partin, J., and Carter, C.** (1987). Association of reovirus proteins with the structural matrix of infected cells. *Virology* 159, 265-277.

**Mühlschlegel, F., Sygulla, L., Frosch, P., Massetti, P., and Frosch, M.** (1993). Paramyosin of *Echinococcus granulosus*: cDNA sequence and characterization of a tegumental antigen. *Parasitol. Res.* 79, 660-666.

**Netherton, C., Moffat, K., Brooks, E., and Wileman, T.** (2007). A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication. *Adv. Virus Res.* 70, 101-182.

**Olson, N. H.** (1978). *Diseases of poultry*, Iowa State University Press.

**Parker, J. S. L., Broering, T. J., Kim, J., Higgins, D. E., and Nibert, M. L.** (2002). Reovirus core protein mu2 determines the filamentous morphology of viral inclusion bodies by interacting with and stabilizing microtubules. *J. Virol.* 76, 4483-4496.

**Poncet, D., Lindenbaum, P., L'Haridon, R., and Cohen, J.** (1997). In vivo and in vitro phosphorylation of rotavirus NSP5 correlates with its localization in viroplasms. *J. Virol.* 71, 34-41.

**Racine, T., Barry, C., Roy, K., Dawe, S. J., Shmulevitz, M., and Duncan, R.** (2007). Leaky scanning and scanning-independent ribosome migration on the tricistronic S1 mRNA of avian reovirus. *J. Biol. Chem.* 282, 25613-25622.

**Racine, T., and Duncan, R.** (2010). Facilitated leaky scanning and atypical ribosome shunting direct downstream translation initiation on the tricistronic S1 mRNA of avian reovirus. *Nucleic Acids Res.* 38, 7260-7262.

**Rebouillat, D., and Hovanessian, A. G.** (1999). The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J. Interferon Cytokine Res.* 19, 295-308.

**Reinisch, K. M., Nibert, M. L., and Harrison, S. C.** (2000). Structure of the reovirus core at 3.6 Å resolution. *Nature* 404, 960-967.

**Rhim, J. S., Jordan, L. E., and Mayor, H. D.** (1962). Cytochemical, fluorescent-antibody and electron microscopic studies on the growth of reovirus (ECHO 10) in tissue culture. *Virology* 17, 342-355.

**Richard, A., and Tulasne, D.** (2012). Caspase cleavage of viral proteins, another way for viruses to make the best of apoptosis. *Cell Death Dis.* 3, e277.

**Robertson, M. D. y Wilcox, G. E.** (1986). Avian Reovirus. *Vet. Bull*, I, 759-766.

**Rodríguez-Grille, J., Busch, L. K., Martínez-Costas, J., and Benavente, J.** (2014). Avian reovirus-triggered apoptosis enhances both virus spread and the processing of the viral nonstructural muNS protein. *Virology* 462-463, 49-59.

**Rosenberger, J. K., Sterner, F. J., Botts, S., Lee, K. P., and Margolin, A.** (1989). In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. I. Pathogenicity and antigenic relatedness of several avian reovirus isolates. *Avian Dis.* 33, 535-544.

**Ruan, Y., and Straney, D. C.** (1994). In vitro transcription from the *Nectria haematococca* PDA1 promoter in an homologous extract reflects in vivo pisatin-responsive regulation. *Curr. Genet.* 27, 46-53.

**Rüegg, U. T., and Burgess, G. M.** (1989). Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 218-220.

**Sambrook, J., and Russell, D. W.** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Volume 1*, CSHL Press.

**Satoh, S., Hirota, M., Noguchi, T., Hijikata, M., Handa, H., and Shimotohno, K.** (2000). Cleavage of hepatitis C virus nonstructural protein 5A by a caspase-like protease(s) in mammalian cells. *Virology* 270, 476-487.

**Schägger, H., and von Jagow, G.** (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.

**Schmitz, A. M., Morrison, M. F., Agunwamba, A. O., Nibert, M. L., and Lesser, C. F.** (2009). Protein interaction platforms: visualization of interacting proteins in yeast. *Nat. Methods* 6, 500-502.

**Schnitzer, T. J.** (1985). Protein coding assignment of the S genes of the avian reovirus S1133. *Virology* 141, 167-170.

**Schnitzer, T. J., Ramos, T., and Gouvea, V.** (1982). Avian reovirus polypeptides: analysis of intracellular virus-specified products, virions, top component, and cores. *Microbiology* 43, 1006-1014.

**Sen, G. C.** (2001). Viruses and interferons. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 255-281.

**Shapouri, M. R., Arella, M., and Silim, A.** (1996). Evidence for the multimeric nature and cell binding ability of avian reovirus sigma 3 protein. *J. Gen. Virol.* 77, 1203-1210.

**Shih, W. L., Hsu, H. W., Liao, M. H., Lee, L. H., and Liu, H. J.** (2004). Avian reovirus sigmaC protein induces apoptosis in cultured cells. *Virology* 321, 65-74.

**Shmulevitz, M., Corcoran, J., Salsman, J., and Duncan, R.** (2004). Cell-cell fusion induced by the avian reovirus membrane fusion protein is regulated by protein degradation. *J. Virol.* 78, 5996-6004.

**Shmulevitz, M., and Duncan, R.** (2000). A new class of fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins encoded by the non-enveloped fusogenic reoviruses. *EMBO J.* 19, 902-912.

**Shmulevitz, M., Salsman, J., and Duncan, R.** (2003). Palmitoylation, membrane-proximal basic residues, and transmembrane glycine residues in the reovirus p10 protein are essential for syncytium formation. *J. Virol.* 77, 9769-9779.

**Shmulevitz, M., Yameen, Z., Dawe, S., Shou, J., O'Hara, D., Holmes, I., and Duncan, R.** (2002). Sequential partially overlapping gene arrangement in the tricistronic S1 genome segments of avian reovirus and Nelson Bay reovirus: implications for translation initiation. *J. Virol.* 76, 609-618.

**Silverstein, S. C., Astell, C., Levin, D. H., Schonberg, M., and Acs, G.** (1972). The mechanisms of reovirus uncoating and gene activation in vivo. *Virology* 47, 797-806.

**Sonenberg, N., and Hinnebusch, A. G.** (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731-745.

**Spandidos, D., and Graham, A.** (1976). Physical and chemical characterization of an avian reovirus. *J. Virol.* 19, 968-976.

**Spiropoulou, C. F., and Nichol, S. T.** (1993). A small highly basic protein is encoded in overlapping frame within the P gene of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 67, 3103-3110.

**Sterner, F. J., Rosenberger, J. K., Margolin, A., and Ruff, M. D.** (1989). In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. II. Clinical evaluation of chickens infected with two avian reovirus pathotypes. *Avian Dis.* 33, 545-554.

**Su, Y. P., Shien, J. H., Liu, H. J., Yin, H. S., and Lee, L. H.** (2007). Avian reovirus core protein muA expressed in *Escherichia coli* possesses both NTPase and RTPase activities. *J. Gen. Virol.* 88, 1797-805.

**Sun, J., Yu, Y., and Deubel, V.** (2012). Japanese encephalitis virus NS1' protein depends on pseudoknot secondary structure and is cleaved by caspase during virus infection and cell apoptosis. *Microbes Infect.* 14, 930-940.

**Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M., and Tomita, F.** (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135, 397-402.

**Tarrant, M. K., and Cole, P. A.** (2009). The chemical biology of protein phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 797-825.

**Teodoro, J. G., and Branton, P. E.** (1997). Regulation of apoptosis by viral gene products. *J. Virol.* 71, 1739-1746.

**Thomas, C. P., Booth, T. F., and Roy, P.** (1990). Synthesis of bluetongue virus-encoded phosphoprotein and formation of inclusion bodies by recombinant baculovirus in insect cells: it binds the single-stranded RNA species. *J. Gen. Virol.* 71, 2073-2083.

**Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

**Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T., and Nicholson, D. W.** (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 17907-17911.

**Timmer, J. C., and Salvesen, G. S.** (2007). Caspase substrates. *Cell Death Differ.* 14, 66-72.

- Top, D., Barry, C., Racine, T., Ellis, C. L., and Duncan, R.** (2009). Enhanced fusion pore expansion mediated by the trans-acting Endodomain of the reovirus FAST proteins. *PLoS Pathog.* 5, e1000331.
- Tourís-Otero, F., Cortez-San Martín, M., Martínez-Costas, J., and Benavente, J.** (2004a). Avian reovirus morphogenesis occurs within viral factories and begins with the selective recruitment of sigmaNS and lambdaA to microNS inclusions. *J. Mol. Biol.* 341, 361-374.
- Tourís-Otero, F., Martínez-Costas, J., Vakharia, V. N., and Benavente, J.** (2004b). Avian reovirus nonstructural protein microNS forms viroplasm-like inclusions and recruits protein sigmaNS to these structures. *Virology* 319, 94-106.
- Tourís-Otero, F., Martínez-Costas, J., Vakharia, V. N., and Benavente, J.** (2005). Characterization of the nucleic acid-binding activity of the avian reovirus non-structural protein sigmaNS. *J. Gen. Virol.* 86, 1159-1169.
- van der Heide, L.** (2000). The history of avian reovirus. *Avian Dis.* 44, 638-641.
- van der Heide, L., and Kalbac, M.** (1975). Infectious tenosynovitis (viral arthritis): characterization of a Connecticut viral isolant as a reovirus and evidence of viral egg transmission by reovirus-infected broiler breeders. *Avian Dis.* 19, 683-688.
- van der Heide, L., Kalbac, M., and Brustolon, M.** (1983). Development of an attenuated apathogenic reovirus vaccine against viral arthritis/tenosynovitis. *Avian Dis.* 27, 698-706.
- van Raaij, M. J., Hermo Parrado, X. L., Guardado Calvo, P., Fox, G. C., Llamas-Saiz, A. L., Costas, C., Martínez-Costas, J., and Benavente, J.** (2005). Crystallization of the C-terminal globular domain of avian reovirus fibre. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 61, 651-654.
- Varela, R., and Benavente, J.** (1994). Protein coding assignment of avian reovirus strain S1133. *J. Virol.* 68, 6775-6777.
- Varela, R., Martínez-Costas, J., Mallo, M., and Benavente J.** (1996). Intracellular posttranslational modifications of S1133 avian reovirus proteins. *J. Virol.* 70, 2974-2981.
- Vázquez-Iglesias, L., Lostalé-Seijo, I., Martínez-Costas, J., and Benavente, J.** (2009). Avian reovirus sigmaA localizes to the nucleolus and enters the nucleus by a nonclassical energy- and carrier-independent pathway. *J. Virol.* 83, 10163-10175.

**Wang, W., Suguitan, A. L., Zengel, J., Chen, Z., and Jin, H.** (2012). Generation of recombinant pandemic H1N1 influenza virus with the HA cleavable by bromelain and identification of the residues influencing HA bromelain cleavage. *Vaccine* 30, 872-878.

**White, J. M., Delos, S. E., Brecher, M., and Schornberg, K.** (2008). Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 43, 189-219.

**Wiener, J. R., Bartlett, J. A., and Joklik, W. K.** (1989). The sequences of reovirus serotype 3 genome segments M1 and M3 encoding the minor protein mu 2 and the major nonstructural protein mu NS, respectively. *Virology* 169, 293-304.

**Wileman, T.** (2006). Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication. *Science* 312, 875-878.

**Wileman, T.** (2007). Aggresomes and pericentriolar sites of virus assembly: cellular defense or viral design? *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 149-167.

**Yanagisawa, M., Hamada, Y., Katsuragawa, Y., Imamura, M., Mikawa, T., and Masaki, T.** (1987). Complete primary structure of vertebrate smooth muscle myosin heavy chain deduced from its complementary DNA sequence. Implications on topography and function of myosin. *J. Mol. Biol.* 198, 143-157.

**Yin, H. S., and Lee, L. H.** (1998). Identification and characterization of RNA-binding activities of avian reovirus non-structural protein sigmaNS. *J. Gen. Virol.* 79, 1411-1413.

**Yu, Y.-L., Chiang, Y.-J., Chen, Y.-C., Papetti, M., Juo, C.-G., Skoultchi, A. I., and Yen, J. J. Y.** (2005). MAPK-mediated phosphorylation of GATA-1 promotes Bcl-XL expression and cell survival. *J. Biol. Chem.* 280, 29533-29542.

**Zhang, X., Tang, J., Walker, S. B., O'Hara, D., Nibert, M. L., Duncan, R., and Baker, T. S.** (2005). Structure of avian orthoreovirus virion by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *Virology* 343, 25-35.

