

ESTUDIO DEL SISTEMA DEL INTERFERÓN EN CÉLULAS AVIARES INFECTADAS CON EL REOVIRUS AVIAR S1133

Irene Lostalé Seijo

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOXÍA MOLECULAR
CENTRO SINGULAR DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA
BIOLÓXICA E MATERIAIS MOLECULARES
SANTIAGO DE COMPOSTELA

2015



ESTUDIO DEL SISTEMA DEL INTERFERÓN EN CÉLULAS AVIARES INFECTADAS CON EL REOVIRUS AVIAR S1133

Fdo.:

Irene Lostalé Seijo

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOXÍA MOLECULAR

CENTRO SINGULAR DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA
BIOLÓXICA E MATERIAIS MOLECULARES

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 del sistema del interferón en células aviares infectadas con el reovirus aviar S1133” que presenta Irene Lostalé Seijo 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.: Irene Lostalé Seijo

Santiago de Compostela, 23 de Febrero 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.

Irene Lostalé Seijo ha disfrutado de una beca para la realización de estudios de Tercer Ciclo de la Xunta de Galicia (2006), una beca para la Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia (AP2006-03859) y dos becas de investigación de la Diputación Provincial de A Coruña (convocatorias 2011 y 2013).



ESTUDIO DEL SISTEMA DEL INTERFERÓN EN CÉLULAS AVIARES INFECTADAS CON EL REOVIRUS AVIAR S1133

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. Neste traballo estudouse a resposta inmune innata que este virus desencadea en dous tipos celulares do seu hospedador natural, o polo, e comparouse coa xerada por outros virus coma o virus vaccinia e o virus da estomatite vesicular. O reovirus aviario é o único dos virus estudados capaz de inducir a produción de interferón (IFN) e aumentar os niveis da proteína quinasa R (PKR) en cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de polo (CEF), mentres que é incapaz de facelo na liña celular DF1 derivada destes, o que podería depender de diferenzas nos niveis dos receptores de recoñecemento de patrón (PRRs) ou a unha menor eficiencia de infección destas células. A indución de IFN en CEF infectadas co reovirus aviario depende da decapsidación do virus pero non da expresión dos seus xenos. O reovirus aviario é resistente ao IFN e é capaz de impedir a activación de PKR e a fosforilación de eIF2 α , ao contrario que os outros dous virus estudados. Esta capacidade para impedir a activación de PKR depende da capacidade da proteína σ A para unir ARN bicatenario. Por outra banda, observouse que o pretratamento con IFN de células DF1 aumenta a cantidade de células infectadas co reovirus aviario mediante un mecanismo independente da activación das caspasas. Finalmente, estudáronse algúns posibles mecanismos da inhibición da síntese das proteínas celulares durante a infección con reovirus aviario.

PALABRAS CLAVE

virus, inmunidade innata, reovirus aviario, interferón, proteína quinasa R

RESUMEN

Los reovirus aviares son virus desnudos con genoma de ARN bicatenario que infectan a aves, causando enfermedades como la artritis infecciosa o el síndrome de malabsorción. En este trabajo se ha estudiado la respuesta inmune innata que este virus desencadena en dos tipos celulares de su hospedador natural, el pollo, y se ha comparado con la que generan otros virus como el virus vaccinia y el virus de la estomatitis vesicular. El reovirus aviar es el único de los virus estudiados capaz de inducir la producción de interferón (IFN) y aumentar los niveles de la proteína quinasa R (PKR) en cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de pollo (CEF), mientras que es incapaz de hacerlo en la línea celular DF1 derivada de éstos, lo que podría depender de diferencias en los niveles de los receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) o a una menor eficiencia de infección de estas células. La inducción de IFN en CEF infectadas con reovirus aviar depende de la decapsidación del virus pero no de la expresión de sus genes. El reovirus aviar es resistente al IFN y es capaz de impedir la activación de PKR y la fosforilación de eIF2 α , al contrario que los otros dos virus estudiados. Esta capacidad para impedir la activación de PKR depende de la capacidad de la proteína σ A para unir ARN bicatenario. Por otra parte, se ha observado que el pretratamiento con IFN de células DF1 aumenta la cantidad de células infectadas con el reovirus aviar mediante un mecanismo independiente de la activación de las caspasas. Finalmente, se han estudiado algunos posibles mecanismos de la inhibición de la síntesis de proteínas celulares durante la infección con reovirus aviar.

PALABRAS CLAVE

virus, inmunidad innata, reovirus aviar, interferón, proteína quinasa R

ABSTRACT

Avian reoviruses are nonenveloped viruses containing a dsRNA genome that infect birds, causing diseases like viral arthritis or malabsorption syndrome. In this report, the innate immune response triggered by this virus on two chicken cell lines has been studied and compared to the ones caused by vaccinia virus and vesicular stomatitis virus. Only avian reovirus is able to induce interferon (IFN) secretion and protein kinase R (PKR) induction in primary chicken embryo fibroblasts (CEF), while it is unable to do so in DF1 cells, probably due to differences on pattern recognition receptors (PRRs) levels or infection efficiency. IFN induction in avian reovirus infected cells depends on viral uncoating but not on viral gene expression. Avian reovirus is resistant to IFN effects and blocks PKR activation and eIF2 α phosphorylation, unlike the other viruses used on this study. The ability to inhibit PKR activation relies on σ A protein's ability to sequester dsRNA. On the other hand, IFN pretreatment of DF1 cells increases the number of avian reovirus infected cells through a mechanism independent of caspase activation. Finally, several possible mechanisms of host protein shutoff during avian reovirus infection are explored.

KEYWORDS

virus, innate immunity, avian reovirus, interferon, protein kinase R



ÍNDICE



ABREVIATURAS	15
INTRODUCCIÓN.....	21
1.- LA FAMILIA REOVIRIDAE.....	23
2.- ESTRUCTURA DEL REOVIRUS AVIAR	24
2.1.- El genoma del reovirus aviar	24
2.2.- Proteínas del reovirus aviar	25
2.3.- Estructura de la partícula viral.....	32
3.- EL CICLO REPLICATIVO DEL REOVIRUS AVIAR.....	32
3.1.- Entrada y decapsidación	32
3.2.- Expresión génica	34
3.3.- Morfogénesis y salida.....	35
4.- EL SISTEMA DEL INTERFERÓN Y EL ESTADO ANTIVIRAL	36
4.1.- El sistema del interferón y los interferones	36
4.2.- Detección de la infección viral	38
4.3.- Señalización por interferones y creación y activación del estado antiviral	40
5.- REOVIRUS Y RESPUESTA CELULAR	45
5.1.- Reovirus de mamífero	45
5.2.- Reovirus aviar.....	46
6.- VIRUS VACCINIA Y VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR	47
6.1.- Virus vaccinia.....	47
6.2.- Virus de la estomatitis vesicular.....	48
OBJETIVOS	51
MATERIALES Y MÉTODOS	55
1.- MATERIAL BIOLÓGICO	57
1.1.- Células eucariotas.....	57
1.2.- Virus	57
1.3.- Células procariotas	57
1.4.- Plásmidos.....	58
1.5.- Anticuerpos	59
1.6.- Proteínas	60
2.- MATERIAL NO BIOLÓGICO.....	60
2.1.- Medios de cultivo	60
2.2.- Disoluciones y tampones	61
2.3.- Cebadores	62
2.4.- Otros productos químicos.....	62
3.- MÉTODOS	63
3.1.- Manipulación de cultivos celulares y virus	63
3.2.- Manipulación de bacterias.....	67
3.3.- Manipulación de ácidos nucleicos.....	67
3.4.- Manipulación de proteínas	70
3.5.- Hibridación <i>in situ</i>	71
3.6.- Inmunofluorescencia	71
3.7.- Ensayos de actividad de luciferasa	72
3.8.- Ensayos de actividad de las caspasas 3/7	72

RESULTADOS	73
1.- ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE IFN E INDUCCIÓN DE PKR EN CEF	75
2.- EL REOVIRUS AVIAR INDUCE PKR DE FORMA INDIRECTA A TRAVÉS DE LA SECRECIÓN DE IFN AL MEDIO DE CULTIVO	80
3.- IDENTIFICACIÓN DE LA ETAPA DEL CICLO INFECTIVO DE ARV QUE INDUCE LA PRODUCCIÓN DE IFN	82
4.- LA INFECCIÓN CON ARV NO INDUCE LA SECRECIÓN DE IFN NI LA PRODUCCIÓN DE PKR EN CÉLULAS DF1	89
5.- ESTADO DE ACTIVACIÓN DE PKR Y DE SU SUSTRATO eIF2 α	94
5.1.- Estudio de la activación de PKR en células aviares	94
5.2.- Estado de PKR y eIF2 α en células aviares infectadas	97
5.3.- El papel de PKR en la sensibilidad al IFN de los virus WR y VSV	101
5.4.- Efecto de la fosforilación de eIF2 α sobre la síntesis de proteínas virales	104
6.- EL PAPEL DE LA PROTEÍNA σ A DEL REOVIRUS AVIAR EN LA RESISTENCIA AL IFN	107
7.- EL IFN PROMUEVE LA REPLICACIÓN DEL REOVIRUS AVIAR EN CÉLULAS DF1.....	112
8.- ESTUDIO DEL MECANISMO DE <i>SHUTOFF</i> INDUCIDO POR ARV.....	118
DISCUSIÓN.....	125
1.- EL REOVIRUS AVIAR INDUCE LA PRODUCCIÓN DE IFN EN CEF.....	127
2.- LA INDUCCIÓN DE IFN DURANTE LA INFECCIÓN REQUIERE LA DECAPSIDACIÓN DEL VIRUS.....	130
3.- LAS CÉLULAS DF1 NO PRODUCEN IFN ANTE LA INFECCIÓN CON ARV	133
4.- SUSCEPTIBILIDAD DE LOS VIRUS VSV Y WR AL IFN EN CÉLULAS AVIARES	135
5.- EL REOVIRUS AVIAR ES RESISTENTE AL PRETRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS CON IFN	138
6.- EL PAPEL DE LA PROTEÍNA σ A DEL REOVIRUS AVIAR EN LA RESISTENCIA AL IFN	140
7.- EL IFN PROMUEVE LA REPLICACIÓN DEL ARV EN CÉLULAS DF1	142
8.- ESTUDIO DE LOS POSIBLES MECANISMOS DE <i>SHUTOFF</i>	143
CONCLUSIONES	147
BIBLIOGRAFÍA	151



ABREVIATURAS



ADAR – Adenosina desaminasa específica de dsRNA
AP – Fosfatasa alcalina
AraC – Citosina arabinósido
ARV – Reovirus aviar
ATP – Adenosina 5' trifosfato
BFA – Brefeldina A
BSA – Seroalbúmina bovina
BTV – Virus de la lengua azul
CARD – Dominio de reclutamiento y activación de caspasas
cDNA – DNA complementario
CEF – Fibroblastos embrionarios de pollo
Cq – Ciclo de cuantificación
CVA – Virus Ankara corioalantoideo
DAPI – 4', 6-diamino-2-fenilindol
DC-Chol – Colesterol 3 β -N-(di-metil-amino-etil)-carbamato hidrocloreto
DF1 – Línea celular inmortalizada de fibroblastos embrionarios de pollo
DLP – *Downstream Hairpin Loop*
DMEM – Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DOPE – L- α -Fosfatidiletanolamina, dioleoil
dsDNA – DNA de doble cadena
dsRBM – Motivos de unión a dsRNA
dsRNA – RNA de doble cadena
DTT – Ditioneitol
eIF2 – Factor de iniciación de la traducción eucariota 2
eIF4B – Factor de iniciación de la traducción eucariota 4B
eIF4G – Factor de iniciación de la traducción eucariota 4G
FAST – *Fusion Associated Small-Transmembrane*
FBS – Suero bovino fetal
GCN2 – *General control nonderepressible 2*
GDP – Guanosina 5' difosfato
GTP – Guanosina 5' trifosfato
GTPasa – Trifosfatasa de guanosina

Abreviaturas

HA – Epitopo de hemaglutinina
hpi – horas post-infección
HRI – Inhibidor regulado por hemo
HSV – Virus del herpes simplex
IBDV – Virus de la bursitis infecciosa
ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*
IFN – Interferón
IFNAR – Receptor de IFN α/β
IKK – Quinasa de I κ B
IL – Interleuquina
IRES – *Internal Ribosome Entry Site*
IRF – Factor regulador del interferón
ISGs – Genes estimulados por IFN
ISRE – Elementos de respuesta estimulados por IFN
ISGF3 – Factor génico 3 estimulado por IFN
ISVP – Partículas subvirales infecciosas
I κ B – Inhibidor del NF- κ B
JAK – Tirosina quinasa Janus
kDa – kilodalton
MAPK – Proteína quinasa activada por mitógeno
MAVS – *Mitochondrial anti-viral signaling protein*
MDA5 – *Melanoma differentiation-associated gene 5*
MEF – Fibroblastos embrionarios de ratón
miRNA – micro RNA
MOI – Multiplicidad de infección
mRNA – RNA mensajero
MRV – Reovirus de mamífero
MVA – Virus vaccinia Ankara modificado
NDV – Virus de la enfermedad de Newcastle
NF- κ B – Factor nuclear kappa de células B
NLRs – *NOD-like receptors*
NOD – *Nucleotide-binding oligomerization domain*
OAS – Oligoadenilato sintetasa

ORF – Pauta abierta de lectura
PABP – Proteína de unión a la cola de poli(A)
PACT – Proteína activadora de PKR
PAMP – Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS – tampón fosfato salino
PCR – Reacción en cadena de la polimerasa
PEG – Polietilenglicol
PERK – Quinasa del retículo endoplasmático similar a PKR
pfu – Unidad formadora de placas
PI3K – Fosfatidil inositol 3 quinasa
pIC – Ácido poliinosínico:policitidílico
PKR – Proteína quinasa R
PNPP – para-Nitrofenilfosfato
PRR – Receptor de reconocimiento de patrón
qPCR – PCR cuantitativa
RIG-I – *Retinoic acid-inducible gene I*
RLR – *RIG-I-like receptors*
RNA – Ácido ribonucleico
rRNA – RNA ribosomal
Rv – Ribavirina
SDS – Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SGs – Gránulos de estrés
ssRNA – RNA de cadena sencilla
STAT – Transductor de señal y activador de la transcripción
TLR – *Toll-like receptors*
TPB – Caldo de triptosa fosfato
tRNA – RNA transferente
U. R. L. – Unidades relativas de luz
UPR – *Unfolded protein response*
UTR – *Untranslated regions*
VSV – Virus de la estomatitis vesicular
WR – Virus vaccinia, cepa Western Reserve





INTRODUCCIÓN



1.- LA FAMILIA REOVIRIDAE

Los miembros de la familia *Reoviridae* son virus desnudos de morfología icosaédrica con un genoma compuesto por 9-12 segmentos de RNA bicatenario (dsRNA). La cápside está formada por 2 ó 3 cubiertas proteicas con un diámetro externo (excluyendo las fibras) de 60-85 nm. Estos virus replican en el citoplasma de las células, dentro de unos cuerpos de inclusión de naturaleza proteica denominados viroplasmos o factorías virales.

Esta familia está formada por numerosos géneros, que infectan a un amplio rango de hospedadores, desde plantas y hongos hasta invertebrados y vertebrados (incluido el hombre). En la siguiente tabla se indican los géneros de la familia *Reoviridae* reconocidos actualmente por el International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).

Familia <i>Reoviridae</i>		
Género	Número de segmentos	Hospedadores
Con torretas (Subfamilia <i>Spinareovirinae</i>)		
<i>Orthoreovirus</i>	10	Mamíferos, aves, reptiles
<i>Aquareovirus</i>	11	Peces, moluscos
<i>Cypovirus</i>	10	Insectos
<i>Idnoreovirus</i>	10	Insectos
<i>Fijivirus</i>	10	Plantas, insectos (como vector)
<i>Oryzavirus</i>	10	Plantas, insectos (como vector)
<i>Coltivirus</i>	12	Mamíferos, artrópodos (como vector)
<i>Dinovernavirus</i>	9	Insectos
<i>Mycoreovirus</i>	11 ó 12	Hongos
Sin torretas (Subfamilia <i>Sedoreovirinae</i>)		
<i>Rotavirus</i>	11	Mamíferos, aves
<i>Orbivirus</i>	10	Mamíferos, aves, artrópodos (como vector)
<i>Mimoreovirus</i>	11	Protistas fotosintéticos marinos
<i>Cardoreovirus</i>	12	Artrópodos
<i>Phytoreovirus</i>	12	Plantas, insectos (como vector)
<i>Seadornavirus</i>	12	Mamíferos, insectos (como vector)

Tabla 1. Familia *Reoviridae*: Tomado de ICTV Master Species List (ICTV, 2012) y ViralZone (Hulo et al., 2011)

Los miembros del género *Orthoreovirus* se caracterizan por poseer un genoma formado por 10 segmentos de dsRNA, y una doble cápside proteica, con unas estructuras en forma de torretas que se extienden desde la cápside interna hasta la cápside externa. El prototipo de este género son los reovirus no fusogénicos de mamífero (MRVs), aunque este género también incluye una serie de virus fusogénicos que pueden infectar a aves, reptiles y mamíferos (Day, 2009).

Los reovirus aviarios (ARVs) son patógenos muy extendidos en aves que generalmente provocan infecciones asintomáticas, aunque algunas cepas virulentas producen altos índices de mortalidad. La primera enfermedad con la que se les relacionó fue la tenosinovitis viral o artritis infecciosa, enfermedad que consiste en una inflamación de las articulaciones de las patas con la aparición de lesiones en los tendones del gastrocnemio. También se han asociado con otras enfermedades entéricas y respiratorias, miocarditis, alteraciones neurológicas, hepatitis y el síndrome de malabsorción (van der Heide, 2000; Jones, 2000; Van de Zande y Kuhn, 2007). Aunque la mayoría de estas patologías no son letales, ralentizan el crecimiento de las aves y reducen, por tanto, la productividad de las explotaciones.

Pese a las semejanzas morfológicas y físico-químicas que presentan los reovirus aviarios con sus homólogos de mamífero (Spandidos y Graham, 1976), ambos grupos se diferencian en patogenicidad, número de proteínas que codifican y varias propiedades biológicas y serológicas, destacando el que sólo los ARVs son fusogénicos y sólo los MRVs tienen actividad hemaglutinante (Benavente y Martínez-Costas, 2007).

2.- ESTRUCTURA DEL REOVIRUS AVIAR

2.1.- El genoma del reovirus aviar

El genoma del ARV está compuesto por 10 segmentos de RNA bicatenario. Estos segmentos se dividen en tres clases según su movilidad electroforética: L (*large* o grandes), M (*medium* o medianos) y S (*small* o pequeños). Las clases L y M están compuestas por 3 segmentos cada una mientras que la clase S consta de 4 segmentos (Spandidos y Graham, 1976).

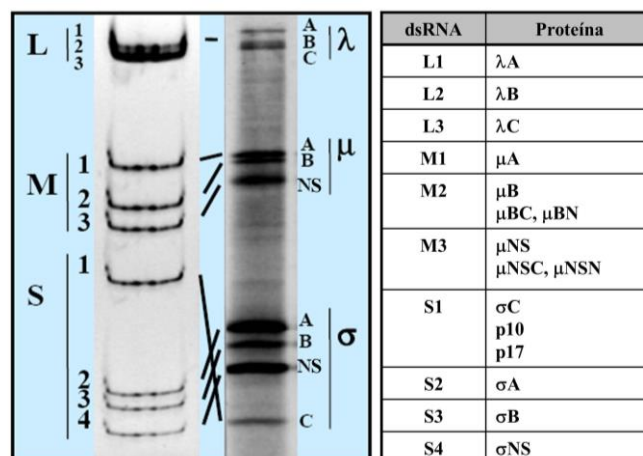


Figura 1. Relación entre los segmentos genómicos del reovirus aviar y las proteínas que codifican. Las proteínas p10 y p17 por su pequeño tamaño no aparecen en este tipo de gel. En la tabla de la derecha se resume la correspondencia entre los segmentos genómicos y las proteínas que codifican.

La hebra positiva de cada segmento genómico es idéntica al mRNA viral que codifica y presenta un cap tipo 1 en su extremo 5', mientras que la hebra negativa posee un grupo pirofosfato en esa posición (Martínez-Costas et al., 1995). La cadena positiva de todos los segmentos genómicos analizados contiene la secuencia 5'GCUUUUU3' en el extremo 5' y la secuencia 5'UCAUC3' en el 3', sugiriendo que estas secuencias tienen papeles relevantes en procesos como la encapsidación, transcripción o replicación (Benavente y Martínez-Costas, 2007). Además de los 10 segmentos de RNA bicatenario, el virión contiene una serie de oligonucleótidos de cadena sencilla ricos en adenina, con función todavía desconocida (Spandidos y Graham, 1976).

2.2.- Proteínas del reovirus aviar

El genoma del ARV codifica para al menos 12 productos de traducción primarios, de los cuales 8 son estructurales, formando parte del virión, y los otros 4 son no estructurales, ya que se expresan en las células infectadas pero no se incorporan a la partícula viral. A esta lista habría que añadir las proteínas que se originan por procesamiento proteolítico de los productos primarios de traducción. Todos los segmentos genómicos codifican un único polipéptido, a excepción del segmento S1 que expresa tres (Bodelón et al., 2001).

Las proteínas se nombran con una letra griega (λ, μ o σ) según la clase del segmento genómico que las codifica (L, M o S respectivamente). A las proteínas estructurales de cada clase se les asigna un sufijo alfabético (A, B o C) en orden inverso a su movilidad electroforética. Los ARVs también expresan cuatro proteínas no

estructurales: las proteínas no estructurales μ NS y σ NS que están codificadas por los segmentos M3 y S4, respectivamente, y las proteínas p10 y p17, que están codificadas por los dos primeros cistrones del segmento genómico S1.

El virión contiene al menos 10 proteínas estructurales distintas, siendo 8 de ellas productos de traducción primarios (λ A, λ B, λ C, μ A, μ B, σ A, σ B, σ C) y las otras dos, μ BN y μ BC, producto del procesamiento proteolítico de μ B (Varela et al., 1996). Además, en células infectadas con ARV se detectan otras dos formas de μ NS, denominadas μ NSC y μ NSN (Busch et al., 2011; Tourís-Otero et al., 2004b).

La proteína λ A, codificada por el gen L1, es la proteína viral de mayor tamaño. 120 copias de esta proteína forman el armazón interno del core o cápside interna. Durante la morfogénesis viral es reclutada directamente por μ NS a las factorías virales (Tourís-Otero et al., 2004a).

La proteína λ B está codificada por el gen L2 y es un componente minoritario de la cápside interna. Su tamaño, distribución y número de copias sugieren que es la RNA polimerasa del virus, sugerencia que está fuertemente apoyada por la homología de secuencia que presenta con la RNA polimerasa de los reovirus de mamífero, la proteína λ 3 (Xu y Coombs, 2008).

La proteína λ C está codificada por el segmento L3 y sus pentámeros forman las torretas en las que se introduce la fibra viral σ C (Zhang et al., 2005). Esta proteína es la guanilil-transferasa del virus y, por tanto, la responsable de la formación del cap de los mRNA virales (Martínez-Costas et al., 1995). Estudios realizados con una proteína λ C recombinante mostraron que la actividad guanililtransferasa reside en el fragmento N-terminal de 42 kDa, mientras que el fragmento de 100 kDa debe poseer actividad metilasa (Hsiao et al., 2002).

La proteína μ A, codificada por el segmento M1, es una proteína minoritaria del core (Martínez-Costas et al., 1997). Su homóloga en reovirus de mamífero, la proteína μ 2, interacciona con los microtúbulos celulares y con μ NS, siendo la responsable de la asociación de las inclusiones virales con los microtúbulos y del aspecto filamentoso de las inclusiones de la mayoría de las cepas de MRV (Parker et al., 2002). Sin embargo, el

hecho de que las inclusiones de ARV sean globulares y no estén asociadas a microtúbulos (Brandariz-Nuñez et al., 2010; Tourís-Otero et al., 2004b) sugiere que μA no interacciona con los microtúbulos. Estudios realizados con una proteína μA recombinante expresada en bacterias demostraron que, al igual que su homóloga de mamífero, esta proteína posee actividad nucleótido trifosfatasa (NTPasa) y RNA trifosfatasa (RTPasa) (Su et al., 2007) y que las regiones implicadas en esas funciones se encuentran muy conservadas (Noad et al., 2006). Estos resultados sugieren que esta proteína actúa como cofactor de la RNA polimerasa viral λB .

La proteína μB es el producto de traducción primario del gen M2 (Varela y Benavente, 1994). La mayoría de las moléculas de μB sintetizadas en células infectadas se procesan para dar lugar a un fragmento pequeño miristoilado N-terminal, denominado μBN , y un fragmento C-terminal más grande, denominado μBC (Varela et al., 1996). Tanto la proteína entera como sus productos proteolíticos se encuentran presentes en los viriones (Martínez-Costas et al., 1997). El hecho de que esta proteína no se procese cuando se expresa mediante traducción *in vitro* o en el sistema baculovirus-células de insecto sugiere que en su procesamiento interviene algún factor viral. Ese factor posiblemente sea σB , dado que esta proteína forma complejos ternarios con μB y μBC (Tourís-Otero et al., 2004a; Varela y Benavente, 1994). La proteína μBC juega un papel importante en la internalización del virus en la célula, puesto que la decapsidación del virus en el lisosoma está acompañada de dos cortes secuenciales cerca del extremo C-terminal de la proteína que generan los péptidos δ y δ' , los cuales parecen ser necesarios para la interacción con la membrana lisosomal y la liberación de los cores transcripcionalmente activos al citoplasma (Duncan, 1996).

La proteína μNS está codificada por el gen M3 del ARV. Esta proteína de 70 kDa posee dos regiones coiled-coil en las posiciones 448-477 y 542-605, que posiblemente estén implicadas en la formación de homo-oligómeros (Brandariz-Nuñez et al., 2010; Tourís-Otero et al., 2004b). Es la única proteína del virus capaz de formar inclusiones cuando se expresa individualmente y esto, sumado a su capacidad para reclutar otras proteínas virales a las inclusiones, indica que debe jugar un papel fundamental en la morfogénesis del ARV (Tourís-Otero et al., 2004a; Tourís-Otero et al., 2004b). Las inclusiones formadas durante la infección con ARV tienen aspecto

globular y su formación no depende del transporte retrógrado a través de los microtúbulos (Brandariz-Nuñez et al., 2010). Una fracción de la proteína μ NS de ARV sufre un corte proteolítico en la célula infectada para dar lugar a un fragmento N-terminal de 15 kDa, denominado μ NSN, y un fragmento C-terminal de 55 kDa denominado μ NSC. Recientemente se ha demostrado que este procesamiento está catalizado por caspasas que se activan durante la apoptosis inducida por el virus (Busch et al., 2011; Rodríguez-Grille et al., 2014). De esta forma, la isoforma μ NSC de ARV se genera por un mecanismo distinto al de su homóloga de MRV, que se produce por iniciación de la traducción en un codón AUG alternativo del mRNA m3 (Wiener et al., 1989).

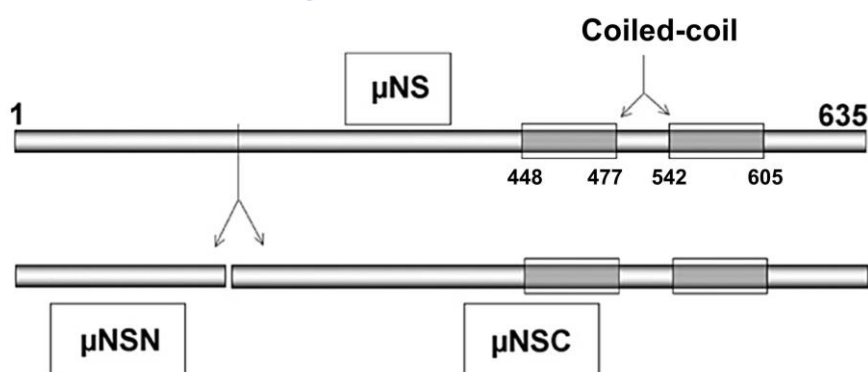


Figura 2. Estructura y procesamiento de la proteína μ NS del reovirus aviar. Se indica la localización de los dos dominios coiled-coil necesarios para la formación de inclusiones y el lugar del procesamiento que origina los dos fragmentos, μ NSN y μ NSC.

La proteína σ A, codificada por el segmento S2, se encuentra situada en la cápside interna, y sus 150 copias se distribuyen en forma de nódulos sobre el armazón formado por la proteína λ A (Martínez-Costas et al., 1997; Zhang et al., 2005). Esta proteína une fuertemente dsRNA de manera independiente de secuencia (Martínez-Costas et al., 2000; Tourís-Otero et al., 2005; Yin et al., 2000). La estructura de σ A ha sido resuelta recientemente (Guardado-Calvo et al., 2008) y en ella se ha detectado una región cargada positivamente en la que la presencia de los residuos de arginina 155 y 273 es necesaria para la interacción con el dsRNA. La unión de σ A al dsRNA es cooperativa y se ha determinado que el tamaño mínimo del dsRNA necesario para que se pueda unir la proteína es de 14-18 pares de bases. Su homóloga en MRV, la proteína σ 2, carece de la capacidad para unir dsRNA, aunque esa función sí la posee otra proteína de MRV, σ 3, homóloga de la proteína σ B. Se cree que la capacidad de σ A para unir dsRNA desempeña un papel fundamental en la resistencia de los ARVs al

interferón (González-López et al., 2003; Martínez-Costas et al., 2000). En células aviares infectadas, σA se encuentra tanto en los cuerpos de inclusión citoplasmáticos como en los nucleolos de la célula, mientras que en células de mamífero se acumula en el nucleoplasma, dejando excluido el nucleolo, lo que podría explicar la poca eficiencia con la que el reovirus aviar replica en células de mamífero. En ambos tipos celulares la entrada de σA al núcleo es independiente de factores virales y citosólicos y no requiere energía, pero sí la interacción con nucleoporinas del poro nuclear (Vázquez-Iglesias et al., 2009; Vázquez-Iglesias et al., 2012).

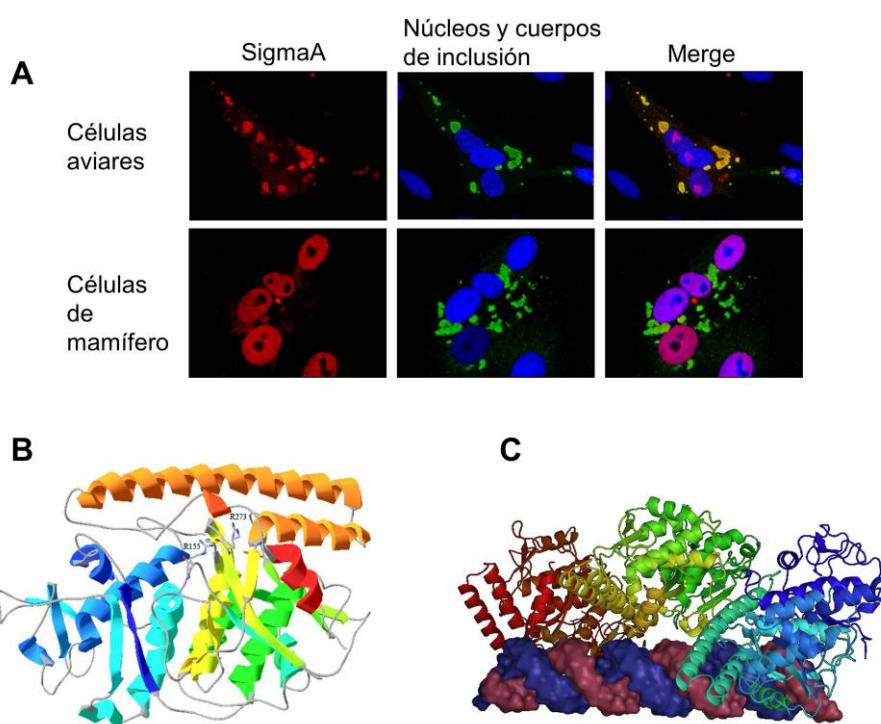


Figura 3. A) Distribución de σA en células aviares (CEF) y de mamífero (VERO) infectadas. La proteína σA se muestra en rojo, los cuerpos de inclusión que forma la proteína μNS en verde y los núcleos en azul. **B) Estructura de σA .** Se indican en la figura la posición de las dos argininas (R155 y R273) que están implicadas en la interacción con el dsRNA. **C) Interacción de la proteína con dsRNA.** Se muestran tres moléculas de σA interaccionando entre ellas y con el dsRNA.

La proteína σB está codificada por el segmento S3 y es un componente mayoritario de la cápside externa (Martínez-Costas et al., 1997; Varela et al., 1996). A diferencia de su homóloga de MRV, $\sigma 3$, no une dsRNA por lo que se cree que no tiene actividad anti-interferón (Tourís-Otero et al., 2005). La proteína σB se asocia en el citosol con μB y μBC formando complejos ternarios hetero-oligoméricos que son los que se incorporan a las partículas virales en formación (Tourís-Otero et al., 2004a; Tourís-Otero et al., 2004b).

La proteína σC está codificada por la tercera pauta de lectura del segmento S1 y es una proteína minoritaria de la cápside externa que se dispone en forma de trímeros en las torretas formadas por λC . Es la proteína viral que interacciona con el receptor celular, aunque sólo lo hace en su forma oligomérica (Grande et al., 2000; Grande et al., 2002; Martínez-Costas et al., 1997). Se trata de la proteína viral que más variación presenta entre cepas y la más inmunogénica, ya que la mayoría de los anticuerpos neutralizantes están dirigidos contra ella (Shapouri et al., 1996b). Mediante cristalografía de rayos X se ha determinado la estructura de gran parte de la proteína (Guardado-Calvo et al., 2005; Guardado-Calvo et al., 2009). La comparación con su homóloga de MRV, la proteína $\sigma 1$, permite dividirla en varias regiones. La primera, que comprende los aminoácidos 1-50, interacciona con las torretas de λC , mientras que la segunda (51-156), que presenta poca homología de secuencia con $\sigma 1$ aunque estructuralmente es muy parecida, adopta una estructura de triple coiled-coil (Guardado-Calvo et al. 2009). Separada de la anterior por una pequeña región bisagra se encuentra la tercera región (residuos 160-191), que está formada por dos repeticiones del motivo triple espiral β (a diferencia de la de MRV en la que está formada por tres repeticiones). La cuarta y última región (residuos 192-326) forma la cabeza globular de la proteína. Está compuesta por un barril β en cada monómero que interacciona con los otros dos y posiblemente sea la región que interaccione con el receptor celular.

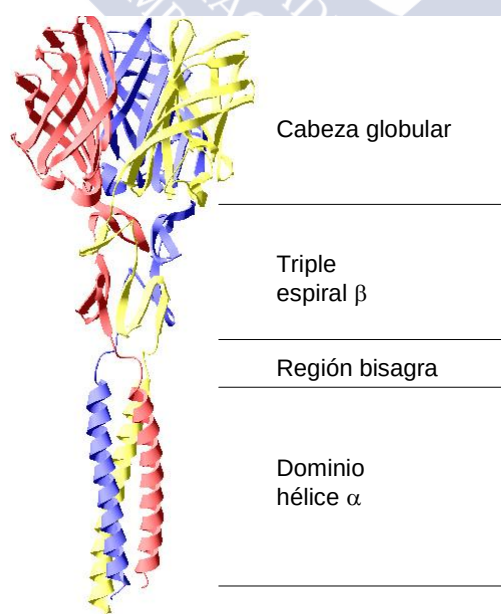


Figura 4: Estructura de σC (residuos 117-326). Se indican a la derecha de la figura los diferentes dominios que se detallan en el texto.

La proteína p10, de 10,3 kDa, está codificada por la primera pauta de lectura del segmento S1. Se trata de una proteína transmembrana de tipo I con un dominio transmembrana central que separa unos dominios intra y extracelular de similar tamaño (Shmulevitz y Duncan, 2000). Esta proteína es la responsable de la fusión celular que se observa durante la infección con ARV (Bodelón et al., 2001; Shmulevitz y Duncan, 2000) y es el prototipo de un nuevo grupo de proteínas de fusión denominadas FAST (*Fusion-Associated Small Transmembrane proteins*), que no requieren la presencia de la proteína en las dos membranas a fusionar (Shmulevitz et al., 2004). La expresión de esta proteína en células eucariotas y procariotas altera la permeabilidad de la membrana, siendo esta actividad viroporina independiente del dominio fusogénico N-terminal, indicando que la desestabilización y la fusión de membranas están mediadas por dominios distintos (Bodelón et al., 2002). La alteración de la membrana que provoca p10 puede activar la apoptosis (Salsman et al., 2005).

La proteína p17 está codificada por la segunda pauta de lectura del gen S1. Se trata de una proteína que no tiene homología con ninguna otra proteína viral o celular conocida. Esta proteína se acumula en el núcleo de células infectadas y transfectadas, lo que se debe a la presencia de una secuencia de localización nuclear próxima a su extremo C-terminal. Es una proteína que recircula entre el núcleo y el citoplasma y su presencia en el núcleo depende del estado transcripcional de la célula (Costas et al., 2005).

La proteína σ NS, codificada por el segmento S4 (Schnitzer, 1985; Varela y Benavente, 1994), es una proteína no estructural que une ssRNA de manera independiente de secuencia, para lo que es necesario un correcto plegamiento de la proteína (Tourís-Otero et al., 2005). En ausencia de ssRNA forma homodímeros u homotrímeros. Esta proteína forma grandes complejos ribonucleoproteicos en las células, que son reclutados a los cuerpos de inclusión por interacción directa con μ NS. Su capacidad para unir RNA y acumularse en los cuerpos de inclusión sugiere que σ NS juega un papel importante en el empaquetamiento del RNA viral y en la replicación del reovirus aviar.

2.3.- Estructura de la partícula viral

Los viriones de reovirus aviar son partículas icosaédricas, con un diámetro externo de 85 nm y una densidad de 1,37 g/ml (Spandidos y Graham, 1976; Zhang et al., 2005). Se han empleado diversas técnicas para determinar la distribución de las proteínas en el virión (Martínez-Costas et al., 1997) y se ha resuelto su estructura mediante criomicroscopía (Zhang et al., 2005). Gracias a estos estudios se ha podido determinar que las proteínas λA , λB , μA y σA son componentes de la cápside interna, que μB , μBC , μBN , σB y σC forman la cápside externa y que λC forma las torretas que se extienden desde la cápside interna hasta la cápside externa (Figura 5).

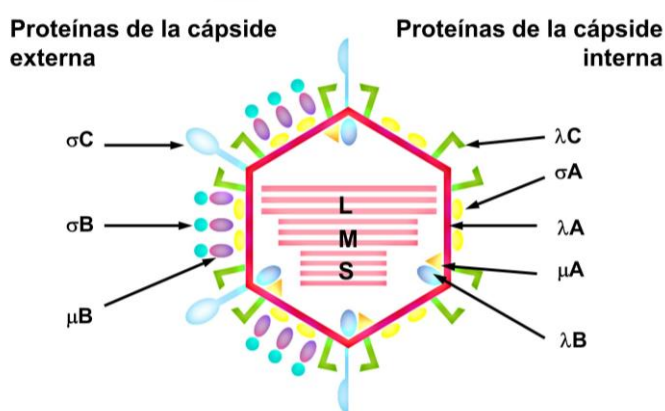


Figura 5. Representación esquemática del virión de reovirus aviar.

Mediante tratamientos *in vitro* de los reoviriones con proteasas se pueden conseguir dos tipos de partículas subvirales: las partículas subvirales intermedias (ISVPs) y los cores (Grande y Benavente, 2000; Martínez-Costas et al., 1997). Las ISVPs carecen de las proteínas de la cápside externa μB , μBC , μBN y σB , pero no de λC ni σC , por lo que se trata de partículas infecciosas y transcripcionalmente activas. Los cores están compuestos únicamente por λA , λB , μA , σA y λC y, aunque son transcripcionalmente activos, no son infectivos, por carecer de la proteína de unión a las células σC .

3.- EL CICLO REPLICATIVO DEL REOVIRUS AVIAR

3.1.- Entrada y decapsidación

La unión del virus a las células está mediada por interacciones específicas entre la proteína σC y los receptores de la superficie celular (Grande et al., 2000; Shapouri et

al., 1996a). Aunque el receptor celular para los ARVs no ha sido identificado todavía, los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que se trata de una proteína de la superficie celular y que en la unión no participan grupos conjugados, puesto que la adsorción del virus sólo se inhibe por pretratamiento de las células con proteasas, pero no con glicosidasas, lipasas, EDTA o periodato sódico. Esto supone una diferencia con los MRVs, que unen ácido siálico de las proteínas de superficie. Esto, y el hecho de que los MRVs sean incapaces de unirse a fibroblastos embrionarios de pollo sugiere que los reovirus aviares y de mamífero tienen receptores distintos (Barton et al., 2001). El receptor parece ser una proteína ubicua, puesto que los ARVs también son capaces de adherirse y replicar en líneas celulares de mamífero.

La observación al microscopio electrónico de células infectadas con ARV muestra que el virus entra en los fibroblastos embrionarios de pollo por endocitosis mediada por receptor (Figura 6).

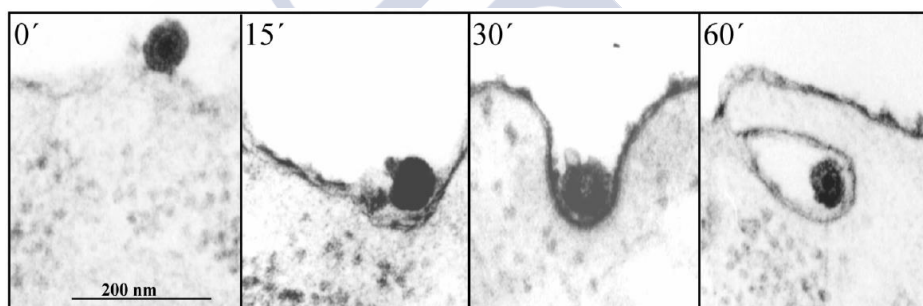


Figura 6. Observación al microscopio electrónico de la entrada del reovirus aviar.

La decapsidación del virus tiene lugar en el endosoma, y requiere tanto la acidificación del endosoma como el procesamiento proteolítico de la proteína mayoritaria μ BC para generar los péptidos δ y δ' (Duncan, 1996; Labrada et al., 2002). El mecanismo concreto por el cual los cores atraviesan la membrana endosomal y alcanzan el citoplasma todavía se desconoce.

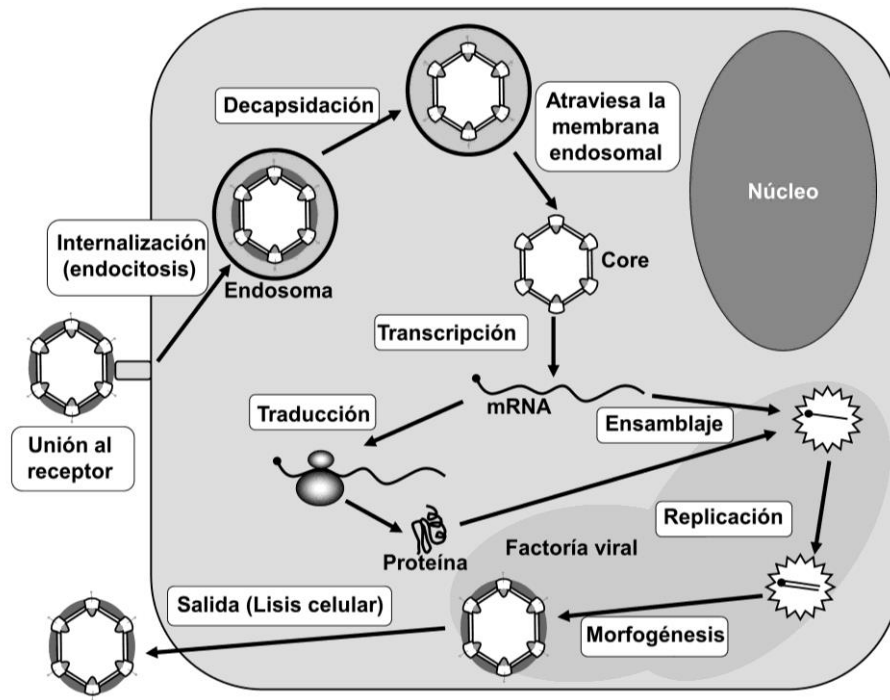


Figura 7. Modelo propuesto para el ciclo replicativo del reovirus aviar.

3.2.- Expresión génica

La expresión de los genes virales comienza con la síntesis de los 10 mRNAs, un proceso que está catalizado por la RNA polimerasa dependiente de RNA, la proteína λB , que utiliza como molde la cadena negativa de los segmentos genómicos. Aunque los reoviriones intactos poseen actividad RNA polimerasa, son incapaces de producir transcritos enteros, por lo que parece que las características físicas de la partícula viral regulan la actividad de λB (Martínez-Costas et al., 1995).

Los mRNA virales poseen un cap de tipo 1 en su extremo 5', no están poliadenilados y presentan en ambos extremos unas regiones cortas no codificantes (Martínez-Costas et al., 1995). Los mRNAs se sintetizan en el interior del core y adquieren el cap al salir a través de las torretas formadas por pentámeros de λC . Los mRNAs virales sirven para programar la síntesis de las proteínas virales y también como molde para la síntesis de las hebras negativas de los genomas de la progenie viral. A excepción del gen S1, todos los mRNAs de ARV son monocistrónicos, y su traducción se inicia en el AUG más próximo al extremo 5', que se encuentra en un contexto fuerte de iniciación de la traducción según la regla de Kozak (Kozak, 1991). El mRNA s1 es tricistrónico, con tres pautas de lectura fuera de fase y solapantes que codifican para las proteínas p10, p17 y σC (Bodelón et al., 2001). La expresión de σC parece depender en parte del *leaky scanning* del ribosoma, en el que el ribosoma ignora

los codones de iniciación de los dos primeros cistrones por no encontrarse en un contexto óptimo y empieza a traducir la tercera pauta de lectura, y en parte de una secuencia reguladora complementaria al rRNA 18S que favorece, de manera independiente al *leaky scanning* pero dependiente del cap, la traducción de σC (Racine et al., 2007; Racine y Duncan, 2010). Este mecanismo permite al virus expresar una mayor cantidad de σC que de las proteínas p10 y p17, a pesar de que σC está codificada por la tercera pauta de lectura.

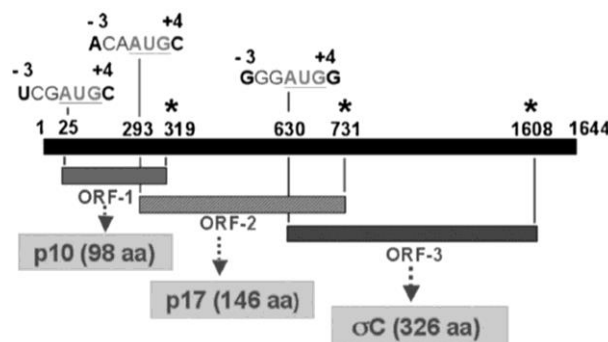


Figura 8. Organización del mRNA s1 del reovirus aviar. Se indica la posición de los tres cistrones y el contexto del AUG de iniciación de cada uno de ellos.

Pese a que los transcritos virales parecen producirse en igual proporción, existen grandes diferencias en las cantidades de las proteínas virales presentes en la célula infectada, siendo σB , μBC y σNS las más abundantes y λB , μA y las tres proteínas codificadas por el gen S1 las menos abundantes. Esto sugiere la existencia de una regulación de la expresión a nivel traduccional, quizá debida a características estructurales y conformacionales de los mRNAs virales.

A tiempos tardíos de infección apenas se detecta síntesis de proteínas celulares, aunque se mantiene la de las proteínas virales. Los mecanismos por los que se produce esta inhibición o *shutoff* de la síntesis de proteínas celulares todavía se desconocen.

3.3.- Morfogénesis y salida

Todos los miembros de la familia *Reoviridae* se ensamblan en inclusiones citoplasmáticas densas denominadas viroplasma, inclusiones virales o factorías virales. Estas inclusiones no están asociadas a orgánulos ni membranas y contienen proteínas estructurales y no estructurales, además de partículas virales parcial o totalmente ensambladas (Rhim et al., 1962; Silverstein y Schur, 1970). La proteína μNS es la única proteína de ARV capaz de formar inclusiones por sí sola, y puede reclutar directamente a esas estructuras a las proteínas σNS , λA y λC . El ensamblaje de los nuevos viriones

tiene lugar exclusivamente dentro de las factorías virales, y la incorporación de las proteínas virales a esas estructuras es un proceso controlado y selectivo (Tourís-Otero et al., 2004a). El reclutamiento de los mRNAs que servirán de molde para la síntesis de los genomas podría estar mediado por σ NS, puesto que una RNA de cadena sencilla e interacciona con μ NS. Se cree que la síntesis de las hebras negativas de los segmentos genómicos tiene lugar en el interior de los viriones en formación, evitando así la exposición del RNA de doble cadena al citoplasma y la activación de los sistemas de defensa de la célula. La RNA polimerasa viral, λ B, usa los mRNAs como molde para la síntesis de las hebras negativas.

Poco se sabe acerca de los mecanismos de salida de la célula infectada de las nuevas partículas virales, aunque se pueden esperar dos formas de diseminación. Por un lado, las nuevas partículas virales podrían liberarse por lisis celular, mientras que, por otro lado, la fusión celular inducida por p10 permitiría la diseminación del virus a células adyacentes sin que queden expuestos al sistema inmune del hospedador (Bodelón et al., 2002; Shmulevitz y Duncan, 2000). La capacidad de los reovirus para formar sincitios parece estar relacionada con su patogenicidad, puesto que las cepas con mayor potencial fusogénico suelen ser más virulentas (Duncan y Sullivan, 1998).

4.- EL SISTEMA DEL INTERFERÓN Y EL ESTADO ANTIVIRAL

4.1.- El sistema del interferón y los interferones

El sistema del interferón, encuadrado dentro de la defensa inmune innata, es la primera barrera defensiva de los vertebrados frente a una infección viral. El interferón (IFN) se describió por primera vez en 1957 (Isaacs y Lindenmann, 1957) como un factor soluble secretado por células aviares infectadas con el virus influenza que era capaz de inhibir la replicación de virus homólogos y heterólogos y, actualmente, el término engloba a un grupo de citoquinas secretadas con actividad antiviral. La expresión de los genes del IFN está reprimida en ausencia de estímulo, pero se activa rápidamente en respuesta a una infección viral y a otros estímulos, como dsRNA. Los IFNs son secretados fuera de la célula y, al interactuar con la propia célula que los sintetiza o con células vecinas, inducen en éstas un estado antiviral o ayudan a coordinar la respuesta inmune. Además de su papel en el sistema inmune, los interferones están

implicados en la regulación del crecimiento, la diferenciación celular, y la apoptosis (Randall y Goodbourn, 2008).

Los IFNs presentan cierta especificidad de especie, y son activos frente a muchos virus distintos, aunque su actividad varía dependiendo del sistema célula-virus. Los IFNs son imprescindibles para el control de las infecciones virales en vertebrados, independientemente de la presencia de un sistema inmune adaptativo normal, lo que hace que muchos virus hayan desarrollado estrategias para contrarrestar los efectos de estas citoquinas. Los IFNs conocidos se agrupan en tres clases en función del receptor celular al que se unen:

- **IFNs tipo I o virales:** son producidos por la mayoría de los tipos celulares. Se caracterizan porque sus genes carecen de intrones, expresan glicoproteínas de 15-23 kDa que se unen al receptor IFNAR, y son los que presentan mayor actividad antiviral.
- **IFNs tipo II o inmunes:** sólo lo producen determinadas células del sistema inmunitario y su papel principal es la regulación de la respuesta inmune celular. Es necesario para la activación de macrófagos y para la defensa contra bacterias intracelulares, aunque también posee actividad antiviral. Su forma activa es un dímero, y su gen posee tres intrones.
- **IFNs tipo III:** son una serie de interferones que se han descubierto recientemente que son inducidos por virus y presentan actividad antiviral (aunque menos potente que la de los tipo I), pero se unen a un receptor diferente que los de tipo I. Sus genes poseen intrones y son activos como monómeros.

En pollo se han identificado interferones de tipo I (IFN α , IFN β , IFN κ e IFN ω), de tipo II (IFN γ) y de tipo III (IFN λ) (Kaiser, 2010). El primer gen del IFN de pollo se clonó en 1994 (Sekellick et al., 1994) y, pese a su escasa homología de secuencia con el IFN de mamífero, acabó identificándose como el primer IFN α de pollo. El análisis del genoma del pollo reveló la existencia de al menos 10 genes para el IFN α y uno para el IFN β (Schultz et al., 2004). El IFN α de pollo presenta una actividad antiviral mayor que el IFN β y, salvo algunas excepciones, tiene un efecto mayor que éste sobre la inducción de los genes estimulados por IFN (Qu et al., 2013; Schwarz et al., 2004).

El sistema del IFN puede dividirse en tres etapas:

- i) Inducción de la síntesis de IFN y su secreción fuera de la célula
- ii) Señalización e inducción de los genes de respuesta al IFN (ISGs) para la creación de un estado antiviral latente.
- iii) Infección por virus y activación del estado antiviral

4.2.- Detección de la infección viral

El primer paso del sistema del IFN consiste en la detección de las partículas virales en el interior de la célula infectada. Esta detección la realizan unas proteínas denominadas receptores de reconocimiento de patrón (*pattern-recognition receptors*, o PRRs), los cuales al identificar componentes virales inician unas rutas de señalización que, mediante la activación de factores de transcripción específicos, conducen a la expresión de diversas proteínas, entre ellas los IFNs. Algunos PRRs, como la proteína quinasa R (PKR) y las oligoadenilato sintetasas (OASs) no sólo realizan función de sensores en la detección de componentes virales, sino que también poseen actividad antiviral. Los PRRs detectan en el interior de la célula componentes virales, que no están presentes en células sin infectar o que no suelen encontrarse en algún compartimento celular específico (Stetson y Medzhitov, 2006; Unterholzner y Bowie, 2008). Estos componentes, denominados en su conjunto PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos), suelen ser ácidos nucleicos de origen viral, aunque también pueden ser proteínas virales. Uno de los PAMPs más estudiados es el dsRNA, una molécula que se origina durante la replicación de muchos tipos de virus. Este dsRNA puede ser el que está presente en el genoma de los virus dsRNA, el que se genera como intermediario durante la replicación de virus ssRNA, el que se forma durante la transcripción solapante de genes presentes en hebras complementarias en virus de DNA, o regiones estructuradas de RNAs virales monocatenarios (Jacobs y Langland, 1996). Los PRRs también pueden detectar otros ácidos nucleicos, como los que contienen dímeros CpG sin metilar y que se encuentran en el genoma de algunos virus de dsDNA como el HSV, o ssRNAs carentes de cap y con extremos 5' di o trifosfato.

Actualmente se reconocen 3 tipos de PRRs: los *Toll-like receptors* (TLRs), los *RIG-I-like receptors* (RLRs) y los *nucleotide oligomerization domain like receptors* (NLRs) (Takeuchi y Akira, 2009). Los TLRs son receptores transmembrana que se encuentran generalmente en el interior de vesículas citoplasmáticas, como los endosomas y el retículo endoplasmático, aunque algunos también están presentes en la

membrana celular. Los TLRs detectan partículas virales degradadas presentes en endosomas y en cuerpos apoptóticos, y su expresión es mayor en algunos tipos celulares especializados, como macrófagos y células dendríticas, aunque algunos también están presentes en fibroblastos (Stetson y Medzhitov, 2006). Los NLRs son sensores citoplasmáticos que al unirse a su ligando, oligomerizan y activan respuestas inflamatorias y apoptóticas. Los RLRs, que incluyen a varias helicasas como MDA5 y RIG-I, reconocen RNAs citosólicos, estando la proteína MDA5 especializada en el reconocimiento de moléculas grandes de dsRNA, o moléculas en las que se alternan regiones de ssRNA y dsRNA, y la proteína RIG-I en el reconocimiento de moléculas pequeñas de dsRNA y moléculas de ssRNA con extremos 5' trifosfato (Takeuchi y Akira, 2008). Curiosamente, en el genoma de pollo no se ha encontrado el gen de la helicasa RIG-I, por lo que la ausencia de esta helicasa podría ser la causa de la mayor susceptibilidad de estas aves frente al virus de la gripe aviar (Barber et al., 2010; Barber et al., 2012; Karpala et al., 2011).

La interacción de los TLRs o de los RLRs con sus ligandos provoca la activación de rutas de señalización que activan a factores de transcripción, entre los que destacan los miembros de la familia IRF (factor regulador del IFN) y de la familia NF- κ B (factor nuclear kappa de células B).

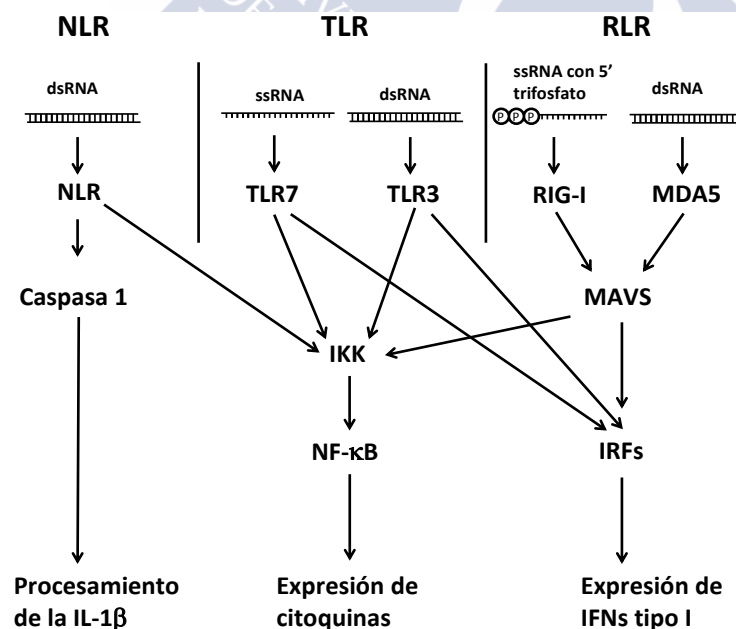


Figura 9. PRRs implicados en la detección de RNA viral y sus rutas de señalización. Adaptado de Takeuchi y Akira (2009). Se muestra un esquema de las principales vías de señalización activadas por la presencia de RNAs virales en células de mamífero.

En células de mamífero, la proteína IRF3 se expresa constitutivamente y se activa por fosforilación tras la activación de los RLRs y TLRs. La proteína fosforilada

homodimeriza o heterodimeriza con IRF7 y los dímeros resultantes entran al núcleo y activan la transcripción del IFN β y de otros ISGs (Paun y Pitha, 2007). En pollo se han identificado varios miembros de la familia IRF, entre ellos chIRF3 (citado a veces en la literatura como IRF7) que, aunque no es homólogo ni de IRF3 ni de IRF7, se une a las mismas secuencias ISRE (elementos de respuesta estimulados por IFN) que se encuentran en las regiones reguladoras de los genes inducidos por IFN (Grant et al., 2000).

Los factores de transcripción de la familia NF- κ B regulan multitud de procesos celulares. En ausencia de estimulación, estos factores se encuentran en forma inactiva en el citoplasma unidos a una proteína inhibidora de la familia I κ B. Las rutas de señalización iniciadas por RLRs, NLRs y TLRs activan a las quinasas IKK (quinasa de I κ B) provocando la fosforilación de I κ B y su degradación, lo que deja al dímero de NF- κ B libre para ir al núcleo e inducir la expresión de distintos genes, entre ellos el del IFN β , pero no el del IFN α (Hayden y Ghosh, 2008; Oeckinghaus y Ghosh, 2009). En el genoma de pollo se han encontrado homólogos de la mayoría de los miembros de esta familia, aunque se han descrito diferencias en la distribución tisular de alguno de ellos (Huguet et al., 1997; Piffat et al., 2001).

4.3.- Señalización por interferones y creación y activación del estado antiviral

Todos los IFNs de tipo I se unen al mismo receptor de la superficie celular formado por dos subunidades, IFNAR-1 e IFNAR-2. La interacción de los IFNs de tipo I con su receptor provoca su heterodimerización y la activación de rutas de transducción de señales a través de proteínas JAK-STAT, aunque también parece activar otras rutas, menos estudiadas, que implican a PKR, MAPK y PI3K (Samuel, 2001). A través de la vía JAK-STAT se induce la formación del complejo ISGF3 (factor génico 3 estimulado por IFN), un trímero formado por la asociación de las proteínas IRF9, STAT-1 y STAT-2. Aunque aún no se ha encontrado un homólogo de IRF9 en pollo, se cree que su papel lo podría desempeñar algún otro miembro de la familia (Huang et al., 2010; Nehyba et al., 2009). El complejo ISGF3 penetra en el núcleo y activa la transcripción de unos 300 genes que poseen secuencias ISRE en sus regiones promotoras, conocidos como genes estimulados por IFN (ISGs). Aunque se desconoce la función concreta de muchas de las proteínas expresadas por estos genes, se sabe que algunas poseen actividad antiviral, actuando principalmente mediante la inhibición de la síntesis de polipéptidos virales

(Samuel, 2001). Además, los IFNs pueden tener otros efectos en la célula, como inducir la producción de algunos miRNAs, detener el ciclo celular, o generar un estado proapoptótico (Randall y Goodbourn, 2008).

Los principales efectores antivirales del sistema del IFN son la proteína quinasa dependiente de dsRNA (PKR), el sistema oligoadenilato sintetasa (OAS)/RNasaL, la adenosina desaminasa (ADAR1) y las GTPasas de la familia Mx (Samuel, 2001). La señalización por los IFNs de tipo I también provoca un incremento en la expresión del factor de transcripción IRF7 en células de mamífero, lo que induce la expresión de genes del IFN α y el mantenimiento de la expresión del gen del IFN β .

Muchas de estas proteínas, como PKR y OAS, se expresan en forma inactiva en respuesta al IFN, creando así un estado antiviral latente en las células adyacentes a la infectada. La infección posterior de esas células por un virus conduce a la activación de esas proteínas y del estado antiviral.

Sistema OAS/RNasaL

Las 2',5'-oligoadenilato sintetetas son un grupo de proteínas inducidas por IFN, que al unirse a dsRNA oligomerizan y se activan, produciendo oligorribonucleótidos de adenina con enlaces 2'-5', con la estructura general pppA(2'p5'A)_n. Estos oligonucleótidos interactúan con monómeros de RNasaL, provocando su dimerización y activación. La RNasaL es una endorribonucleasa que corta moléculas de ssRNA preferentemente en zonas ricas en U, y generalmente tras UU o UA, dejando extremos 5'-OH y 3'-P. Aunque se cree que presenta cierta preferencia por los RNAs virales, también degrada los celulares, impidiendo la traducción de los mensajeros y dañando los ribosomas, por lo que su actividad continuada provoca el bloqueo de la síntesis de proteínas y la inducción de apoptosis (Silverman, 2007). En pollo se ha identificado un gen para la OAS con dos alelos que dan lugar a proteínas de diferente tamaño y diferente actividad sintetasa, aunque ambas presentan actividad antiviral (Goossens et al., 2013).

Adenosina desaminasa específica de RNA (ADAR1)

El grupo de las proteínas ADAR incluye varias proteínas que catalizan la reacción de desaminación de la adenosina en el carbono 6 para dar inosina en regiones con estructura de dsRNA. Este cambio desestabiliza el emparejamiento de bases y provoca la introducción de mutaciones dado que la inosina es reconocida como

Introducción

guanosina por polimerasas y ribosomas. La proteína ADAR1 de mamífero es inducible por IFN, aunque algunas de sus isoformas se expresan de manera constitutiva. Pese a considerarse una proteína antiviral, porque puede introducir mutaciones fatales en el genoma viral, en ocasiones las mutaciones generadas pueden ser necesarias para el progreso del ciclo viral, o pueden reducir la activación de PKR al desestabilizar el dsRNA que le sirve como activador (Samuel, 2001).

Proteínas Mx

Las proteínas Mx son un grupo de GTPasas de alto peso molecular pertenecientes a la superfamilia de la dinamina. No todas presentan actividad antiviral, y se considera que la actividad GTPasa es necesaria para su función. Su mecanismo de actuación se desconoce, aunque se cree que podrían unirse a componentes virales para su retención y degradación en el citoplasma (Haller et al., 2007). En pollo se ha detectado un gen polimórfico que podría ser activo contra algunos virus (Ko et al., 2002; Sasaki et al., 2013), aunque otros estudios cuestionan su actividad antiviral por carecer de actividad GTPasa (Benfield et al., 2010).

PKR

La proteína quinasa R (PKR) es inducida por IFN y se sintetiza en forma latente. Al interactuar con dsRNA se activa y provoca una inhibición generalizada de la síntesis de proteínas. La PKR es una proteína fundamental en la respuesta antiviral, aunque también interviene en otros procesos como la regulación de la proliferación celular y la apoptosis.

Esta proteína posee en su región N-terminal dos dominios de unión a dsRNA, dsRBM1 y dsRBM2, unidos por un espaciador de unos 20 aminoácidos con estructura flexible, lo que permite la unión simultánea de los dos dsRBMs a una hélice de dsRNA A. En el extremo carboxilo posee un dominio serina-treonina quinasa, semejante al presente en otras quinasas que fosforilan a la subunidad α del factor de iniciación de la traducción eIF2, como GCN2, HRI o PERK (Williams, 1999). Actualmente se la considera una quinasa dual, ya que también es capaz de fosforilar residuos de tirosina (Su et al., 2006).

Su activación mediante la unión a dsRNA implica su dimerización y autofosforilación. Aunque por lo general el dsRNA actúa como activador, puede comportarse como inhibidor cuando se trata de moléculas muy pequeñas o muy grandes

o si su concentración es muy elevada, ya que la probabilidad de que dos monómeros se encuentren en la misma hebra disminuye (Williams, 1999). La unión de PKR a dsRNA libera el dominio catalítico y permite la dimerización y autofosforilación de la quinasa en varias serinas, treoninas y tirosinas. Para la activación de la PKR humana basta con la fosforilación de las treoninas 446 y 451, mientras que las fosforilaciones en otros residuos estabilizan el dímero, modificando su afinidad por el sustrato o aumentando su actividad (Romano et al., 1998a; Su et al., 2006).

Se han descrito otros mecanismos de activación de PKR, como la unión a polianiones como la heparina, la degradación por caspasas del dominio N-terminal y la interacción con la proteína PACT de mamífero, de la que de momento no se ha identificado su homóloga en pollo.

El sustrato mejor caracterizado de PKR es la subunidad α del factor de iniciación de la traducción eIF2, el cual media la unión del metionil-tRNA iniciador a la subunidad ribosomal 40S. Este factor es activo únicamente cuando está unido a GTP y, tras el posicionamiento de la subunidad ribosomal 40S sobre el codón de iniciación y la entrada de la subunidad 60S, se libera unido a GDP. La regeneración de la forma activa, eIF2 α -GTP, está catalizada por el factor de iniciación eIF2B, un factor intercambiador de guaninas cuya concentración en la célula es mucho menor que la del eIF2. La fosforilación de la subunidad α de eIF2 en la serina 51 lo convierte en un potente inhibidor competitivo del eIF2B y, ya que éste se encuentra en menor concentración en las células, la fosforilación de una pequeña fracción de eIF2 α es suficiente para bloquear la actividad de eIF2B e inhibir la traducción de la mayoría de los mensajeros celulares. Una vez retirado el estímulo que causó el estrés, la traducción se recupera por la desfosforilación de eIF2 α , la cual está catalizada por la fosfatasa PP1 (García et al., 2007; Proud, 2005).

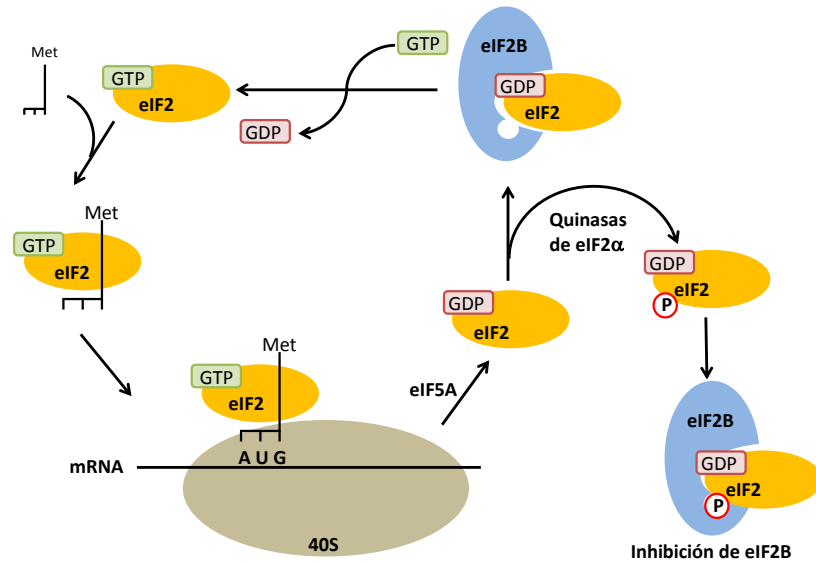


Figura 10. Regulación de la traducción a través de la fosforilación de eIF2

La activación de PKR afecta también a la activación de algunos factores de transcripción, como IRF1, IRF9, STAT1 o STAT3. La activación de NF- κ B se reduce en células que carecen de PKR, aunque se desconoce si PKR activa a las IKKs directamente o lo hace a través de otras proteínas, ni si es necesaria la actividad catalítica de PKR para esta función (García et al., 2007).

Siendo PKR un elemento clave de la respuesta antiviral, muchos virus han desarrollado estrategias para evitar la inhibición de la síntesis de las proteínas virales mediada por esta quinasa. Los virus no son los únicos que expresan inhibidores de PKR ya que algunas proteínas celulares como p58^{IPK}, o las chaperonas Hsp70 y Hsp90 actúan también como inhibidores de PKR al prevenir su dimerización o fosforilación (García et al., 2007).

En la siguiente tabla se muestran ejemplos de proteínas virales que bloquean los efectos antivirales de PKR mediante diversos mecanismos:

Mecanismo		Virus	Producto génico
INHIBICIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE PKR	Degradación de PKR	Poliovirus	Proteasa (activación de proteasa celular)
	Secuestro del dsRNA activador	Vaccinia	E3L
		Reovirus	$\sigma 3$
		Influenza	NS1
		Rotavirus	NSP3, NSP5
		Herpes Simplex	Us11
		EBV	SM
	RNA inhibidor	EBV	EBER RNA
		Adenovirus	VAI I, VAI II
		HCV	IRES
	Interacción con PKR	HCV	NS5A, E2
		Influenza	Activación de la p58 ^{IPK} celular
		Vaccinia	E3L
		Herpes Simplex	Us11
		EBV	SM
		HHV-8	v-IRF2
EVITAR LA ACUMULACIÓN DE eIF2 α FOSFORILADO	Inhibidor competitivo (pseudosustrato)	Vaccinia	K3L
		<i>Ambystoma tigrinum</i> virus	ReIF2H
		HIV	Tat
	Activación de la fosfatasa PP1	Herpes virus	$\gamma_{34.5}$
		Papilloma virus	E6
		SV40	Antígeno T grande
TRADUCCIÓN INDEPENDIENTE DE eIF2 α	RNA de estructura compleja	Semliki Forest Virus y Sindbis virus (Alphavirus)	DLP (1)
		Cricket paralysis virus (Picornavirus)	IRES del segundo cistón (2)

Tabla 2. Mecanismos de evasión de PKR

(1) Ventoso et al., (2006)

(2) Pestova y Hellen, (2003)

Todo lo demás, adaptado de Langland et al., (2006)

5.- REOVIRUS Y RESPUESTA CELULAR

5.1.- Reovirus de mamífero

La respuesta celular ante la infección con MRV presenta grandes diferencias según la cepa de virus y la línea celular utilizadas. Hay cepas reovirales que provocan una fuerte inhibición de la síntesis de las proteínas celulares (*shutoff*), mientras que otras no la producen. Estas diferencias parecen guardar relación con la diferente afinidad de

$\sigma 3$ por $\mu 1/\mu 1C$, ya que la interacción de $\sigma 3$ con estas proteínas de la cápside del virión disminuye su capacidad para unir y secuestrar dsRNA. Así, se ha propuesto que, en las cepas con baja afinidad, la proteína $\sigma 3$ se encuentra dispersa en el citoplasma, donde une y secuestra el dsRNA, previniendo la activación de PKR y evitando el *shutoff*, mientras que en las que tiene alta afinidad, se concentra en las factorías virales, con lo que PKR se activa y se inhibe la síntesis de proteínas celulares (Schmechel et al., 1997). En el *shutoff* provocado por la infección con MRV están implicadas tanto la PKR como la RNasaL (Smith et al., 2005) y la replicación del reovirus en células incapaces de fosforilar eIF2 α se ve perjudicada, posiblemente porque en estas células los mRNAs virales tienen que competir con los celulares por la maquinaria traduccional de la célula (Smith et al., 2006).

En cuanto a la capacidad para inducir la producción de IFN β , también existen diferencias entre cepas, sin que exista relación entre su capacidad para producir *shutoff* y para inducir IFN. RIG-I es el sensor más importante durante la infección con MRV de fibroblastos embrionarios de ratón, aunque no se descarta que MDA5 y TLR3 puedan ser importantes en otros tipos celulares (Holm et al., 2007). Algunas cepas son capaces de inhibir la producción de IFN, llegando a alterar la distribución de factores de transcripción (Zurney et al., 2009), mientras que otras parecen estimularla (Stebbing et al., 2014).

Los MRVs también inducen apoptosis, por un mecanismo independiente de la inducción de IFN. Durante la infección se activa tanto la ruta apoptótica extrínseca como la intrínseca (Clarke y Tyler, 2003; Knowlton et al., 2012). La actividad proapoptótica de los MRVs varía de unas cepas a otras (Knowlton et al., 2012) y ha sido relacionada con la proteína $\sigma 1$, que interacciona con el receptor, y con las proteínas de la cápside externa $\mu 2/\mu 2C$, implicadas en la decapsidación, y no parece depender de la síntesis de proteínas virales o de la presencia de RNA viral.

5.2.- Reovirus aviar

El ARV se ha empleado como inductor de la producción de IFN en CEF envejecidos para obtener grandes cantidades de IFN de pollo, observándose que el virus inactivado con UV también es capaz de producirlo (Ellis et al., 1983; Winship y Marcus, 1980). La capacidad para inducir la IL-1 β en macrófagos de pollo también ha sido estudiada, y se ha descrito una inducción temprana transitoria dependiente de la

decapsidación y otra tardía más persistente y dependiente de la transcripción de los mensajeros virales (Wu et al., 2008).

Pese a su capacidad para inducir citoquinas, el ARV es muy resistente a la actividad antiviral del interferón y en esta resistencia parece que está implicada la proteína σA , una proteína que une fuertemente dsRNA (González-López et al., 2003; Martínez-Costas et al., 2000). La resistencia de los reovirus aviares frente al IFN parece depender de su capacidad para prevenir la activación de PKR, puesto que si ésta se activa antes de la infección, disminuye considerablemente la producción de virus (Marcus y Sekellick, 2001).

La infección por ARV también activa el programa apoptótico en las células infectadas por un mecanismo dependiente de la decapsidación del virus e independiente de la expresión de genes virales (Labrada et al., 2002).

6.- VIRUS VACCINIA Y VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR

6.1.- Virus vaccinia

El virus vaccinia, perteneciente al género *Orthopoxvirus* de la familia *Poxviridae*, es un virus envuelto con un genoma de dsDNA de cerca de 200 kb que expresa más de 200 genes. Se trata de un virus de replicación citoplasmática, en el que la expresión de sus genes está regulada temporalmente, por lo que estos se clasifican en genes tempranos, que se expresan antes de la replicación de su genoma; genes intermedios, que dependen de los factores de transcripción expresados por los genes tempranos y de la replicación del genoma y los genes tardíos, que están regulados por los factores de transcripción codificados por los genes intermedios (Moss, 2007).

Este virus expresa gran número de proteínas para controlar la respuesta celular, interfiriendo con la regulación de la apoptosis y la generación del estado antiviral a varios niveles (Haga y Bowie, 2005; Perdiguero y Esteban, 2009; Smith et al., 2013). Entre los elementos que regulan el estado antiviral se encuentran proteínas que bloquean las rutas de señalización desde los PRRs o los IFNs hasta los factores de transcripción, proteínas secretadas que secuestran los IFNs, o proteínas que inactivan a las proteínas efectoras del estado antiviral. Entre estas últimas destacan las proteínas E3L y K3L, dos proteínas que impiden la acumulación de eIF2 α fosforilado mediante el secuestro del dsRNA y la inhibición de la activación de PKR mediante interacción con ella en el caso

de E3L (Chang et al., 1992; Romano et al., 1998b), o actuando como pseudosustrato de las quinasas que fosforilan eIF2 α en el caso de K3L (Carroll et al., 1993; Sharp et al., 1997).

Pese a la presencia de estos mecanismos, la sensibilidad del virus vaccinia al tratamiento con IFN varía mucho en función de la línea celular estudiada, sugiriendo que muchos factores virales anti-IFN presentan especificidad de especie. Así, el virus es resistente al IFN en varias líneas celulares de mamífero, como HeLa, mientras que es sensible en células de pollo como CEF. En este último caso, la inhibición parece que tiene lugar por un mecanismo post-transcripcional, ya que afecta a la síntesis de proteínas virales, pero no a la de los RNAs virales (Esteban y Metz, 1973). En experimentos previos en nuestro laboratorio se había observado que la infección con virus vaccinia de células CEF tratadas con IFN no provoca la activación del sistema OAS/RNasaL, sugiriendo que este sistema no participa en el bloqueo de la replicación del virus en células aviares pretratadas con IFN (González-López et al., 2003).

6.2.- Virus de la estomatitis vesicular

El virus de la estomatitis vesicular (VSV), perteneciente al género *Vesiculovirus* de la familia *Rhabdoviridae*, es un virus envuelto con genoma de ssRNA de polaridad negativa que contiene 5 genes y que replica en el citoplasma (Lyles y Rupprecht, 2007).

La proteína M del virus juega un papel fundamental en la inhibición de la respuesta antiviral del hospedador, dado que provoca un rápido bloqueo del transporte de los mRNAs celulares al citoplasma seguido de la inhibición de las tres RNA polimerasas celulares, lo que impide la expresión de los genes del IFN y de la respuesta antiviral (Ahmed et al., 2003; Gerlier y Lyles, 2011). Sin embargo, cuando las células han sido pretratadas con IFN y ya se ha establecido un estado antiviral, el virus es incapaz de replicar. Según el sistema estudiado, la inhibición de la replicación de VSV por el IFN puede producirse tanto en una fase pretranscripcional como post-transcripcional (Belkowski y Sen, 1987; Thacore, 1978).

Son varias las proteínas inducidas por IFN que están implicadas en la inhibición de la replicación de VSV. En fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) se ha observado que tanto PKR como la quinasa PERK del retículo endoplasmático son necesarias para la eliminación de la infección (Connor y Lyles, 2005). Otra proteína que juega un importante papel en el bloqueo de la replicación de VSV es la proteína Mx de

algunas especies, como la MxA humana o la Mx2 de ratón. Algunos estudios consideran que la proteína Mx de pollo es activa contra VSV (Sasaki et al., 2013). Sin embargo, es posible que en la inhibición de VSV participen además otras proteínas dado que en MEFs carentes de Mx, PKR y RNasaL el tratamiento con IFN sigue inhibiendo la replicación de VSV (Zhou et al., 1999).







OBJETIVOS



Con la finalidad de comprender mejor la interacción virus-célula del reovirus aviar, se decidió estudiar la respuesta inmune innata que desencadena este virus en células de pollo, tanto en cultivos primarios de fibroblastos, como en la línea celular DF1, y compararla con la provocada por el virus vaccinia y el virus de la estomatitis vesicular. Para la realización de este estudio se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.- Estudiar la capacidad de los tres virus para inducir la expresión de IFN y la creación de un estado antiviral en células aviares.
- 2.- Determinar el grado de activación del estado antiviral durante la infección con cada uno de estos virus.
- 3.- Analizar la sensibilidad de los tres virus hacia un interferón recombinante de pollo y determinar los mecanismos responsables de la resistencia o sensibilidad viral.
- 4.- Estudiar posibles mecanismos del *shutoff* de la síntesis de proteínas celulares durante la infección con reovirus aviar.





MATERIALES Y MÉTODOS





1.- MATERIAL BIOLÓGICO

1.1.- Células eucariotas

- **Fibroblastos embrionarios de pollo (CEF):** son cultivos primarios obtenidos a partir de embriones de pollo (*Gallus gallus*) de 9 a 10 días de incubación, tal y como se indica en la sección de métodos.
- **Células DF1:** línea celular obtenida por transformación espontánea de fibroblastos embrionarios de pollo (*Gallus gallus*).
- **Células BHK-21:** línea celular procedente de células de riñón de hámster (*Mesocricetus auratus*).
- **Células COS-7:** línea celular de fibroblastos de riñón de mono verde africano (*Chlorocebus aethiops*) que expresan el antígeno T grande del virus SV40.
- **Células VERO:** línea celular originada a partir de células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Chlorocebus aethiops*).

1.2.- Virus

- **Reovirus aviar (ARV):** en este trabajo se ha empleado la cepa S1133, una cepa de reovirus aviar poco virulenta que se ha utilizado en la elaboración de vacunas.
- **VSV:** virus de la estomatitis vesicular. Se ha empleado la cepa Indiana.
- **WR WT:** cepa Western Reserve del virus vaccinia.
- **WRLuc:** virus vaccinia recombinante, desarrollado a partir de la cepa Western Reserve, que expresa de manera constitutiva la proteína luciferasa, descrito en Rodríguez et al., (1988).
- **WRS2:** virus vaccinia recombinante, desarrollado a partir de la cepa Western Reserve, que expresa la proteína σA de ARV, cuya construcción se describe en González-López et al. (2003).

1.3.- Células procariotas

- **XL1-blue** (Stratagene): es una cepa de *Escherichia coli* empleada para el crecimiento y purificación de plásmidos con genotipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F' proAB lacI^q Z Δ M15 Tn10 (Tet^r)*].

1.4.- Plásmidos

- **pcDNA 3.1** (Invitrogen): vector para expresión transitoria en células eucariotas. Los genes clonados se encuentran bajo el control del promotor temprano del citomegalovirus.

Derivan de este plásmido:

- **pcDNA- σ A WT**: plásmido para la expresión de la proteína σ A de ARV en células eucariotas. Contiene el ORF del gen S2 entre las dianas de enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (González-López et al., 2003).
- **pcDNA- σ A R155A**: plásmido para la expresión de un mutante de la proteína σ A en el que el residuo de arginina de la posición 155 ha sido sustituido por uno de alanina. La proteína mutada es incapaz de unir dsRNA (Guardado-Calvo et al., 2008).
- **pCI-neo** (Promega): vector para expresión transitoria en células eucariotas, bajo el control del promotor del citomegalovirus.

Deriva de este plásmido:

- **pCI-neo-HA-MDA5**: plásmido para la expresión de la proteína MDA5 de pollo fusionada a la etiqueta HA.
- **pGL3-P-chMx-luc**: plásmido que contiene el gen de la luciferasa bajo el control del promotor del gen de la proteína Mx de pollo, cedido por el Dr. Nicolas Ruggli y descrito en Liniger et al. (2012).
- **pcDNAI-chIFN α** : plásmido para la expresión en eucariotas del IFN α de pollo, cedido por el Dr. Peter Staeheli (Schultz et al., 1995).
- **pcDNAI-chIFN β** : plásmido para la expresión en eucariotas del IFN β de pollo, cedido por el Dr. Peter Staeheli (Sick et al., 1996).
- **pVP16** (Clontech): plásmido que permite expresar una proteína fusionada al dominio de activación de la transcripción (AD) de la proteína VP16 del virus del herpes simplex (HSV).
- **pM** (Clontech): plásmido que permite expresar una proteína fusionada al dominio de unión al DNA (BD) de la proteína GAL4.

De los dos plásmidos anteriores derivan:

- **pM-S2 y pVP16-S2**: contienen el gen de la proteína σ A de ARV.
- **pM-chPKR y pVP16-chPKR**: contienen el gen de la PKR de pollo (*Gallus gallus*)

- **pM-chPKR K308R y pVP16-chPKR K308R**: contienen el gen de la PKR de pollo con una mutación en la posición 308 que la hace catalíticamente inactiva y permite su sobreexpresión en las células.
- **pVP16T y pM53**: expresan el antígeno T del SV40 y la proteína p53 de ratón fusionadas a los dominios correspondientes, y se emplean como control positivo en el sistema del doble híbrido al tratarse de proteínas que interaccionan entre sí.
- **pG5luc** (Promega): plásmido que contiene el gen de la luciferasa a continuación de 5 repeticiones de la secuencia de unión a GAL4.

1.5.- Anticuerpos

El anticuerpo policlonal contra σA se obtuvo inmunizando conejos con la proteína recombinante MBP- σA (González-López et al., 2003). El anticuerpo contra μNS se obtuvo inmunizando conejos con la proteína expresada en el sistema de baculovirus-células de insecto y purificada en gel SDS-PAGE (Tourís-Otero et al., 2004b). El anticuerpo policlonal contra σC se obtuvo inmunizando conejos con la proteína purificada expresada en bacterias (Grande et al., 2000).

Los anticuerpos policlonales 4849 y 4850 contra la proteína PKR de pollo los generó la empresa BioSynthesis inmunizando conejos con el fragmento de PKR de pollo ⁵²⁷CSASQIIDILKSRDKDNSHKAYSH⁵⁵⁰.

Los anticuerpos policlonales de conejo contra el IFN α o β de pollo fueron cedidos por el Dr. Peter Staeheli (Sick et al., 1996).

El anticuerpo monoclonal J2, que reconoce RNA de doble cadena con longitud igual o superior a 40 pb, se compró a la empresa Scicons (Hungría).

Los anticuerpos monoclonales de ratón contra la proteína PABP recombinante humana (clon 10E10, #P6246), contra HA (clon HA-7, #H3663) y contra α -tubulina (clon DM1A, #T9026) son de Sigma-Aldrich.

Los anticuerpos policlonales de conejo anti eIF2 α (aminoácidos 1-315 de la proteína humana) FL315 (#sc-11386), contra la región C-terminal de la actina humana, clon I-19 (#sc-1616-R), y el anticuerpo monoclonal de ratón contra la histona H1 (AE-4) (#sc-8030) son de Santa Cruz Biotechnology.

El anticuerpo monoclonal de conejo anti eIF2 α -P, desarrollado contra un fosfopéptido que abarca la región que rodea al aminoácido 51 (Ser 51) (#9721) es de Cell Signaling Technology.

Como anticuerpos secundarios, para Western blot se emplearon anti-IgG de conejo (Sigma-Aldrich #A0545) y de ratón (Sigma-Aldrich #A4416) conjugados con HRP y diluidos 1:20.000. En inmunofluorescencia se emplearon los anticuerpos anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen #A11008) y anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 594 (Invitrogen #A11005) a dilución 1:1.000 y estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 594 (Invitrogen #S11227) a dilución 1:500.

1.6.- Proteínas

El fragmento purificado de la proteína σ C (151-326) fue cedido por el Dr. Pablo Guardado-Calvo (Guardado-Calvo et al., 2005).

2.- MATERIAL NO BIOLÓGICO

2.1.- Medios de cultivo

Para el cultivo de fibroblastos embrionarios de pollo se usó medio 199 con sales de Earle (Gibco) suplementado con 2, 5 o 10% de suero fetal bovino (Gibco), 2 mM L-glutamina (Gibco), 100 U/ml de penicilina (Sigma) y 100 μ g/ml de estreptomycin (Sigma). En el momento de la siembra, se suplementó el medio con 10% de caldo de triptosa fosfato (TPB) (Gibco) y 0,25 μ g/ml de fungizona (Gibco). El pH se ajustó a 7,2 con bicarbonato sódico.

Para el mantenimiento de las demás líneas celulares se ha usado el medio DMEM (Gibco), conteniendo 2, 5 o 10 % de suero bovino fetal (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco), 100 U/ml de penicilina (Gibco) y 100 μ g/ml de estreptomycin (Sigma).

Para el cultivo de bacterias en suspensión se empleó el medio de Luria-Bertani (LB) con 0,2% de glucosa. Para seleccionar las bacterias transformadas con plásmidos, se añadió al medio 100 μ g/ml de ampicilina. Para el cultivo en medio sólido, se utilizó el mismo medio suplementado con 1,5% de bacto-agar (Sigma), y con las mismas concentraciones de antibióticos. La composición de estos medios se describe de forma detallada en el manual de protocolos de Sambrook et al.(1989).

2.2.- Disoluciones y tampones

- PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄ y 1,5 mM KH₂PO₄.
- PBS-T: PBS con 0,05 % de Tween-20.
- PBS-T-Leche: PBS-T con 4 % de leche en polvo desnatada
- Medio de montaje: 6 g de glicerol; 2,4 g de mowiol; 6 ml de H₂O y 12 ml de 0,2 M Tris-HCl pH 8,5.
- SSC 20x: 3 M NaCl; 0,35 M citrato sódico a pH 7.
- Solución de prehibridación: 100 µl de SSC 20x; 100 µl de tRNA (10 µg/µl); 100 mg sulfato de dextrano; 250 µl formamida; 550 µl de H₂O.
- Tampón de electroforesis para SDS-PAGE (Tris-Glicina-SDS): 25 mM Tris-HCl pH 8,3; 192 mM glicina y 0,1 % SDS.
- Tampón de transferencia: 25 mM Tris-HCl pH 8,3; 192 mM glicina y 20% metanol.
- Tampón de electroforesis para DNA (TAE): 40 mM Tris; 1,1%, ácido acético y 1 mM EDTA, pH 8,3.
- Tampón para electroforesis desnaturante de RNA 10x (MOPS 10x): 0,4 M MOPS pH 7,0; 0,1 M acetato sódico y 10 mM de EDTA.
- Tampón de muestra para DNA 6x: 15 % Ficoll; 0,25% de azul de bromofenol y 0,25% de xilencianol.
- Tampón Laemmli (1x): 10% glicerol; 60 mM Tris-HCl pH 6,8; 5% β-mercaptoetanol; 0,05% azul de bromofenol y 2% SDS.
- Tampón de lisis para Western blot: 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM KCl; 400 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 % Triton X-100; 5 mM β-mercaptoetanol; 20% glicerol; con los siguientes inhibidores de fosfatasas: 10 mM NaF; 10 mM β-glicerofosfato; 300 µM Na₃VO₄; 10 mM PNPP; e inhibidores de proteasas sin EDTA.
- Tampón de lisis RIPA: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 0,5% deoxicolato sódico y 0,1% SDS.
- Tampón TBN: 10 mM Tris-HCl pH 6,5; 140 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 0,5% NP-40.
- Tampón para ensayos de luciferasa: 220 mM K₂HPO₄; 30 mM KH₂PO₄.
- Solución de transformación (TSS): 10% PEG 4000; 5% DMSO; 25 mM MgCl₂; 10 % de glicerol en LB.

2.3.- Cebadores

Para los ensayos de qPCR se emplearon los siguientes cebadores:

Gen	GenBank	Secuencia	Tm	Amplicón
β-Actina (Li et al., 2007)	L08165	Fw: GAGAAATTGTGCGTGACATCA	62,4°C	152 bp
		Rv: CCTGAACCTCTCATTGCCA		
GAPDH	NM_204305	Fw: AGATGCAGGTGCTGAGTATG	63,4°C	113 bp
		Rv: CTGAGGGAGCTGAGATGATAAC		
MDA5 (Lee et al., 2012)	XM_422031.2	Fw: TGCAAGGGAGCTGTTGAGCAGAAT	60°C	89 bp
		Rv: GGCTTTCATGTTGGGTTTCTCGCA		

Para generar la versión mutada de la PKR de pollo, en la que la lisina 308 se ha reemplazado por arginina, se emplearon los siguientes cebadores (se ha subrayado el sitio de la mutación):

Pkr_R308_Fw:

GAG AGA ACC TAT GCA ATC AGA CGA GTT GAG TTA ATA AAT AGG

Pkr_R308_Rev:

CCT ATT TAT TAA CTC AAC TCG TCT GAT TGC ATA GGT TCT CTC

Para generar el DNA que expresa la MDA5 de pollo con el epitopo HA en su extremo N-terminal, se emplearon los cebadores:

HAMDA5Sh-NheI-Fw:

CTAGCTAGCACCATGTATCCGTATGATGTGCCGATTATGCGTCGGAGGAGT
GCC

MDA5-SalI-Rv

ATAGTCGACTTAATCTTCATCACTTGAAGGAC

La posición de los codones de inicio y terminación se ha indicado mediante subrayado y la de las dianas de restricción mediante doble subrayado.

2.4.- Otros productos químicos

El cloruro amónico (#O9718), la cloroquina (#C6628), el inhibidor de PKR C16 (#I9785), citosina arabinósido (#C1768), el ATP (#A8937), DOPE (#P1223) y DC-Chol (#C2832) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El inhibidor de apoptosis Q-VD-OPh (#551476) se compró a Calbiochem. El tampón de lisis CCLR 5x (#E1531) es de Promega. La luciferina (#LUC-D050) se compró a Biaffin.

3.- MÉTODOS

3.1.- Manipulación de cultivos celulares y virus

3.1.1.- 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 células eucariotas se mantuvieron en el interior de un incubador Napco a 37°C, con una humedad relativa del 95% y una presión parcial de CO₂ del 5%. El material desechable se esterilizó en autoclave antes de su eliminación definitiva.

3.1.2.- Obtención de fibroblastos embrionarios de pollo (CEF)

Los cultivos primarios se obtuvieron a partir de embriones de pollo libres de patógenos de 9 a 10 días de incubación, cedidos por MSD Animal Health (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 corioalantoidea para penetrar en la cavidad amniótica. El embrión extraído del huevo se decapitó y evisceró. El tejido resultante se introdujo en un volumen de 250 ml de PBS y se troceó mecánicamente con unas tijeras. La papilla resultante se digirió con tripsina (10 ml de tripsina al 0,25% en PBS por embrión) a 37°C durante 1 h, tras lo cual se filtró a través de una rejilla metálica, se le añadió un volumen igual de medio 199 precalentado a 37°C, y se centrifugó a 1.500 x g durante 35 min. El pellet celular resultante 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 la suspensión celular se sembró en placas que se incubaron en un incubador de CO₂ a 37°C.

3.1.3.- Conservación y mantenimiento de líneas celulares

Para congelar células en monocapa, las células de cultivos confluentes se disgregaron con una mezcla de tripsina y EDTA, y la actividad de la tripsina se neutralizó añadiendo medio de cultivo completo antes de centrifugar 5 minutos a 500 x g. Las células sedimentadas se resuspendieron en medio de congelación (medio DMEM suplementado con 40% de FBS y 20% de DMSO como crioprotector), los crioviales se mantuvieron 24 h a -80°C y, a continuación, se introdujeron en nitrógeno líquido. Para descongelarlas, se calentaron los viales en un baño a 37°C para conseguir una

descongelación rápida, se diluyó el contenido del vial en 5 volúmenes de medio completo precalentado a 37°C y se centrifugó 5 minutos a 500 x g. El pellet resultante se resuspendió en medio de cultivo y se sembró en frascos que se incubaron a 37°C.

3.1.4.- Crecimiento y titulación de virus

Los virus WR, WRLuc, WRS2 y VSV se crecieron en células BHK-21, mientras que el ARV se creció en células CEF. En cualquier caso, se sembraron las células en placas de 150 mm y, cuando la monocapa estaba casi confluyente, se lavaron dos veces con PBS y se infectaron a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 pfu/célula. Después de 90 minutos de adsorción en PBS a 37°C, se retiró el inóculo y se añadió el medio de cultivo con 2% de FBS. Las células se recogieron entre las 24 y 48 h cuando era notable el efecto citopático. Los pellets de células se congelaron y descongelaron 3 veces para liberar el virus y los restos celulares se eliminaron por centrifugación.

El título viral se determinó con el método de ensayo en placa, utilizando monocapas de CEF confluentes sembradas en placas de 6 pocillos. Se prepararon diluciones seriadas 1:10 del stock de virus en PBS y a cada pocillo se le añadieron 0,2 ml de cada dilución. Tras un periodo de adsorción de 90 min, se aspiró el virus y se añadieron 4 ml de medio de titulación a cada pocillo (medio 199 con 1% agar, 4% FBS, 2% de glutamina y 1% de antibióticos), y cuando solidificó el agar, se dejó de nuevo en el incubador hasta la aparición de placas de lisis (2 días para VSV, 3 días para ARV y 4-5 días para WR). Las células se tiñeron con 0,25 mg/ml de rojo neutro en PBS y se calculó el título viral contando el número de placas en cada dilución.

3.1.5.- Purificación e inactivación del reovirus aviar

La purificación de partículas virales se realizó por el método descrito por Smith et al. (1969) y modificado por Mendez et al. (2000), en el que se sustituye el Freón 113 por Vertrel XF (1, 1, 1, 2, 3, 4, 4, 5, 5, 5-decafluoropentano), un disolvente orgánico más inocuo que el Freón. Las células CEF se infectaron con una MOI de 0,1 pfu/célula, se recogieron a las 24 hpi y se congelaron y descongelaron 3 veces. Se mezclaron con un volumen igual de Vertrel XF, y se mezcló con la ayuda de un homogeneizador VirTis. La fase acuosa se separó de la fase orgánica centrifugando 5 min a 2.000 rpm y 4°C. Esta fase orgánica se volvió a extraer con un pequeño volumen de PBS. Después de juntar las dos fases acuosas, se reextrajeron con un pequeño volumen de Vertrel XF y la fase

acuosa final se separó de la orgánica por centrifugación durante 10 min a 4°C y 2.000 rpm.

El sobrenadante obtenido a partir de esta extracción se puso sobre un colchón de CsCl de densidad 1,37 g/ml (índice de refracción 1,3715) y se centrifugó en un rotor JS-24.15 durante 1 hora a 20.000 rpm y 4°C. Las bandas virales se recogieron por punción, el índice de refracción de la suspensión viral se ajustó a 1,37 (densidad 1,38 g/ml) y la muestra se centrifugó durante 18 h en un rotor SW50.1 a 35.000 rpm. La banda resultante se recuperó por punción del tubo. El virus así obtenido se dializó contra 10 mM Tris-HCl pH 8,0 y 150 mM NaCl y se almacenó a 4°C hasta su uso.

El virus purificado se inactivó exponiéndolo durante 15 minutos a la radiación UV (302 nm) de un transiluminador (GelDoc XR, BioRad), en un vial de vidrio refrigerado con hielo.

3.1.6.- Transfección de plásmidos

Para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas, monocapas de células subconfluentes se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con las mezclas de transfección durante 3 h antes de reemplazarlas por medio con 10% de FBS. Para la preparación de las mezclas de transfección se empleó una mezcla de liposomas catiónicos compuestos por DC-Chol y DOPE en una relación molar 1:1,09, diluidos en medio de cultivo sin suero ni antibióticos, que se mezclaron con los plásmidos diluidos en el mismo medio y se incubaron 15 min a temperatura ambiente antes de añadirlos a las células.

3.1.7.- Obtención de IFN de pollo

Se transfectaron células VERO con el plásmido pcDNAI-chIFN α y a los 3 días post-transfección se recogió el sobrenadante, se centrifugó 5 min a 1.000 x g y 4°C, para eliminar posibles restos celulares, y se almacenó en alícuotas a -20°C.

3.1.8.- Marcaje radiactivo

Para marcar metabólicamente las proteínas con radiactividad, el medio de cultivo de las monocapas celulares se reemplazó por un pequeño volumen de medio DMEM sin metionina (Gibco #21013) suplementado con 100 μ Ci/ml de una mezcla de metionina y cisteína marcadas con ^{35} S (Hartmann Analytic #IS-103). Tras 1 h de incubación a 37°C, se retiró el medio, se lavó una vez con PBS y se lisaron las células en tampón RIPA.

3.1.9.- Preparación de sobrenadantes de células infectadas para la detección de IFN

El sobrenadante de monocapas de células infectadas se recogió y se centrifugó 5 min a 1.000 x g y 4°C para eliminar restos celulares. A continuación, se incubó durante 30 min a 65°C para inactivar el virus presente en la muestra (Liniger et al., 2012).

Como método alternativo, se eliminó el virus mediante precipitación con ácido perclórico como se describe en Sekellick y Marcus, (1986). Para ello, se recogió el medio de las células infectadas y se enfrió en hielo. Se añadió FBS hasta una concentración del 6% y se añadieron 0,1 volúmenes de ácido perclórico 1,5 M frío. Se incubó durante 24 h con agitación a 4°C, y el precipitado formado se eliminó centrifugando 10 min a 2.000 rpm. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se neutralizó el exceso de ácido perclórico con KOH hasta que el indicador rojo fenol presente en el medio de cultivo viró a rojo. Se ajustó el pH a 6,5-6,8 con ácido perclórico diluido y el precipitado de perclorato potásico se eliminó por centrifugación a 2.000 rpm durante 5 min. Se igualó el volumen de todos los sobrenadantes para poder comparar los resultados, se filtraron para esterilizarlos y los sobrenadantes resultantes se almacenaron a -20°C hasta su uso.

3.1.10.- Ensayo de activación del promotor de Mx

Para determinar la capacidad de los sobrenadantes para activar el promotor del gen Mx, se transfectaron células DF1 en placas de 24 pocillos con 0,5 µg del plásmido pGL3-P-chMx-luc. A las 24 hpt se añadieron al medio de cultivo 50 µl de los sobrenadantes tratados y, tras 24 h de incubación, las células se lisaron en tampón CCLR (Promega) para después medir la actividad luciferasa de los extractos con un luminómetro.

3.1.11.- Ensayos de doble híbrido en células de mamífero

Para los ensayos de doble híbrido adaptado a células de mamífero se utilizó el sistema “Mammalian Matchmaker two-hybrid” (Clontech) siguiendo las indicaciones del fabricante. El día anterior a la transfección se sembraron células COS-7 en placas de 12 pocillos a una densidad aproximada de 5×10^4 células por pocillo. Posteriormente, se transfectaron con el plásmido reportero pG5luc (que contiene el gen de la luciferasa y 5 lugares de unión del GAL4) junto con las diferentes combinaciones de las construcciones de pM y pVP16 en una relación 1:1:1. Tras incubar 48 h a 37°C las

células se lisaron en tampón CCLR (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se determinó la actividad de luciferasa presente en los extractos usando un luminómetro.

3.2.- Manipulación de bacterias

3.2.1.- Preparación de bacterias competentes y transformación

Para la preparación de células competentes se diluyó un cultivo de la cepa bacteriana correspondiente en medio LB y se incubó a 37 °C hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó un valor de 0,3. Las bacterias se recogieron por centrifugación a 3.000 x g durante 10 min a 4°C, se resuspendieron en 1:10 del volumen original de solución de transformación (TSS), recién preparada y fría, y se guardaron en alícuotas a -80°C.

Para transformar, se tomó una alícuota de 100 µl de bacterias competentes y se mezcló con el DNA deseado (1-100 ng). Se incubó la mezcla 30 min en hielo y después se realizó un choque térmico a 42°C durante 45 s. Tras dejarlas 2 min en hielo, se añadieron 0,5 ml de LB y se incubaron durante 1 h a 37°C, antes de recogerlas por centrifugación y sembrarlas en una placa de LB-Agar con el antibiótico correspondiente.

3.2.2.- Crecimiento y mantenimiento de bacterias

Las bacterias se crecieron con agitación a 37°C en medio LB-0,2% glucosa con ampicilina (100 µg/ml) (Sigma) según el método de selección para cada plásmido y se conservaron congeladas a -80°C en el mismo medio suplementado con 20% de glicerol.

3.3.- Manipulación de ácidos nucleicos

3.3.1.- Purificación de plásmidos

La purificación de DNA a pequeña escala, para el análisis de transformantes, se realizó usando el sistema DNA Wizard[®] Minipreps System (Promega), a partir de 3 ml de cultivo bacteriano. Para la obtención de DNA a mayor escala se utilizaron 50 ml de cultivo bacteriano, a partir de los cuales se aisló el plásmido usando el sistema PureYield[™] Plasmid Midiprep System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.2.- Digestiones enzimáticas y purificación de fragmentos de DNA

La digestión del DNA con enzimas de restricción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones indicadas por el suministrador para cada enzima. Las reacciones de ligación se realizaron a temperatura ambiente empleando la T4 DNA ligasa (Promega) y con una relación vector:inserto de 1:5.

La purificación de productos de PCR y de otros fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa del 0,8% con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Las bandas de DNA se cortaron con una cuchilla, se pasaron a tubos eppendorf, y el DNA se extrajo del gel mediante el kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.3.- RT-PCR y PCR

Para las reacciones de transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa se empleó el kit SuperScript[®] III One Step RT-PCR System con Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen). En la reacción se empleó como molde 1 µg de RNA total extraído con Trizol de monocapas de células CEF, y los cebadores se utilizaron a una concentración de 0,2 µM. El programa empleado para la amplificación fue un ciclo de 30 min a 55°C, seguido de una desnaturalización de 2 min a 94°C. A continuación se realizaron 40 ciclos de amplificación (15 s a 94°C, 30 s a 55°C, 4 min a 68°C) y una elongación final de 5 min a 68°C.

Para la amplificación de fragmentos por PCR se empleó el enzima PfuTurbo DNA polymerase (Agilent Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.4.- PCR cuantitativa

Para los ensayos de PCR cuantitativa, se extrajo el RNA de placas de 100 mm de diámetro con Trizol (Life Technologies #15596-026), y 4 µg de este RNA se trataron con 2 U de DNasa RQ I (Promega #M6101) en un volumen de 20 µl durante 35 min a 37°C para eliminar los restos de DNA genómico. Tras esta incubación, se añadieron 2 µl de DNase I Stop Solution, y se calentó 10 min a 65°C para inactivar el enzima. Para la síntesis del cDNA, se empleó 1 µg del RNA así tratado en cada reacción de 20 µl empleando el kit iScript[™] cDNA Synthesis Kit (BioRad #170-8890) que contiene una mezcla de oligo(dT) y random primers. Para cada muestra se hicieron 2 reacciones de transcripción inversa independientes. Se incubaron las mezclas de reacción primero 5

min a 25°C, después 40 min a 42°C y finalmente 5 min a 85°C. El cDNA así obtenido se diluyó 10 veces en agua y se guardó en alícuotas congeladas a -20°C. En las reacciones de qPCR se empleó el reactivo IQ SYBR Green SuperMix (BioRad #170-8882), utilizando en cada reacción de 10 µl, 5 µl de IQ SYBR Green SuperMix, 2,5 µl de cDNA diluido y 300 nM de cada primer. Para detectar la amplificación en tiempo real, se empleó el equipo C1000 Touch de BioRad con el módulo óptico CFX96. El programa empleado incluye una desnaturalización inicial de 3 min a 95°C, 40 ciclos de 10 s a 95°C, 30 s a la temperatura de hibridación correspondiente, seguida de la lectura de las placas, y una elongación de 10 s a 72°C. Tras la amplificación, se hizo un análisis de la curva de disociación de 65 a 95°C con incrementos de 0,5°C cada 5 s, para comprobar la especificidad de los productos obtenidos. El análisis de los resultados se realizó con el software CFX Manager de BioRad. Para cada par de cebadores se optimizó la temperatura de hibridación, buscando la temperatura que proporcionara un Cq más bajo, y se comprobó que la eficiencia de la amplificación se encontraba entre 90 y 110% realizando diluciones seriadas de la propia muestra.

3.3.4.- Mutaciones puntuales

La mutación puntual del DNA de la PKR de pollo se realizó con el kit QuikChange Site Directed Mutagenesis (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.5.- Electroforesis de rRNA en gel desnaturalizante

El RNA total de placas de 100 mm de diámetro se extrajo con Trizol. La concentración del RNA se cuantificó con un Nanodrop, y 4 µg se incubaron 10 min a 65°C en 30 µl de solución desnaturalizante (50% de formamida desionizada, 2,2 M de formaldehído, 0,1 mg/ml de bromuro de etidio en tampón MOPS 1x). Se mezcló inmediatamente con 3 µl de tampón de carga (50% glicerol, 1 mM EDTA, 0,25% azul de bromofenol en tampón MOPS 1x) y los rRNAs se separaron en un gel de 1% agarosa en tampón MOPS conteniendo 0,22 M de formaldehído, durante 35 min a 100 V.

3.4.- Manipulación de proteínas

3.4.1.- Fraccionamiento subcelular

Para la obtención de extractos citosólicos y nucleares de células CEF y VERO, células en placas de 150 mm se lavaron dos veces con PBS, se recogieron con espátula y se centrifugaron a 1.000 x g durante 5 min. Se incubaron durante 15 min en hielo con 300 µl de tampón TBN y se centrifugaron durante 5 min a 5.000 x g 4°C, para obtener un sobrenadante con la fracción citosólica. El pellet se lavó una vez con tampón TBN, y se incubó 5 min en hielo con 150 µl de tampón RIPA. Tras centrifugar 5 min a 20.000 x g se guardó el sobrenadante de esta centrifugación como la fracción nuclear.

3.4.2.- Electroforesis y fijación de geles

La electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) se llevó a cabo tal y como describe Laemmli, (1970). Las concentraciones de poliacrilamida o de ProtoGel (National Diagnostic, England) del gel separador fueron del 10% o del 12,5%, y para el gel concentrador del 4%. En el caso de muestras marcadas radiactivamente, los geles se fijaron durante 30 min en una solución de 33% de metanol y 10% de acético, se secaron en un secageles y se expusieron a -20°C hasta obtener la señal deseada.

3.4.3.- Western blot

Para la inmunodetección por Western blot, las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana PVDF/Immobilon-P (Millipore) en tampón de transferencia, durante 1 h a 100 V utilizando el sistema MiniProtean III (BioRad). Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con 4% de leche desnatada en PBS-T. Las membranas se incubaron durante 90 min con los anticuerpos primarios diluidos en PBS-T-Leche y se lavaron con PBS-T para retirar los anticuerpos no unidos específicamente. Los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron con anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa, y se revelaron con el sustrato Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore).

3.4.4.- Far Western blot

Para el ensayo de far Western blot, las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF/Immobilon-P en las mismas condiciones que en el apartado anterior. A continuación se lavó la membrana 2 veces durante 5 min con hidrocloreuro de guanidina

6 M en PBS, seguidos de 6 lavados de 10 min con diluciones seriadas 1:2 del tampón anterior en PBS a las que se les añadió 1 mM DTT. Las membranas se incubaron durante 1 h con solución bloqueante, se lavaron dos veces con 0,25% de leche y 0,1% de Tween-20 en PBS y se incubaron toda la noche con 5 µg/ml del fragmento de σ C (151-326) diluido en PBS con 0,25% de leche, 0,1% de Tween-20 y 1 mM DTT. Al día siguiente se lavaron 4 veces con 0,25% de leche, 0,1% de Tween-20 en PBS, se incubaron con el anticuerpo primario contra la proteína σ C y se continuó como en un Western blot normal.

3.4.5.- Tratamiento con fosfatasa alcalina

Monocapas de células en placas de 6 pocillos se lisaron en 60 µl de tampón de lisis para Western blot sin inhibidores de fosfatasas. Alícuotas de 25 µl de estos extractos se incubaron durante 1 h a 37°C con 10 U de fosfatasa alcalina (Promega, #M182A) en un volumen final de 60 µl, y a continuación se hirvieron 5 min en tampón de muestra Laemmli 1x.

3.5.- Hibridación *in situ*

Para el ensayo de hibridación *in situ* se siguió el protocolo de Chakraborty et al. (2006) con pequeñas modificaciones. Células creciendo sobre cubreobjetos se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 8 min y se lavaron varias veces con PBS. A continuación se permeabilizaron durante 5 min con 0,5% Triton X-100 en PBS a 4°C, y se volvieron a lavar con PBS antes de incubar durante 15 min a 42°C con la solución de prehibridación. Estos cubreobjetos se incubaron durante toda la noche a 42°C con esta misma solución a la que se le añadió 50 µg/ml de oligo(dT)₄₅ biotinilado. Se lavaron 2 veces durante 15 min con SSC 2x y una vez con SSC 0,5x a 42°C y se fijaron de nuevo 8 min con paraformaldehído. A continuación se realizó una inmunofluorescencia con el anticuerpo contra la proteína μ NS y se detectó la sonda biotinilada con estreptavidina conjugada con Alexa Fluor.

3.6.- Inmunofluorescencia

Monocapas de células sobre cubreobjetos se fijaron con metanol a -20 °C durante 15 min, o con 4% paraformaldehído en PBS a temperatura ambiente durante 20 min. A continuación se lavaron con PBS y, en el caso de la fijación con paraformaldehído, se

permeabilizaron con 0,5% Triton X-100 en PBS o con metanol durante 3 min. Tras lavar con PBS se incubaron durante 30 min con 2% BSA en PBS a temperatura ambiente. A continuación se incubaron 1 h con el anticuerpo primario diluido 1:1.000 en 2% BSA en PBS. Tras tres lavados con PBS, se incubaron 1 h en oscuridad con los anticuerpos secundarios diluidos 1:1.000 y con 1 µg/ml DAPI (tinción nuclear). Las células se lavaron tres veces con PBS, y se montaron con medio de montaje para su observación al microscopio de fluorescencia (Olympus BX51).

3.7.- Ensayos de actividad de luciferasa

Para los ensayos de actividad luciferasa se colocaron 20 µl de cada extracto en una placa opaca de 96 pocillos. Tras añadir 100 µl de mezcla de reacción (una solución compuesta por 80% de tampón de luciferasa, 10% de 100 mM ATP, 10% de 200 mM MgCl₂ y suplementada con 1 mM de luciferina) se realizaron 3 medidas de 10 s de la luz emitida en un luminómetro Luminoskan-Ascent (Thermo). Los resultados se expresan como unidades relativas de luz (U. R. L.), y en las figuras se indica la desviación estándar. En el caso de los ensayos de actividad del promotor de Mx los resultados obtenidos se dividieron por el valor obtenido para células DF1 transfectadas con el plásmido y sin tratar, y se indican los resultados como múltiplo sobre el control.

3.8.- Ensayos de actividad de las caspasas 3/7

Para determinar la actividad de las caspasas en las células infectadas, se sembraron células en placas de 96 pocillos. Al día siguiente se infectaron con la cantidad indicada de virus, se reemplazó el medio pasados 90 min y se dejó avanzar la infección hasta las 9 hpi. En ese momento se añadieron a cada pocillo 50 µl del reactivo Caspase-Glo[®] 3/7 (Promega) y se incubaron 1 h a temperatura ambiente en oscuridad, momento en que se determinó la luz emitida con un luminómetro Luminoskan-Ascent (Thermo).



RESULTADOS



1.- ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE IFN E INDUCCIÓN DE PKR EN CEF

Experimentos previos de nuestro laboratorio habían demostrado que la replicación del reovirus aviar S1133 (ARV) en células CEF es mucho más resistente al pretratamiento con IFN α de pollo que la replicación del virus vaccinia (WR) y del virus de la estomatitis vesicular (VSV) (González-López et al., 2003). En la figura 11 se observa el efecto del pretratamiento con IFN sobre la síntesis de proteínas en células CEF infectadas con los virus VSV, WR y ARV. El tratamiento con IFN no afecta a la síntesis de proteínas celulares en células sin infectar (comparar carriles 1 y 2). Sin embargo, en células infectadas con VSV, el IFN bloquea totalmente la síntesis de proteínas virales y rescata en parte la síntesis de proteínas celulares (carriles 3 y 4), mientras que en las infectadas con WR el IFN inhibe en gran medida la síntesis de proteínas virales (carriles 5 y 6). Finalmente, en células infectadas con ARV, el IFN no ejerce un efecto significativo sobre la síntesis de proteínas virales ni celulares (carriles 7 y 8).

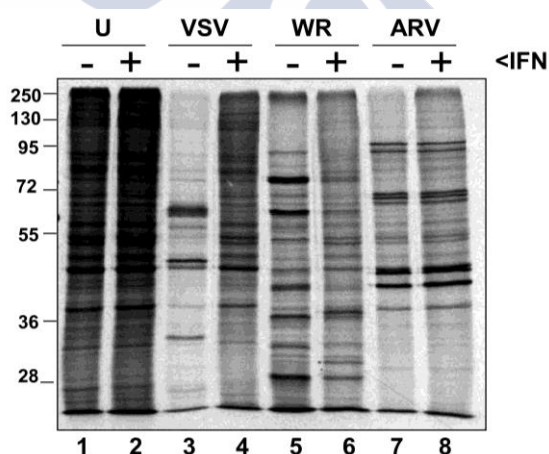


Figura 11. Efecto del IFN sobre la síntesis de proteínas en células CEF infectadas y sin infectar. Monocapas de CEF sin tratar (-) o tratadas con IFN durante 24 h (+), se infectaron con 10 pfu/célula de los virus indicados en la parte superior. A las 17 hpi las células se marcaron durante 1 h con [^{35} S]-metionina-cisteína y, a continuación, se lisaron. Los extractos resultantes se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía. Se indica a la izquierda de la figura la posición de los marcadores de peso molecular (kDa).

Este resultado sugiere que durante la infección de CEF con VSV o WR no se secreta IFN al medio de cultivo ya que de ser así, el propio IFN secretado durante la infección inhibiría la síntesis de las proteínas virales; o bien, la producción de IFN y generación de un estado antiviral en estas células infectadas se retrasa hasta un momento en el que el virus puede evitar sus efectos por otros mecanismos. Por otra parte, se ha descrito que los reovirus aviares son potentes inductores de la producción de IFN en

fibroblastos embrionarios de pollo envejecidos (Ellis et al., 1983; Sekellick y Marcus, 1986), a pesar de lo cual son muy resistentes al efecto antiviral de esta citoquina (Ellis et al., 1983; González-López et al., 2003; Martínez-Costas et al., 2000). En la primera parte de este trabajo, se decidió investigar la capacidad de cada uno de estos virus para inducir la producción y secreción de IFN en células CEF.

La producción de IFN por las células puede detectarse mediante diferentes ensayos que se basan en el análisis de algunas de sus actividades biológicas. Los primeros métodos desarrollados se basaban en la capacidad del IFN para inhibir el efecto citopático que provoca un virus cuando infecta células sensibles (Rubinstein et al., 1981). Posteriormente se desarrollaron métodos alternativos, como ensayos de actividad antiproliferativa, cuantificación de proteínas inducidas por IFN o cuantificación de la expresión de genes reporteros bajo el control de promotores sensibles al IFN (Meager, 2002). En este trabajo, la capacidad de los virus para inducir la producción de IFN se determinó de dos formas diferentes: i) mediante detección por Western blot de los niveles de la proteína PKR, cuya expresión es inducida por IFN; y ii) examinando la capacidad de los sobrenadantes de células infectadas para activar el promotor del gen de la proteína Mx, presente en el plásmido pGL3-P-Mx-luc (generosamente cedido por el Dr. Nicolas Ruggli), que contiene el gen de la luciferasa bajo el control del promotor del gen Mx de pollo y que ha sido empleado anteriormente para detectar la presencia de IFN en el medio de cultivo en células de pollo (Liniger et al., 2012; Schwarz et al., 2004). Para asegurarnos de que el inóculo de ARV que utilizamos en estos experimentos no contiene IFN, las infecciones con este virus se realizaron con ARV purificado tal y como se describe en la sección de materiales y métodos.

El empleo de un plásmido reportero obliga a transfectar las células antes de infectarlas o de incubarlas con el medio con IFN. Sin embargo, experimentos preliminares mostraron que la transfección de células CEF con un plásmido cualquiera, incluso con el plásmido vacío pcDNA 3.1, es suficiente para inducir la expresión de PKR (Figura 12A, carriles 1 y 2), mientras que esto no ocurre cuando se transfecta la línea celular estable DF1, originada por transformación espontánea de fibroblastos de pollo (Figura 12A, carriles 4 y 5). Este incremento de los niveles de PKR en células CEF transfectadas requiere la internalización del plásmido, ya que no se produce cuando las células se incuban sólo con el plásmido o sólo con el reactivo de transfección (Figura 12B). Por otra parte, el hecho de que el antibiótico brefeldina A, que inhibe el transporte

anterógrado de proteínas a través del aparato de Golgi (Klausner et al., 1992) y, por tanto, la secreción de IFN, bloquee la inducción de PKR en células CEF transfectadas sugiere que esta inducción está mediada por IFN (Figura 12C). Por último, el sobrenadante de células CEF o DF1 transfectadas o sin transfectar se añadió a células DF1 transfectadas con el plásmido pGL3-P-Mx-luc, para ver su capacidad para aumentar la expresión de la luciferasa en estas células. Únicamente el sobrenadante de células CEF transfectadas es capaz de activar dicho promotor y aumentar la cantidad de luciferasa en los extractos, confirmando que la transfección de células CEF con un plásmido induce la expresión y secreción de IFN (Figura 12D).

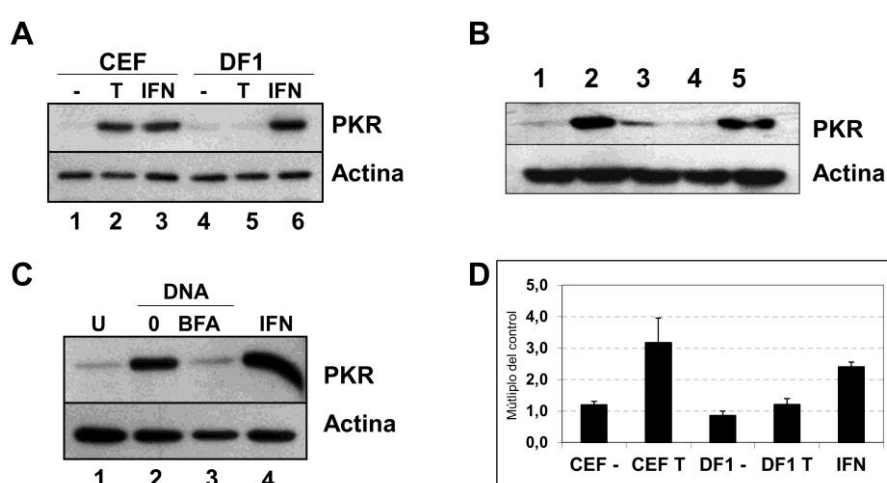


Figura 12. La transfección con plásmidos de células CEF, pero no de DF1, induce la expresión de PKR. A) Células CEF o DF1 sin tratar (-), transfectadas con el plásmido pcDNA 3.1 vacío (T) o incubadas con IFN (IFN), se lisaron a las 24 h post-transfección. Los niveles intracelulares de PKR se determinaron mediante Western blot. Un anticuerpo anti-actina permitió comprobar que se habían cargado volúmenes de extractos procedentes de cantidades similares de células. **B)** Análisis por Western blot de los niveles de PKR y actina en los extractos procedentes de células CEF: (1) sin tratar; (2) transfectadas con el plásmido pcDNA en presencia del reactivo de transfección; (3) incubadas con el plásmido en ausencia del reactivo de transfección; y (5) incubadas con IFN. **C)** Células CEF sin tratar (U), incubadas con IFN (IFN), o transfectadas con el plásmido pcDNA 3.1 vacío (DNA), en ausencia (0) o presencia (BFA) de 0,5 µg/ml de BFA desde las 3 hasta las 24 h post-transfección. Las células se lisaron y los extractos se analizaron por Western blot. **D)** Células DF1 se transfectaron con el plásmido reportero pGL3-P-Mx-luc y 24 h más tarde se incubaron con 50 µl del sobrenadante de células CEF o DF1 sin transfectar (-) o transfectadas con el plásmido pcDNA 3.1 vacío (T), o se incubaron con IFN como control. Las células se lisaron para determinar la actividad luciferasa 24 h más tarde. Los valores se expresan como múltiplo de la señal obtenida con las células DF1 transfectadas con pGL3-P-Mx-luc sin tratar; las barras de error indican la desviación estándar.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente por otros autores, que observaron que el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) no replicaba bien en células CEF que habían sido transfectadas con plásmidos, y que la capacidad replicativa del virus se restablecía cuando se añadían anticuerpos contra IFN al medio de cultivo

Resultados

(Park et al., 2003). Estos autores sugirieron que la transcripción del plásmido podría generar dsRNA que sería detectado por la célula y activaría la secreción de IFN. Dado que la transfección de células DF1 con plásmidos no provoca la liberación de IFN que podría afectar a los resultados, los ensayos de detección del IFN en los sobrenadantes de células infectadas se realizaron incubándolos con células DF1 que habían sido transfectadas con el plásmido reportero pGL3-P-Mx-luc.

Para determinar la capacidad de los virus para inducir la expresión de PKR, monocapas de CEF sin infectar, incubadas o no con IFN, o infectadas con 2 pfu/célula de cada uno de los tres virus, se lisaron a las 18 hpi y los extractos resultantes se analizaron por Western blot con anticuerpos contra PKR y actina. Los resultados que se muestran en la figura 13A ponen de manifiesto que sólo la infección con ARV, pero no con VSV o WR, induce la expresión de PKR.

Los sobrenadantes de estas mismas células se recogieron para determinar su capacidad para estimular el promotor del gen Mx. Los virus presentes en los sobrenadantes se inactivaron por incubación a 65°C durante 30 min, una temperatura que apenas tiene efecto sobre la actividad del IFN presente en el medio (Liniger et al., 2012), y los sobrenadantes así tratados se incubaron con células DF1 transfectadas con el plásmido pGL3-P-Mx-luc. En la figura 13B se muestra que únicamente el sobrenadante de células CEF infectadas con ARV, pero no el de las infectadas con VSV o WR, es capaz de activar el promotor de Mx e inducir la expresión de luciferasa en células DF1, sugiriendo que sólo la infección con ARV es capaz de inducir la producción y secreción de IFN en células CEF.

La incubación a 65°C podría desestabilizar la cápside del ARV, lo que provocaría la liberación del dsRNA genómico y la estimulación de la producción de IFN por las células DF1. Para descartar esta posibilidad, alícuotas del sobrenadante de células CEF infectadas con ARV se incubaron durante 30 minutos a 37°C en presencia o ausencia de 50 U/ml de benzonasa, una endonucleasa que degrada ácidos nucleicos, tanto de cadena sencilla como de cadena doble. También se incubó una muestra a 95°C durante 5 minutos, una temperatura a la que se desnaturalizan la mayor parte de las proteínas y el IFN pierde su actividad biológica. Los resultados mostrados en la figura 13C indican que, mientras que el tratamiento con benzonasa sólo reduce ligeramente la capacidad del sobrenadante para activar el promotor de Mx, la incubación a 95°C la elimina totalmente.

Estos resultados indican que es el IFN, y no el dsRNA genómico, el responsable de la activación del promotor de Mx.

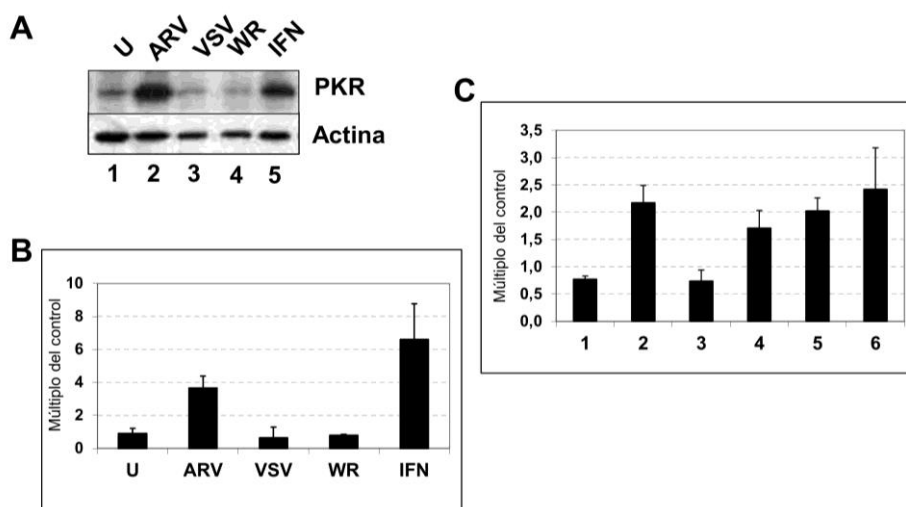


Figura 13. La infección de CEF con ARV, pero no con VSV o WR, induce la producción de IFN. **A)** Células CEF se infectaron durante 18 h con 2 pfu/célula de los virus indicados (U, células sin infectar). Las células se lisaron y los niveles de PKR y actina se determinaron por Western blot. **B)** Células DF1 se transfectaron con el plásmido pGL3-P-Mx-luc y se trataron con IFN (IFN) o se incubaron con sobrenadantes de células CEF sin infectar (U) o infectadas con los virus indicados. Las células se lisaron 24 h después y se determinó la actividad luciferasa de los extractos. **C)** Actividad luciferasa de los extractos de células DF1 transfectadas con el plásmido pGL3-P-Mx-luc e incubadas con los sobrenadantes de células CEF: (1) sin infectar; (2) infectadas con ARV; (3) infectadas con ARV, incubado 5 min a 95°C; (4) infectadas con ARV, incubado 30 min a 37°C en presencia de 50 U/ml de benzonasa; (5) infectadas con ARV, incubado 30 min a 37°C; o (6) tratadas con IFN como control.

Para confirmar estos resultados empleamos un método alternativo de eliminación del virus que no requiere la incubación a altas temperaturas. Este método, descrito en la sección de materiales y métodos, consiste en precipitar el virus, junto con parte de las proteínas presentes en el medio de cultivo, mediante el uso de ácido perclórico, manteniéndose las muestras a 4°C en todo momento (Sekellick y Marcus, 1986). La incubación de los sobrenadantes resultantes con células DF1 transfectadas con pGL3-P-Mx-luc confirmó que únicamente el sobrenadante de células infectadas con ARV es capaz de activar el promotor de Mx (Figura 14A). También examinamos la capacidad de los sobrenadantes de células infectadas para activar la expresión de PKR cuando se incuban con células CEF sin infectar. Para ello, monocapas de CEF se incubaron con dos cantidades de los sobrenadantes durante 24 h, las células se lisaron y los niveles de PKR de los extractos se analizaron mediante Western blot. Sólo el sobrenadante de células infectadas con ARV, pero no los de las células sin infectar o los de las infectadas con VSV o WR, fue capaz de aumentar los niveles de PKR (Figura 14B). Estos resultados

Resultados

demuestran que tanto la incubación a 65°C como la precipitación con ácido perclórico son procedimientos adecuados y eficaces para eliminar el virus de los sobrenadantes sin eliminar la actividad del IFN. Dado que el primer procedimiento permite trabajar con muchas muestras y pequeños volúmenes, es el que se empleó en los siguientes experimentos.

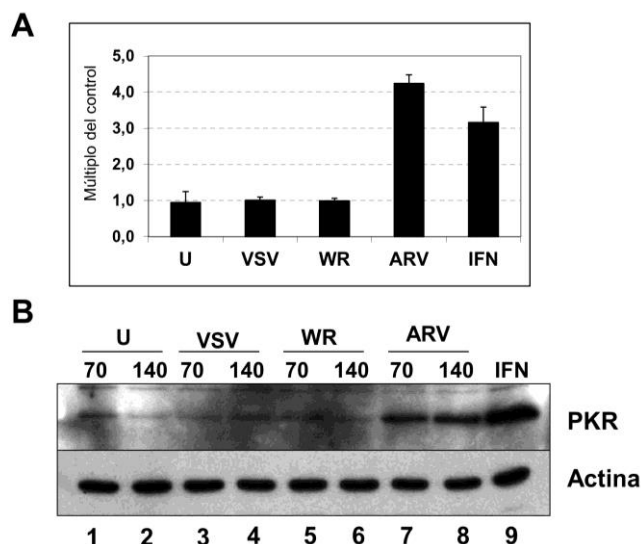


Figura 14. Eliminación de virus por precipitación con ácido perclórico. A) Actividad luciferasa de extractos de células DF1 transfectadas con pGL3-P-Mx-luc e incubados con los sobrenadantes de células CEF sin infectar (U) o infectadas con los virus indicados. Los virus se eliminaron de los sobrenadantes mediante precipitación con ácido perclórico. Se trató un pocillo con IFN como control (IFN). **B)** Monocapas de células CEF se incubaron con los volúmenes indicados (en µl) de estos mismos sobrenadantes. En el pocillo control de la derecha, las células se trataron con IFN. Pasadas 24 h las células se lisaron y los niveles de PKR y actina se determinaron por Western blot.

Todos estos resultados demuestran que únicamente las células CEF infectadas con ARV, pero no las infectadas con VSV o WR, liberan IFN al medio de cultivo, que el IFN liberado es funcional y que las células CEF y DF1 son capaces de captar y transmitir la señal iniciada por dicha citoquina.

2.- EL REOVIRUS AVIAR INDUCE PKR DE FORMA INDIRECTA A TRAVÉS DE LA SECRECIÓN DE IFN AL MEDIO DE CULTIVO

Los resultados mostrados en las figuras 13 y 14 demuestran que la infección de CEF con ARV induce la expresión de la proteína quinasa PKR. La activación de la expresión del gen de PKR durante la infección con ARV podría producirse de manera

indirecta, dependiendo únicamente del IFN secretado al medio. Sin embargo, debido al papel que desempeña en otros procesos celulares, PKR presenta mecanismos de regulación de la expresión independientes de la señalización por IFN. Así, en el promotor de la PKR humana y de ratón se han encontrado al menos tres regiones reguladoras: una secuencia ISRE inducible por IFN, una región KCS, responsable de sus niveles basales de expresión, y unos dominios p53RE que inducen la expresión de PKR en caso de activación de p53 (Das et al., 2006; Yoon et al., 2009). Estos datos sugieren que una infección viral podría inducir la expresión de PKR por mecanismos dependientes e independientes de la producción y secreción de IFN.

Para determinar si la expresión de PKR en células infectadas con ARV es dependiente o independiente del IFN, se infectaron monocapas de CEF con ARV purificado y se bloqueó la secreción de IFN con el antibiótico brefeldina A (BFA). Este antibiótico, a bajas concentraciones, inhibe ligeramente la replicación de ARV, pero bloquea totalmente la ruta secretora, como lo demuestra el hecho de que impide la integración de la proteína viral p10 en la membrana de células infectadas con ARV (Bodelón et al., 2002; Duncan, 1996). Los resultados de la figura 15A muestran que, aún a bajas concentraciones, la BFA tiene un efecto perjudicial sobre la síntesis de proteínas virales, pero bloquea totalmente la capacidad del virus para inducir PKR, lo que sugiere que la infección con ARV induce PKR de forma indirecta, a través del IFN secretado al medio de cultivo durante la infección.

Para evitar los efectos perjudiciales que ejerce la BFA sobre la replicación de ARV, se bloqueó la señalización del IFN mediante un método alternativo, añadiendo al medio de cultivo de células infectadas anticuerpos neutralizantes contra los IFNs α y β de pollo (cedidos por el Dr. Peter Staeheli). Los resultados de la figura 15B indican que la presencia de estos anticuerpos provoca una disminución en los niveles de PKR detectados en células infectadas con ARV. El anticuerpo contra el IFN α es el que ejerce un efecto más acusado, aunque es necesaria la presencia de los dos anticuerpos para que se bloquee totalmente la inducción de PKR (Figura 15B, carril 5). Estos resultados indican que la infección con reovirus aviar induce la expresión de los IFNs α y β , a la vez que confirman que la inducción de la expresión de PKR en células CEF infectadas con ARV está promovida únicamente por el IFN que producen y secretan las células infectadas.

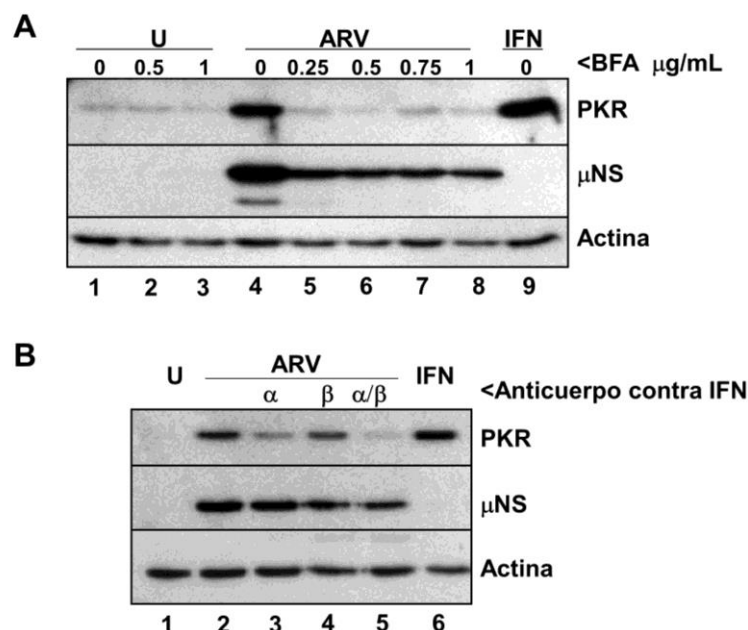


Figura 15. La expresión de PKR en CEF infectadas con ARV depende únicamente del IFN secretado al medio de cultivo. A) Células CEF sin infectar (U) o infectadas con 2 pfu/célula de ARV (ARV) se incubaron durante 18 h en presencia de las concentraciones indicadas de BFA. Como control, las células del pocillo de la derecha (IFN) se trataron con IFN durante 18 h. Las células se lisaron y los niveles intracelulares de PKR, μNS y actina se determinaron mediante Western blot. **B)** Al medio de cultivo de células CEF infectadas con 2 pfu/célula de ARV se le añadieron los anticuerpos anti-IFN de pollo indicados a una concentración del 2%. A las 18 hpi las células se lisaron y los niveles intracelulares de PKR, μNS y actina se determinaron mediante Western blot

3.- IDENTIFICACIÓN DE LA ETAPA DEL CICLO INFECTIVO DE ARV QUE INDUCE LA PRODUCCIÓN DE IFN

El primer paso del ciclo replicativo de un virus es la interacción extracelular del virus con su receptor celular. En el caso de MRV se ha sugerido que la interacción de la fibra viral $\sigma 1$ con su receptor puede contribuir a la activación de la apoptosis (Clarke y Tyler, 2003). También se ha sugerido que la unión del ARV a su receptor activa varias rutas de señalización que favorecen la internalización del virus (Huang et al., 2011), por lo que no se puede descartar que la interacción de ARV con su receptor sea suficiente para activar la expresión de IFN y, como consecuencia, la de PKR. Para comprobarlo, decidimos examinar los niveles intracelulares de PKR en células incubadas con un fragmento carboxilo terminal (151-326) de la proteína σC , la proteína que emplea el ARV para unirse a los receptores celulares (Grande et al., 2002; Martínez-Costas et al., 1997). En nuestro laboratorio se había demostrado previamente que ese fragmento se une al receptor viral de células CEF y que esa unión bloquea la adsorción y replicación del

ARV (Guardado-Calvo et al., 2005). Los resultados que se muestran en la figura 16A indican que no se producen cambios significativos en los niveles de PKR cuando las células se incuban durante 18 h con cantidades crecientes del fragmento de σC , lo que sugiere que la interacción extracelular del virus con su receptor no es suficiente para inducir la expresión de IFN.

Para identificar otras etapas del ciclo infectivo en las que se podría inducir la expresión de IFN, utilizamos diferentes inhibidores del ciclo replicativo viral. Tras la unión al receptor y la internalización del virus en endosomas, se produce la decapsidación de los reoviriones, un proceso dependiente de la acidificación del endosoma y del procesamiento proteolítico de la proteína de la cápside externa μBC (Duncan, 1996). Resultados anteriores de nuestro laboratorio habían demostrado que la decapsidación del ARV puede bloquearse con agentes lisosomotrópicos, como la cloroquina y el cloruro amónico, cuando se añaden al inicio de la infección, pero no cuando se añaden a partir de las 3 hpi (Labrada et al., 2002). Para comprobar si la decapsidación del virus es necesaria para la inducción de IFN, monocapas de células CEF se infectaron con 2 pfu/célula de ARV purificado y se incubaron en presencia de 100 μM de cloroquina o 20 mM de cloruro amónico desde el inicio de la infección o a partir de las 3 hpi. A las 18 hpi se recogió el medio de cultivo, se incubó 30 min a 65°C para inactivar el virus, y se analizó su capacidad para activar el promotor de Mx en células DF1. Por otra parte, las células se lisaron para determinar mediante Western blot los niveles intracelulares de PKR. Los resultados indicaron que la capacidad de los sobrenadantes para activar el promotor de Mx desaparece cuando los agentes lisosomotrópicos están presentes desde las 0 hpi, pero no cuando se añaden 3 h más tarde (Figura 16B). El hecho de que la actividad luciferasa no se recupere totalmente cuando los agentes se añaden a las 3 hpi puede deberse a algún efecto perjudicial de estos compuestos sobre la infección secundaria o sobre alguna etapa de la producción de IFN. Algo similar ocurre con la inducción de PKR, que prácticamente desaparece cuando se añaden los agentes a tiempo 0, pero no cuando se añaden a las 3 hpi (Figura 16C). La eficacia de los agentes para inhibir la replicación del virus queda demostrada por la ausencia de expresión de la proteína viral μNS cuando se añaden a 0 hpi, aunque también se observa un ligero efecto perjudicial sobre la cantidad de proteína viral producida cuando se añaden a las 3 hpi. Estos resultados indican que la decapsidación intraendosomal de los reoviriones parentales es necesaria para la inducción

Resultados

de IFN y que, por tanto, esta inducción depende de la decapsidación o de una etapa del ciclo viral posterior a dicha decapsidación.

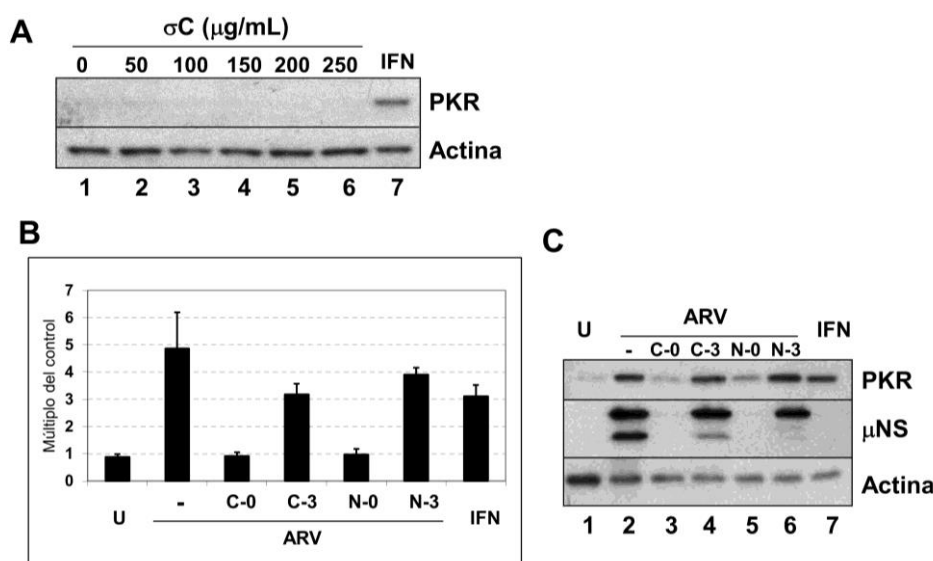


Figura 16. La decapsidación de los reoviriones de ARV es necesaria para que se induzca la producción de IFN. **A)** Monocapas de CEF se incubaron 15 min con 1% de BSA en PBS para bloquear los lugares de unión no específicos. A continuación, se añadieron las concentraciones indicadas del fragmento carboxilo-terminal de σC , y las células se incubaron durante 18 h más a 37°C. Como control positivo, se trataron con IFN las células del carril de la derecha. Los niveles intracelulares de PKR y actina se determinaron por Western blot. **B)** Capacidad para activar el promotor Mx en células DF1 transfectadas con el plásmido reportero pGL3-P-Mx-luc de los sobrenadantes de células CEF sin infectar (U), infectadas con ARV (ARV) sin tratar (-), o tratadas con los agentes lisosomotrópicos cloroquina (C) o cloruro amónico (N) a las 0 (C-0, N-0) o 3 hpi (C-3, N-3). Un pocillo se trató con IFN como control. **C)** Células CEF sin infectar (U) o infectadas con 2 pfu/célula de ARV se incubaron con los agentes lisosomotrópicos a los tiempos indicados. A las 18 hpi las células se lisaron y los niveles intracelulares de PKR, μNS y actina se analizaron por Western blot.

Para determinar si la expresión de IFN es dependiente de la expresión de los genes virales, analizamos la expresión de IFN y PKR en células incubadas en presencia del compuesto antiviral ribavirina. La ribavirina es un análogo de nucleósido que impide la transcripción de mensajeros reovirales sin afectar a la síntesis de los celulares (Bodelón et al., 2002; Rankin et al., 1989). Los resultados que se muestran en la figura 17A indican que la incubación con 100 μM de ribavirina de células CEF infectadas con ARV no inhibe la expresión de PKR, a pesar de que bloquea totalmente la expresión de los genes reovirales, como se demuestra por la ausencia de expresión de la proteína no estructural μNS . Además, los sobrenadantes de células infectadas e incubadas con ribavirina siguen manteniendo la capacidad para activar el promotor del gen Mx (Figura 17B). Debido a que se ha descrito que la ribavirina puede tener un efecto potenciador del sistema del IFN (Thomas et al., 2011), empleamos un método alternativo para analizar la dependencia de

la inducción de IFN y PKR de la expresión de los genes reovirales. Para ello, se infectaron células con ARV inactivado con luz UV, puesto que estudios previos habían mostrado que el tratamiento del ARV con luz UV elimina la capacidad del virus para expresar proteínas virales, aunque no para provocar apoptosis (Labrada et al., 2002). Se obtuvieron niveles similares de expresión de PKR cuando las células se infectaron con ARV sin inactivar o inactivado, a pesar de que el virus inactivado no expresa proteínas virales (Figura 17C). Al analizar la capacidad de los sobrenadantes para estimular el promotor de Mx, se observó que el sobrenadante de células infectadas con virus inactivado es capaz de activar dicho promotor aunque lo hace en menor cuantía que el sobrenadante de las células infectadas con virus sin inactivar (Figura 17D). Esto podría deberse a la incapacidad del virus inactivado para producir progenie viral e infecciones secundarias, lo que debería afectar negativamente a la producción de IFN.

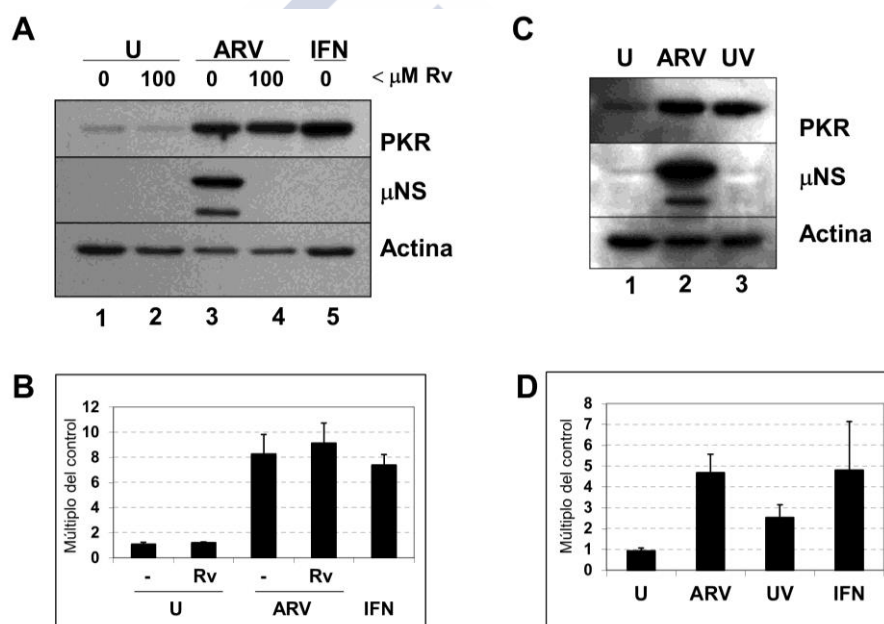


Figura 17. La inducción de PKR en células infectadas con ARV se produce en ausencia de expresión de genes virales. **A)** Monocapas de CEF sin infectar (U) o infectadas con 2 pfu/célula de ARV purificado se incubaron 18 h en presencia o ausencia de 100 μ M de ribavirina (Rv). Estas células, y células control incubadas 18 h con IFN, se lisaron y los niveles de PKR, μ NS y actina se determinaron mediante Western blot. **B)** Capacidad de los sobrenadantes de las células del experimento anterior para activar el promotor Mx en células DF1 transfectadas con el plásmido reportero pGL3-P-Mx-luc. **C)** Monocapas de células CEF se infectaron con 2 pfu/célula de ARV purificado o con la misma cantidad de virus inactivado con luz UV (UV). A las 18 hpi se lisaron las células y los niveles de PKR, μ NS y actina se determinaron por Western blot. **D)** Capacidad de los sobrenadantes de las células del experimento anterior para activar el promotor Mx en células DF1 transfectadas.

Por último, examinamos la distribución intracelular del dsRNA en células infectadas, dado que éste podría ser el activador de los PRRs. Se cree que el dsRNA genómico de los reovirus nunca llega a estar expuesto en el citoplasma de la célula

Resultados

infectada, ya que la transcripción de los segmentos genómicos tiene lugar en el interior de los cores, liberándose los mRNAs así generados al citoplasma a través de las torretas formadas por la proteína λ C. Por otra parte, la síntesis de la hebra negativa se produce cuando los 10 mRNAs virales se encuentran encapsidados dentro de las partículas virales en formación, con lo que el dsRNA genómico de la progenie tampoco quedaría expuesto al citoplasma. Sin embargo, en células infectadas con rotavirus, se han encontrado focos de dsRNA en el citoplasma, fuera de los viroplasmas, y se cree que ese dsRNA es el responsable de la activación de PKR y de la fosforilación de eIF2 α que se observa durante la infección con ese virus (Rojas et al., 2010). Para comprobar si durante la infección con ARV se genera dsRNA citoplasmático accesible a los sensores celulares, células CEF se infectaron con ARV durante 10 h, se fijaron con paraformaldehído y se estudió mediante inmunofluorescencia la distribución del dsRNA. Para ello se empleó el anticuerpo monoclonal J2, que reconoce dsRNA de más de 40 pares de bases, pero que no reconoce a los RNAs ribosomales. Como control, se emplearon células transfectadas con el dsRNA sintético poli(I:C). En estos experimentos observamos que la permeabilización de las células fijadas con Triton X-100 no es suficiente para permitir que el anticuerpo detecte el dsRNA de los nuevos viriones y que es necesario desnaturalizar las proteínas de las inclusiones mediante la incubación con metanol para que pueda ser detectado (Figura 18A). Esto sugiere que el dsRNA de los nuevos viriones, que supone la mayor parte del dsRNA presente en las células infectadas, es muy poco accesible a las proteínas citoplasmáticas y, por tanto, es poco probable que pueda ser detectado por la célula. Sin embargo, en todos los casos se detecta un patrón punteado de dsRNA en el citoplasma de las células infectadas, fuera de las inclusiones.

Para comprobar si los puntos detectados por J2 en el citoplasma se corresponden con los segmentos genómicos de las partículas parentales, o, por el contrario, se trata de dsRNA producido por los cores transcripcionalmente activos, se infectaron células CEF con ARV en presencia o ausencia del inhibidor de la decapsidación cloruro amónico y se analizaron a distintos tiempos. El cloruro amónico, al inhibir la decapsidación, no sólo impide que las partículas virales alcancen el citoplasma y sean detectadas por la célula, sino que inhibe los cambios estructurales necesarios para que se active la transcripción de los genes virales (Martínez-Costas et al., 1995). En la figura 18B se observa que, pese al tratamiento con cloruro amónico, el anticuerpo J2 sigue detectando dsRNA en el citoplasma, indicando que este anticuerpo es lo suficientemente sensible para detectar el dsRNA de los reoviriones retenidos en el endosoma. A tiempos tardíos, la señal parece

acumularse en una región de la célula, lo que quizá se deba a la acumulación de las vesículas (Figura 18B, paneles de la derecha). Finalmente, se empleó un anticuerpo contra una de las proteínas mayoritarias del core, la proteína σA , y se observó que el dsRNA detectado fuera de las inclusiones colocaliza con ella (Figura 18C), sugiriendo que el dsRNA se encuentra recubierto por las proteínas del core. Estos resultados apoyan el modelo de que durante la infección con reovirus aviar el dsRNA viral no queda expuesto en ningún momento.

Estos resultados indican que la detección del virus por la célula se produce después de la decapsidación y antes de que comience la expresión de los genes virales. Los eventos desencadenantes podrían ser: i) la exposición de proteínas de las ISVPs o del core, ya sea en el interior de los lisosomas o en el citoplasma; ii) la disrupción de la membrana lisosomal; o iii) la liberación al citoplasma de ácidos nucleicos virales, bien sean los oligonucleótidos cortos ricos en adenina, bien los segmentos genómicos liberados por algunas cápsides más inestables y que no lleguen a detectarse con el anticuerpo α -J2, o bien estructuras secundarias de mRNA virales que puedan empezar a sintetizarse aún en presencia de ribavirina.

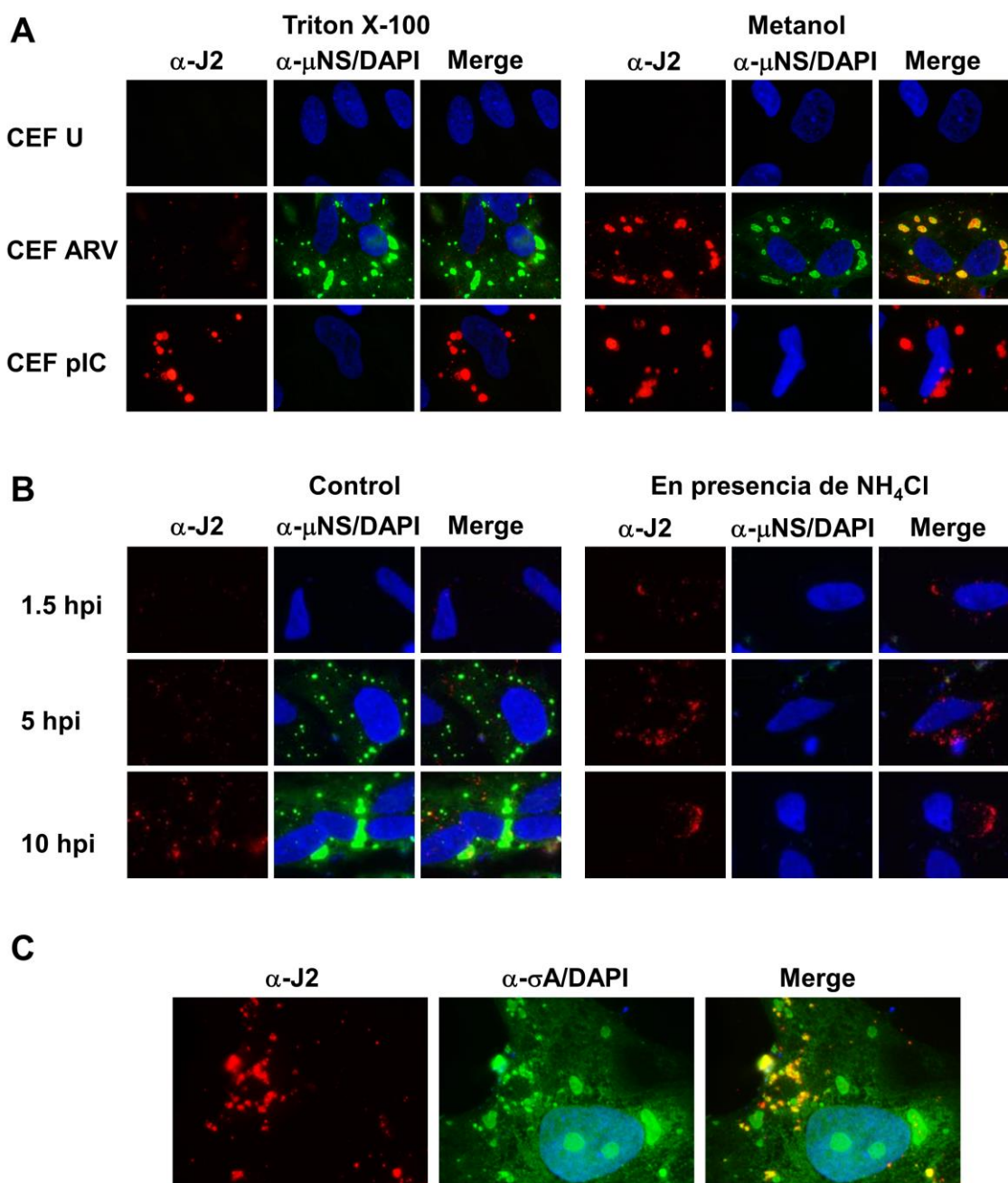


Figura 18. Distribución del dsRNA en células CEF y DF1 infectadas con ARV. **A)** Células CEF se infectaron con 10 pfu/célula de ARV durante 10 h, o se transfectaron con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de poli(I:C) durante 4 h (pIC) o se dejaron sin tratar (U). Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS y se permeabilizaron con Triton X-100 o metanol como indica la figura. Después se analizaron por inmunofluorescencia, empleando anticuerpos contra la proteína formadora de los cuerpos de inclusión, μNS (en verde), y contra el dsRNA de más de 40 pb (α -J2, en rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI. **B)** Células CEF se infectaron con una multiplicidad de 10 pfu/célula de ARV, en presencia (bloque de la derecha) o ausencia (bloque de la izquierda) de 20 mM de cloruro amónico y se fijaron a los tiempos indicados con paraformaldehído. La permeabilización se realizó empleando Triton X-100 para reducir la señal del dsRNA de las inclusiones. La tinción de la inmunofluorescencia se realizó como en la figura anterior. **C)** Células CEF se infectaron a una multiplicidad de 10 pfu/célula de reovirus aviar y se fijaron con paraformaldehído a 10 hpi. Se permeabilizó con Triton X-100 para evitar que el anticuerpo α -J2 detectara el RNA del interior de las inclusiones, y se realizó inmunofluorescencia con anticuerpos contra la proteína σA del reovirus aviar (en verde) y dsRNA (α -J2, en rojo).

4.- LA INFECCIÓN CON ARV NO INDUCE LA SECRECIÓN DE IFN NI LA PRODUCCIÓN DE PKR EN CÉLULAS DF1

La línea celular DF1 es una línea estable que se originó por transformación espontánea de CEF. Sin embargo, esta línea celular presenta una serie de diferencias con las CEF de las que procede, como una mayor expresión de los genes implicados en el progreso del ciclo celular, inhibición de rutas apoptóticas o una mayor capacidad para el transporte de moléculas (Kong et al., 2011). En este trabajo ya hemos mostrado que los dos tipos celulares responden de forma diferente a la transfección con plásmidos, puesto que la transfección induce la expresión de IFN y PKR en células CEF, pero no en DF1. Por ello decidimos comparar la expresión de IFN y PKR en células CEF y DF1 cuando estas células se infectan con diferentes virus o se exponen a otros estímulos.

Para analizar la respuesta a infecciones virales, se infectaron células DF1 con 2 pfu/célula de los virus VSV, WR y ARV y, a las 18 hpi, se recogieron los sobrenadantes y se lisaron las células. Los resultados mostraron que no se produce un incremento de los niveles intracelulares de PKR ni secreción de IFN al medio de cultivo en células DF1 infectadas con cada uno de los tres virus (Figuras 19A y 19B). Sin embargo, el tratamiento de células DF1 con IFN sí indujo un aumento de los niveles de PKR y estimuló el promotor de Mx, lo que demuestra que estas células poseen receptores para el IFN y disponen de una ruta activa de transmisión de señales para esta citoquina. Estos resultados muestran que, a diferencia de lo que ocurre en CEF, la infección con ARV de células DF1 no induce la expresión de IFN.

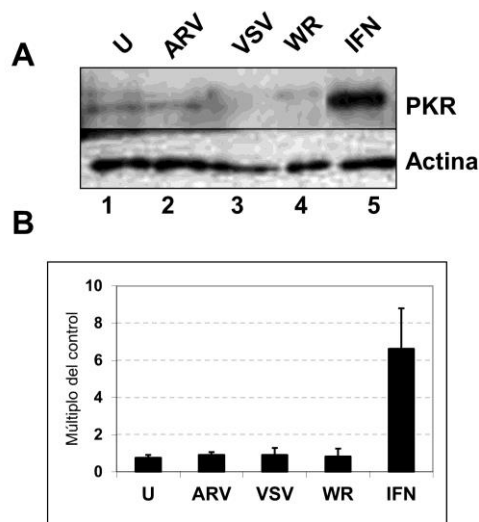


Figura 19. La infección con ARV de células DF1 no induce la expresión de IFN. **A)** Análisis por Western blot de los niveles de PKR en extractos de células DF1 sin infectar (U), tratadas con IFN (IFN) o infectadas durante 18 h con 2 pfu/célula de los virus indicados en la parte superior. **B)** Capacidad de los sobrenadantes de las mismas células para activar el promotor del gen Mx cuando se añaden a células DF1 transfectadas con el plásmido pGL3-P-Mx-luc.

La incapacidad de células DF1 infectadas con ARV para secretar IFN podría deberse a que: i) el virus no es detectado por los PRRs en estas células; ii) la ruta de transducción de señales que va desde los PRRs hasta la activación de los factores de transcripción está dañada; iii) el gen del IFN en estas células carece de un promotor funcional; o iv) las células DF1 no son capaces de secretar IFN al exterior de la célula. Para determinar si estas células son defectivas en la liberación de IFN se transfectaron células DF1 con los plásmidos pcDNA-chIFN α y chIFN β (cedidos por el Dr. Peter Staeheli), que expresan los IFNs de pollo α y β , respectivamente. A las 24 h post-transfección se lisaron las células y los niveles de PKR de los extractos se determinaron mediante Western blot. Puede verse en la figura 20A que la transfección con cualquiera de los dos plásmidos que expresan IFN, pero no con el plásmido vacío, produce un gran incremento en los niveles de PKR. Sin embargo, ese incremento no tiene lugar cuando las células transfectadas se incuban en presencia de 0,5 μ g/ml de BFA, lo que demuestra que las células DF1 son capaces de producir IFN y de secretarlo al medio de cultivo.

El dsRNA es un estímulo que suele inducir la expresión y secreción de IFN, lo que a su vez provoca un aumento en los niveles de PKR. Para comprobar si el gen del IFN de células DF1 tiene un promotor funcional y activable por dsRNA, se transfectaron estas células con 10 μ g/ml de poli(I:C), se incubaron en presencia o ausencia de BFA y se lisaron a las 18 h post-transfección. En la figura 20B se observa que la transfección de

dsRNA induce un aumento de los niveles de PKR, pero que ese aumento no tiene lugar cuando las células transfectadas se incuban en presencia de BFA. Estos resultados demuestran que el gen del IFN de las células DF1 posee un promotor funcional y que estas células son capaces de secretar IFN en respuesta a determinados estímulos. En el caso del reovirus de mamífero se ha sugerido que la irradiación del virus con UV provoca la desestabilización de la cápside viral y facilita la salida del dsRNA genómico al citoplasma (Henderson y Joklik, 1978). Dado que hemos demostrado que el dsRNA es inductor de IFN en las células DF1, decidimos comprobar si el ARV inactivado con luz UV también podría actuar como inductor de la expresión de IFN. Para ello, se infectaron células DF1 con ARV purificado, inactivado o no con UV, o se transfectaron con poli(I:C). Como control se trataron de la misma manera células CEF. Puede verse en la figura 20C que, mientras que los niveles de PKR en células DF1 aumentan tras la transfección con poli(I:C), éstos permanecen inalterados tras la incubación con ARV inactivado con luz UV. Sin embargo, el virus inactivado sí es capaz de inducir la expresión de PKR en células CEF.

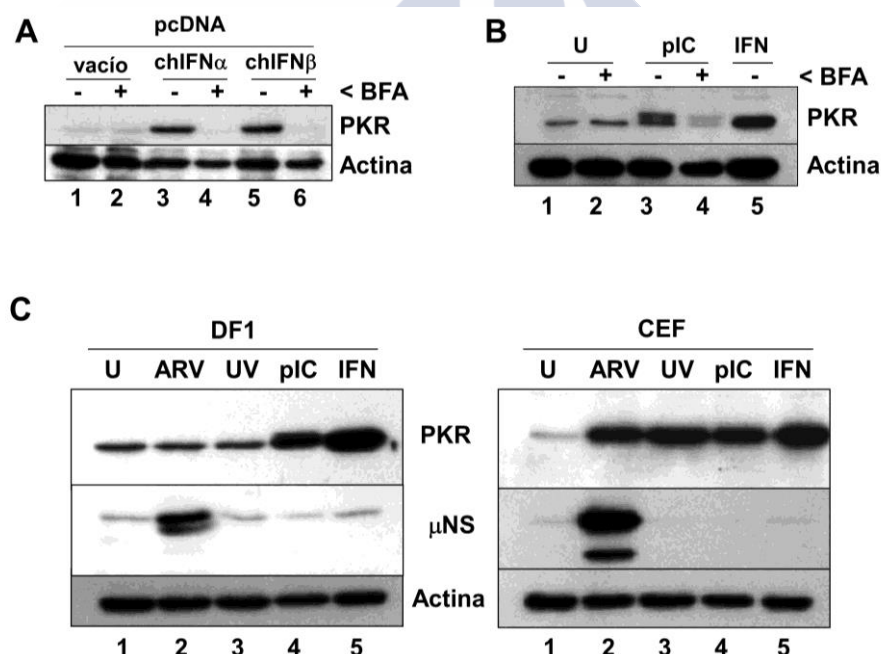


Figura 20. Las células DF1 tienen capacidad para expresar y secretar IFN. A) Células DF1 se transfectaron con los plásmidos indicados en presencia o ausencia de 0,5 μ g/ml de BFA desde las 3 h post-transfección. A las 18 h post-transfección, las células se lisaron y los niveles de PKR de los extractos se determinaron mediante Western blot. B) Análisis por Western blot de extractos de células DF1 sin transfectar (U) o transfectadas con 10 μ g/ml de poli(I:C) (pIC) en presencia o ausencia de 0,5 μ g/ml de BFA y lisadas a 18 h post-transfección. Las células del carril de la derecha se incubaron 18 h con IFN. C) Células DF1 (panel de la izquierda) o CEF (panel de la derecha) se incubaron con 2 pfu/célula de reovirus aviar purificado (ARV), con la misma cantidad de virus inactivado con luz UV (UV) o se transfectaron con poli(I:C). En los pocillos de la izquierda, las células no se trataron (U) y en los de la derecha se trataron con IFN. A las 18 h post-tratamientos, las células se lisaron y los niveles de PKR y μ NS se determinaron mediante Western blot.

Resultados

Los resultados obtenidos demuestran que el promotor del gen del IFN de células DF1 es funcional y que estas células son capaces de expresar y secretar IFN ante determinados estímulos, aunque no ante la infección con ARV. La incapacidad de las células DF1 para reconocer la presencia de partículas de ARV en su interior podría deberse a la carencia de PRRs o a deficiencias en la ruta de transducción de señales que inician estos receptores. La detección de poli(I:C) en células de pollo está mediada en parte por el receptor TLR3 (Karpala et al., 2008), un receptor que se encuentra en la superficie de la membrana celular o en el interior de endosomas. El hecho de que las células DF1 sean capaces de responder a la transfección con poli(I:C) sugiere que la ruta de transducción de señales iniciada por TLR3 es funcional, por lo que este receptor no parece estar implicado en el reconocimiento de ARV. Sin embargo, en los dos casos en que hemos observado diferencias de comportamiento entre CEF y DF1, parece que la detección se produce en el citoplasma, puesto que para que se produzca la secreción de IFN en células CEF transfectadas debe estar presente tanto el plásmido como el reactivo de transfección, y en la infección con ARV debe producirse la decapsidación y liberación del core reoviral al citoplasma. Por otra parte, se ha descrito que la detección de los MRVs en el interior de células infectadas depende de los sensores citoplasmáticos denominados RLRs, unas helicasas con dominios de reclutamiento de caspasas (CARDs) que reconocen RNAs virales. En el reconocimiento de los reovirus de mamífero parecen estar implicados tanto RIG-I, que activaría al factor de transcripción IRF3, como MDA5, que activaría a NF- κ B (Sherry, 2009), sugiriendo que la célula detecta un RNA citoplasmático producido durante la infección. Se ha publicado recientemente que las células de pollo no expresan el receptor RIG-I, lo que sugiere que la detección de RNAs virales en el interior de células de pollo corre a cargo exclusivamente del sensor MDA5 (Karpala et al., 2011).

Para averiguar si la incapacidad de las células DF1 para secretar IFN en respuesta a la infección por ARV se debe que estas células expresan bajos niveles del sensor MDA5, se realizó un análisis comparativo por qPCR de los niveles del mRNA de este sensor en células DF1 y CEF. Los resultados de la figura 21 muestran que los niveles del mRNA de MDA5 presentes en células DF1 son muy inferiores a los detectados en células CEF. Esto sugiere que la baja expresión del sensor MDA5 en células DF1 podría ser, al menos en parte, responsable de la incapacidad de estas células para secretar IFN en respuesta a la infección por reovirus aviar o a la transfección de plásmidos.

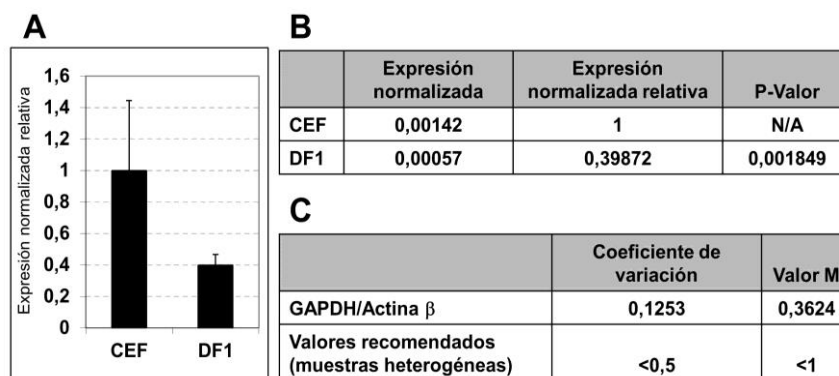


Figura 21. Diferencia en los niveles de mRNA de MDA5 en células CEF y DF1. **A)** El RNA total de tres muestras de CEF y DF1 se extrajo con Trizol y se preparó como se indica en el apartado de materiales y métodos para determinar por qPCR los niveles de expresión de los genes MDA5, Actina β y GAPDH. Debido a que la muestra es heterogénea (se están comparando dos tipos celulares diferentes), se han empleado dos genes de referencia (Actina β y GAPDH). La gráfica muestra la expresión relativa del gen MDA5 en CEF y DF1, a la expresión en células CEF se le ha dado el valor 1. Las barras de error indican el error estándar sobre la media. **B)** Tabla resumen de los datos de expresión de MDA5, donde se muestra que la diferencia de expresión es estadísticamente significativa ($p < 0,01$). **C)** Parámetros de calidad de los genes empleados como referencia, indicando que la estabilidad de estos genes está dentro de los valores aceptables para muestras heterogéneas.

Para intentar corroborar esta hipótesis, se clonó el gen que expresa la proteína MDA5 de pollo fusionada a la etiqueta HA en el plásmido pCI-neo y se transfectó en células DF1. Como control, las células se transfectaron con el plásmido pCI-neo vacío. Tras 6 h de transfección, las células se infectaron con 2 pfu/célula de ARV purificado y a las 18 hpi se recogieron las células. Los resultados que se muestran en la figura 22A indican que la sobreexpresión de MDA5 en ausencia de infección basta para aumentar los niveles de PKR, posiblemente por activación del promotor del IFN β (Lee et al., 2012). Debido a que la producción de IFN afectará también a los niveles de otros PRRs, el ligero incremento en los niveles de PKR que se observa en células transfectadas con MDA5 e infectadas, respecto a las células transfectadas con MDA5 y sin infectar (Figura 22B), no puede atribuirse con certeza a la sobreexpresión de este receptor y podría deberse a otros factores.

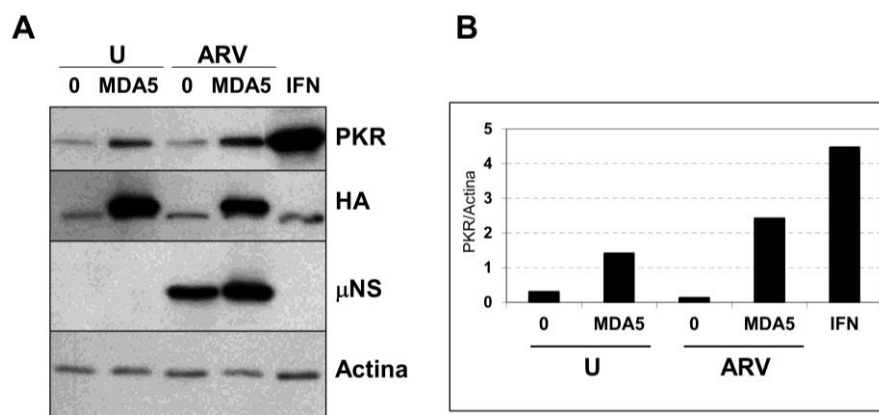


Figura 22. La sobreexpresión de MDA5 altera los niveles de PKR. A) Células DF1 se transfectaron con pCI-neo (0) o con pCI-neo-HA-MDA5 (MDA5), o se trataron con IFN. A las 6 h post-transfección, las células se infectaron con 2 pfu/célula de reovirus aviar (ARV). A las 18 hpi las células se lisaron y los extractos se analizaron mediante Western blot con anticuerpos contra las proteínas indicadas a la derecha. **B)** Análisis por densitometría de los niveles de PKR normalizados a los niveles de actina.

5.- ESTADO DE ACTIVACIÓN DE PKR Y DE SU SUSTRATO eIF2α

5.1.- Estudio de la activación de PKR en células aviares

Nuestros resultados mostraron que, a pesar de que en células CEF infectadas con ARV se induce la expresión de IFN y de PKR, el virus replica bien en esas células. Esto podría deberse a que PKR no se active en células infectadas con ARV o a que el ARV sea capaz de replicar en células en las que PKR está activada. La activación de PKR se puede producir por unión a dsRNA, lo que provoca un cambio conformacional que permite la dimerización de la proteína y su autofosforilación en residuos de serina, treonina y tirosina (Cole, 2007). De los múltiples sitios de fosforilación que posee la proteína PKR humana se han identificado dos que son fundamentales para su actividad catalítica, los residuos de treonina que ocupan las posiciones 446 y 451 (Romano et al., 1998a; Zhang et al., 2001). Las fosforilaciones en otras posiciones contribuyen a aumentar la estabilidad del dímero y la afinidad por sus sustratos, modulando así su actividad quinasas (Su et al., 2006).

La comparación de las secuencias aminoácidas de las proteínas PKR de pollo, humana y murina, mostró diferencias considerables en la región en la que se producen las fosforilaciones activadoras, por lo que era de esperar que los anticuerpos comerciales específicos contra las PKR fosforiladas humana y de ratón no fuesen capaces de detectar a la PKR fosforilada de pollo. Debido a esto, decidimos comprobar si las formas fosforilada y no fosforilada de la PKR de pollo se pueden separar electroforéticamente,

para identificarlas con el anticuerpo contra PKR de pollo que tenemos en nuestro laboratorio. Para ello, células CEF y DF1 se trataron con IFN para inducir la expresión de la forma inactiva y sin fosforilar de PKR, o se trataron con IFN y se transfectaron con poli(I:C) para provocar la expresión, activación y fosforilación de PKR. La actividad de PKR se determinó analizando en paralelo la fosforilación de su sustrato eIF2 α mediante Western blot, empleando anticuerpos contra la forma fosforilada y no fosforilada de este factor de iniciación. Además, los extractos de las células transfectadas con poli(I:C) se incubaron con fosfatasa alcalina en un intento de desfosforilar la forma activa de PKR. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 23. El pretratamiento con IFN de células CEF induce la aparición de dos isoformas de PKR, difíciles de distinguir en la mayoría de los geles, mientras que en DF1 sólo aparece una banda, que migra en la posición de la de mayor movilidad electroforética de CEF (Figura 23, panel a, carriles 2 y 6). Esta banda debería corresponderse con la forma inactiva y sin fosforilar de PKR, ya que su aparición no va acompañada de un aumento de los niveles de fosforilación de eIF2 α , lo que concuerda con la idea de que el IFN induce la expresión de PKR pero no su activación.

Dos hipótesis podrían explicar la aparición de la banda de PKR de menor movilidad electroforética en CEF pero no en DF1: i) las células CEF son fibroblastos en vías de diferenciación y, dado que se ha descrito que PKR participa en algunas etapas de la diferenciación celular aumentando los niveles de fosforilación de eIF2 α (Gerlitz et al., 2002), la isoforma de menor movilidad electroforética podría corresponderse con una forma de PKR de actividad intermedia; y ii) otra posibilidad es que en los cultivos primarios de CEF haya diferentes tipos celulares que expresen isoformas de PKR de diferente tamaño. Una situación similar se ha descrito para la PKR humana, donde en diferentes tejidos se expresan tres transcritos distintos de PKR que dan lugar a dos isoformas de diferente tamaño, con una diferencia de 40 aminoácidos (Kawakubo et al., 1999; NCBI, 2014).

Cuando las células pretratadas con IFN se transfectaron con poli(I:C) se obtuvieron resultados dispares en los dos tipos celulares, aunque en ambos se observó que la transfección de dsRNA activa la apoptosis, como se demuestra por la aparición de un fragmento de degradación de eIF2 α , consecuencia de la activación de caspasas (Marissen et al., 2000; Satoh et al., 1999). En células DF1, la transfección de dsRNA

Resultados

provocó la aparición de una banda de PKR de menor movilidad electroforética, al mismo tiempo que se redujo la intensidad de la de mayor movilidad electroforética (Figura 23, panel a, carril 7) y se produjo un incremento significativo de los niveles de fosforilación de eIF2 α . Estos resultados sugieren que la banda de menor movilidad electroforética se corresponde con la forma hiperfosforilada y activa de PKR, lo que está apoyado por el hecho de que el tratamiento con fosfatasa alcalina de los extractos de células transfectadas reduce considerablemente la intensidad de esta banda y aumenta la de mayor movilidad electroforética (Figura 23, panel a, carril 8). En células CEF los efectos de la transfección de dsRNA sobre la activación de PKR no son tan claros como en DF1. La banda de PKR que se genera por transfección de dsRNA no es muy intensa y se encuentra muy próxima a la banda superior del doblete que se observa en las células CEF sin transfectar, aunque el hecho de que desaparezca tras la incubación con fosfatasa alcalina indica que se trata de una forma fosforilada (Figura 23, comparar carriles 3 y 4). Esta isoforma parece tener una actividad quinasa algo inferior a la que se forma en DF1 dado que el aumento en los niveles de eIF2 α fosforilado en respuesta a dsRNA es mucho menor en CEF que en DF1. Además, se ha observado un cierto grado de fosforilación basal de eIF2 α en células CEF sin tratar y en ausencia de niveles elevados de PKR (Figura 23, carril 1), quizá relacionado con la diferenciación de los fibroblastos, o que podría depender de otras quinasas de eIF2 α .

Curiosamente, la incubación con fosfatasa alcalina indujo la desfosforilación de PKR pero no la de eIF2 α (Figura 23, carriles 7 y 8, comparar paneles a y c). Esto podría deberse a que la forma fosforilada de eIF2 α se une fuertemente al factor intercambiador de guaninas eIF2B, lo que podría ocultar a la serina 51 de eIF2 α y hacerla inaccesible a la fosfatasa. También podría ocurrir que la fosfatasa alcalina tenga cierta preferencia por la desfosforilación de treoninas o tirosinas en lugar de serinas, o que la desfosforilación no sea completa, ya que en el caso de DF1 aún se detecta algo de señal por encima de la banda de PKR inactiva (Figura 23, panel a, carril 8).

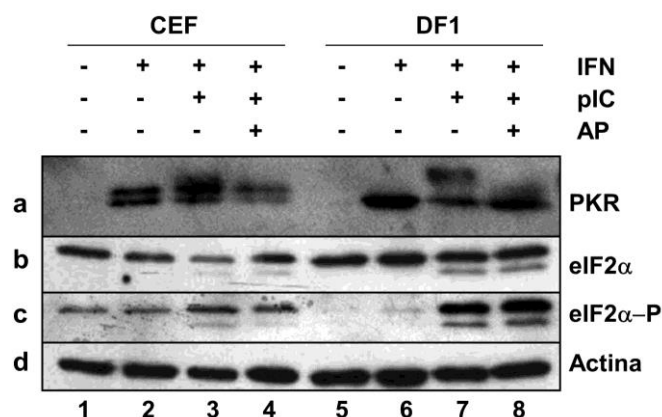


Figura 23. La banda de menor movilidad electroforética de PKR se corresponde con una forma hiperfosforilada y activa. Células CEF o DF1 sin tratar (carriles 1 y 5) o tratadas con IFN (carriles 2-4 y 6-8) durante 24 h, se transfectaron con 10 µg/ml de poli(I:C) (carriles 3, 4, 7 y 8) o no (carriles 1, 2, 5 y 6) durante 4 h más. En ese momento se lisaron las células y parte de los extractos de células transfectadas se incubaron durante 1 h a 37°C con fosfatasa alcalina, tal y como se describe en métodos (carriles 4 y 8). Los extractos se analizaron mediante Western blot con anticuerpos contra las proteínas indicadas a la derecha de la figura. Para separar mejor las bandas de PKR, se desarrolló la electroforesis durante más tiempo.

5.2.- Estado de PKR y eIF2α en células aviares infectadas

A continuación, se estudió el estado de PKR y de su sustrato eIF2α en células CEF pretratadas o no con IFN e infectadas con los virus WR, VSV o ARV. Como control positivo de fosforilación de eIF2α, las células se trataron con DTT, un agente reductor que al romper los puentes disulfuro de las proteínas del retículo endoplasmático, provoca la activación de la UPR (*unfolded protein response*) y la fosforilación de eIF2α mediada por la proteína quinasa PERK (Harding et al., 2002). El tratamiento con IFN, como ya se había observado antes (Figura 11), inhibe totalmente la síntesis de las proteínas de VSV y prácticamente todas las de WR, mientras que sólo ejerce un pequeño efecto perjudicial sobre las de ARV (Figura 24 panel a). También se puede observar que, en células no tratadas con IFN, la infección con cada uno de los tres virus induce una inhibición muy acusada de la síntesis de proteínas celulares (*shutoff*), a pesar de que el grado de fosforilación de eIF2α es bajo y similar al de células sin infectar. Este resultado sugiere que la infección por estos virus inhibe la síntesis de proteínas celulares por mecanismos independientes de la fosforilación de eIF2α. Por otra parte, sólo se detectó la forma de menor movilidad electroforética (activa) de PKR en células pretratadas con IFN e infectadas con WR (Figura 24, carril 8), lo que viene acompañado de un incremento de la forma fosforilada de eIF2α y de la inhibición de la

Resultados

síntesis de proteínas virales y celulares. Esto sugiere que la activación de PKR desempeña un papel importante en la sensibilidad de WR hacia el IFN en células CEF. En el caso de VSV, el pretratamiento con IFN indujo una disminución muy grande de la síntesis de proteínas virales y un rescate parcial de la síntesis de las celulares (Figura 24, comparar carriles 5 y 6 del panel a). Esto viene acompañado de un aumento en los niveles de fosforilación de eIF2 α , aunque no se observó la aparición de la isoforma activa de PKR (Figura 24, panel c, carriles 5 y 6). Esto podría deberse a que en la infección de algunas células con este virus se activa también PERK, otra quinasa de eIF2 α que se encuentra en el retículo endoplasmático y que contribuye a la eliminación del virus (Baltzis et al., 2004), o a la dificultad de observar la activación de PKR en CEF. En el caso de CEF infectadas con ARV, el IFN no provocó una reducción significativa de la síntesis de proteínas virales, ni la aparición de la forma activa de PKR o un aumento de la fosforilación de eIF2 α , lo que sugiere que la resistencia de ARV hacia el IFN se debe a que este virus utiliza mecanismos que previenen la activación de PKR y la fosforilación de su sustrato.

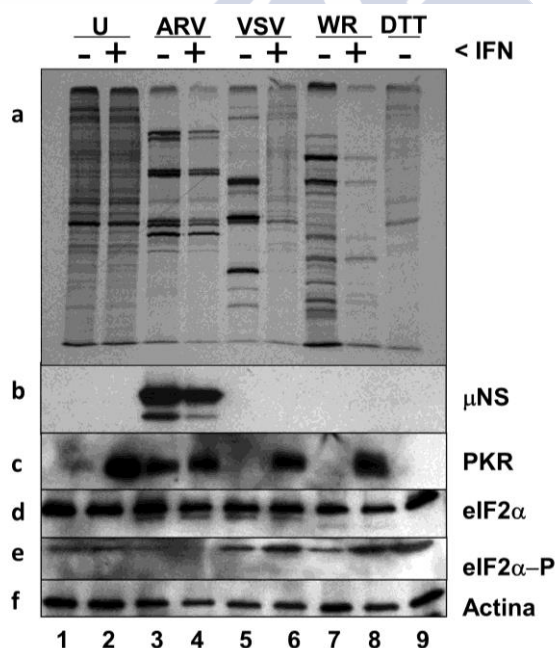


Figura 24. Estado de activación de PKR en células CEF infectadas con distintos virus. Células CEF se trataron o no con IFN durante 24 h según indica la figura y se infectaron con 10 pfu/célula de ARV, 5 pfu/célula de VSV, 5 pfu/célula de WR o se dejaron sin infectar (U). Las células sin infectar del carril de la derecha se trataron con 1 mM de DTT desde las 8,75 hpi hasta la lisis a las 10 hpi. Un grupo de células infectadas con ARV se marcó con [^{35} S]-metionina-cisteína de 9 a 10 hpi y a continuación se lisaron (panel a), mientras que otro grupo se lisó a las 10 hpi para analizar los extractos mediante Western blot con anticuerpos contra las proteínas indicadas a la derecha de la figura (paneles b-f). El marcaje de las células infectadas con VSV se realizó de 5 a 6 hpi y la lisis de las células a las 6 hpi, mientras que el de las células infectadas con WR se realizó de 8 a 9 hpi y se lisaron las células a las 9 hpi.

Un estudio similar realizado en células DF1 reveló que los virus VSV y WR responden al IFN de forma muy parecida a como lo hacen en células CEF. En el caso de células pretratadas con IFN, la infección con WR promueve la aparición de la forma hiperfosforilada de PKR y la fosforilación de eIF2 α (Figura 25A, carril 6). En las células pretratadas con IFN e infectadas con VSV se detecta la activación de una pequeña fracción de PKR, que está acompañada de un aumento en la fosforilación de eIF2 α (Figura 25A, panel d, carril 4). En el caso de la infección con ARV se encontraron diferencias importantes con los resultados obtenidos en CEF (Figura 25B). No se detectó inhibición de la síntesis de proteínas celulares durante la infección con ARV de células DF1 no tratadas con IFN, lo que enmascara las bandas de las proteínas virales. Por otra parte, el pretratamiento con IFN de las células DF1 infectadas con ARV produce un aumento de la síntesis de proteínas virales sin que se detecte apenas activación de PKR ni fosforilación de eIF2 α (Figura 25B, carriles 5 y 6). El hecho de que el pretratamiento de las células DF1 con IFN induzca un aumento en la síntesis de proteínas de ARV es un resultado sorprendente, ya que se supone que el IFN debería ejercer el efecto opuesto.

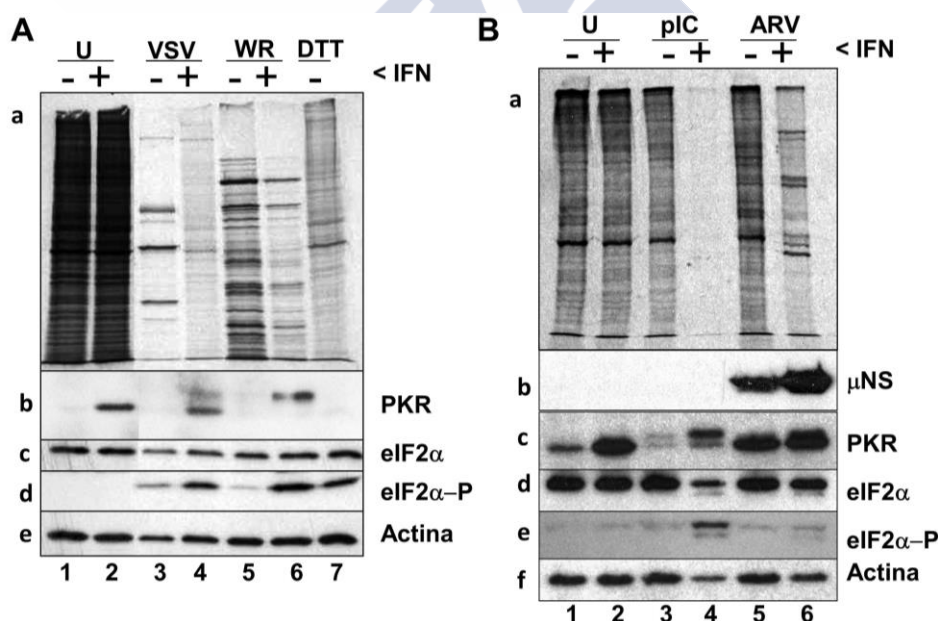


Figura 25. Estado de activación de PKR en células DF1 infectadas con distintos virus. A) Células DF1 se trataron o no con IFN durante 24 h según indica la figura y se infectaron con 5 pfu/célula de VSV o 5 pfu/célula de WR. Las células del pocillo de la derecha se trataron con 1 mM DTT desde las 7,75 hpi hasta su lisis a las 9 hpi. Un grupo de las células infectadas con WR se marcó con [^{35} S]-metionina-cisteína de 8 a 9 hpi justo antes de lisar, mientras que las del otro grupo se lisaron a las 9 hpi para analizar los extractos mediante Western blot con anticuerpos contra las proteínas indicadas a la derecha de la figura. En el caso de las células infectadas con VSV, el marcaje se realizó de 5 a 6 hpi y la lisis a las 6 hpi. **B)** Células DF1 se trataron o no con IFN durante 24 h, y se infectaron con 10 pfu/célula de ARV. Como control, se transfectaron dos muestras con 10 μ g/ml de poli(I:C) durante 4 h (pIC). De 9 a 10 hpi, un grupo de células se marcó con [^{35} S]-metionina-cisteína, y otro se lisó a las 10 hpi para analizar los extractos mediante Western blot con anticuerpos contra las proteínas indicadas a la derecha de la figura.

Los resultados que hemos obtenido hasta ahora sugieren que el ARV utiliza mecanismos para prevenir la activación de PKR y contrarrestar así la acción antiviral del IFN. Dado que la proteína PKR se activa por unión a dsRNA o a regiones estructuradas de ssRNAs, que se suelen encontrar en células infectadas con algunos virus, decidimos investigar si la infección con ARV es capaz de bloquear o reducir la capacidad del dsRNA para activar PKR. Para ello, células CEF o DF1 pretratadas con IFN se infectaron durante 6 h con ARV antes de transfectarlas con el dsRNA sintético poli(I:C) durante 4 h más. Los resultados revelaron que el dsRNA induce la activación de la PKR de pollo en células sin infectar de ambos tipos celulares, puesto que aparece una banda de PKR de menor movilidad electroforética y aumenta la cantidad de eIF2 α fosforilado (Figura 26A y B, comparar carriles 1 y 2). La activación de PKR es más evidente en células DF1 que en CEF, ya que la transfección del dsRNA induce la casi total desaparición de la banda de PKR inactiva (Figura 26B, comparar carriles 1 y 2). Sin embargo, la activación de PKR en respuesta a dsRNA es mucho menor en células infectadas con ARV que en células sin infectar, como lo demuestra el hecho de que el grado de fosforilación de eIF2 α es más bajo que el de células sin infectar y se reduce la intensidad de la banda de PKR de menor movilidad electroforética (Figuras 26A y B, comparar carriles 2 y 4). Estos resultados indican que la infección de células aviares con ARV reduce la capacidad del dsRNA para activar a PKR, sugiriendo que ARV utiliza mecanismos para prevenir la activación de PKR.

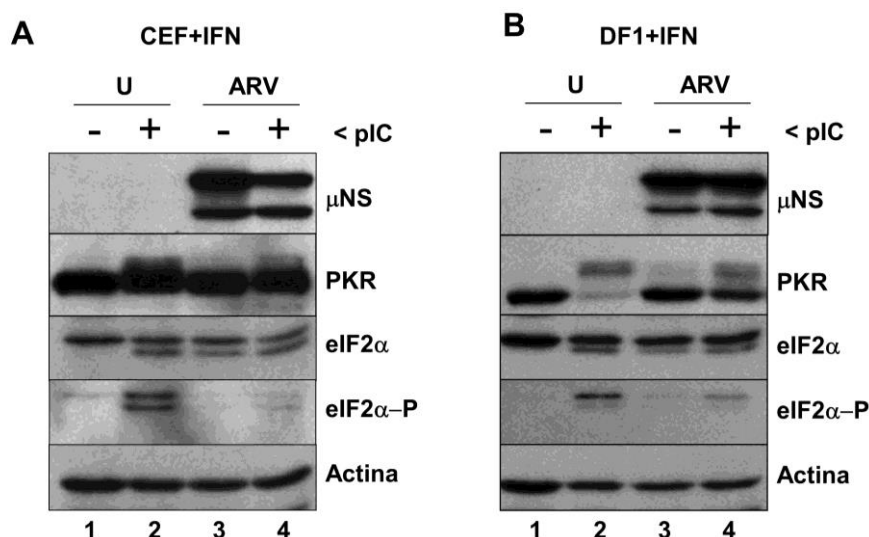


Figura 26. La infección con ARV reduce la capacidad del dsRNA para activar PKR. A) Células CEF pretratadas con IFN durante 24 h para inducir un aumento en los niveles de PKR se infectaron con 10 pfu/célula de ARV (carriles 3 y 4) o se dejaron sin infectar (U, carriles 1 y 2). A las 6 hpi se transfectaron con 10 μ g/ml de poli(I:C) (carriles 2 y 4) y a las 4 h post-transfección se lisaron para analizar sus extractos mediante Western blot con anticuerpos contra las proteínas indicadas a la derecha de la figura. **B)** Células DF1 pretratadas con IFN durante 24 h se infectaron con 20 pfu/célula de ARV (carriles 3 y 4), o se dejaron sin infectar (U, carriles 1 y 2) y se procesaron igual que las células del experimento anterior.

5.3.- El papel de PKR en la sensibilidad al IFN de los virus WR y VSV

Para estudiar la importancia de PKR en la sensibilidad de los virus WR y VSV hacia el IFN, se analizó el efecto del inhibidor específico de PKR, el compuesto C16 (Jammi et al., 2003), sobre la síntesis de proteínas virales en células DF1. El compuesto C16 es un inhibidor de bajo peso molecular que actúa sobre el sitio de unión a ATP de PKR, impidiendo la autofosforilación y activación de la quinasa. Primero se comprobó si este inhibidor es capaz de prevenir la activación de la proteína PKR de pollo y se determinó la concentración mínima que se debería emplear en los siguientes experimentos. Para ello, monocapas de células DF1 se incubaron con IFN durante 24 h y a continuación se incubaron en presencia de las concentraciones indicadas del inhibidor C16. Pasadas 5 h, las células se transfectaron con 10 μ g/ml de poli(I:C), siempre en presencia del inhibidor, y se lisaron 4 h más tarde. Los extractos se analizaron por Western blot con anticuerpos anti-PKR. En la figura 27A puede comprobarse que el inhibidor sólo induce un descenso notable en la intensidad de la banda hiperfosforilada de PKR cuando se usa a la concentración de 10 μ M, pero no a concentraciones inferiores, por lo que decidimos emplear esta concentración en los experimentos posteriores. Estos resultados indican que el inhibidor C16 puede utilizarse para prevenir la activación de la PKR de pollo.

Resultados

A continuación, analizamos si C16 es capaz de rescatar la replicación de WR en células DF1 pretratadas con IFN. Para ello, se añadió el inhibidor al medio de cultivo 30 min antes de añadir el virus y se mantuvo presente hasta el lisado de las células. Sorprendentemente, el inhibidor C16 indujo un aumento de los niveles de fosforilación de eIF2 α en células DF1 sin infectar, pretratadas o no con IFN, aunque eso sólo se tradujo en una ligera inhibición de la síntesis de proteínas celulares, lo que podría indicar que C16 induce la activación de alguna otra quinasa que fosforila a eIF2 α (Figura 27B, carriles 1-4). Además, la presencia del inhibidor no resultó perjudicial para la viabilidad de las células, al menos durante el tiempo de realización del experimento (resultado no mostrado). Sin embargo, el inhibidor no indujo un aumento en la forma fosforilada de eIF2 α en células no pretratadas con IFN e infectadas con WR, cuando se comparan con las mismas células sin tratar con el inhibidor (Figura 27B, carriles 5 y 6). En células infectadas con WR y pretratadas con IFN, C16 impidió la activación de PKR, lo que se tradujo en un descenso en los niveles de fosforilación de eIF2 α y en un rescate de la síntesis de proteínas virales (Figura 27B comparar carriles 7 y 8) hasta niveles equiparables a los de células sin tratar con IFN (Figura 27B, carril 6). Estos resultados indican que la sensibilidad de WR hacia el IFN en células aviares se debe, al menos en parte, a la activación de PKR y a la acumulación de eIF2 α fosforilado.

Curiosamente, el tratamiento con C16 de células DF1 infectadas con WR alteró el patrón de las proteínas virales sintetizadas (Figura 27B, comparar carriles 5 y 6). En presencia del inhibidor se sintetizan varias proteínas que no se detectan en su ausencia, otras que se expresan con mayor intensidad y dos o tres que no se expresan en presencia del inhibidor. La alteración del patrón proteico que induce C16 podría deberse a que este compuesto bloquee la expresión de los genes virales de expresión intermedia o tardía, y que esto aumente la expresión de los genes tempranos. Para comprobar esta hipótesis, comparamos el patrón de proteínas virales de WR sintetizadas en presencia de C16 o de citosina arabinósido (AraC). AraC es un análogo de nucleósido que bloquea la síntesis del DNA viral, impidiendo así la expresión de los genes virales intermedios y tardíos. Los resultados que se muestran en la figura 27C indican claramente que el patrón de proteínas virales obtenido con C16 es diferente al obtenido con AraC. En presencia de AraC apenas hay inhibición de la síntesis de proteínas celulares y sólo se detecta la síntesis de unas pocas proteínas virales. Sin embargo, sólo algunas de las proteínas virales tempranas que se detectan en presencia de AraC se sintetizan en las células incubadas con el inhibidor

de PKR C16. Estos resultados indican que C16 no es un inhibidor de la replicación del DNA viral, aunque desconocemos el mecanismo por el que este inhibidor altera el patrón de expresión de los genes virales. Una posibilidad sería que, de alguna manera, mantuviese la expresión de algunos genes tempranos o intermedios cuando se están expresando los tardíos.

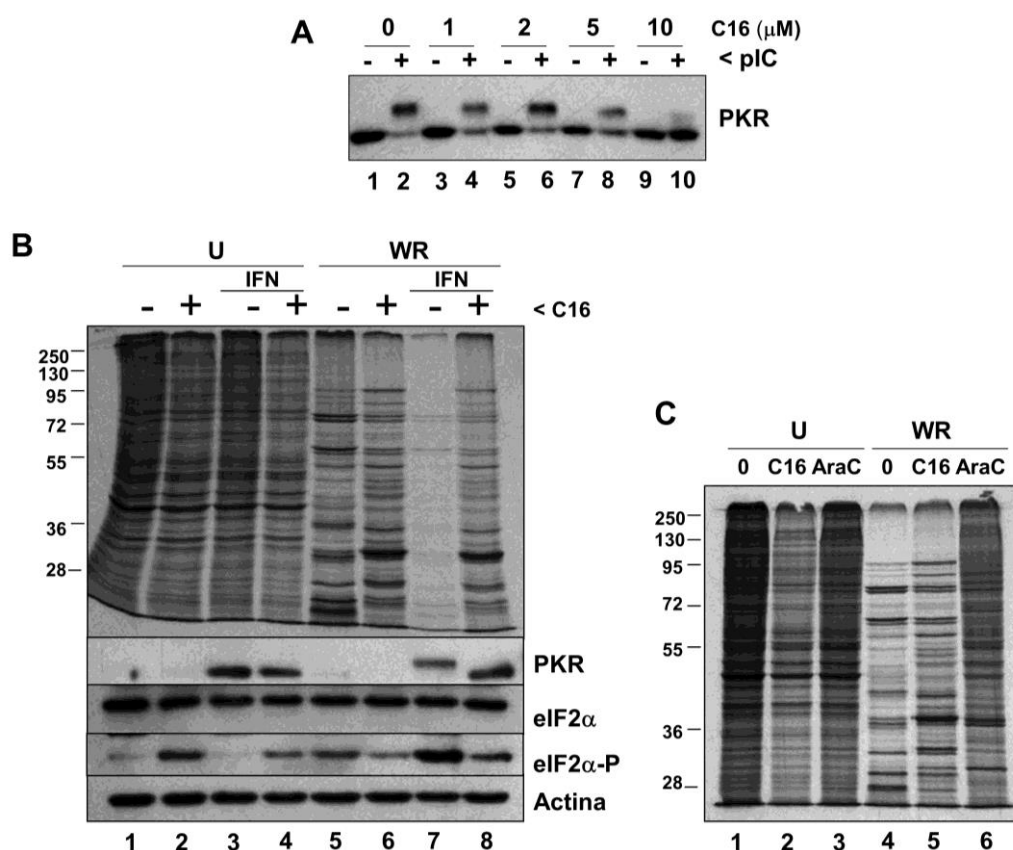


Figura 27. La activación de PKR juega un papel importante en la sensibilidad de WR hacia el IFN en células aviares. **A)** Células DF1 pretratadas con IFN se trataron con las concentraciones indicadas del inhibidor de PKR C16 durante 5 h. A continuación, las células se transfectaron con poli(I:C) y se incubaron 4 h más antes de lisar y analizar el grado de activación de PKR por Western blot. **B)** Células DF1, pretratadas o no con IFN, se incubaron en presencia o ausencia de 10 μ M de C16 desde 30 min antes de la infección con 5 pfu/célula de WR. Un grupo de células se marcó de 8 a 9 hpi con [^{35} S]-metionina-cisteína, mientras que el otro se lisó a 9 hpi para analizar los extractos mediante Western blot con anticuerpos contra las proteínas indicadas a la derecha de la figura. **C)** Células DF1 se trataron con 10 μ M C16 desde 30 min antes de la infección, o con 40 μ g/ml de AraC desde 1 hpi, y se marcaron con [^{35} S]-metionina-cisteína de 8 a 9 hpi. Las células se lisaron y los extractos se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía.

Por último, analizamos el efecto del inhibidor de PKR C16 sobre la síntesis de proteínas de VSV en células DF1 tratadas con IFN. Al igual que en el experimento anterior, el inhibidor C16 provocó un aumento en los niveles de eIF2 α fosforilado (Figura 28, comparar carriles 1 y 2), pero ese aumento no afecta a la expresión de

Resultados

proteínas virales en células no tratadas con IFN (Figura 28, carriles 5 y 6). Al contrario que en el caso de WR, la presencia de C16 no rescató la expresión de proteínas de VSV en células pretratadas con IFN (Figura 28, carril 8), indicando que, aunque PKR pudiera contribuir a la inhibición de la replicación de VSV, en la célula deben existir otros mecanismos que bloqueen la expresión de los genes virales.

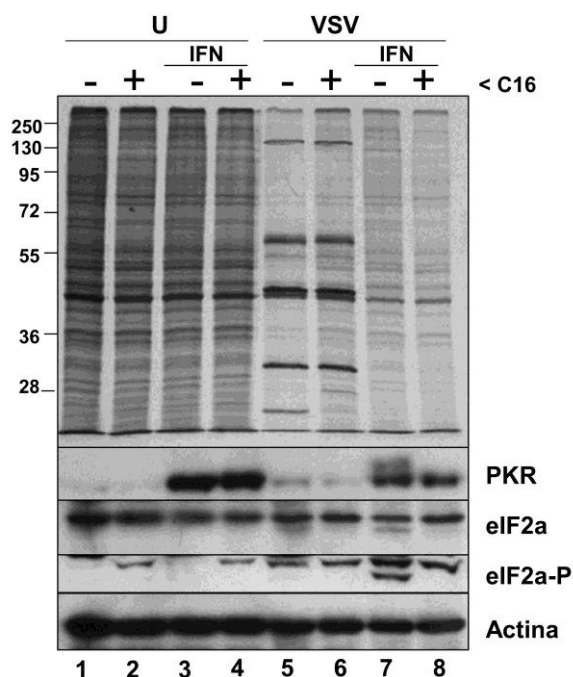


Figura 28. La inhibición de PKR no es suficiente para rescatar la síntesis de proteínas de VSV en células aviares pretratadas con IFN. Células DF1, pretratadas o no con IFN, se trataron con 10 μ M de C16 desde 30 min antes de infectar con 5 pfu/célula de VSV. Un grupo de células se marcó de 5 a 6 hpi con [^{35} S]-metionina-cisteína, mientras que el otro se lisó a 6 hpi para analizar los extractos mediante Western blot con anticuerpos contra las proteínas indicadas a la derecha de la figura.

5.4.- Efecto de la fosforilación de eIF2 α sobre la síntesis de proteínas virales

Una de las consecuencias de la activación de PKR es el aumento del nivel de fosforilación de eIF2 α , lo que provoca la inhibición de la síntesis de proteínas a nivel de la iniciación de la traducción. Algunos virus son capaces de contrarrestar la acción antiviral del IFN bloqueando la acumulación de la forma fosforilada de eIF2 α por mecanismos distintos a la inhibición de la activación de PKR. Los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que la resistencia del ARV al IFN se debe, al menos en parte, a su capacidad para impedir la activación de PKR mediada por dsRNA y la fosforilación de eIF2 α que eso conlleva. Sin embargo, no sabemos si la síntesis de las proteínas virales tendría lugar en presencia de eIF2 α fosforilado. Por otra parte, es posible que los virus VSV y WR, sensibles al pretratamiento de las células con IFN y a la presencia de altos

niveles de PKR desde el inicio de la infección, sean capaces de prevenir la fosforilación de eIF2 α una vez hayan expresado sus proteínas. Para testar estas hipótesis, las células infectadas se trataron con DTT a tiempos tardíos de infección para provocar la activación de PERK y la fosforilación de eIF2 α en presencia de grandes cantidades de proteínas virales.

Así, células CEF o DF1 se infectaron con ARV, VSV o WR y durante la última hora de infección las células se incubaron con 1 mM de DTT. A continuación las células se lisaron y se analizó la síntesis de proteínas y el grado de fosforilación de eIF2 α . Se obtuvieron resultados muy similares en células CEF y DF1. El tratamiento con DTT de células sin infectar provoca la fosforilación de eIF2 α y una inhibición casi total de la síntesis de proteínas celulares (Figura 29A y B, comparar carriles 1 y 2). Una situación similar se observa en células infectadas con VSV, ya que el tratamiento con DTT induce la fosforilación de eIF2 α e inhibe la síntesis tanto de proteínas virales como celulares (Figura 29A y B, comparar carriles 5 y 6). Esto está en consonancia con lo descrito por Connor y Lyles (2005), que sugieren que al *shutoff* de las proteínas celulares provocado por alteraciones en el complejo eIF4F durante la infección con VSV le sigue un bloqueo de la síntesis de proteínas virales por la acumulación de eIF2 α fosforilado, sugiriendo que este virus no es resistente a la fosforilación de eIF2 α . En el caso de células infectadas con WR, el tratamiento con DTT no provocó inhibición de la síntesis de proteínas virales ni un aumento en la fosforilación de eIF2 α (Figuras 29A y B, carriles 7 y 8), lo que sugiere que WR expresa proteínas que previenen la fosforilación de eIF2 α . En este sentido, está descrito que WR expresa la proteína K3L, una proteína que posee regiones homólogas a las de eIF2 α y que impide la fosforilación de este factor al actuar como pseudosustrato para las quinasas de eIF2 α (Sharp et al., 1997). En el caso de ARV, el DTT induce un aumento en los niveles de eIF2 α fosforilado, aunque algo menor que el que provoca en células sin infectar, sin que se aprecie una reducción significativa en la síntesis de proteínas virales, aunque sí en la de las celulares (Figura 29, carriles 3 y 4). Este resultado sugiere que el ARV es capaz de inhibir parcialmente la capacidad del DTT para fosforilar eIF2 α y que la traducción de los mRNAs de ARV es más resistente que la de los celulares a la fosforilación de este factor.

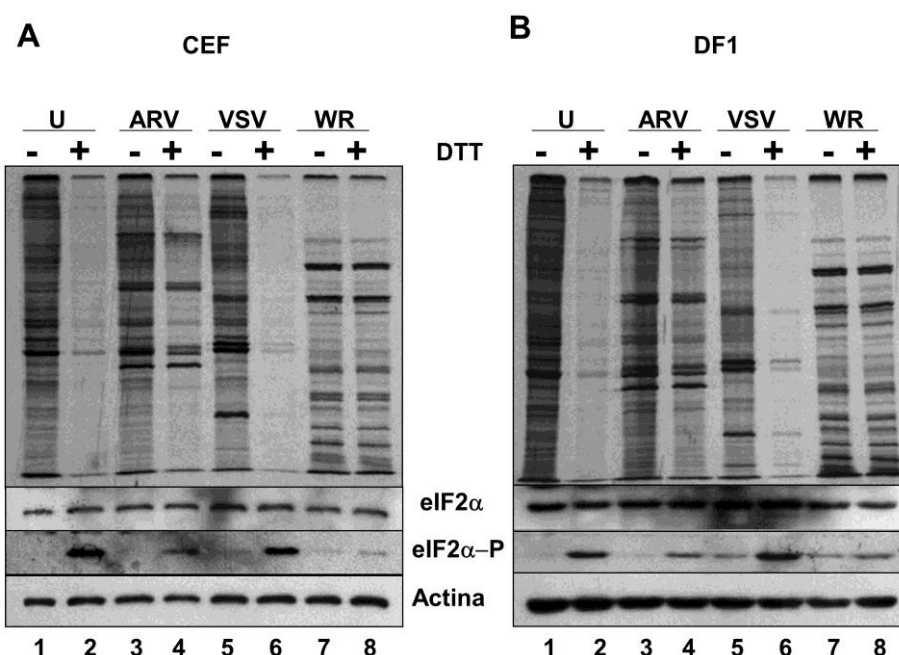


Figura 29. Efecto del DTT sobre la síntesis de proteínas virales. A) Células CEF se infectaron con 10 pfu/célula de ARV o con 5 pfu/célula de VSV o WR, y a las 8 hpi se añadió al medio de cultivo 1 mM DTT. Un grupo de células se marcó de 8,25 a 9 hpi con [³⁵S]-metionina-cisteína para analizar la síntesis de proteínas mediante electroforesis y autorradiografía, mientras que otro se lisó a las 9 hpi para analizar los extractos mediante Western blot con anticuerpos contra las proteínas indicadas en el centro de la figura. En el caso del virus VSV, el marcaje se realizó de 5,25 a 6 hpi y la lisis de las células a las 6 hpi, mientras que para WR el marcaje se realizó de 8,25 a 9 hpi. **B)** Células DF1 se infectaron con 50 pfu/célula de ARV o con 5 pfu/célula de VSV o WR, y se procesaron igual que las CEF.

Para analizar con más detalle la resistencia de la traducción de los mRNAs de ARV a la fosforilación de eIF2α, examinamos el efecto de dos concentraciones de DTT, 0,5 y 1 mM (Figura 30). La concentración de 0,5 mM de DTT fue suficiente para inducir en células sin infectar un alto grado de fosforilación de eIF2α y una drástica inhibición de la síntesis de proteínas celulares. Esa misma concentración de DTT indujo un alto grado de fosforilación de eIF2α en células infectadas con ARV, aunque ligeramente menor que en células sin infectar, pero ese nivel de fosforilación fue insuficiente para inhibir la síntesis de proteínas virales. También parece que la síntesis de proteínas celulares en células infectadas se ve menos afectada por el tratamiento con DTT que en células sin infectar, posiblemente debido a esa ligera disminución en los niveles de fosforilación de eIF2α. Estos datos sugieren que la infección con ARV de células aviares no sólo inhibe la activación de PKR mediada por dsRNA, sino que también es capaz de interferir con la fosforilación de eIF2α mediada por PERK. Estos resultados

también indican que la traducción de los mRNAs de ARV es más resistente a la fosforilación de eIF2 α que la traducción de los celulares.

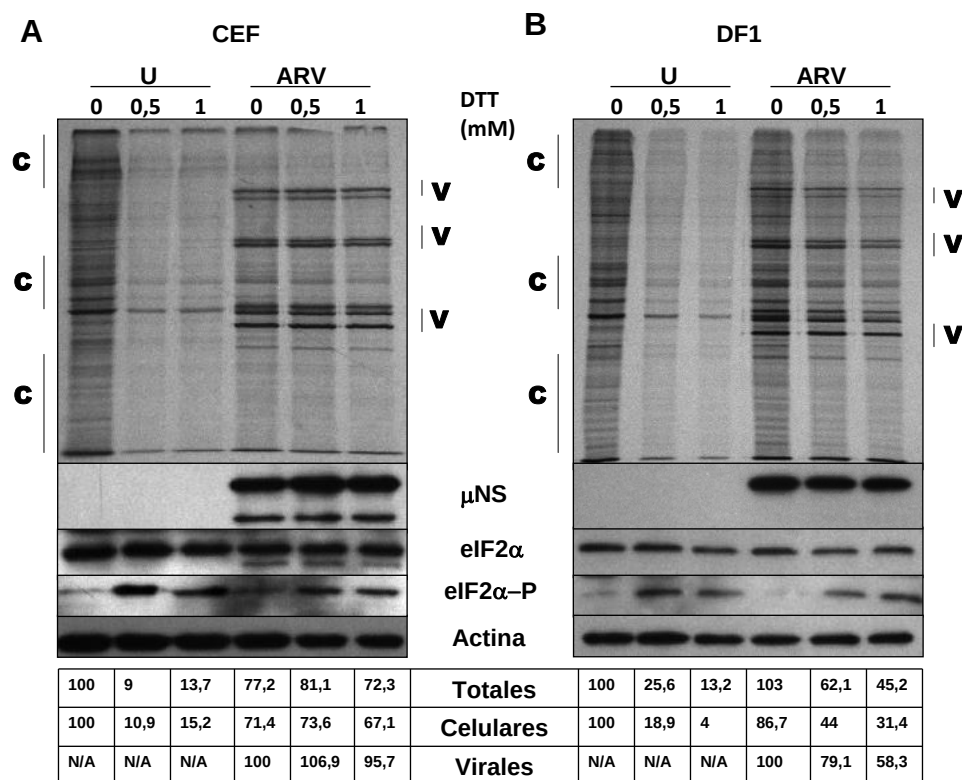


Figura 30. La infección con ARV reduce ligeramente los efectos del DTT sobre la síntesis de proteínas celulares y virales. A) Células CEF se infectaron con 10 pfu/célula de ARV y a las 9 hpi se trataron con las concentraciones indicadas de DTT durante 1 h y se lisaron. Un grupo de células se marcó con [^{35} S]-metionina-cisteína durante los últimos 45 min y los extractos resultantes se analizaron mediante electroforesis y autorradiografía. El otro grupo de células se lisó para analizar sus extractos mediante Western blot con anticuerpos contra las proteínas indicadas en el centro de la figura. En la tabla de la parte inferior se cuantificó la intensidad de las bandas mediante densitometría, a partir de las imágenes de los autorradiogramas. Para determinar la intensidad total se seleccionó todo el carril, mientras que para determinar las intensidades de proteínas celulares (c) y virales (v) se seleccionaron las regiones indicadas a ambos lados de la figura. Los valores se expresan como porcentaje del control sin tratar (totales y celulares) o de las infectadas sin tratar (virales). B) El mismo experimento realizado en células DF1. En este caso la infección se realizó con 50 pfu/célula de ARV.

6.- EL PAPEL DE LA PROTEÍNA σ A DEL REOVIRUS AVIAR EN LA RESISTENCIA AL IFN

La estructura de la proteína σ A de ARV se ha resuelto recientemente (Guardado-Calvo et al., 2008). Esta proteína une fuertemente RNA bicatenario (Martínez-Costas et al., 2000) y se ha sugerido que esta actividad juega un papel muy importante en la resistencia del ARV hacia el IFN, al prevenir la activación de PKR (González-López et al., 2003). Sin embargo, las conclusiones de esos estudios se basaban en evidencias

indirectas, ya que entonces no se disponía de la metodología necesaria para detectar de forma directa la activación de la PKR de pollo. La puesta a punto de las condiciones que permiten la separación electroforética de las isoformas de PKR fosforilada y sin fosforilar y el disponer de un anticuerpo específico contra la forma fosforilada de la subunidad α del factor de iniciación eIF2 nos permitieron analizar de forma directa el efecto de la proteína σA sobre la activación de PKR, especialmente en células DF1, en las que las dos isoformas de la quinasa se separan bien. Para ello, se emplearon dos virus vaccinia recombinantes, uno que contiene el gen de la luciferasa (WRLuc), y otro que contiene el de la proteína σA de ARV (WRS2). Con estos virus se infectaron células DF1 que habían sido pretratadas o no con IFN durante 24 h y, a las 8 hpi, un grupo de células se marcó con [^{35} S]-metionina-cisteína durante 1 h para analizar síntesis de proteínas y el otro se lisó a las 9 hpi para analizar mediante Western blot el grado de activación de PKR y el de fosforilación de eIF2 α . En la figura 31A se observa que el pretratamiento con IFN no afecta a la síntesis de proteínas en células sin infectar, pero inhibe en gran parte la de las proteínas del virus WRLuc (Figura 31A, panel a, carriles 3 y 4). Esta inhibición de la síntesis de proteínas viene acompañada de la aparición de la forma activa de PKR y de la fosforilación de eIF2 α (Figura 31A, paneles c y e, carril 4). Sin embargo, el pretratamiento con IFN no tiene ningún efecto sobre la síntesis de proteínas del virus WRS2 que expresa la proteína σA de ARV, y tampoco se observa la aparición de la forma activa de PKR ni la fosforilación de eIF2 α (Figura 31A, carriles 5 y 6). Por otra parte, ambos virus son capaces de impedir la fosforilación de eIF2 α inducida por DTT cuando han expresado sus proteínas (Figura 31B), indicando que la proteína K3L de estos virus es capaz de impedir la fosforilación de eIF2 α por PERK en células aviares. Estos resultados confirman que la fosforilación de eIF2 α por PKR es un factor importante en la sensibilidad del virus WR hacia el IFN en células aviares y que la expresión de la proteína σA de ARV previene la activación de PKR y la fosforilación de eIF2 α .

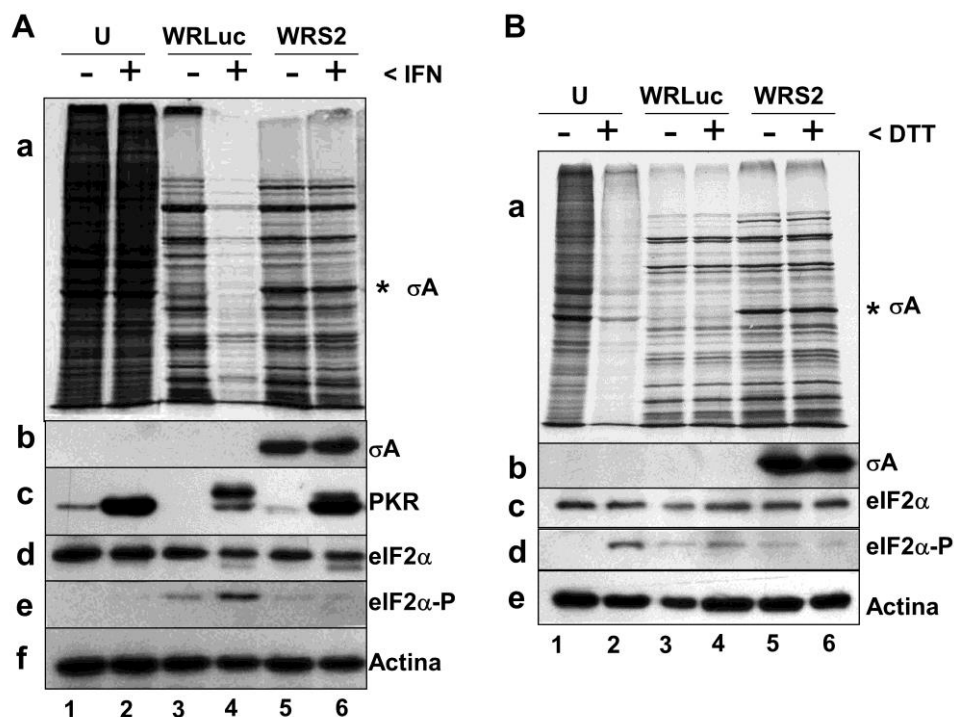


Figura 31. La expresión de la proteína σA previene la activación de PKR y protege al virus vaccinia frente al IFN en células de pollo. A) Células DF1 pretratadas o no durante 24 h con IFN se infectaron con 5 pfu/célula de los virus WR recombinantes indicados. Un grupo de células se marcó con [^{35} S]-metionina-cisteína de 8 a 9 hpi, las células se lisaron y los extractos se analizaron por electroforesis y autorradiografía (panel a). El otro grupo de células se procesó a las 9 hpi para realizar Western blot con los anticuerpos contra las proteínas que se indican a la derecha de los paneles b-f. **B)** Células DF1 se infectaron con 5 pfu/célula de los virus indicados. Un grupo de células se incubó con 1 mM DTT de 8 a 9 hpi y se lisó para analizar los extractos mediante Western blot con los anticuerpos indicados a la derecha de los paneles b-e. Otro grupo se incubó con 1 mM DTT de 8 a 9 hpi y con [^{35} S]-metionina-cisteína los últimos 45 min. Los extractos radiactivos de estas células se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía (panel a).

Para averiguar si la capacidad de la proteína σA para prevenir la activación de PKR está relacionada con la unión a dsRNA, comparamos la actividad anti-PKR de σA con la de su mutante R155A, que no une dsRNA (Guardado-Calvo et al., 2008). Para ello, se transfectaron células DF1 con un plásmido vacío o con los plásmidos que expresan la proteína σA o su mutante R155A. A las 3 h post-transfección, las células se trataron con IFN y 18 h más tarde se transfectaron con poli(I:C) y se incubaron durante 4 h más para provocar la activación de PKR. En la figura 32A puede observarse que los dos plásmidos expresan niveles similares de σA y que la transfección con poli(I:C) provoca la activación de PKR en las células transfectadas con el plásmido vacío, como lo demuestra la aparición de la forma hiperfosforilada de la quinasa. La aparición de esa banda también se observó en las células transfectadas con el mutante R155A, pero su intensidad se redujo considerablemente en las transfectadas con el plásmido que expresa

Resultados

la proteína σA sin mutar, indicando que la capacidad de σA para prevenir la activación de PKR radica fundamentalmente en su capacidad para unir y secuestrar el dsRNA activador de la quinasa. Curiosamente, en las células que expresan σA la disminución de la activación de PKR no va acompañada por una disminución de la fosforilación de eIF2 α , lo que podría deberse a una baja eficiencia de transfección o a que la sobreexpresión de la proteína σA de ARV en células transfectadas da lugar a la formación de agrosomas (Vázquez-Iglesias et al., 2009), que podrían activar una respuesta de estrés celular en la que se active otra de las quinasas de eIF2 α .

Para comprobar si la proteína σA se une al dsRNA transfectado, se analizó mediante inmunofluorescencia la capacidad de σA y de su mutante para colocalizar con dsRNA en células DF1 transfectadas con poli(I:C). En las inmunofluorescencias que se muestran en la figura 32B puede verse que la señal del dsRNA colocaliza con la de la proteína σA sin mutar, tanto en las células en las que sobreexpresa (Figura 32B, fila 3) como en las que no (Figura 32B, fila 2), pero no con la de σA mutada (Figura 32B, fila 4), lo que confirma que el principal mecanismo que utiliza σA para prevenir la activación de PKR es la unión y secuestro del dsRNA.

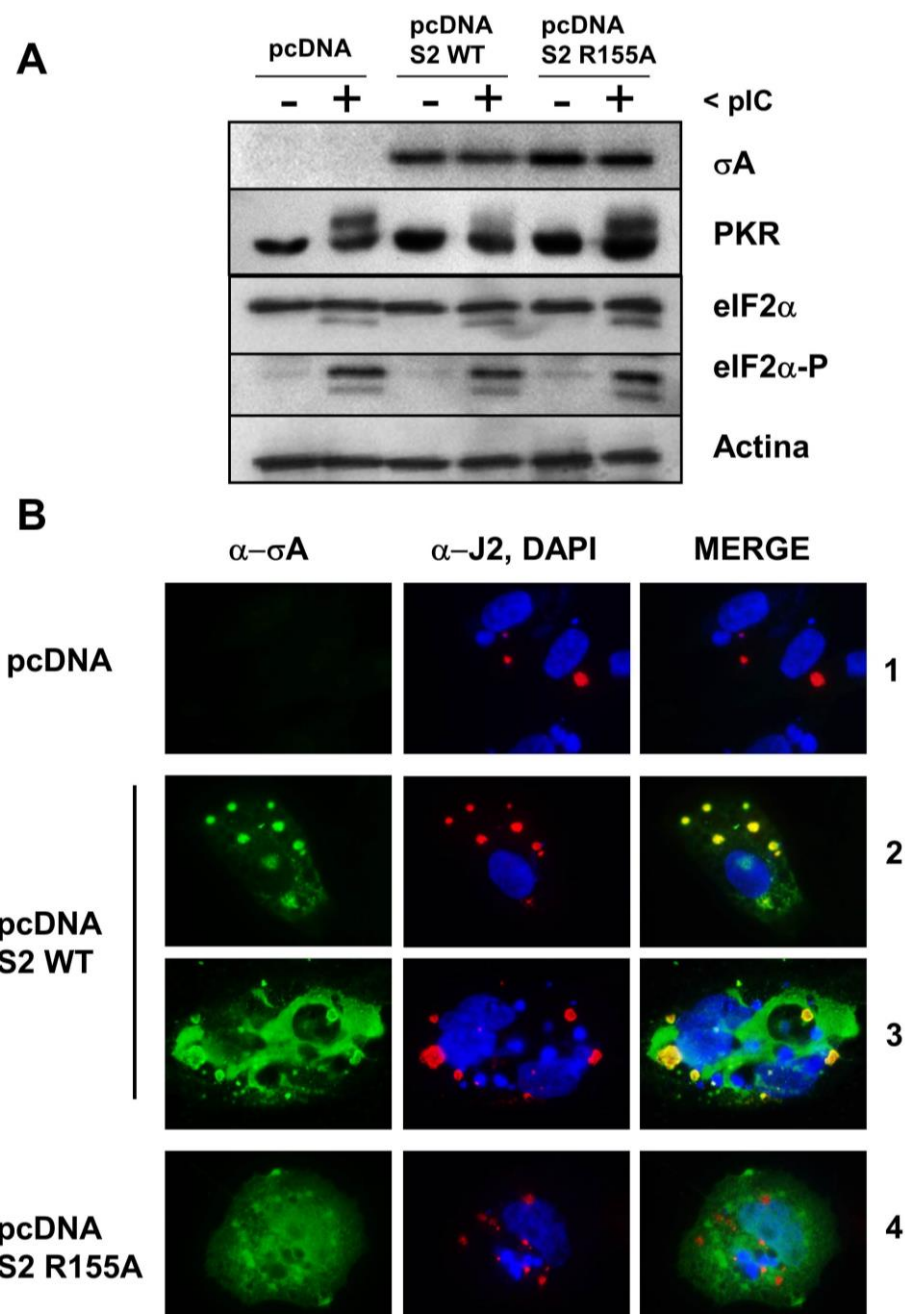


Figura 32. La capacidad de σ A para prevenir la activación de PKR está relacionada con su capacidad para unir dsRNA. A) Células DF1 se transfectaron con los plásmidos indicados en la parte superior y 3 h más tarde se trataron con IFN durante 18 h. A continuación, las células se transfectaron (+) o no (-) con poli(I:C) y se incubaron 4 h más. Las células se lisaron y los extractos se analizaron por Western blot con anticuerpos contra las proteínas que se indican a la derecha. **B)** Células tratadas como en el experimento anterior se fijaron con paraformaldehído y se analizaron por inmunofluorescencia con anticuerpos contra la proteína σ A (verde) y contra dsRNA de más de 40 pb (anticuerpo J2, rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI.

Algunas proteínas virales pueden prevenir la activación de PKR por interacción directa con la quinasa como, por ejemplo, la proteína expresada por el gen E3L del virus WR que inhibe la activación de PKR tanto por secuestro del dsRNA activador como por

Resultados

interacción directa con la quinasa (Romano et al., 1998b), o la proteína NS1 del virus de la gripe, que puede inhibir a PKR interaccionando con ella sin que sea necesaria su capacidad de unir dsRNA (Li et al., 2006). Para comprobar si σA interacciona con la proteína PKR de pollo se realizó un ensayo de doble híbrido en células COS-7. Para ello, se clonaron en los plásmidos pM y pVP16 los genes que expresan σA y una versión mutada de la proteína PKR de pollo (K308R) que es catalíticamente inactiva, lo que permite expresar niveles elevados de la proteína sin que se produzca un bloqueo de la síntesis de proteínas celulares. Los resultados de este análisis sugieren que no hay interacción directa entre σA y PKR, aunque sí se detectó interacción entre moléculas de σA (Figura 33), sugiriendo que la proteína σA impide la activación de PKR únicamente a través del secuestro del dsRNA activador.

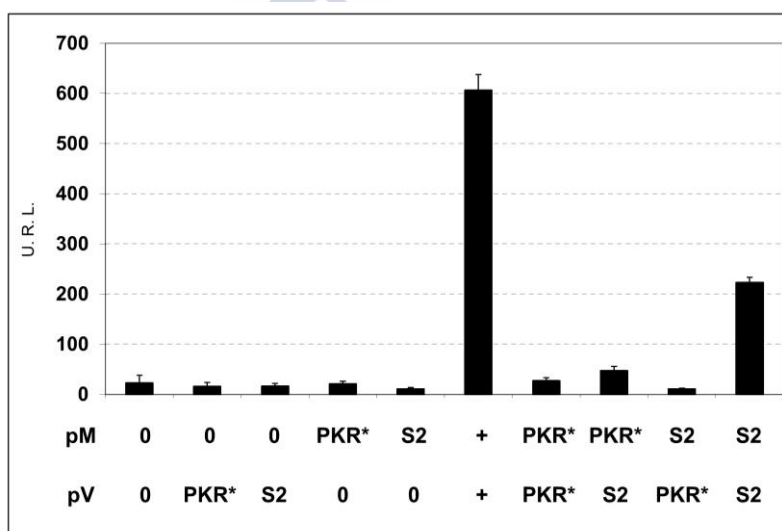


Figura 33. Ensayo de doble híbrido en células COS-7. Células COS-7 se transfectaron con los plásmidos pM y pVP16 expresando las proteínas indicadas (0: plásmido vacío; PKR*: PKR K308R; S2: σA ; +: controles positivos de interacción p53 en pM y el antígeno T grande en pVP16) y las células se lisaron para determinar la actividad luciferasa de los extractos, tal y como se describe en materiales y métodos. En la gráfica se indican las unidades relativas de luz (U. R. L.) para cada muestra, las barras de error indican la desviación estándar.

7.- EL IFN PROMUEVE LA REPLICACIÓN DEL REOVIRUS AVIAR EN CÉLULAS DF1

En varios experimentos se había observado que el pretratamiento con IFN de células DF1 infectadas con ARV inducía un aumento en los niveles de la proteína viral μNS , al contrario de lo que ocurría en células CEF, en las que se observaba una ligera

disminución. Esto podría deberse a que el IFN induzca un aumento del número de células infectadas o a que promueva la expresión de los genes virales en la célula infectada.

Para determinar la capacidad del virus para replicar y extenderse en estos dos tipos celulares, se tituló el mismo stock de virus sobre monocapas de células CEF y DF1 pretratadas o no con IFN. En la figura 34A se observa que en células CEF el tratamiento con IFN tan sólo induce una pequeña reducción en el número de placas y, por tanto, en el título aparente del virus. Cuando el mismo virus se titula en células DF1, se observa que el número y el tamaño de las placas es mucho menor que en CEF y que el título aparente se reduce unas 100 veces. Sin embargo, cuando las células DF1 que se emplean para titular el virus se pretratan con IFN, el tamaño de las placas aumenta, aunque sin llegar a alcanzar el que se obtiene en CEF, y su número también aumenta hasta alcanzar niveles próximos a los obtenidos en células CEF.

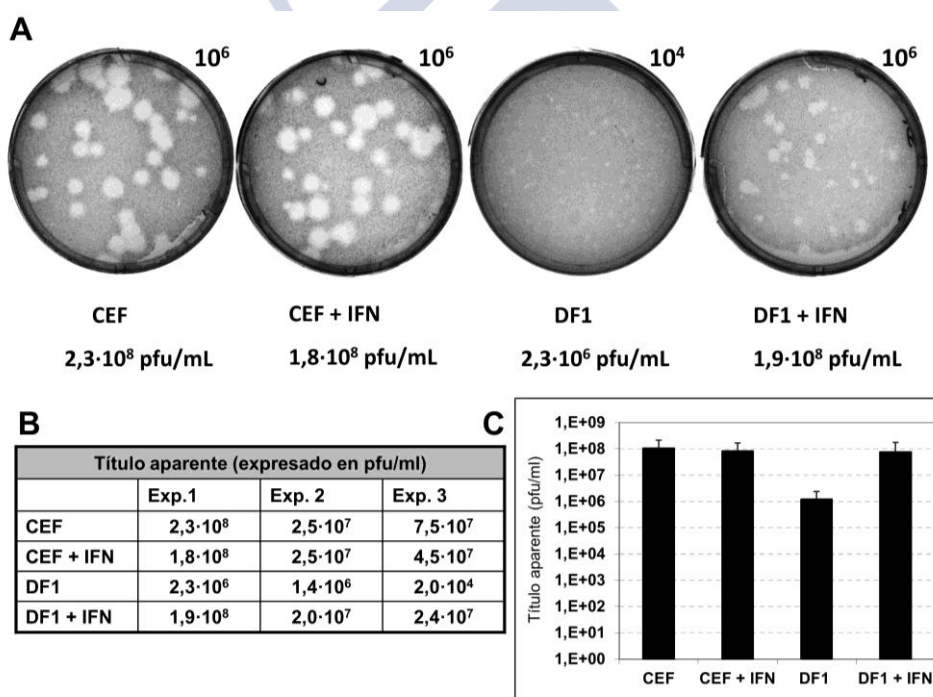


Figura 34. Efecto del tratamiento con IFN sobre el número y tamaño de las placas de lisis en un ensayo de titulación de un stock de ARV. A) Células CEF o DF1 en placas de 6 pocillos se trataron o no con IFN como indica la figura antes de realizar sobre ellas un ensayo de titulación en placa de un mismo stock de virus. A los tres días, las células se tiñeron con rojo neutro y se determinó el título aparente por recuento del número de placas de lisis. Se muestran en la figura los pocillos en los que se contaron las placas de un experimento representativo, el número de la esquina superior derecha indica la dilución del stock de virus empleada en ese pocillo. **B)** Tabla resumen de los tres experimentos. **C)** Título aparente (en pfu/ml) obtenido al titular en los dos tipos celulares. Se muestra la media de tres experimentos independientes y las barras indican la desviación estándar.

Resultados

El bajo número de placas que se obtiene al titular ARV en células DF1 sin tratar con IFN podría deberse a que el virus en estas células produce placas muy pequeñas y difíciles de detectar. El tamaño reducido de las placas de lisis podría ser consecuencia de que las células DF1 tienen una expresión menor de caspasa 3 que las células CEF (Kong et al., 2011), por lo que la infección produciría menos apoptosis y lisis celular. Para comprobar si esta diferencia en el número de placas es real, se determinó mediante inmunofluorescencia el porcentaje de células infectadas cuando una misma cantidad de ARV se incubaba con células CEF y DF1 tratadas o no con IFN. Este experimento se realizó a tiempos cortos para evitar la aparición de infecciones secundarias y a baja multiplicidad de infección para poder distinguir claramente las células infectadas. Los resultados de este experimento (Figura 35 A y B) indican que el número de células DF1 infectadas es muy inferior al de CEF infectadas y que el pretratamiento con IFN aumenta el número de células DF1 infectadas mientras que disminuye ligeramente el de CEF infectadas.

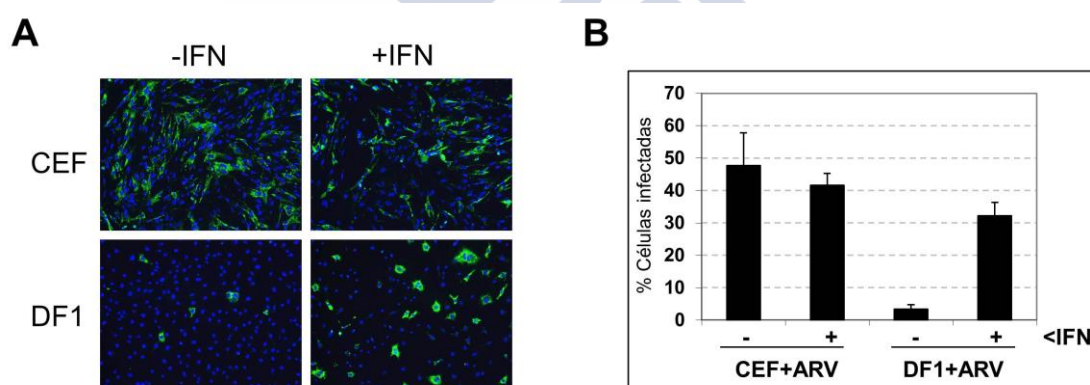


Figura 35. Efecto del IFN sobre el número de células infectadas. A) Células CEF o DF1 pretratadas o no con IFN se infectaron con 0,5 pfu/célula de ARV. A las 10 hpi se fijaron con paraformaldehído y se realizó inmunofluorescencia contra la proteína viral μ NS (en verde) para identificar las células infectadas, mientras que los núcleos se tiñeron con DAPI (en azul). B) Porcentaje de células infectadas por campo. De cada muestra del experimento anterior se fotografiaron 3 campos a 100x y se contaron los núcleos de células que expresan μ NS (células infectadas) y el número de núcleos teñidos con DAPI (células totales). En el gráfico se indica la media del porcentaje núcleos de células infectadas por campo, las barras de error indican la desviación estándar.

En las células DF1 infectadas con ARV el pretratamiento con IFN provocó una disminución del número de núcleos por campo y la aparición de núcleos fragmentados, sugiriendo que dicho tratamiento activa la apoptosis en las células infectadas. Para confirmarlo, se determinó la actividad de las caspasas efectoras 3 y 7 mediante el empleo del kit Caspase Glo 3/7, en el que un sustrato luminogénico al ser procesado por estas caspasas, y con la mediación de la luciferasa, produce una señal luminiscente

fácilmente cuantificable. Los resultados obtenidos muestran que en células sin infectar el tratamiento con IFN aumenta ligeramente la actividad de las caspasas efectoras, tanto en CEF como en DF1 (Figura 36A), algo esperable dado que el IFN sensibiliza a las células para la apoptosis (Bekisz et al., 2010; Chawla-Sarkar et al., 2003), aunque no afecta a la morfología celular (Figura 36B). Durante la infección de células CEF con ARV se produce un aumento de la actividad caspasa que es ligeramente mayor en las pretratadas con IFN, pero apenas hay diferencias en la morfología de las células. Sin embargo, el pretratamiento con IFN de células DF1 infectadas induce un aumento drástico en la actividad de estas caspasas (Figura 36A), y produce redondeamiento de las células infectadas (Figura 36B).

La apoptosis provoca una serie de cambios en la célula que modifican el entorno donde se produce la replicación del virus. Los cambios que se producen en los factores de traducción en la etapa preapoptótica podrían favorecer la expresión de los mensajeros virales sobre los celulares (Morley et al., 2005). Además, en el caso de las proteínas virales, se ha observado que el procesamiento de la proteína no estructural μ NS, para dar lugar a los fragmentos μ NSC y μ NSN, depende de la actividad de las caspasas efectoras del tipo de la caspasa 3 (Rodríguez-Grille et al., 2014), y este procesamiento podría ser necesario para el progreso de la infección. Para ver si el IFN estimula la replicación de ARV a través de su actividad proapoptótica, analizamos el efecto del compuesto Q-VD-OPh, un inhibidor de caspasas de amplio espectro y escasa toxicidad (Caserta et al., 2003), sobre el número de células infectadas. En la figura 36C puede observarse que, en células DF1 pretratadas con IFN e infectadas con ARV, la presencia del inhibidor Q-VD-OPh no reduce el número de células infectadas, e incluso lo aumenta ligeramente, posiblemente porque al inhibir la apoptosis se pierden menos células infectadas en la inmunofluorescencia (Figura 36D). Estos resultados sugieren que la activación de las caspasas efectoras y el procesamiento de la proteína μ NS no son los responsables de que el IFN promueva la expresión de proteínas de ARV en células DF1. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que, aún en presencia del inhibidor Q-VD-OPh, se produzcan modificaciones de los factores de iniciación de la traducción que favorezcan la replicación del virus, puesto que se ha observado que algunas de las modificaciones de éstos en la fase preapoptótica no dependen de la actividad de las caspasas (Morley et al., 2005).

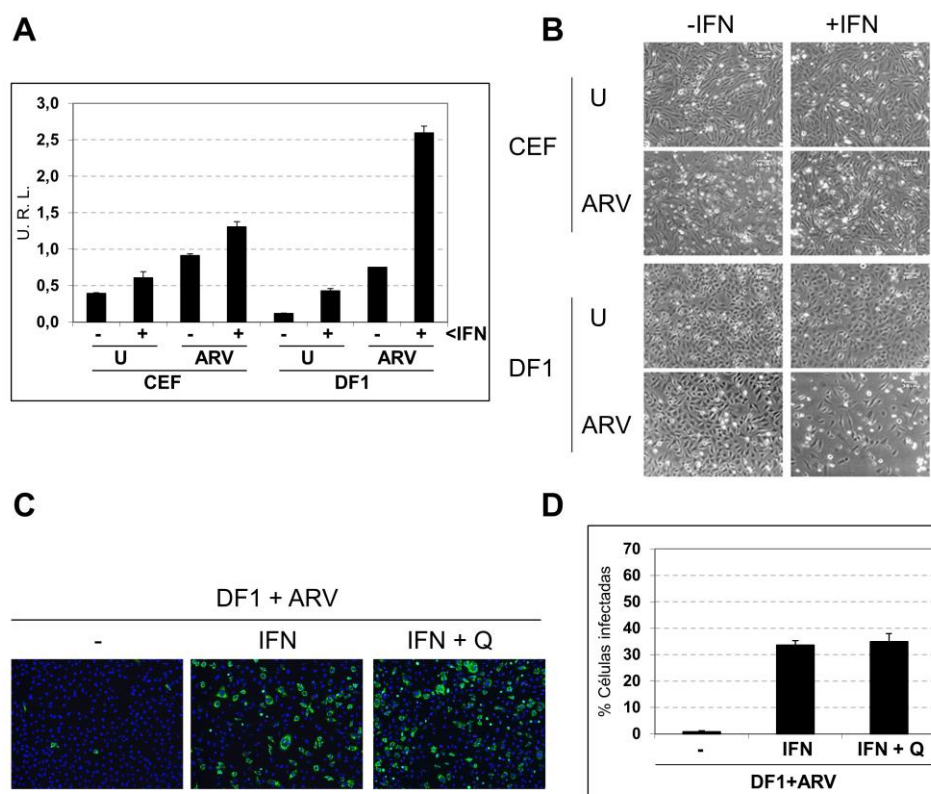


Figura 36. El IFN aumenta la actividad de las caspasas efectoras en células DF1 infectadas con ARV y tratadas con IFN, pero ésta no es la causa de la mejoría de la replicación del virus. A) Células CEF o DF1, pretratadas o no con IFN, se infectaron con 10 pfu/célula de ARV durante 9 h, momento en el que se determinó la actividad caspasa empleando el kit CaspaseGlo 3/7. Se muestran los resultados de un experimento representativo y las barras indican la desviación estándar entre triplicados. **B)** Células CEF o DF1 pretratadas o no con IFN se infectaron con 10 pfu/célula de ARV y a 9 hpi se observaron al microscopio. **C)** Células DF1 tratadas o no con IFN se infectaron con 0,5 pfu/célula de ARV. A uno de los pocillos tratados con IFN se le añadió 10 μ M del inhibidor Q-VD-OPh desde el inicio de la infección. A las 10 hpi se fijaron las células y se realizó inmunofluorescencia con el anticuerpo contra μ NS (en verde) y se tiñeron los núcleos con DAPI (en azul). **D)** Porcentaje de células infectadas por campo, calculado igual que en la figura 35B. La gráfica muestra la media del porcentaje de células infectadas en cada campo, las barras de error indican la desviación estándar.

Dado que el pretratamiento de células DF1 con IFN provoca un incremento en el número de células infectadas, investigamos si ese incremento se debe a un aumento del número de receptores celulares para ARV. El receptor de este virus no ha sido identificado todavía, pero sí se ha demostrado que el virus se une a su receptor a través de la proteína σ C (Martínez-Costas et al., 1997). Por otra parte, experimentos previos habían mostrado que un fragmento de la proteína σ C expresada en bacterias es capaz de unirse al receptor y competir con el virus por la unión a células CEF (Guardado-Calvo et al., 2005). Para comprobar si este mismo fragmento puede emplearse como sonda que reconozca al receptor de ARV inmovilizado en una membrana, se realizó un ensayo de far Western blot, empleando extractos citosólicos y nucleares de células CEF y VERO.

Las células VERO se emplearon como control negativo, puesto que se requiere una alta multiplicidad de infección de ARV para poder infectarlas, sugiriendo que son deficientes o carecen del receptor para ARV, con lo que la entrada del virus a estas células sería mucho menos eficiente y dependería de la presencia en el stock viral de partículas subvirales capaces de atravesar directamente la membrana celular (Borsa et al., 1979). En primer lugar se comprobó la calidad del fraccionamiento subcelular mediante el uso de anticuerpos contra la proteína citoplasmática α -tubulina (Figura 37A, panel b) y contra la proteína nuclear histona H1 (Figura 37A, panel c), que parece presentar distinto tamaño en células VERO que en CEF. Los resultados revelaron que la proteína σ C reconoce una doble banda de alrededor de 40 kDa únicamente en células CEF, y no en células VERO (figura 37A, panel a). Además, esta banda aparece casi exclusivamente en la fracción citoplasmática, mientras que la detectada en la fracción nuclear podría deberse a una pequeña contaminación con el extracto citosólico, ya que también se observa una tenue banda de α -tubulina en la fracción nuclear de células CEF (figura 37A, panel b, comparar carriles 1 y 2). Esto sugiere que la proteína detectada mediante far Western blot con σ C podría ser una proteína de membrana, y quizás, el receptor de ARV. De tratarse del receptor, estos resultados también indicarían que las células VERO carecen de un receptor específico para ARV.

Para comprobar si el IFN afecta a los niveles de este posible receptor en las células, extractos de células CEF o DF1 tratadas o no con IFN se analizaron mediante far Western blot (Figura 37B). Los resultados mostraron que el tratamiento con IFN no modifica los niveles del receptor, sugiriendo que el IFN no mejora la replicación de ARV en células DF1 a través de un aumento de los niveles de su receptor y que debe actuar sobre otra etapa de la replicación del virus.

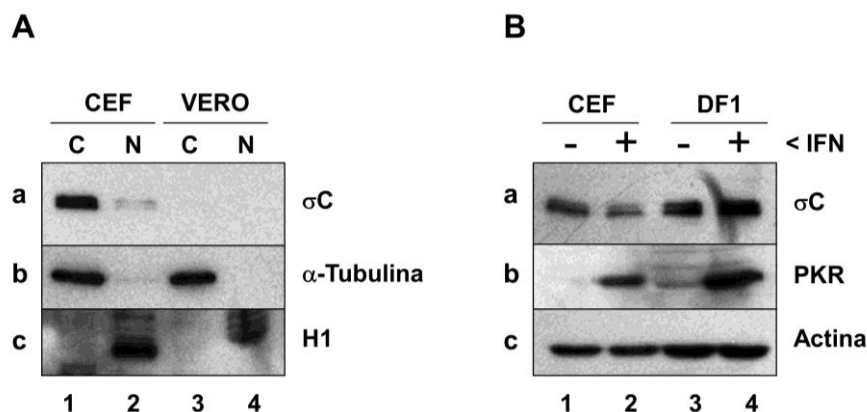


Figura 37. El IFN no modifica los niveles del receptor celular para ARV. A) Extractos citosólicos (C) y nucleares (N) de células CEF y VERO se separaron mediante electroforesis y se transfirieron a una membrana de PVDF. En los paneles b y c se realizó Western blot con anticuerpos contra las proteínas indicadas a la derecha; la membrana del panel a se incubó con un fragmento de la proteína σ C de ARV y posteriormente con anticuerpos contra esa proteína (far Western blot). **B)** Lisados de células CEF o DF1 tratadas o no con IFN durante 24 h se analizaron mediante far Western blot empleando como sonda a la proteína σ C de ARV (panel a) o se incubaron con los anticuerpos contra las proteínas indicadas a la derecha para hacer Western blot (paneles b y c).

8.- ESTUDIO DEL MECANISMO DE *SHUTOFF* INDUCIDO POR ARV

La infección de células con virus líticos suele venir acompañada de la inhibición de la síntesis de las proteínas celulares, lo que se conoce como *shutoff*, al tiempo que se mantiene la síntesis de las proteínas virales. Por lo general, el *shutoff* es beneficioso para la replicación del virus, dado que de esta manera una mayor cantidad de los recursos celulares queda disponible para la síntesis de sus proteínas. Las alteraciones celulares responsables del *shutoff* pueden ser muy diversas, aunque normalmente afectan a la etapa de iniciación de la traducción de los mRNAs celulares, incluyendo cambios en la integridad, localización o actividad de los factores de iniciación eIF4G, eIF4B y eIF2 α , o de la proteína de unión a la cola de poli(A) PABP (Aranda y Maule, 1998; Schneider y Mohr, 2003). Nuestros resultados mostraron que la infección de células CEF con ARV induce un fuerte *shutoff*, por lo que en este apartado se ha intentado averiguar los mecanismos responsables de este efecto.

Una de las posibles causas del *shutoff* inducido por ARV podría ser la alteración de PABP. La proteína PABP se une simultáneamente a la cola poli(A) de los mensajeros celulares y al complejo eIF4F, lo que induce la circularización del mRNA y contribuye a aumentar la estabilidad del mensajero y a mejorar su eficiencia de traducción. Modificaciones de esta proteína podrían favorecer la traducción de los mRNAs de ARV

ya que, a diferencia de los celulares, los de ARV carecen de cola poli(A), por lo que serían resistentes a estas alteraciones. En este sentido, se ha publicado que algunos virus provocan alteraciones en esta proteína para favorecer la traducción de sus mensajeros frente a los celulares (Goss y Kleiman, 2014). Por ejemplo, algunas proteasas de picornavirus degradan PABP (Joachims et al., 1999), mientras que la proteína NSP3 de rotavirus provoca su acumulación en el interior del núcleo (Harb et al., 2008).

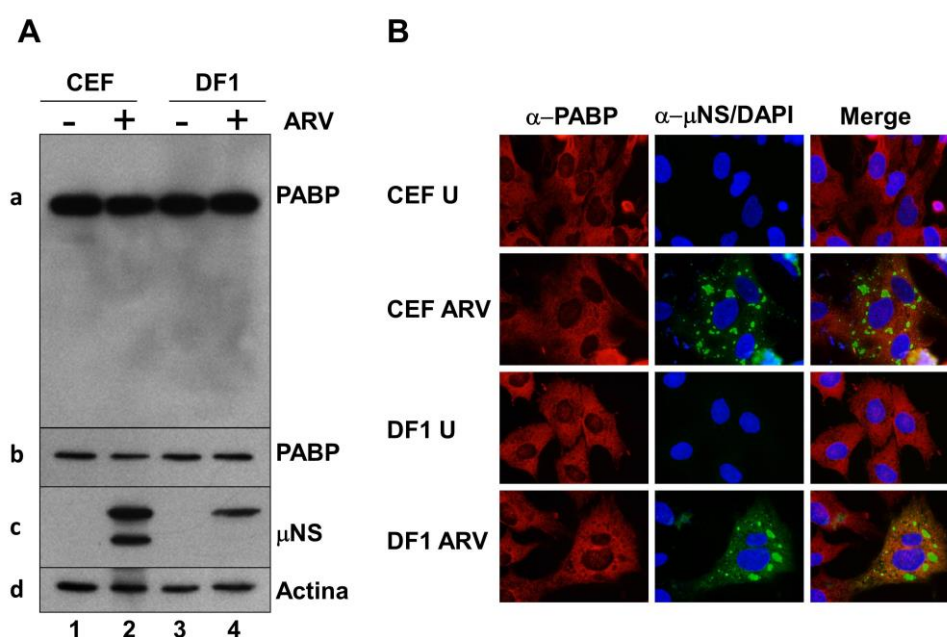


Figura 38. La infección con ARV no induce degradación ni deslocalización de la proteína PABP. A) Células CEF y DF1 se infectaron (carriles 2 y 4) o no (1 y 3) con 10 pfu/célula (CEF) o 20 pfu/célula (DF1) de ARV y, a las 10 hpi, se lisaron para analizar sus extractos por Western blot con anticuerpos contra las proteínas indicadas a la derecha. El panel a es la misma membrana que b, solo que sobreexpuesta para permitir la búsqueda de los fragmentos de degradación. **B)** Células CEF y DF1 se infectaron (ARV) o no (U) en las mismas condiciones que en el apartado anterior, y a 10 hpi se fijaron con paraformaldehído para realizar inmunofluorescencia con anticuerpos contra las proteínas PABP (en rojo), y μ NS (en verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI.

Para comprobar si la infección con ARV modifica los niveles intracelulares de PABP, se analizaron mediante Western blot los niveles intracelulares de esta proteína en extractos de células CEF y DF1 infectadas y sin infectar (Figura 38A). Los resultados revelaron que la infección con ARV no provoca un descenso en los niveles de PABP ni genera fragmentos de degradación de esta proteína (Figura 38A, paneles a y b). Para comprobar si la infección con ARV altera la distribución celular de PABP, células CEF y DF1 se infectaron con ARV y a las 10 hpi se fijaron para hacer inmunofluorescencia contra las proteínas μ NS y PABP. En la figura 38B, se observa que la distribución fundamentalmente citoplasmática de PABP no se ve alterada por la infección con ARV en ninguno de los dos tipos celulares.

Resultados

Otro mecanismo por el cual algunos virus interfieren con la síntesis de las proteínas celulares consiste en bloquear el transporte de los mensajeros celulares del núcleo al citoplasma. La acumulación nuclear de los mensajeros celulares se ha observado durante la infección con varios virus, como el virus de la gripe, el virus VSV o los rotavirus (Kuss et al., 2013). Para averiguar si los mensajeros celulares se acumulan en el núcleo de las células, se realizó hibridación *in situ* con oligo(dT) de células infectadas con ARV o VSV. En la figura 39, se observa que los mRNAs con cola poli(A) se distribuyen de manera más o menos homogénea en células sin infectar, mientras que en las células infectadas con VSV la señal se acumula principalmente en el núcleo de las células, como se había descrito previamente (Chakraborty et al., 2006). En células infectadas con ARV no se ve alteración en la distribución de los mensajeros celulares, únicamente en algunas células muy infectadas se observa una ligera reducción en la intensidad de la señal, sugiriendo una disminución de los mensajeros celulares a tiempos tardíos de infección.

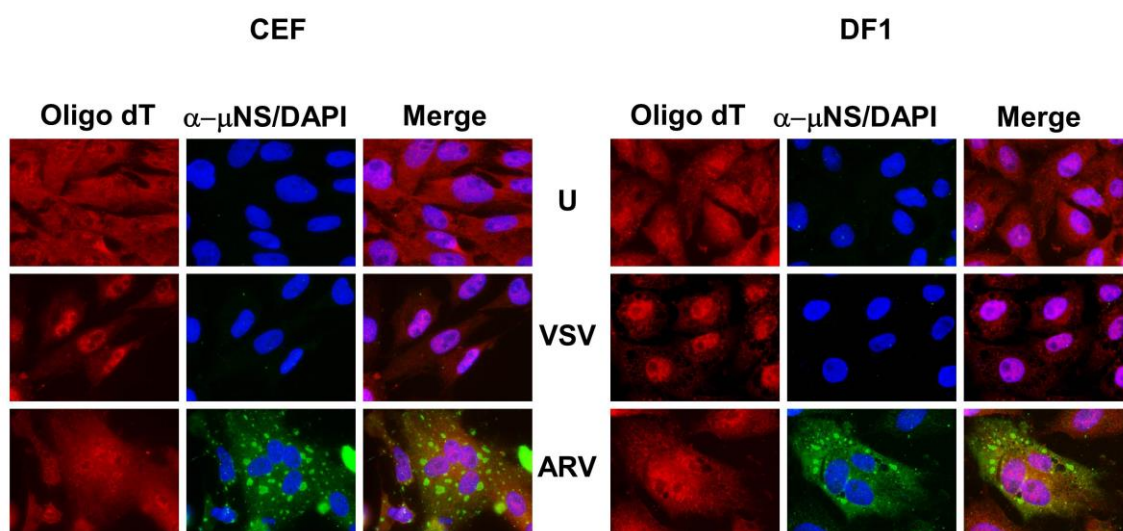


Figura 39. La infección con ARV no altera la distribución de los mensajeros celulares. Células CEF o DF1 se infectaron con 10 pfu/célula de ARV o con 5 pfu/célula de VSV durante 10 h, o se dejaron sin infectar (U). Las células se fijaron con paraformaldehído y se realizó hibridación *in situ* con un oligo(dT) biotinilado (en rojo) como se describe en la sección de materiales y métodos. A continuación se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpo contra la proteína μ NS (en verde). Los núcleos se tiñeron en azul con DAPI.

Otra posible causa del *shutoff* en células infectadas por ARV sería la degradación de la maquinaria traduccional de la célula, que podría ocurrir si el virus induce la degradación de los rRNAs. La degradación de los rRNAs es un indicador de la activación del sistema OAS/RNasaL y suele venir acompañada de la activación de la

apoptosis (Silverman et al., 1983; Wreschner et al., 1981). El enzima 2',5'-oligoadenilato sintetasa se activa por unión a dsRNA y cataliza la producción de pequeños oligonucleótidos de adenina con enlaces 2'-5'. Estos oligonucleótidos, a su vez, provocan la activación de la RNasaL, una endorribonucleasa celular que degrada RNAs tanto virales como celulares, lo cual podría contribuir al *shutoff* de la síntesis de las proteínas celulares.

Para comprobar el estado de los rRNAs ribosomales, se extrajo el RNA total de células CEF y DF1 infectadas con ARV que habían sido pretratadas o no con IFN, y se analizó mediante electroforesis desnaturizante. La infección con ARV de células CEF, tanto en presencia como en ausencia de IFN, provoca un considerable descenso en los niveles de los rRNAs 18S y 28S (Figura 40A, panel b, carriles 3 y 4). Por el contrario, en células DF1 infectadas con ARV únicamente se observa degradación cuando las células han sido pretratadas con IFN, y en este caso la degradación es mucho mayor que en CEF, con un patrón de degradación semejante al descrito para la RNasaL (Wreschner et al., 1981) (Figura 40A, panel b, carriles 7 y 8). Sin embargo, la infección de DF1 sin pretratar con IFN también provoca *shutoff* de la síntesis de proteínas celulares a tiempos tardíos de infección, sin que se observe degradación de los rRNAs, sugiriendo que el *shutoff* provocado por ARV se debe a un mecanismo distinto a la degradación de los rRNAs. En el caso de la infección de células DF1 pretratadas con IFN, la reducción en la síntesis de proteínas virales a tiempos tardíos de infección se debe a la pérdida de gran parte de la monocapa por apoptosis antes de realizar el marcaje.

Un experimento similar se realizó comparando células CEF tratadas o no con IFN e infectadas con distintos virus (Figura 40B). Se incluyó una muestra de CEF infectadas en presencia del inhibidor de la apoptosis Q-VD-Oph, para ver la implicación de la apoptosis en la degradación de los rRNAs. En la figura 40B se observa que la infección de CEF con VSV induce la degradación de los rRNAs, pero que ésta no se produce cuando las células se han pretratado con IFN y, por tanto, se ha inhibido la infección (Figura 40B, carriles 6 y 7). En el caso de la infección con WR, tanto en presencia como en ausencia de IFN se induce algo de degradación de los rRNAs, como se pone de manifiesto por la aparición de algunas bandas adicionales de RNAs de mayor movilidad electroforética (Figura 40B, panel b, carriles 8 y 9). En el caso de ARV, la infección induce la degradación de los rRNAs independientemente del tratamiento con IFN (Figura 40B, panel b, carriles 3 y 4). Sin embargo, dicha degradación no tiene lugar

Resultados

cuando las células se incuban con el inhibidor de la apoptosis Q-VD-OPh (Figura 40B, panel b, carril 5). Este resultado indica que en CEF la infección con ARV no provoca la degradación de los rRNAs de forma directa, sino a través de la inducción de la apoptosis, sugiriendo que esta degradación de los rRNAs durante la infección está mediada por caspasas, algo que ocurre en algunos tipos celulares (King et al., 2000; Nadano y Sato, 2000). Al analizar la síntesis de proteínas en estas mismas células, se observa que se sigue produciendo *shutoff* en las células incubadas con el inhibidor Q-VD-OPh, pese a que no hay degradación de los rRNAs. Esto sugiere que el *shutoff* que se produce en células infectadas con ARV no depende de la degradación de los rRNAs.

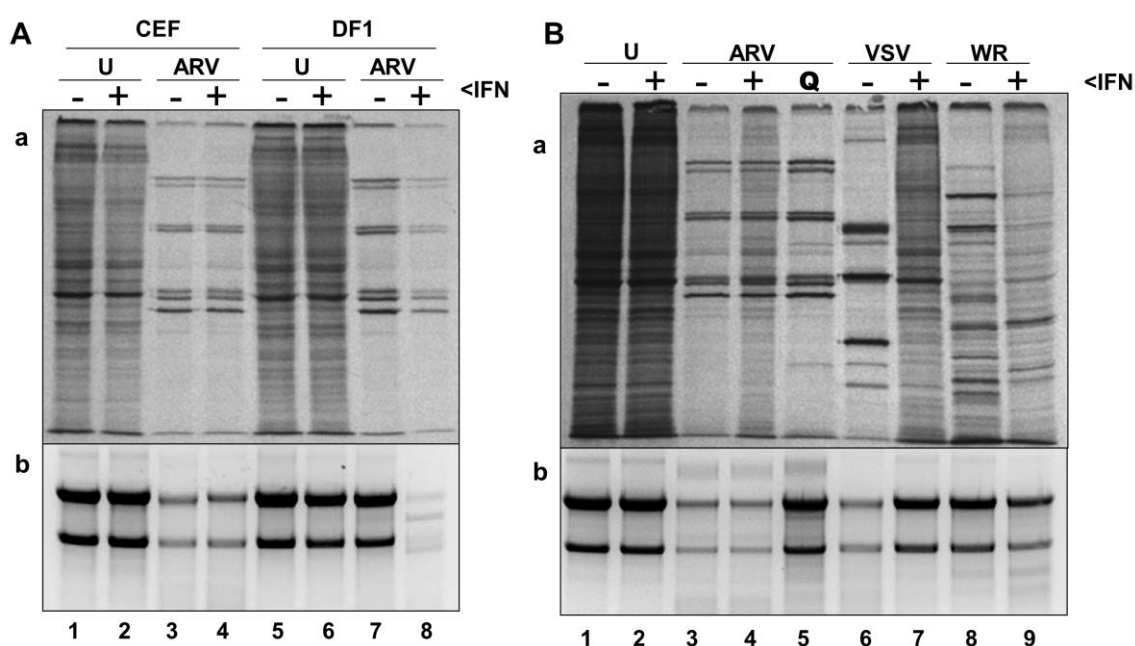


Figura 40. Estado de degradación de los RNAs ribosomales. A) Células CEF o DF1 pretratadas o no con IFN se infectaron con 3 pfu/célula durante 24 h, momento en el que un grupo de células se marcó durante 1 h con [³⁵S]-metionina-cisteína (panel a) o se extrajo el RNA total para su análisis mediante electroforesis desnaturalizante (panel b). B) Células CEF pretratadas o no con IFN se infectaron con 3 pfu/célula de ARV, VSV, WR, o se dejaron sin infectar durante 24 h, momento en el que se marcaron como en el caso anterior (panel a) o se extrajo el RNA total para su análisis mediante electroforesis desnaturalizante (panel b).

La infección con 10 pfu/célula de ARV induce *shutoff* en CEF a las 8-10 hpi, pero no en células DF1. Dado que en el experimento anterior se observó que a tiempos tardíos también se producía *shutoff* en células DF1, se decidió comprobar la dependencia de éste del tiempo y de la multiplicidad de infección. En la figura 41A se observa que, mientras que a las 8 hpi no hay *shutoff*, a las 16 hpi sí hay inhibición de la síntesis de las proteínas celulares, indicando que el ARV es capaz de inducir *shutoff* en células DF1,

aunque a tiempos más tardíos que en CEF. Por otra parte, el *shutoff* en células DF1 se adelanta a las 8 hpi cuando se eleva la multiplicidad de infección a 50-100 pfu/célula (Figura 41B), lo que sugiere que los mRNAs celulares tienen que competir con los virales por la maquinaria traduccional de la célula y que el *shutoff* se produce cuando se acumulan grandes cantidades de los mRNAs virales.

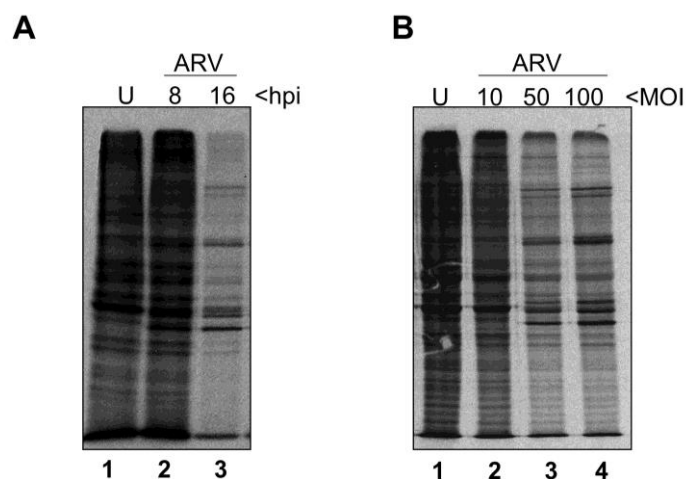


Figura 41. Efecto del tiempo y de la multiplicidad de infección sobre el *shutoff* en células DF1 infectadas con ARV. A) Células DF1 se infectaron con 10 pfu/célula de ARV y a los tiempos indicados se marcaron durante 1 h con [^{35} S]-metionina-cisteína. El pocillo de la izquierda se dejó sin infectar (U). **B)** Células DF1 se infectaron o no con ARV a las multiplicidades de infección indicadas en la parte superior de la figura y a las 8 hpi se marcaron durante 1 h con [^{35} S]-metionina-cisteína.





DISCUSIÓN



1.- EL REOVIRUS AVIAR INDUCE LA PRODUCCIÓN DE IFN EN CEF

La respuesta inicial de una célula frente a una infección viral consiste en la inducción de la expresión de IFN de tipo I. El IFN producido es secretado fuera de la célula donde interacciona con el receptor heterodimérico IFNAR de la propia célula y de células vecinas, y esta interacción activa rutas de señalización que llevan a la creación de un estado antiviral. El sistema del IFN es un mecanismo fundamental para la defensa de los organismos frente a las infecciones virales y representa uno de los mayores obstáculos que un virus ha de superar para establecer una infección productiva. Por ello, no es de extrañar que los virus hayan desarrollado diversas estrategias para contrarrestar distintas etapas del sistema del IFN.

Los resultados que se han obtenido en este trabajo muestran que, en cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de pollo, únicamente la infección con ARV provoca la liberación de IFN al medio de cultivo y la inducción de PKR, mientras que esto no ocurre durante la infección con los virus WR o VSV, sugiriendo que tanto VSV como WR son capaces de inhibir al sistema del IFN de células aviares en esta primera etapa.

El genoma del virus vaccinia codifica muchas proteínas que interfieren con la generación del estado antiviral y que actúan a varios niveles. Algunas interfieren con las rutas de señalización que van desde los PRRs hasta la activación de los factores de transcripción, otras inhiben a proteínas efectoras del estado antiviral, y otras son capaces de bloquear la apoptosis o de impedir la síntesis de proteínas celulares. Además, algunas proteínas de WR son secretadas al exterior de la célula y secuestran el IFN extracelular, impidiendo así la señalización entre células y la activación del sistema inmune (Perdiguero y Esteban, 2009; Smith et al., 2013). Pese a que la eficacia de estos factores varía según el hospedador estudiado, nuestros resultados sugieren que estos mecanismos son suficientes para bloquear la inducción de un estado antiviral en células CEF y DF1 infectadas con la cepa WR del virus vaccinia, bien sea bloqueando la señalización desde los PRRs a los factores de transcripción, o bien secuestrando el IFN secretado con la proteína B18 del virus (Waibler et al., 2009). La importancia de estas proteínas en el bloqueo de la inducción del IFN de pollo se pone de manifiesto al comparar nuestros resultados con los obtenidos con la cepa modificada Ankara del virus vaccinia (MVA), que sí provoca la producción de IFN cuando infecta células CEF (Schwarz et al., 2004). Esta cepa atenuada de vaccinia, que se obtuvo mediante pases seriados de la cepa CVA

(virus Ankara corioalantoideo) en células CEF, ha perdido parte del genoma y posee mutaciones inactivadoras en otros genes, entre los que se encuentran varios genes implicados en el control de la respuesta inmune del hospedador que sí están presentes en WR y otros poxvirus (Antoine et al., 1998; Meisinger-Henschel et al., 2007; Waibler et al., 2009), lo que explicaría la diferencia entre WR y MVA a la hora de inducir la producción de IFN en células aviares.

En el caso de VSV, se ha publicado que la proteína viral M es un factor clave para impedir que células de mamífero infectadas con este virus produzcan y secreten IFN (Faul et al., 2009). Esta proteína inhibe rápidamente la transcripción de los genes nucleares, incluido el del IFN β (Ferran y Lucas-Lenard, 1997), así como el transporte del núcleo al citoplasma de los mensajeros celulares (Ahmed et al., 2003; Faul et al., 2009), evitando la generación de un estado antiviral. Nuestros resultados sugieren que la actividad de la proteína M también podría ser la responsable de la ausencia de IFN en los sobrenadantes de células aviares infectadas con VSV, ya que en estas células se inhibe la síntesis de proteínas celulares y se observa la acumulación de los mRNAs celulares en el núcleo. Estos resultados contrastan con los publicados por otro grupo de investigación que observaron durante la infección de células DF1 con VSV un aumento en los niveles del mRNA de los IFNs de pollo α y β (Qu et al., 2013). La discrepancia entre los resultados obtenidos por este grupo de investigación y los nuestros podría deberse al uso de diferentes cepas virales o a que, mientras que nosotros hemos detectado el IFN secretado por las células infectadas, ellos han analizado los niveles intracelulares de los mRNAs de los IFNs. Así, existe la posibilidad de que estos mRNAs permanezcan retenidos dentro del núcleo o de que su traducción esté inhibida, por lo que un aumento en los niveles de los mRNAs de los IFNs no estaría acompañado de un aumento del IFN secretado al exterior de la célula infectada.

En cuanto a los reovirus aviares, ya se había descrito anteriormente que la infección de fibroblastos de pollo envejecidos induce la secreción de IFN al medio (Ellis et al., 1983), lo que se había aprovechado para obtener grandes cantidades de IFN de pollo antes de que se hubieran clonado los genes de esta citoquina (Skellick y Marcus, 1986). También se ha publicado que distintas cepas de ARV presentan diferencias en su capacidad para producir IFN. Así, se observó que una cepa virulenta de ARV producía más IFN que otra menos virulenta (Ellis et al., 1982), lo que sugiere que el IFN producido durante la infección con ARV no controla su virulencia, probablemente debido a que el ARV es muy resistente a la acción antiviral de esta citoquina. Además, la

producción de IFN durante la infección con este virus podría contribuir a la inflamación que acompaña a la tenosinovitis infecciosa (Pertile et al., 1996) o ayudar a la diseminación del virus, aumentando la apoptosis y la liberación de los viriones al medio, como se ha propuesto para rotavirus (Frias et al., 2012), por lo que la producción de IFN podría tener un efecto beneficioso para el virus *in vivo*.

En esta tesis se ha demostrado que durante la infección de células CEF con ARV se produce IFN de tipo α y β (Figura 15B), una situación similar a la observada durante la infección de CEF con MVA o con un virus de la gripe defectivo en NS1. Sin embargo, esta situación es diferente a la que ocurre durante la infección con NDV, con el virus de la fiebre del valle del Rift o con Thogotovirus, en las que únicamente se detecta la producción de IFN α (Schwarz et al., 2004). Nuestros resultados también parecen confirmar los obtenidos por otros autores (Qu et al., 2013; Schwarz et al., 2004) que sugieren que el IFN α tiene un efecto mayor que el IFN β sobre la inducción de los ISGs, ya que hemos observado que los niveles de PKR se reducen mucho más cuando al medio de cultivo de células CEF infectadas con ARV se le añaden anticuerpos contra el IFN α que cuando se añaden contra el IFN β .

En otros miembros de la familia *Reoviridae* se han encontrado grandes diferencias entre especies y cepas a la hora de inducir la producción de IFN. En MRV, esto parece relacionarse con la estabilidad de la cápside, que impediría la detección de los segmentos genómicos de dsRNA, o con la capacidad de producir grandes cantidades de RNA virales y proteínas, que podrían inhibir la producción de IFN (Sherry et al., 1996; Sherry et al., 1998; Sherry, 2009). Algunas de las proteínas de MRV que regulan la respuesta celular frente a la infección son $\sigma 3$, capaz de unir fuertemente dsRNA (Imani y Jacobs, 1988; Schmechel et al., 1997), y la proteína $\mu 2$, que en algunas cepas es capaz de inactivar y secuestrar en el núcleo a IRF9, inhibiendo la señalización mediada por IFN (Irvin et al., 2012; Zurney et al., 2009). Sin embargo, en otras cepas se ha encontrado un motivo ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) en $\mu 2$ que estimularía la activación de NF- κ B, la producción de IFN y la inducción de la apoptosis, favoreciendo la diseminación del virus en algunos tipos celulares (Stebbing et al., 2014).

En rotavirus, la proteína NSP1 es capaz de degradar los IRFs de algunas especies, y de impedir la translocación nuclear de NF- κ B, bloqueando en esas especies la respuesta del IFN (Arnold et al., 2013). Sin embargo, en células del epitelio intestinal,

la inhibición del sistema del IFN no es total y esa pequeña cantidad de IFN parece ser necesaria para crear un ambiente adecuado para la replicación del virus (Frias et al., 2012). En el caso del virus de la lengua azul (BTV), un orbivirus, la proteína NS3, y puede que también NS4, inhibe la activación del promotor del IFN β bloqueando la señalización entre RIG-I/MAVS y la activación de IRF3 y NF- κ B (Vitour et al., 2013).

Pese a que en este trabajo no se ha encontrado ninguna evidencia de que el virus ARV regule la producción de IFN, no se puede descartar que el virus presente algún mecanismo que module la producción de IFN para evitar una producción excesiva de esta citoquina, como parece ocurrir con otros virus emparentados.

2.- LA INDUCCIÓN DE IFN DURANTE LA INFECCIÓN REQUIERE LA DECAPSIDACIÓN DEL VIRUS

En este trabajo hemos realizado estudios adicionales para intentar identificar la etapa del ciclo replicativo de ARV que provoca la inducción de IFN, lo que también podría aportar información sobre la naturaleza del factor viral que induce la expresión de esta citoquina. Hemos determinado que la decapsidación, pero no la síntesis de proteínas virales, es necesaria para que se produzca la inducción de IFN. Esto nos deja con varias posibilidades en cuanto a la molécula viral que puede ser detectada por la célula: i) proteínas de ISVPs o cores que queden expuestas tras la decapsidación de los reoviriones parentales; ii) proteasas lisosomales liberadas al citoplasma tras la desestabilización de la membrana lisosomal o iii) ácidos nucleicos virales, como los oligonucleótidos cortos ricos en adenina, los segmentos genómicos o transcritos abortivos que puedan sintetizarse aún en presencia de ribavirina o por partículas inactivadas con UV.

Durante la decapsidación de los reoviriones parentales, la acidificación del endosoma y la actuación de proteasas provocan la pérdida de σ B y el procesamiento de μ B para dar lugar a los fragmentos δ y δ' , que están implicados en la desestabilización de la membrana lisosomal para permitir el paso de los cores reovirales al citoplasma (Duncan, 1996). Estos fragmentos u otras proteínas de la cápside externa podrían ser detectados por algún TLR, aunque por lo general los fibroblastos expresan poca variedad de TLRs y en pequeña cantidad comparados con otros tipos celulares (Stetson y Medzhitov, 2006). Por otra parte, los fragmentos δ y δ' podrían afectar a la integridad de

otras membranas celulares, como la mitocondrial o la del retículo endoplasmático, y provocar otras alteraciones en la célula, de manera similar a lo que ocurre con los fragmentos de $\mu 1$ de MRV (Coffey et al., 2006), que es la homóloga de μB de ARV.

En el caso de algunos virus, como los adenovirus, la rotura de la membrana lisosomal libera al citoplasma catepsinas que activan a NLRs, provocando la formación del inflamasoma y la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β (Barlan et al., 2011). Sin embargo, durante la decapsidación de MRV apenas se liberan catepsinas y no se activa el inflamasoma, posiblemente porque los poros que se forman son de menor tamaño (Agosto et al., 2006; Barlan et al., 2011). Suponiendo que el mecanismo de translocación al citoplasma de ARV sea semejante al de MRV, podría descartarse la rotura del endosoma como el desencadenante de la inducción de IFN en fibroblastos. Sin embargo, en macrófagos infectados con ARV sí se ha observado secreción de la citoquina IL-1 β , de manera dependiente de la decapsidación e independiente de la presencia de dsRNA genómico (Wu et al., 2008), sugiriendo que, o bien los TLRs que poseen los macrófagos detectan alguna proteína viral, o bien en estas células se activan los NLRs de manera semejante a lo que ocurre con adenovirus (Barlan et al., 2011).

Otra posibilidad es que el inductor de la expresión de IFN en células CEF infectadas con ARV sean los ácidos nucleicos virales. En el caso de MRV se ha observado que partículas virales vacías carentes de segmentos genómicos son incapaces de inducir la producción de IFN (Lai y Joklik, 1973), sugiriendo que los PRRs de la célula hospedadora reconocen RNAs virales. Nuestros resultados indicaron que en células infectadas con ARV la mayor parte del dsRNA viral sintetizado se concentra en las inclusiones y es poco accesible a los PRRs, mientras que en el citoplasma se detecta únicamente el dsRNA de las partículas parentales, que se encuentra protegido por las proteínas de la cápside. Es posible que algunas de esas cápsides estén degradadas, lo que permitiría el acceso de los PRRs a los segmentos genómicos virales. En este sentido, se ha publicado que el tratamiento de los reoviriones de MRV con luz UV desestabiliza la cápside y aumenta la producción de IFN, lo que sugiere que los segmentos genómicos de las partículas parentales podrían actuar como inductores de la producción de IFN (Henderson y Joklik, 1978; Lai y Joklik, 1973; Sherry, 2009). En nuestro caso hemos visto que el tratamiento de los reoviriones de ARV con UV no elimina la capacidad del virus para inducir la expresión de IFN, aunque sí reduce la cantidad del IFN producido. Esto contrasta con los datos obtenidos por otros autores (Winship y Marcus, 1980), que

observaron que el tratamiento de los reoviriones de ARV con UV duplicaba la capacidad del virus para producir IFN. Es probable que estas discrepancias se deban a diferencias en las cepas virales empleadas o en la dosis de irradiación empleada, dado que un tratamiento excesivo perjudica la capacidad del virus para inducir la secreción de IFN (von Bülow et al., 1984; Lai y Joklik, 1973).

Se ha publicado que el dsRNA genómico de las partículas parentales de rotavirus no es suficiente para activar a los PRRs de células infectadas y que en estas células se generan, durante la transcripción de los genes virales, ssRNAs con extremos 5' trifosfato o incompletamente 2'-O-metilados, lo que los convierte en potentes activadores de los RLRs (Uzri y Greenberg, 2013). Es posible que durante la infección con ARV también se produzcan mRNAs con cap defectuosos, que serían detectados por los PRRs, lo que explicaría que la decapsidación y generación de cores transcripcionalmente activos sea necesaria para que se produzca la inducción de IFN. Esto parece contradecir los resultados obtenidos en presencia de ribavirina o con virus inactivado con UV, en los que se supone que no hay expresión de genes virales. Sin embargo, la ribavirina actúa sobre todo inhibiendo la elongación de los mensajeros, teniendo un efecto mucho menor sobre la iniciación de la transcripción y la formación del cap (Rankin et al., 1989), lo que permitiría que se iniciara la síntesis de mRNAs con extremos 5' anómalos capaces de activar la producción de IFN a través de los RLRs. En cuanto al virus inactivado con UV, también se ha descrito la producción en muy pequeñas cantidades de transcritos incompletos (Henderson y Joklik, 1978), que podrían ser los responsables de la producción de IFN. Por último, los reovirus, incluido el ARV, contienen unos oligonucleótidos pequeños de función desconocida que son liberados al citoplasma celular al comienzo de la infección, que no pueden descartarse como inductores de la expresión de IFN.

No se conoce la identidad del PRR que transmite la señal para la activación del promotor del IFN en células CEF infectadas con ARV. En otros miembros de la familia *Reoviridae*, como MRV, BTV y rotavirus están implicados RIG-I y MDA-5 (Holm et al., 2007; Sen et al., 2011; Sherry, 2009; Vitour et al., 2013), que son sensores de RNA citosólico. Si en el caso de ARV el inductor fuese también un RNA viral, tendría que ser detectado por el sensor MDA5, puesto que en pollo no se ha encontrado RIG-I. En mamíferos, la proteína MDA5 está especializada en la detección de fragmentos grandes de dsRNA, mientras que RIG-I se activa en presencia de fragmentos cortos de dsRNA o ssRNAs con extremos 5' di- o trifosfato (Takeuchi y Akira, 2009), lo que permite que se

activen de manera diferente ante distintos virus. En pollo, la proteína MDA5 no llega a compensar totalmente la ausencia de RIG-I, dado que la expresión de la proteína RIG-I de pato en células de pollo aumenta el número de genes estimulados ante una infección (Barber et al., 2012; Karpala et al., 2011). A diferencia de lo que ocurre en mamífero, la proteína MDA5 de pollo responde ante dsRNAs de cualquier tamaño y ante ssRNAs virales, independientemente de la naturaleza estructural de sus extremos 5' (Karpala et al., 2011). Esto sugiere que la proteína MDA5 de pollo podría detectar estructuras secundarias específicas de los RNAs u otras características aún no identificadas, lo que le permitiría reconocer inductores virales que en mamífero sólo son detectados por RIG-I, como es el caso del virus de la gripe (Karpala et al., 2011; Liniger et al., 2012).

3.- LAS CÉLULAS DF1 NO PRODUCEN IFN ANTE LA INFECCIÓN CON ARV

En este trabajo hemos observado que, al contrario de lo que ocurre en células CEF, durante la infección de células DF1 con ARV no se secreta IFN. No es el único caso en que se ha descrito que la infección con ARV no induce la secreción de IFN, ya que tampoco se produce durante la infección con varias cepas de ARV de células CK, derivadas de riñón de pollo, aunque sí se secreta cuando esas mismas células se incuban con ARV inactivado con luz UV (Ellis et al., 1983). En nuestro caso, el ARV inactivado con luz UV tampoco indujo la producción de IFN en células DF1, lo que podría deberse a distintos grados de inactivación con UV o a otras diferencias entre las células DF1 y las CK.

Las células DF1 son capaces de producir IFN ante determinados estímulos, como la transfección de dsRNA (Figura 20C) o la infección con otros virus, como el virus de la gripe o el IBDV (Lee et al., 2014; Liniger et al., 2012), lo que indica que la ausencia de IFN en el sobrenadante de células infectadas con reovirus aviar no se debe a que las células DF1 tengan un defecto generalizado del sistema del IFN. La infección con ARV y la transfección con plásmidos son los dos estímulos estudiados que inducen la expresión de IFN en células CEF pero no en DF1 y, en ambos casos, para que se produzca la inducción de IFN, el virus o el plásmido tienen que alcanzar el citoplasma de células CEF. Esto supone una diferencia con la detección del dsRNA transfectado en la que TLR3, un PRR endosomal, bastaría para estimular la producción de IFN (Karpala et al., 2008). El hecho de que las células de pollo no expresen RIG-I sugiere que los

bajos niveles de expresión del gen de MDA5 en células DF1, comparados con los de células CEF, podrían ser responsables de la incapacidad de las células DF1 para inducir la secreción de IFN en respuesta a la infección con ARV. Desgraciadamente, no se ha podido confirmar esta hipótesis experimentalmente, dado que la sobreexpresión de MDA5 induce por sí sola la secreción de IFN, aumentando la expresión de otros PRRs que también podrían estar implicados en la detección del inductor. Como alternativa, se intentó silenciar la expresión de MDA5 en CEF transfectando un plásmido que expresa un shRNA específico contra el mRNA de esta proteína (Liniger et al., 2012), pero desafortunadamente la transfección de este plásmido provocó un aumento en los niveles de PKR (resultados no mostrados), lo que impide extraer conclusiones. No obstante, la diferencia en los niveles de MDA5 no bastaría para explicar la ausencia de respuesta ante la infección con ARV, puesto que, como se ha indicado anteriormente, los niveles de MDA5 que poseen las células DF1 son suficientes para estimular la secreción de IFN cuando se infectan con otros virus (Lee et al., 2014; Liniger et al., 2012).

Otro posible motivo por el que sólo se ha detectado la producción de IFN en células CEF, y no en DF1, podría estar relacionado con el hecho de que durante algunas etapas del desarrollo embrionario de pollo se producen grandes cantidades de IFN para compensar los bajos niveles de receptores del IFN (Karpala et al., 2012), y que de esta manera un mismo estímulo produciría una cantidad detectable de IFN en CEF que se encontraría por debajo del límite de detección en DF1. Sin embargo, desconocemos cuáles son los niveles de los receptores de IFN en células DF1 respecto a los de CEF.

Por último, otro factor que podría influir en la incapacidad de las células DF1 para producir IFN es el hecho de que en estas células se detectan niveles menores de mRNAs (resultados no mostrados) y proteínas virales que en células CEF infectadas con la misma cantidad de virus, posiblemente debido a que el virus penetra peor en células DF1. Una menor cantidad de RNA viral presente en el citoplasma para activar los PRRs también justificaría una menor producción de IFN por estas células.

Por tanto, todos estos factores podrían contribuir a las diferencias que hemos observado a la hora de producir IFN e inducir PKR entre CEF y DF1 infectadas con ARV.

4.- SUSCEPTIBILIDAD DE LOS VIRUS VSV Y WR AL IFN EN CÉLULAS AVIARES

Los resultados de esta tesis y de estudios anteriores (Ellis et al., 1983; González-López et al., 2003; Martínez-Costas et al., 2000) pusieron de manifiesto que la replicación de ARV en células de pollo es mucho más resistente a la acción antiviral del IFN que la replicación de WR o VSV. En este estudio hemos tratado de averiguar los mecanismos que controlan la resistencia o susceptibilidad al IFN de estos virus, analizando la síntesis de proteínas, el estado de activación de PKR y el grado de fosforilación de eIF2 α . Nuestros resultados mostraron que los tres virus responden de forma diferente al pretratamiento de células aviares con un IFN α recombinante de pollo.

En el caso de VSV, el pretratamiento con IFN de las células de pollo provoca la inhibición de la síntesis de proteínas virales y un rescate parcial de las celulares. Durante la infección con VSV de estas células se ha observado la activación de una pequeña fracción de PKR y un ligero aumento de los niveles de fosforilación de eIF2 α . La traducción de los mRNAs de VSV es sensible a la fosforilación de eIF2 α , incluso en presencia de proteínas virales, como lo demuestra el hecho de que ésta se inhibe totalmente cuando se añade DTT al medio de cultivo a tiempos tardíos de infección. Esto concuerda con lo publicado por Connor y Lyles, (2005), que observaron que la fosforilación de eIF2 α es responsable de la inhibición de la síntesis de proteínas de VSV a tiempos tardíos de infección en células sin tratar con IFN. Sin embargo, la inhibición de PKR mediante el uso de C16 no es suficiente para rescatar la replicación del virus, aunque sí protege en parte a la monocapa celular de la apoptosis inducida por el virus (resultados no mostrados). Esto sugiere que en el bloqueo de la replicación de VSV en células aviares pretratadas con IFN deben estar implicados además otros ISGs. En fibroblastos embrionarios de ratón infectados con VSV se ha demostrado que PKR contribuye al bloqueo de la infección mediado por el IFN, pero que también participan otras proteínas como PERK o Mx (Balachandran et al., 2000; Connor y Lyles, 2005; Jin et al., 1999; Zhou et al., 1999) y en pollo se han descrito polimorfismos de Mx que son eficaces contra VSV (Sasaki et al., 2013; Seyama et al., 2006), por lo que Mx podría participar en la inhibición de la síntesis de proteínas de VSV que hemos observado en células aviares pretratadas con IFN. No obstante, otros estudios han demostrado que, aún en ausencia de PKR, RNaseL y Mx, las células poseen mecanismos capaces de inhibir la

replicación de VSV en etapas del ciclo viral como la entrada, decapsidación y transcripción (Basu et al., 2006; Belkowsky y Sen, 1987; Marcus y Sekellick, 1978; Thacore, 1978; Weidner et al., 2010; Zhou et al., 1999), que también podrían estar actuando durante la infección con VSV de células aviares.

La replicación de WR en muchas líneas celulares de mamífero es resistente al pretratamiento de las células con IFN, mientras que es sensible a esta citoquina en células aviares. La sensibilidad en CEF se ha achacado a un bloqueo en la traducción de los mRNAs virales, ya que se observa síntesis de RNA viral pero no de proteínas virales (Esteban y Metz, 1973). Estos resultados están de acuerdo con los que hemos obtenido en este estudio, que sugieren que la activación de PKR y la fosforilación de eIF2 α desempeñan un papel fundamental en la sensibilidad de WR hacia el IFN en células aviares. Esta sugerencia está apoyada por el hecho de que el virus WR pasa de ser sensible al IFN a ser resistente cuando se previene la activación de PKR, bien por expresión de la proteína σA de ARV, o bien mediante el empleo del inhibidor específico C16.

A diferencia de σA , el inhibidor C16 produce alteraciones en el patrón de proteínas expresadas por WR, en el que parece mantenerse la expresión de algunos genes tempranos cuando ya se están expresando los tardíos. Esto podría deberse a la preexistencia de una cierta cantidad de eIF2 α fosforilado, que, sin llegar a inhibir totalmente la síntesis de proteínas, puede facilitar o dificultar la expresión de determinados genes virales en función de su región UTR 5'. Esto podría provocar alteraciones en los niveles de proteínas virales que estabilizan o reprimen la expresión de otras, dando lugar a este patrón de expresión viral modificado (Yang et al., 2011).

El sistema OAS/RNaseL no parece tener un papel importante en la inhibición de la replicación de WR en células aviares, dado que no hemos detectado un aumento en la degradación de los rRNAs en células tratadas con IFN e infectadas (Figura 40B), ni se observan diferencias entre WR y WRS2 (González-López et al., 2003). Estos datos refuerzan la hipótesis de que la inhibición de la replicación de WR en células aviares pretratadas con IFN se debe principalmente a la activación de PKR y la fosforilación de eIF2 α .

El hecho de que WR sea incapaz de prevenir la activación de PKR cuando las células aviares se pretratan con IFN es bastante curioso, dado que WR expresa varias proteínas anti-PKR que deberían evitar la acumulación de eIF2 α fosforilado, entre las

que destacan K3L y E3L. La proteína K3L presenta una alta homología con eIF2 α y actúa como pseudosustrato de las quinasas de eIF2 α (Carroll et al., 1993; Sharp et al., 1997; Sood et al., 2000), mientras que E3L es una proteína de unión a dsRNA capaz de formar complejos ternarios del tipo E3L·dsRNA·PKR, que mantienen a PKR en estado inactivo (Romano et al., 1998b). La gran sensibilidad de WR hacia el IFN de pollo en células aviares contrasta con la resistencia del virus al tratamiento con DTT. El hecho de que la replicación del virus WR sea resistente al tratamiento de células aviares con DTT sugiere que K3L es capaz de actuar como pseudosustrato de la proteína PERK aviar, indicando que se parece bastante al eIF2 α aviar. El que PKR sea capaz de fosforilar a eIF2 α en células aviares infectadas con WR y pretratadas con IFN sugiere que PKR se activa antes de que se acumule suficiente cantidad del pseudosustrato K3L, o bien que K3L es incapaz de actuar como pseudosustrato de la PKR aviar. La proteína eIF2 α está muy conservada en los diferentes grupos de organismos por encargarse de un proceso básico como es la traducción, mientras que PKR está sometida a una gran presión evolutiva para discriminar entre eIF2 α y los pseudosustratos virales, algo que ha sido bien caracterizado en el grupo de los primates (Elde et al., 2009). Esta presión evolutiva no se observa sobre otras quinasas de eIF2 α , como PERK (Heinicke et al., 2009) y, si esto se extiende a otros vertebrados, podría explicar porqué K3L es capaz de actuar como pseudosustrato de PERK y no de PKR. En la siguiente tabla se muestra el grado de conservación de la secuencia aminoacídica de PERK, PKR y eIF2 α en el hombre y el pollo.

Proteína	Humana	Pollo	Idénticos	Positivos (Id+semejantes)
eIF2α	NP_004085.1	NP_001006477.1	98 %	98 %
PERK	NP_004827.4	XP_420868.2	79 %	86 %
PKR	NP_001129123.1	NP_989818.1	37 %	52 %

Tabla 3. Comparación de las proteínas humanas y de pollo. Se emplearon las herramientas BLAST y HomoloGene.

En cuanto a E3L, varios estudios sugieren que para que pueda inhibir eficazmente a PKR no basta con su capacidad para secuestrar dsRNA, sino que debe interaccionar con PKR (Romano et al., 1998b). Si la actividad anti-PKR de E3L estuviera basada exclusivamente en su capacidad para unir dsRNA, esta actividad no debería estar influenciada por el tipo celular infectado, a no ser que la cantidad de dsRNA producido por el virus en distintos tipos celulares sea diferente, en cuyo caso se

necesitarían niveles diferentes de E3L para secuestrar todo el dsRNA producido en la célula infectada (Langland y Jacobs, 2002). En este caso, la presencia de otra proteína de unión a dsRNA como la proteína σA de ARV en el virus WRS2 ayudaría a secuestrar la totalidad del RNA y a impedir la activación de PKR. También es posible que E3L no sea capaz de interaccionar directamente con la PKR aviar por diferencias en la secuencia, dado que la región de interacción se solapa en parte con las zonas de interacción con K3L y eIF2 α (Romano et al., 1998b).

5.- EL REOVIRUS AVIAR ES RESISTENTE AL PRETRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS CON IFN

Los ARVs son muy resistentes al pretratamiento de las células con IFN cuando se comparan con otros virus (Ellis et al., 1983), lo que, sumado a que son buenos inductores de la producción de IFN, sugiere que poseen mecanismos para replicar en presencia de un estado antiviral, latente o activo. En este trabajo hemos comprobado que durante la infección con ARV de células aviares pretratadas con IFN no se detecta la forma hiperfosforilada de PKR, ni un incremento acusado en los niveles de fosforilación de eIF2 α , aunque no se puede descartar que se genere una forma de PKR poco activa o que sólo se active una pequeña fracción de esta quinasa.

El grado de activación de PKR en células infectadas con otros reovirus varía según el virus y cepa estudiados. En rotavirus se observa desde las primeras horas de infección un aumento en el grado de fosforilación de eIF2 α que se mantiene durante toda la infección, por un mecanismo mediado por PKR (Rojas et al., 2010) y dependiente de la presencia de las proteínas VP2, VP6, NSP2 y NSP5 (Montero et al., 2008). Se ha planteado que esta activación se debe a la presencia de acúmulos de dsRNA en el citoplasma celular que no parecen corresponderse con estructuras secundarias de los mRNA virales (Rojas et al., 2010). En este trabajo, hemos estudiado la distribución del dsRNA en células infectadas con ARV y no hemos detectado dsRNA accesible fuera de los cuerpos de inclusión, dado que los puntos que detectamos en el citoplasma colocalizan con la proteína σA , indicando que, o bien se trata de cores, o bien el dsRNA se encuentra recubierto por esta proteína, por lo que no debería ser accesible a PKR.

En células infectadas con MRV el grado de activación de PKR depende de la cepa empleada. Se cree que la distribución de la proteína de unión a dsRNA $\sigma 3$

condiciona el estado de activación de esta quinasa: si se encuentra en el citoplasma además de en las inclusiones, inhibe la activación de PKR y fosforilación de eIF2 α a nivel global, mientras que si se concentra en las inclusiones, sólo se inhibe la activación de PKR en el entorno de la inclusión, permitiendo que se mantenga la síntesis de proteínas virales (Schmechel et al., 1997). En el caso del ARV, las inmunofluorescencias muestran que la proteína de unión a dsRNA σ A no se concentra exclusivamente en las inclusiones y mediante fraccionamiento subcelular se había comprobado que no toda la proteína sintetizada se incorpora inmediatamente a los cuerpos de inclusión y que gran parte permanece en la fracción soluble (Tourís-Otero et al., 2004a). Esto asemejaría a ARV con las cepas de MRV en las que no se activa PKR ni se induce *shutoff* de las proteínas celulares, aunque en nuestro caso habría *shutoff* sin activación detectable de PKR.

Por otra parte, nuestros resultados mostraron que la traducción de los mRNAs de ARV es resistente a la fosforilación de eIF2 α inducida por DTT. Existen virus cuyos mensajeros se traducen en presencia de eIF2 α fosforilado, lo que consiguen interaccionando con el ribosoma a través de estructuras complejas de sus mRNAs (Mohr y Sonenberg, 2012). No se ha descrito por el momento ninguna estructura de este tipo en miembros de la familia *Reoviridae*, si exceptuamos la región complementaria al rRNA 18S presente en el mRNA s1 de ARV y necesaria para la traducción eficiente del tercer cistron (Racine y Duncan, 2010). Otro mecanismo que podría permitir la traducción de mRNAs en presencia de eIF2 α fosforilado consiste en interferir con la formación de los gránulos de estrés (SGs) que induce la fosforilación de este factor. Los SGs son acumulaciones de mRNAs, complejos de preiniciación de la traducción y otras proteínas que se generan en respuesta a ciertos estímulos de estrés y en los que se almacenan los mRNAs sin traducir a la espera de que se reanude la traducción o sean degradados (White y Lloyd, 2012). Algunos virus de la familia *Reoviridae*, como MRV y rotavirus interfieren con la formación de los SGs para permitir la traducción de las proteínas virales. En el caso de MRV, la infección provoca la formación de SGs a tiempos tempranos de infección que van desapareciendo conforme progresa la infección, aunque se sigan manteniendo niveles altos de eIF2 α fosforilado (Qin et al., 2011). Por otra parte, en células infectadas con rotavirus se inhibe la formación de SGs desde el inicio de la infección, pese a que los niveles de fosforilación de eIF2 α son elevados (Montero et al., 2008). Es posible que alguna proteína del ARV sea capaz de impedir la formación

de los SGs y que por ello no se produzca una inhibición tan acusada de la síntesis de proteínas virales y celulares en las células infectadas cuando se induce la fosforilación de eIF2 α con DTT.

Sin embargo, pese a que el virus es resistente al pretratamiento con IFN, es capaz de inhibir la activación de PKR y de sintetizar proteínas en presencia de eIF2 α fosforilado, la replicación de ARV se ve muy perjudicada si PKR está activada desde el inicio de la infección, como ocurre cuando las células se someten a un tratamiento secuencial con IFN y dsRNA previo a la infección (Marcus y Sekellick, 2001). Esto sería consistente con un modelo en el que es necesaria la acumulación de una cierta cantidad de proteínas virales para impedir la activación de PKR y los efectos perjudiciales de la fosforilación de eIF2 α , mientras que una activación de PKR desde el inicio de la infección inhibiría la síntesis de proteínas virales.

6.- EL PAPEL DE LA PROTEÍNA σ A DEL REOVIRUS AVIAR EN LA RESISTENCIA AL IFN

Anteriormente se habían obtenido pruebas indirectas de que la proteína σ A de ARV es capaz de prevenir la activación de PKR (González-López et al., 2003; Martínez-Costas et al., 2000). En este trabajo se ha estudiado de forma directa los efectos de la expresión de esta proteína sobre la activación de PKR y la fosforilación de eIF2 α . Hemos observado que la expresión de σ A por el virus recombinante WRS2 inhibe la activación de PKR y rescata la replicación del virus en células aviares pretratadas con IFN. Por otra parte, la proteína σ A también es capaz de reducir la activación de PKR en células transfectadas con el dsRNA sintético poli(I:C).

La proteína σ A es una proteína que une fuertemente dsRNA de manera independiente de secuencia (Martínez-Costas et al., 2000; Tourís-Otero et al., 2005; Yin et al., 2000) y en este trabajo se han aportado evidencias experimentales de que su capacidad para unir dsRNA es necesaria para que pueda inhibir la activación de PKR. Además, parece que la inhibición de PKR depende únicamente de su capacidad para secuestrar dsRNA, ya que no se ha detectado interacción directa de σ A con la PKR aviar mediante doble híbrido o por inmunofluorescencia (resultados no mostrados). Sin embargo, no puede descartarse que las etiquetas añadidas en el sistema del doble híbrido estén afectando a la interacción de ambas proteínas, o que interaccionen únicamente en

algún compartimento celular específico, dado que existen muchas proteínas virales de unión a dsRNA que también interaccionan con PKR.

La inhibición de la activación de PKR mediante el secuestro del dsRNA es una estrategia muy utilizada por los virus. Los MRVs poseen otra proteína de unión a dsRNA que no es homóloga a la proteína σA de ARV, la proteína $\sigma 3$ de la cápside externa (Bergeron et al., 1998; Imani y Jacobs, 1988; Schmechel et al., 1997). Es llamativo que ambos virus hayan desarrollado de manera independiente proteínas para secuestrar dsRNA, lo que enfatiza la importancia que tiene el secuestro de dsRNA para el desarrollo del ciclo replicativo de estos virus.

En la siguiente tabla se indican otras proteínas virales de unión a dsRNA que inhiben la activación de PKR:

Virus	Proteína	Observaciones	Referencias
Vaccinia	E3L	Requiere tanto la unión a dsRNA como a PKR	Chang et al., 1992; Romano et al., 1998b
Reovirus	$\sigma 3$		Imani y Jacobs, 1988
Rotavirus porcino	NSP3		Langland et al., 1994
Influenza A	NS1	Puede inhibir la activación de PKR mediante interacción directa aunque no una dsRNA.	Li et al., 2006
Virus Herpes Simplex (HSV)	US11	Une dsRNA, pero también interacciona directamente con ella.	Peters et al., 2002; Poppers et al., 2000
Citomegalovirus humano (HCMV)	TRS1	Requiere tanto la unión a dsRNA como a PKR	Bierle et al., 2013
Citomegalovirus murino (MCMV)	m142/143		Child et al., 2006
Virus Ébola (EBOV)	VP35	Puede inhibir la activación de PKR aunque no una dsRNA.	Feng et al., 2007; Schümann et al., 2009
Virus de Epstein Barr (EBV)	SM	Requiere tanto la unión a dsRNA como a PKR.	Poppers et al., 2003
Coronavirus de oriente medio (MERS)	4a	Une dsRNA e interacciona con PACT, inhibiendo a RLRs, no se ha descrito lo que ocurre con PKR.	Niemeyer et al., 2013; Siu et al., 2014
Virus de la bursitis infecciosa (IBDV)	VP3		Busnadiego et al., 2012

Tabla 4. Proteínas virales de unión a dsRNA que inhiben a PKR. Se indican también los casos en los que se ha descrito interacción directa con PKR o con su activador PACT. Modificado de Randall y Goodbourn, 2008

La expresión de proteínas virales de unión a dsRNA no sólo permitiría a los virus prevenir la activación de PKR, sino que también podría impedir la activación de los sistemas OAS/RNasaL y los basados en RNA interferente, además de reducir la apoptosis o dificultar la detección del virus por los PRRs celulares (Randall y Goodbourn, 2008), aunque en ocasiones estas proteínas sólo son capaces de inhibir eficazmente uno de estos sistemas.

7.- EL IFN PROMUEVE LA REPLICACIÓN DEL ARV EN CÉLULAS DF1

Los resultados presentados en este trabajo pusieron de manifiesto que se infectan menos células y se obtienen niveles más bajos de proteínas virales cuando el virus ARV infecta a células DF1 que cuando infecta a células CEF, pese a que en ambos casos se trata de fibroblastos de pollo. Ya se había descrito anteriormente que el ARV replica con diferente eficiencia en distintos tipos celulares de pollo. Así, el ARV es incapaz de replicar en las líneas celulares RP1 y RP9, derivadas de linfocitos T y B respectivamente, mientras que sí replica en la línea HD11, derivada de macrófagos de pollo (Swanson et al., 2001). Por otra parte, la infección con ARV de células CET, un cultivo primario de tendón de pollo, es mucho menos productiva que la de células CEF, y el número de células infectadas cuando se incuban con la misma cantidad de virus es menor en CET que en CEF, pese a que no se observan diferencias cuando esas mismas células se infectan con otros virus (Huang, 1995), resultados parecidos a los que se han obtenido en este trabajo. Los autores de ese estudio consideran que las diferencias observadas entre líneas celulares podrían deberse a problemas en el procesamiento proteolítico necesario para la decapsidación y activación de la transcripción de los genes virales, lo que ralentizaría el progreso de la infección; o bien a diferencias en tasas metabólicas o en el grado de diferenciación celular. La hipótesis de que estas diferencias se deben a problemas en la decapsidación se ve apoyada por otro estudio en el que se ha observado que la diferente capacidad de dos cepas de ARV para infectar la línea de macrófagos HD11 está asociada al segmento M2 que codifica la proteína μ B (Hara et al., 2001), que se procesa durante la decapsidación.

Nuestros resultados mostraron además que el pretratamiento de células DF1 con IFN mejora considerablemente la infección con ARV. Esta mejoría está acompañada de un gran incremento de la actividad caspasa, que podría ser consecuencia y no causa de la

mejoría en la eficiencia de infección, dado que la apoptosis aumenta con el número de partículas virales que entran en la célula (Labrada et al., 2002), y que el aumento del número de células infectadas que induce el IFN no se revierte cuando se inhibe la actividad de las caspasas efectoras. Sin embargo, no se puede descartar que las modificaciones preapoptóticas de los factores de traducción, que no siempre dependen de caspasas (Morley et al., 2005), pudieran favorecer la traducción de los mensajeros virales frente a la de los celulares.

También hemos comprobado que el IFN no altera los niveles del receptor celular del ARV, por lo que debe ejercer su influencia sobre otro punto del ciclo replicativo. El IFN podría aumentar los niveles de catepsinas lisosomales, necesarias para la decapsidación del virus. En este sentido, se ha encontrado que la replicación de MRV en algunas líneas celulares restrictivas se facilita al preincubar los reoviriones con proteasas, lo que libera proteínas de la cubierta externa para dar lugar a ISVPs capaces de atravesar la membrana obviando la ruta lisosomal (Golden et al., 2002).

Otro mecanismo por el que el IFN podría favorecer la replicación del virus es aumentando la expresión de proteínas implicadas en la creación del estado antiviral, ya que existen varios ejemplos en los que los virus se aprovechan de estas proteínas para mejorar su replicación. Así, el virus HSV-1 induce la expresión de una isoforma de Mx que aumenta la replicación del virus, mientras que el citomegalovirus humano se ve favorecido por la presencia del ISG viperina en las células (Taylor y Mossman, 2013). Dentro de la familia *Reoviridae* se ha descrito que el MRV replica mejor en células que expresan PKR y eIF2 α fosforilable que en aquellas que no lo hacen (Smith et al., 2006), y que la inhibición total de PKR o de la señalización del IFN resulta perjudicial para la replicación de los rotavirus (Frias et al., 2012). En células aviáres infectadas con ARV no hemos encontrado una activación de PKR o fosforilación de eIF2 α equivalente a la que se obtiene mediante la transfección de poli(I:C), pero podría ocurrir que se produzca una activación parcial que seamos incapaces de detectar o que se active a tiempos tempranos de infección, cuando todavía no se han expresado suficientes proteínas virales.

8.- ESTUDIO DE LOS POSIBLES MECANISMOS DE *SHUTOFF*

La inhibición de la síntesis de proteínas celulares en células infectadas con virus puede conseguirse mediante diversos mecanismos. En el caso de VSV la proteína M

inhibe el transporte del núcleo al citoplasma de los mRNA celulares, pero también inhibe la actividad de las tres RNA polimerasas, y se ha observado que durante la infección con este virus se altera el estado de fosforilación de factores de traducción, como eIF4E o eIF2 α , que también podrían contribuir a este bloqueo de la síntesis de proteínas celulares (Connor y Lyles, 2002; Lyles, 2000). Por otra parte, el *shutoff* en células infectadas con WR depende de varios factores, entre los que se incluyen la inhibición de la síntesis de los mRNAs celulares y la degradación de éstos causada por la eliminación del cap por parte de la proteína viral D10 (Moss, 2007; Parrish et al., 2007). Además, el virus WR recluta factores de traducción como PABP o eIF4G a las factorías virales para favorecer la traducción de sus proteínas (Walsh, 2010).

La acumulación en el núcleo de mRNAs celulares es una estrategia empleada por algunos virus, como VSV o rotavirus, para bloquear la síntesis de proteínas celulares (Lyles, 2000; Rubio et al., 2013). Mediante hibridación *in situ* se analizó la distribución de los mRNAs celulares en células aviares infectadas con VSV y con ARV y se observó que, mientras que la infección con VSV de células aviares induce la acumulación nuclear de los mRNAs celulares, esta acumulación no se produce en células infectadas con ARV, lo que demuestra que el ARV no emplea esta estrategia para inducir *shutoff*.

Dado que los mRNAs que expresan los virus de la familia *Reoviridae* carecen de cola poli(A), a diferencia de la mayoría de los mRNAs celulares, se podría esperar que la acumulación en el núcleo o la degradación de la proteína de unión a la cola poli(A) PABP favoreciese la traducción de los mRNAs reovirales frente a la de los celulares. En este sentido, se ha encontrado acumulación de PABP en el núcleo de células infectadas con rotavirus, cuyos mRNAs también carecen de poli(A) (Harb et al., 2008), mientras que otros virus, como los picornavirus, provocan la degradación de PABP (Goss y Kleiman, 2014; Joachims et al., 1999). Sin embargo, nuestros resultados indican que no hay relocalización ni degradación de PABP en células aviares infectadas con ARV.

Por otra parte, se ha sugerido que en células infectadas con MRV la inhibición de la síntesis de proteínas celulares se debe a la gran cantidad de mRNAs reovirales que se acumulan en el citoplasma, lo que dificulta el acceso de los mensajeros celulares a factores de iniciación de la traducción como eIF4E o eIF4A (Ray et al., 1983). Un mecanismo como este podría explicar por qué sólo se produce *shutoff* en células DF1 a altas multiplicidades o a tiempos tardíos de infección, ya que esas condiciones favorecerían la acumulación de grandes cantidades de mRNA reovirales y un mayor número de células infectadas. Sin embargo, en el momento de la escritura de esta tesis se

ha publicado un artículo que sugiere que el MRV recluta componentes ribosomales y factores de traducción a las factorías virales, situándolos en la proximidad de los mRNA reovirales sintetizados en estas inclusiones (Desmet et al., 2014), sugiriendo que no sólo la competición entre mensajeros celulares y virales, sino que también la compartimentalización de los factores de traducción contribuyen a la expresión mayoritaria de las proteínas reovirales.

Se cree que tanto PKR como la RNasaL contribuyen al *shutoff* que se observa en células infectadas con algunas cepas de MRV, ya que éste disminuye en células que carecen de PKR, RNasaL o de eIF2 α fosforilable (Smith et al., 2005). Además, anteriormente se habían relacionado estas diferencias en el *shutoff* con la distribución de la proteína de unión a dsRNA $\sigma 3$, puesto que en las cepas en las que se distribuye por toda la célula es capaz de inhibir a PKR e impedir el *shutoff* de las proteínas celulares, mientras que cuando esta proteína se concentra en las inclusiones suele haber *shutoff* de la síntesis de proteínas celulares (Schmechel et al., 1997). En células infectadas con ARV no hemos detectado un incremento significativo en la fosforilación de eIF2 α ni en la activación de PKR, por lo que no parece que estos factores jueguen un papel importante en el *shutoff* inducido por ARV. Sin embargo, el incremento de fosforilación de eIF2 α provocado por el DTT parece no afectar tanto a la síntesis de proteínas virales como la de las celulares, por lo que es posible que un pequeño incremento en los niveles de eIF2 α , no detectable por Western blot, favorezca la traducción de los mRNA virales frente a los celulares. Por otra parte, hemos visto que en células infectadas con ARV se produce *shutoff* aun cuando no hay degradación de rRNAs, lo que se considera un indicador de la actividad de la RNasaL (Wreschner et al., 1981), lo que sugeriría que esta nucleasa no está implicada en el *shutoff* provocado por ARV. Sin embargo, existe la posibilidad de que una activación parcial de la RNasaL indujese la degradación de algunos mRNA específicos sin afectar a los niveles globales de rRNA (Silverman, 2007; Smith et al., 2005), lo que podría reducir la cantidad de mRNA celulares.





CONCLUSIONES



De los resultados obtenidos en el presente trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1.- La infección con reovirus aviar induce la producción de IFN α y β y un aumento en los niveles de PKR en células CEF pero no en DF1, mientras que no se detecta IFN en los sobrenadantes de estas mismas células infectadas con los virus vaccinia o VSV.
- 2.- La producción de IFN por las células CEF infectadas con reovirus aviar depende de la decapsidación del virus pero no de la expresión de sus genes.
- 3.- El reovirus aviar es resistente al pretratamiento de las células con IFN, y posee mecanismos capaces de reducir la activación de PKR en respuesta a dsRNA.
- 4.- La síntesis de las proteínas del reovirus aviar durante la infección es más resistente a los efectos de la fosforilación del eIF2 α que la de las proteínas celulares.
- 5.- La proteína σA del reovirus aviar inhibe la activación de PKR mediante el secuestro del dsRNA activador.
- 6.- El IFN aumenta el número de células DF1 infectadas con reovirus aviar por un mecanismo que no depende de la activación de las caspasas efectoras.
- 7.- El *shutoff* que se produce durante la infección con reovirus aviar parece depender de la competición entre los RNA celulares y virales, dado que no se observa alteración en la distribución de los mRNAs celulares, en la proteína PABP, o dependencia de la degradación de los rRNAs.
- 8.- Los virus vaccinia y VSV son capaces de inhibir la producción de IFN y la inducción de PKR en células aviares, y no son resistentes al tratamiento de estas células con IFN. Esta sensibilidad al IFN dependería de PKR en el caso del virus vaccinia pero no en el caso de VSV.





BIBLIOGRAFÍA



- Agosto, M.A., Ivanovic, T. y Nibert, M.L.** (2006). Mammalian reovirus, a nonfusogenic nonenveloped virus, forms size-selective pores in a model membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103(44), pp.16496–501.
- Ahmed, M., McKenzie, M.O., Puckett, S., Hojnacki, M., Poliquin, L. y Lyles, D.S.** (2003). Ability of the matrix protein of vesicular stomatitis virus to suppress beta interferon gene expression is genetically correlated with the inhibition of host RNA and protein synthesis. *J. Virol.*, 77(8), pp.4646–57.
- Antoine, G., Scheifflinger, F., Dorner, F. y Falkner, F.G.** (1998). The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*, 244(2), pp.365–96.
- Aranda, M. y Maule, A.** (1998). Virus-induced host gene shutoff in animals and plants. *Virology*, 243(2), pp.261–7.
- Arnold, M.M., Sen, A., Greenberg, H.B. y Patton, J.T.** (2013). The battle between rotavirus and its host for control of the interferon signaling pathway. *PLoS Pathog.*, 9(1), p.e1003064.
- Balachandran, S., Roberts, P.C., Brown, L.E., Truong, H., Pattnaik, A.K., Archer, D.R. y Barber, G.N.** (2000). Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity*, 13(1), pp.129–41.
- Baltzis, D., Qu, L., Papadopoulou, S., Blais, J.D., Bell, J.C., Sonenberg, N. y Koromilas, A.E.** (2004). Resistance to vesicular stomatitis virus infection requires a functional cross talk between the eukaryotic translation initiation factor 2alpha kinases PERK and PKR. *J. Virol.*, 78(23), pp.12747–61.
- Barber, M.R.W., Aldridge, J.R., Fleming-Canepa, X., Wang, Y.-D., Webster, R.G. y Magor, K.E.** (2012). Identification of avian RIG-I responsive genes during influenza infection. *Mol. Immunol.*, 54(1), pp.89–97.
- Barber, M.R.W., Aldridge, J.R., Webster, R.G. y Magor, K.E.** (2010). Association of RIG-I with innate immunity of ducks to influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107(13), pp.5913–8.
- Barlan, A.U., Danthi, P. y Wiethoff, C.M.** (2011). Lysosomal localization and mechanism of membrane penetration influence nonenveloped virus activation of the NLRP3 inflammasome. *Virology*, 412(2), pp.306–14.
- Barton, E.S., Forrest, J.C., Connolly, J.L., Chappell, J.D., Liu, Y., Schnell, F.J., Nusrat, A., Parkos, C.A. y Dermody, T.S.** (2001). Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell*, 104(3), pp.441–51.
- Basu, M., Maitra, R.K., Xiang, Y., Meng, X., Banerjee, A.K. y Bose, S.** (2006). Inhibition of vesicular stomatitis virus infection in epithelial cells by alpha interferon-induced soluble secreted proteins. *J. Gen. Virol.*, 87(Pt 9), pp.2653–62.

- Bekisz, J., Baron, S., Balinsky, C., Morrow, A. y Zoon, K.C.** (2010). Antiproliferative properties of Type I and Type II Interferon. *Pharmaceuticals (Basel)*, 3(4), pp.994–1015.
- Belkowski, L.S. y Sen, G.C.** (1987). Inhibition of vesicular stomatitis viral mRNA synthesis by interferons. *J. Virol.*, 61(3), pp.653–60.
- Benavente, J. y Martínez-Costas, J.M.** (2007). Avian reovirus: structure and biology. *Virus Res.*, 123(2), pp.105–19.
- Benfield, C.T.O., Lyall, J.W. y Tiley, L.S.** (2010). The cytoplasmic location of chicken Mx is not the determining factor for its lack of antiviral activity. *PLoS One*, 5(8), p.e12151.
- Bergeron, J., Mabrouk, T., Garzon, S. y Lemay, G.** (1998). Characterization of the thermosensitive ts453 reovirus mutant: increased dsRNA binding of sigma 3 protein correlates with interferon resistance. *Virology*, 246(2), pp.199–210.
- Bierle, C.J., Semmens, K.M. y Geballe, A.P.** (2013). Double-stranded RNA binding by the human cytomegalovirus PKR antagonist TRS1. *Virology*, 442(1), pp.28–37.
- Bodelón, G., Labrada, L., Martínez-Costas, J.M. y 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(20), pp.17789–96.
- Bodelón, G., Labrada, L., Martínez-Costas, J.M. y 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*, 290(2), pp.181–191.
- Borsa, J., Morash, B.D., Sargent, M.D., Copps, T.P., Lievaart, P.A. y Szekely, J.G.** (1979). Two modes of entry of reovirus particles into L cells. *J. Gen. Virol.*, 45(1), pp.161–70.
- Brandariz-Nuñez, A., Menaya-Vargas, R., Benavente, J. y Martínez-Costas, J.M.** (2010). Avian reovirus muNS protein forms homo-oligomeric inclusions in a microtubule-independent fashion, which involves specific regions of its C-terminal domain. *J. Virol.*, 84(9), pp.4289–301.
- Von Bülow, V., Weiler, H. y Klasen, A.** (1984). Activating effects of interferons, lymphokines and viruses on cultured chicken macrophages. *Avian Pathol.*, 13(4), pp.621–37.
- Busch, L.K., Rodríguez-Grille, J., Casal, J.I., Martínez-Costas, J.M. y Benavente, J.** (2011). Avian and mammalian reoviruses use different molecular mechanisms to synthesize their muNS isoforms. *J. Gen. Virol.*, 92(Pt 11), pp.2566–74.
- Busnadiego, I., Maestre, A.M., Rodríguez, D. y Rodríguez, J.F.** (2012). The infectious bursal disease virus RNA-binding VP3 polypeptide inhibits PKR-mediated apoptosis. *PLoS One*, 7(10), p.e46768.

- Carroll, K., Elroy-Stein, O., Moss, B. y Jagus, R.** (1993). Recombinant vaccinia virus K3L gene product prevents activation of double-stranded RNA-dependent, initiation factor 2 alpha-specific protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 268(17), pp.12837–42.
- Caserta, T.M., Smith, A.N., Gultice, A.D., Reedy, M.A. y Brown, T.L.** (2003). Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis*, 8(4), pp.345–52.
- Chakraborty, P., Satterly, N. y Fontoura, B.M.A.** (2006). Nuclear export assays for poly(A) RNAs. *Methods*, 39(4), pp.363–9.
- Chang, H.W., Watson, J.C. y Jacobs, B.L.** (1992). The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89(11), pp.4825–9.
- Chawla-Sarkar, M., Lindner, D.J., Liu, Y.-F., Williams, B.R.G., Sen, G.C., Silverman, R.H. y Borden, E.C.** (2003). Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis*, 8(3), pp.237–49.
- Child, S.J., Hanson, L.K., Brown, C.E., Janzen, D.M. y Geballe, A.P.** (2006). Double-stranded RNA binding by a heterodimeric complex of murine cytomegalovirus m142 and m143 proteins. *J. Virol.*, 80(20), pp.10173–80.
- Clarke, P. y Tyler, K.L.** (2003). Reovirus-induced apoptosis: A minireview. *Apoptosis an Int. J. Program. cell death*, 8(2), pp.141–50.
- Coffey, C.M., Sheh, A., Kim, I.S., Chandran, K., Nibert, M.L. y Parker, J.S.L.** (2006). Reovirus outer capsid protein mu1 induces apoptosis and associates with lipid droplets, endoplasmic reticulum, and mitochondria. *J. Virol.*, 80(17), pp.8422–38.
- Cole, J.L.** (2007). Activation of PKR: an open and shut case? *Trends Biochem. Sci.*, 32(2), pp.57–62.
- Connor, J.H. y Lyles, D.S.** (2005). Inhibition of host and viral translation during vesicular stomatitis virus infection. eIF2 is responsible for the inhibition of viral but not host translation. *J. Biol. Chem.*, 280(14), pp.13512–9.
- Connor, J.H. y Lyles, D.S.** (2002). Vesicular stomatitis virus infection alters the eIF4F translation initiation complex and causes dephosphorylation of the eIF4E binding protein 4E-BP1. *J. Virol.*, 76(20), pp.10177–87.
- Costas, C., Martínez-Costas, J.M., Bodelón, G. y 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(4), pp.2141–50.
- Das, S., Ward, S. V, Tacke, R.S., Suske, G. y Samuel, C.E.** (2006). Activation of the RNA-dependent protein kinase PKR promoter in the absence of interferon is dependent upon Sp proteins. *J. Biol. Chem.*, 281(6), pp.3244–53.

Day, J.M. (2009). The diversity of the orthoreoviruses: molecular taxonomy and phylogenetic divides. *Infect. Genet. Evol.*, 9(4), pp.390–400.

Desmet, E.A., Anguish, L.J. y Parker, J.S.L. (2014). Virus-mediated compartmentalization of the host translational machinery. *MBio*, 5(5), e01463-14.

Duncan, R. (1996). The low pH-dependent entry of avian reovirus is accompanied by two specific cleavages of the major outer capsid protein mu2C. *Virology*, 219(1), pp.179–89.

Duncan, R. y Sullivan, K. (1998). Characterization of two avian reoviruses that exhibit strain-specific quantitative differences in their syncytium-inducing and pathogenic capabilities. *Virology*, 250(2), pp.263–272.

Elde, N.C., Child, S.J., Geballe, A.P. y Malik, H.S. (2009). Protein kinase R reveals an evolutionary model for defeating viral mimicry. *Nature*, 457(7228), pp.485–9.

Ellis, M.N., Eidson, C.S., Brown, J. y Kleven, S.H. (1983). Studies on interferon induction and interferon sensitivity of avian reoviruses. *Avian Dis.*, 27(4), pp.927–36.

Ellis, M.N., Eidson, C.S., Fletcher, O.J. y Kleven, S.H. (1982). Viral tissue tropisms and interferon production in white leghorn chickens infected with two avian reovirus strains. *Avian Dis.*, 27(3), pp.644–51.

Esteban, M. y Metz, D.H. (1973). Inhibition of early vaccinia virus protein synthesis in interferon-treated chicken embryo fibroblasts. *J. Gen. Virol.*, 20(1), pp.111–5.

Faul, E.J., Lyles, D.S. y Schnell, M.J. (2009). Interferon response and viral evasion by members of the family rhabdoviridae. *Viruses*, 1(3), pp.832–51.

Feng, Z., Cervený, M., Yan, Z. y He, B. (2007). The VP35 protein of Ebola virus inhibits the antiviral effect mediated by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *J. Virol.*, 81(1), pp.182–92.

Ferran, M.C. y Lucas-Lenard, J.M. (1997). The vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits transcription from the human beta interferon promoter. *J. Virol.*, 71(1), pp.371–7.

Frias, A.H., Jones, R.M., Fifadara, N.H., Vijay-Kumar, M. y Gewirtz, A.T. (2012). Rotavirus-induced IFN- β promotes anti-viral signaling and apoptosis that modulate viral replication in intestinal epithelial cells. *Innate Immun.*, 18(2), pp.294–306.

García, M.A., Meurs, E.F. y Esteban, M. (2007). The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie*, 89(6-7), pp.799–811.

Gerlier, D. y Lyles, D.S. (2011). Interplay between innate immunity and negative-strand RNA viruses: towards a rational model. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 75(3), pp.468–90.

Gerlitz, G., Jagus, R. y Elroy-Stein, O. (2002). Phosphorylation of initiation factor-2 α is required for activation of internal translation initiation during cell differentiation. *Eur. J. Biochem.*, 269(11), pp.2810–2819.

Golden, J.W., Linke, J., Schmechel, S., Thoemke, K. y Schiff, L.A. (2002). Addition of exogenous protease facilitates reovirus infection in many restrictive cells. *J. Virol.*, 76(15), pp.7430–43.

González-López, C., Martínez-Costas, J.M., Esteban, M. y Benavente, J. (2003). Evidence that avian reovirus sigmaA protein is an inhibitor of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J. Gen. Virol.*, 84(Pt 6), pp.1629–39.

Goossens, K.E., Ward, A.C., Lowenthal, J.W. y Bean, A.G.D. (2013). Chicken interferons, their receptors and interferon-stimulated genes. *Dev. Comp. Immunol.*, 41(3), pp.370–6.

Goss, D.J. y Kleiman, F.E. (2014). Poly(A) binding proteins: are they all created equal? *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 4(2), pp.167–79.

Grande, A. y Benavente, J. (2000). Optimal conditions for the growth, purification and storage of the avian reovirus S1133. *J. Virol. Methods*, 85(1-2), pp.43–54.

Grande, A., Costas, C. y Benavente, J. (2002). Subunit composition and conformational stability of the oligomeric form of the avian reovirus cell-attachment protein sigmaC. *J. Gen. Virol.*, 83(Pt 1), pp.131–9.

Grande, A., Rodriguez, E., Costas, C., Everitt, E. y Benavente, J. (2000). Oligomerization and cell-binding properties of the avian reovirus cell-attachment protein sigmaC. *Virology*, 274(2), pp.367–77.

Grant, C.E., May, D.L. y Deeley, R.G. (2000). DNA binding and transcription activation by chicken interferon regulatory factor-3 (chIRF-3). *Nucleic Acids Res.*, 28(23), pp.4790–9.

Guardado-Calvo, P., Fox, G.C., Hermo-Parrado, X.L., Llamas-Saiz, A.L., Costas, C., Martínez-Costas, J.M., Benavente, J. y van Raaij, M.J. (2005). Structure of the carboxy-terminal receptor-binding domain of avian reovirus fibre sigmaC. *J. Mol. Biol.*, 354(1), pp.137–49.

Guardado-Calvo, P., Fox, G.C., Llamas-Saiz, A.L. y van Raaij, M.J. (2009). Crystallographic structure of the alpha-helical triple coiled-coil domain of avian reovirus S1133 fibre. *J. Gen. Virol.*, 90(Pt 3), pp.672–7.

Guardado-Calvo, P., Vázquez-Iglesias, L., Martínez-Costas, J.M., Llamas-Saiz, A.L., Schoehn, G., Fox, G.C., Hermo-Parrado, X.L., Benavente, J. y van Raaij, M.J. (2008). Crystal structure of the avian reovirus inner capsid protein sigmaA. *J. Virol.*, 82(22), pp.11208–16.

Haga, I.R. y Bowie, A.G. (2005). Evasion of innate immunity by vaccinia virus. *Parasitology*, 130 Suppl, pp.S11–25.

Haller, O., Stertz, S. y Kochs, G. (2007). The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins. *Microbes Infect.*, 9(14-15), pp.1636–43.

Hara, D.O., Patrick, M.K., Cepica, D., Coombs, K.M., Duncan, R., O'Hara, D. y Kevin, M. (2001). Avian reovirus major mu-class outer capsid protein influences efficiency of productive macrophage infection in a virus strain-specific manner. *J. Virol.*, 75(11), pp.5027–5035.

Harb, M., Becker, M.M., Vitour, D., Baron, C.H., Vende, P., Brown, S.C., Bolte, S., Arold, S.T. y Poncet, D. (2008). Nuclear localization of cytoplasmic poly(A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN. *J. Virol.*, 82(22), pp.11283–93.

Harding, H.P., Calfon, M., Urano, F., Novoa, I. y Ron, D. (2002). Transcriptional and translational control in the mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 18, pp.575–99.

Hayden, M.S. y Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, 132(3), pp.344–62.

Van der Heide, L. (2000). The history of avian reovirus. *Avian Dis.*, 44(3), pp.638–641.

Heinicke, L., Toroney, R. y Bevilacqua, P.C. (2009). Evolution of PKR combats viral mimicry. *Cell Sci.*, 5(4), pp.66–74.

Henderson, D.R. y Joklik, W.K. (1978). The mechanism of interferon induction by UV-irradiated reovirus. *Virology*, 91(2), pp.389–406.

Holm, G.H., Zurney, J., Tumilasci, V., Leveille, S., Danthi, P., Hiscott, J., Sherry, B. y Dermody, T.S. (2007). Retinoic acid-inducible gene-I and interferon-beta promoter stimulator-1 augment proapoptotic responses following mammalian reovirus infection via interferon regulatory factor-3. *J. Biol. Chem.*, 282(30), pp.21953–61.

Hsiao, J., Martínez-Costas, J.M., Benavente, J. y Vakharia, V.N. (2002). Cloning, expression, and characterization of avian reovirus guanylyltransferase. *Virology*, 296(2), pp.288–99.

Huang, B., Qi, Z.T., Xu, Z. y Nie, P. (2010). Global characterization of interferon regulatory factor (IRF) genes in vertebrates: glimpse of the diversification in evolution. *BMC Immunol.*, 11, p.22.

Huang, D.D. (1995). Restriction of avian reovirus in primary chicken embryo tendon cells. *Virology*, 207(1), pp.117–26.

Huang, W.R., Wang, Y.C., Chi, P.I., Wang, L., Wang, C.Y., Lin, C.H. y Liu, H.J. (2011). Cell entry of avian reovirus follows a caveolin-1-mediated and dynamin-2-dependent endocytic pathway that requires activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Src signaling pathways as well as microtubules and small GTPase Rab5 protein. *J. Biol. Chem.*, 286(35), pp.30780–94.

Huguet, C., Crepieux, P. y Laudet, V. (1997). Rel/NF-kappa B transcription factors and I kappa B inhibitors: evolution from a unique common ancestor. *Oncogene*, 15(24), pp.2965–74.

Hulo, C., de Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I. y Le Mercier, P. (2011). ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Res.*, 39(Database issue), pp.D576–82.

ICTV (2012). ICTV Master Species List 2012 v3. Disponible en: http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/4440.aspx.

Imani, F. y Jacobs, B.L. (1988). Inhibitory activity for the interferon-induced protein kinase is associated with the reovirus serotype 1 sigma 3 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85(21), pp.7887–91.

Irvin, S.C., Zurney, J., Ooms, L.S., Chappell, J.D., Dermody, T.S. y Sherry, B. (2012). A single-amino-acid polymorphism in reovirus protein $\mu 2$ determines repression of interferon signaling and modulates myocarditis. *J. Virol.*, 86(4), pp.2302–11.

Isaacs, A. y Lindenmann, J. (1957). Virus Interference. I. The Interferon. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, 147(927), pp.258–267.

Jacobs, B.L. y Langland, J.O. (1996). When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology*, 219(2), pp.339–49.

Jammi, N. V., Whitby, L.R. y Beal, P.A. (2003). Small molecule inhibitors of the RNA-dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 308(1), pp.50–7.

Jin, H.K., Takada, A., Kon, Y., Haller, O. y Watanabe, T. (1999). Identification of the murine Mx2 gene: interferon-induced expression of the Mx2 protein from the feral mouse gene confers resistance to vesicular stomatitis virus. *J. Virol.*, 73(6), pp.4925–30.

Joachims, M., Van Breugel, P.C. y Lloyd, R.E. (1999). Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. *J. Virol.*, 73(1), pp.718–27.

Jones, R.C. (2000). Avian reovirus infections. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.*, 19(2), pp.614–625.

Kaiser, P. (2010). Advances in avian immunology--prospects for disease control: a review. *Avian Pathol.*, 39(5), pp.309–24.

Karpala, A.J., Bagnaud-Baule, A., Goossens, K.E., Lowenthal, J.W. y Bean, A.G.D. (2012). Ontogeny of the interferon system in chickens. *J. Reprod. Immunol.*, 94(2), pp.169–74.

Karpala, A.J., Lowenthal, J.W. y Bean, A.G. (2008). Activation of the TLR3 pathway regulates IFN β production in chickens. *Dev. Comp. Immunol.*, 32(4), pp.435–44.

- Karpala, A.J., Stewart, C., McKay, J., Lowenthal, J.W. y Bean, A.G.D.** (2011). Characterization of chicken Mda5 activity: regulation of IFN- β in the absence of RIG-I functionality. *J. Immunol. (Baltimore, Md. 1950)*, 186(9), pp.5397–405.
- Kawakubo, K., Kuhen, K.L., Vessey, J.W., George, C.X. y Samuel, C.E.** (1999). Alternative splice variants of the human PKR protein kinase possessing different 5'-untranslated regions: expression in untreated and interferon-treated cells and translational activity. *Virology*, 264(1), pp.106–14.
- King, K.L., Jewell, C.M., Bortner, C.D. y Cidlowski, J.A.** (2000). 28S ribosome degradation in lymphoid cell apoptosis: evidence for caspase and Bcl-2-dependent and -independent pathways. *Cell Death Differ.*, 7(10), pp.994–1001.
- Klausner, R.D., Donaldson, J.G. y Lippincott-Schwartz, J.** (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.*, 116(5), pp.1071–80.
- Knowlton, J.J., Dermody, T.S. y Holm, G.H.** (2012). Apoptosis induced by mammalian reovirus is beta interferon (IFN) independent and enhanced by IFN regulatory factor 3- and NF- κ B-dependent expression of Noxa. *J. Virol.*, 86(3), pp.1650–60.
- Ko, J., Jin, H., Asano, A., Takada, A., Ninomiya, A., Kida, H., Hokiya, H., Ohara, M., Tsuzuki, M., Nishibori, M., Mizutani, M. y Watanabe, T.** (2002). Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene. *Genome Res.*, 12(4), pp.595–601.
- Kong, B.-W., Lee, J.Y., Bottje, W.G., Lassiter, K., Lee, J. y Foster, D.N.** (2011). Genome-wide differential gene expression in immortalized DF-1 chicken embryo fibroblast cell line. *BMC Genomics*, 12(1), p.571.
- Kozak, M.** (1991). Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.*, 266(30), pp.19867–70.
- Kuss, S.K., Mata, M.A., Zhang, L. y Fontoura, B.M.A.** (2013). Nuclear imprisonment: viral strategies to arrest host mRNA nuclear export. *Viruses*, 5(7), pp.1824–49.
- Labrada, L., Bodelón, G., Viñuela, J. y 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(16), pp.7932–41.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–5.
- Lai, M.-H.H. y Joklik, W.K.** (1973). The induction of interferon by temperature-sensitive mutants of reovirus, UV-irradiated reovirus, and subviral reovirus particles. *Virology*, 51(1), pp.191–204.

- Langland, J.O., Cameron, J.M., Heck, M.C., Jancovich, J.K. y Jacobs, B.L.** (2006). Inhibition of PKR by RNA and DNA viruses. *Virus Res.*, 119(1), pp.100–10.
- Langland, J.O. y Jacobs, B.L.** (2002). The role of the PKR-inhibitory genes, E3L and K3L, in determining vaccinia virus host range. *Virology*, 299(1), pp.133–41.
- Langland, J.O., Pettiford, S., Jiang, B. y Jacobs, B.L.** (1994). Products of the porcine group C rotavirus NSP3 gene bind specifically to double-stranded RNA and inhibit activation of the interferon-induced protein kinase PKR. *J. Virol.*, 68(6), pp.3821–9.
- Lee, C., Wu, C.C. y Lin, T.L.** (2012). Characterization of chicken melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) from alternative translation initiation. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 35(4), pp.335–43.
- Lee, C.-C., Wu, C.C. y Lin, T.L.** (2014). Chicken melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) recognizes infectious bursal disease virus infection and triggers MDA5-related innate immunity. *Arch. Virol.*, 159(7), pp.1671–86.
- Li, S., Min, J., Krug, R.M. y Sen, G.C.** (2006). Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology*, 349(1), pp.13–21.
- Li, Y.P., Handberg, K.J., Juul-Madsen, H.R., Zhang, M.F. y Jørgensen, P.H.** (2007). Transcriptional profiles of chicken embryo cell cultures following infection with infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.*, 152(3), pp.463–78.
- Liniger, M., Summerfield, A., Zimmer, G., McCullough, K.C. y Ruggli, N.** (2012). Chicken cells sense influenza A virus infection through MDA5 and CARDIF signaling involving LGP2. *J. Virol.*, 86(2), pp.705–17.
- Lyles, D.S.** (2000). Cytopathogenesis and inhibition of host gene expression by RNA viruses. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64(4), pp.709–24.
- Lyles, D.S. y Rupprecht, C.E.** (2007). Rhabdoviridae. En *Fields Virol. 5th Ed.* (D. M. Knipe y P. M. Howley, eds.). Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1363–1408.
- Marcus, P.I. y Sekellick, M.J.** (2001). Combined sequential treatment with interferon and dsRNA abrogates virus resistance to interferon action. *J. Interf. cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interf. Cytokine Res.*, 21(6), pp.423–429.
- Marcus, P.I. y Sekellick, M.J.** (1978). Interferon action III. The rate of primary transcription of vesicular stomatitis virus is inhibited by interferon action. *J. Gen. Virol.*, 38(3), pp.391–408.
- Marissen, W.E., Guo, Y., Thomas, A.A., Matts, R.L. y Lloyd, R.E.** (2000). Identification of caspase 3-mediated cleavage and functional alteration of eukaryotic initiation factor 2alpha in apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 275(13), pp.9314–23.

Martínez-Costas, J.M., González-López, C., Vakharia, V.N. y Benavente, J. (2000). Possible involvement of the double-stranded RNA-binding core protein sigmaA in the resistance of avian reovirus to interferon. *J. Virol.*, 74(3), pp.1124–31.

Martínez-Costas, J.M., Grande, A., Varela, R., García-Martínez, C. y Benavente, J. (1997). Protein architecture of avian reovirus S1133 and identification of the cell attachment protein. *J. Virol.*, 71(1), pp.59–64.

Martínez-Costas, J.M., Varela, R. y Benavente, J. (1995). Endogenous enzymatic activities of the avian reovirus S1133: identification of the viral capping enzyme. *Virology*, 206(2), pp.1017–26.

Meager, A. (2002). Biological assays for interferons. *J. Immunol. Methods*, 261(1-2), pp.21–36.

Meisinger-Henschel, C., Schmidt, M., Lukassen, S., Linke, B., Krause, L., Konietzny, S., Goesmann, A., Howley, P., Chaplin, P., Suter, M. y Hausmann, J. (2007). Genomic sequence of chorioallantois vaccinia virus Ankara, the ancestor of modified vaccinia virus Ankara. *J. Gen. Virol.*, 88(Pt 12), pp.3249–59.

Mendez, I.I., Hermann, L.L., Hazelton, P.R. y Coombs, K.M. (2000). A comparative analysis of freon substitutes in the purification of reovirus and calicivirus. *J. Virol. Methods*, 90(1), pp.59–67.

Mohr, I. y Sonenberg, N. (2012). Host translation at the nexus of infection and immunity. *Cell Host Microbe*, 12(4), pp.470–83.

Montero, H., Rojas, M., Arias, C.F. y López, S. (2008). Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *J. Virol.*, 82(3), pp.1496–504.

Morley, S.J., Coldwell, M.J. y Clemens, M.J. (2005). Initiation factor modifications in the preapoptotic phase. *Cell Death Differ.*, 12(6), pp.571–84.

Moss, B. (2007). Poxviridae: The Viruses and Their Replication. En *Fields Virol. 5th Ed.* (D. M. Knipe y P. M. Howley, eds.). Lippincott Williams & Wilkins, pp. 2905–2945.

Nadano, D. y Sato, T.-A. (2000). Caspase-3-dependent and -independent Degradation of 28 S Ribosomal RNA May Be Involved in the Inhibition of Protein Synthesis during Apoptosis Initiated by Death Receptor Engagement. *J. Biol. Chem.*, 275(18), pp.13967–13973.

NCBI (2014). Gene ID: 5610. EIF2AK2 eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2 [Homo sapiens (human)]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5610>.

Nehyba, J., Hrdlicková, R. y Bose, H.R. (2009). Dynamic evolution of immune system regulators: the history of the interferon regulatory factor family. *Mol. Biol. Evol.*, 26(11), pp.2539–50.

- Niemeyer, D., Zillinger, T., Muth, D., Zielecki, F., Horvath, G., Suliman, T., Barchet, W., Weber, F., Drosten, C. y Müller, M.A.** (2013). Middle East respiratory syndrome coronavirus accessory protein 4a is a type I interferon antagonist. *J. Virol.*, 87(22), pp.12489–95.
- Noad, L., Shou, J., Coombs, K.M. y Duncan, R.** (2006). Sequences of avian reovirus M1, M2 and M3 genes and predicted structure/function of the encoded mu proteins. *Virus Res.*, 116(1-2), pp.45–57.
- Oeckinghaus, A. y Ghosh, S.** (2009). The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 1(4), p.a000034.
- Park, M., Shaw, M.L., Muñoz-Jordan, J., Cros, J.F., Nakaya, T., Bouvier, N., Palese, P., García-Sastre, A. y Basler, C.F.** (2003). Newcastle disease virus (NDV)-based assay demonstrates interferon-antagonist activity for the NDV V protein and the Nipah virus V, W, and C proteins. *J. Virol.*, 77(2), pp.1501–11.
- Parker, J.S.L., Broering, T.J., Kim, J., Higgins, D.E. y 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(9), pp.4483–96.
- Parrish, S., Resch, W. y Moss, B.** (2007). Vaccinia virus D10 protein has mRNA decapping activity, providing a mechanism for control of host and viral gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(7), pp.2139–44.
- Paun, A. y Pitha, P.M.** (2007). The IRF family, revisited. *Biochimie*, 89(6-7), pp.744–53.
- Perdiguero, B. y Esteban, M.** (2009). The interferon system and vaccinia virus evasion mechanisms. *J. Interferon Cytokine Res.*, 29(9), pp.581–98.
- Pertile, T.L., Walser, M.M., Sharma, J.M. y Shivers, J.L.** (1996). Immunohistochemical detection of lymphocyte subpopulations in the tarsal joints of chickens with experimental viral arthritis. *Vet. Pathol.*, 33(3), pp.303–310.
- Pestova, T. V y Hellen, C.U.T.** (2003). Translation elongation after assembly of ribosomes on the Cricket paralysis virus internal ribosomal entry site without initiation factors or initiator tRNA. *Genes Dev.*, 17(2), pp.181–6.
- Peters, G.A., Khoo, D., Mohr, I. y Sen, G.C.** (2002). Inhibition of PACT-mediated activation of PKR by the herpes simplex virus type 1 Us11 protein. *J. Virol.*, 76(21), pp.11054–64.
- Piffat, K.A., Hrdlicková, R., Nehyba, J., Ikeda, T., Liss, A., Huang, S., Sif, S., Gilmore, T.D. y Bose, H.R.** (2001). The chicken RelB transcription factor has transactivation sequences and a tissue-specific expression pattern that are distinct from mammalian RelB. *Mol. cell Biol. Res. Commun. MCBRC*, 4(5), pp.266–75.

Poppers, J., Mulvey, M., Khoo, D. y Mohr, I. (2000). Inhibition of PKR activation by the proline-rich RNA binding domain of the herpes simplex virus type 1 Us11 protein. *J. Virol.*, 74(23), pp.11215–21.

Poppers, J., Mulvey, M., Perez, C., Khoo, D. y Mohr, I. (2003). Identification of a lytic-cycle Epstein-Barr virus gene product that can regulate PKR activation. *J. Virol.*, 77(1), pp.228–36.

Proud, C.G. (2005). eIF2 and the control of cell physiology. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 16(1), pp.3–12.

Qin, Q., Carroll, K., Hastings, C. y Miller, C.L. (2011). Mammalian orthoreovirus escape from host translational shutoff correlates with stress granule disruption and is independent of eIF2 α phosphorylation and PKR. *J. Virol.*, 85(17), pp.8798–810.

Qu, H., Yang, L., Meng, S., Xu, L., Bi, Y., Jia, X., Li, J., Sun, L. y Liu, W. (2013). The Differential Antiviral Activities of Chicken Interferon α (ChIFN- α) and ChIFN- β are Related to Distinct Interferon-Stimulated Gene Expression. *PLoS One*, 8(3), p.e59307.

Racine, T., Barry, C., Roy, K., Dawe, S.J., Shmulevitz, M. y Duncan, R. (2007). Leaky scanning and scanning-independent ribosome migration on the tricistronic S1 mRNA of avian reovirus. *J. Biol. Chem.*, 282(35), pp.25613–25622.

Racine, T. y 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(20), pp.7260–7272.

Randall, R.E. y Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.*, 89(Pt 1), pp.1–47.

Rankin, J.T., Eppes, S.B., Antczak, J.B. y Joklik, W.K. (1989). Studies on the mechanism of the antiviral activity of ribavirin against reovirus. *Virology*, 168(1), pp.147–58.

Ray, B.K., Brendler, T.G., Adya, S., Daniels-McQueen, S., Miller, J.K., Hershey, J.W., Grifo, J.A., Merrick, W.C. y Thach, R.E. (1983). Role of mRNA competition in regulating translation: further characterization of mRNA discriminatory initiation factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 80(3), pp.663–7.

Rhim, J.S., Jordan, L.E. y Mayor, H.D. (1962). Cytochemical, fluorescent-antibody and electron microscopic studies on the growth of reovirus (ECHO 10) in tissue culture. *Virology*, 17, pp.342–55.

Rodriguez, J.F., Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., McGowan, E.B. y Esteban, M. (1988). Expression of the firefly luciferase gene in vaccinia virus: a highly sensitive gene marker to follow virus dissemination in tissues of infected animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85(5), pp.1667–71.

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

Rojas, M., Arias, C.F. y López, S. (2010). Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2alpha in rotavirus infection. *J. Virol.*, 84(20), pp.10457–66.

Romano, P.R., Garcia-Barrio, M.T., Zhang, X., Wang, Q., Taylor, D.R., Zhang, F., Herring, C., Mathews, M.B., Qin, J. y Hinnebusch, A.G. (1998a). Autophosphorylation in the activation loop is required for full kinase activity in vivo of human and yeast eukaryotic initiation factor 2alpha kinases PKR and GCN2. *Mol. Cell. Biol.*, 18(4), pp.2282–97.

Romano, P.R., Zhang, F., Tan, S.-L., Garcia-Barrio, M.T., Katze, M.G., Dever, T.E. y Hinnebusch, A.G. (1998b). Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by vaccinia virus E3: role of complex formation and the E3 N-terminal domain. *Mol. Cell. Biol.*, 18(12), pp.7304–16.

Rubinstein, S., Familletti, P.C. y Pestka, S. (1981). Convenient assay for interferons. *J. Virol.*, 37(2), pp.755–8.

Rubio, R.M., Mora, S.I., Romero, P., Arias, C.F. y López, S. (2013). Rotavirus prevents the expression of host responses by blocking the nucleocytoplasmic transport of polyadenylated mRNAs. *J. Virol.*, 87(11), pp.6336–45.

Salsman, J., Top, D., Boutilier, J. y Duncan, R. (2005). Extensive Syncytium Formation Mediated by the Reovirus FAST Proteins Triggers Apoptosis-Induced Membrane Instability. *J. Virol.*, 79(13), pp.8090–8100.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Samuel, C.E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14(4), pp.778–809.

Sasaki, K., Yoneda, A., Ninomiya, A., Kawahara, M. y Watanabe, T. (2013). Both antiviral activity and intracellular localization of chicken Mx protein depend on a polymorphism at amino acid position 631. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 430(1), pp.161–6.

Satoh, S., Hijikata, M., Handa, H. y Shimotohno, K. (1999). Caspase-mediated cleavage of eukaryotic translation initiation factor subunit 2alpha. *Biochem. J.*, 342 (Pt 1), pp.65–70.

Schmechel, S., Chute, M., Skinner, P., Anderson, R. y Schiff, L.A. (1997). Preferential translation of reovirus mRNA by a sigma3-dependent mechanism. *Virology*, 232(1), pp.62–73.

Schneider, R.J. y Mohr, I. (2003). Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem. Sci.*, 28(3), pp.130–6.

- Schnitzer, T.J.** (1985). Protein coding assignment of the S genes of the avian reovirus S1133. *Virology*, 141(1), pp.167–170.
- Schultz, U., Kaspers, B. y Staeheli, P.** (2004). The interferon system of non-mammalian vertebrates. *Dev. Comp. Immunol.*, 28(5), pp.499–508.
- Schultz, U., Rinderle, C., Sekellick, M.J., Marcus, P.I. y Staeheli, P.** (1995). Recombinant chicken interferon from *Escherichia coli* and transfected COS cells is biologically active. *Fed. Eur. Biochem. Soc. J.*, 229(1), pp.73–76.
- Schümann, M., Gantke, T. y Mühlberger, E.** (2009). Ebola Virus VP35 Antagonizes PKR Activity through Its C-Terminal Interferon Inhibitory Domain. *J. Virol.*, 83(17), pp.8993–8997.
- Schwarz, H., Harlin, O., Ohnemus, A., Kaspers, B. y Staeheli, P.** (2004). Synthesis of IFN-beta by virus-infected chicken embryo cells demonstrated with specific antisera and a new bioassay. *J. Interferon Cytokine Res.*, 24(3), pp.179–84.
- Sekellick, M.J., Ferrandino, A.F., Hopkins, D.A. y Marcus, P.I.** (1994). Chicken interferon gene: cloning, expression, and analysis. *J. Interferon Res.*, 14(2), pp.71–79.
- Sekellick, M.J. y Marcus, P.I.** (1986). Induction of high titer chicken interferon. *Methods Enzymol.*, 119, pp.115–25.
- Sen, A., Pruijssers, A.J., Dermody, T.S., García-Sastre, A. y Greenberg, H.B.** (2011). The early interferon response to rotavirus is regulated by PKR and depends on MAVS/IPS-1, RIG-I, MDA-5, and IRF3. *J. Virol.*, 85(8), pp.3717–32.
- Seyama, T., Ko, J.-H., Ohe, M., Sasaoka, N., Okada, A., Gomi, H., Yoneda, A., Ueda, J., Nishibori, M., Okamoto, S., Maeda, Y. y Watanabe, T.** (2006). Population research of genetic polymorphism at amino acid position 631 in chicken Mx protein with differential antiviral activity. *Biochem. Genet.*, 44(9-10), pp.437–48.
- Shapouri, M.R., Arella, M. y Silim, A.** (1996a). Evidence for the multimeric nature and cell binding ability of avian reovirus sigma 3 protein. *J. Gen. Virol.*, 77 (Pt 6), pp.1203–10.
- Shapouri, M.R., Frenette, D., Larochelle, R., Arella, M. y Silim, A.** (1996b). Characterization of monoclonal antibodies against avian reovirus strain S1133. *Avian Pathol. J. W.V.P.A.*, 25(1), pp.57–67.
- Sharp, T. V, Witzel, J.E. y Jagus, R.** (1997). Homologous regions of the alpha subunit of eukaryotic translational initiation factor 2 (eIF2alpha) and the vaccinia virus K3L gene product interact with the same domain within the dsRNA-activated protein kinase (PKR). *Eur. J. Biochem.*, 250(1), pp.85–91.
- Sherry, B.** (2009). Rotavirus and Reovirus modulation of the interferon response. *J. Interf. cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interf. Cytokine Res.*, 29(9), pp.559–567.

Sherry, B., Baty, C.J. y Blum, M.A. (1996). Reovirus-induced acute myocarditis in mice correlates with viral RNA synthesis rather than generation of infectious virus in cardiac myocytes. *J. Virol.*, 70(10), pp.6709–6715.

Sherry, B., Torres, J. y Blum, M.A. (1998). Reovirus induction of and sensitivity to beta interferon in cardiac myocyte cultures correlate with induction of myocarditis and are determined by viral core proteins. *J. Virol.*, 72(2), pp.1314–23.

Shmulevitz, M. y Duncan, R. (2000). A new class of fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins encoded by the non-enveloped fusogenic reoviruses. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.*, 19(5), pp.902–912.

Shmulevitz, M., Epand, R.F., Epand, R.M. y Duncan, R. (2004). Structural and functional properties of an unusual internal fusion peptide in a nonenveloped virus membrane fusion protein. *J. Virol.*, 78(6), pp.2808–18.

Sick, C., Schultz, U. y Staeheli, P. (1996). A family of genes coding for two serologically distinct chicken interferons. *J. Biol. Chem.*, 271(13), pp.7635–7639.

Silverman, R.H. (2007). Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J. Virol.*, 81(23), pp.12720–9.

Silverman, R.H., Skehel, J.J., James, T.C., Wreschner, D.H. y Kerr, I.M. (1983). rRNA cleavage as an index of ppp(A2'p)nA activity in interferon-treated encephalomyocarditis virus-infected cells. *J. Virol.*, 46(3), pp.1051–5.

Silverstein, S.C. y Schur, P.H. (1970). Immunofluorescent localization of double-stranded RNA in reovirus-infected cells. *Virology*, 41(3), pp.564–6.

Siu, K.-L., Yeung, M.L., Kok, K.-H., Yuen, K.-S., Kew, C., Lui, P.-Y., Chan, C.-P., Tse, H., Woo, P.C.Y., Yuen, K.-Y. y Jin, D.-Y. (2014). Middle east respiratory syndrome coronavirus 4a protein is a double-stranded RNA-binding protein that suppresses PACT-induced activation of RIG-I and MDA5 in the innate antiviral response. *J. Virol.*, 88(9), pp.4866–76.

Smith, G.L., Benfield, C.T.O., Maluquer de Motes, C., Mazzon, M., Ember, S.W.J., Ferguson, B.J. y Sumner, R.P. (2013). Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *J. Gen. Virol.*, 94(Pt 11), pp.2367–92.

Smith, J.A., Schmechel, S.C., Raghavan, A., Abelson, M., Reilly, C., Katze, M.G., Kaufman, R.J., Bohjanen, P.R. y Schiff, L.A. (2006). Reovirus induces and benefits from an integrated cellular stress response. *J. Virol.*, 80(4), pp.2019–33.

Smith, J.A., Schmechel, S.C., Williams, B.R.G., Silverman, R.H. y Schiff, L.A. (2005). Involvement of the interferon-regulated antiviral proteins PKR and RNase L in reovirus-induced shutoff of cellular translation. *J. Virol.*, 79(4), pp.2240–50.

Smith, R.E., Zweerink, H.J. y Joklik, W.K. (1969). Polypeptide components of virions, top component and cores of reovirus type 3. *Virology*, 39(4), pp.791–810.

Sood, R., Porter, A.C., Ma, K., Quilliam, L.A. y Wek, R.C. (2000). Pancreatic eukaryotic initiation factor-2alpha kinase (PEK) homologues in humans, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* that mediate translational control in response to endoplasmic reticulum stress. *Biochem. J.*, 346 Pt 2, pp.281–93.

Spandidos, D.A. y Graham, A.F. (1976). Physical and chemical characterization of an avian reovirus. *J. Virol.*, 19(3), pp.968–76.

Stebbing, R.E., Irvin, S.C., Rivera-Serrano, E.E., Boehme, K.W., Ikizler, M., Yoder, J.A., Dermody, T.S. y Sherry, B. (2014). An ITAM in a nonenveloped virus regulates activation of NF- κ B, induction of beta interferon, and viral spread. *J. Virol.*, 88(5), pp.2572–83.

Stetson, D.B. y Medzhitov, R. (2006). Type I interferons in host defense. *Immunity*, 25(3), pp.373–81.

Su, Q., Wang, S., Baltzis, D., Qu, L., Wong, A.H. y Koromilas, A.E. (2006). Tyrosine phosphorylation acts as a molecular switch to full-scale activation of the eIF2alpha RNA-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103(1), pp.63–8.

Su, Y.P., Shien, J.H., Liu, H.-J., Yin, H.S. y Lee, L.H. (2007). Avian reovirus core protein muA expressed in *Escherichia coli* possesses both NTPase and RTPase activities. *J. Gen. Virol.*, 88(Pt 6), pp.1797–1805.

Swanson, G.J., Meyers, J. y Huang, D.D. (2001). Restricted growth of avirulent avian reovirus strain 2177 in macrophage derived HD11 cells. *Virus Res.*, 81(1-2), pp.103–11.

Takeuchi, O. y Akira, S. (2009). Innate immunity to virus infection. *Immunol. Rev.*, 227(1), pp.75–86.

Takeuchi, O. y Akira, S. (2008). MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr. Opin. Immunol.*, 20(1), pp.17–22.

Taylor, K.E. y Mossman, K.L. (2013). Recent advances in understanding viral evasion of type I interferon. *Immunology*, 138(3), pp.190–7.

Thacore, H.R. (1978). Effect of interferon on transcription and translation of vesicular stomatitis virus in human and simian cell cultures. *J. Gen. Virol.*, 41(2), pp.421–6.

Thomas, E., Feld, J.J., Li, Q., Hu, Z., Fried, M.W. y Liang, T.J. (2011). Ribavirin potentiates interferon action by augmenting interferon-stimulated gene induction in hepatitis C virus cell culture models. *Hepatology*, 53(1), pp.32–41.

Tourís-Otero, F., Cortez-San Martín, M., Martínez-Costas, J.M. y Benavente, J. (2004a). Avian reovirus morphogenesis occurs within viral factories and begins with the selective recruitment of sigmaNS and lambdaA to muNS inclusions. *J. Mol. Biol.*, 341(2), pp.361–74.

- Tourís-Otero, F., Martínez-Costas, J.M., Vakharia, V.N. y Benavente, J.** (2004b). Avian reovirus nonstructural protein μ NS forms viroplasm-like inclusions and recruits protein σ NS to these structures. *Virology*, 319(1), pp.94–106.
- Tourís-Otero, F., Martínez-Costas, J.M., Vakharia, V.N. y Benavente, J.** (2005). Characterization of the nucleic acid-binding activity of the avian reovirus non-structural protein σ NS. *J. Gen. Virol.*, 86(Pt 4), pp.1159–69.
- Unterholzner, L. y Bowie, A.G.** (2008). The interplay between viruses and innate immune signaling: recent insights and therapeutic opportunities. *Biochem. Pharmacol.*, 75(3), pp.589–602.
- Uzri, D. y Greenberg, H.B.** (2013). Characterization of rotavirus RNAs that activate innate immune signaling through the RIG-I-like receptors. *PLoS One*, 8(7), p.e69825.
- Varela, R. y Benavente, J.** (1994). Protein coding assignment of avian reovirus strain S1133. *J. Virol.*, 68(10), pp.6775–7.
- Varela, R., Martínez-Costas, J.M., Mallo, M. y Benavente, J.** (1996). Intracellular posttranslational modifications of S1133 avian reovirus proteins. *J. Virol.*, 70(5), pp.2974–81.
- Vázquez-Iglesias, L., Lostalé-Seijo, I., Martínez-Costas, J.M. y Benavente, J.** (2009). Avian reovirus σ A localizes to the nucleolus and enters the nucleus by a nonclassical energy- and carrier-independent pathway. *J. Virol.*, 83(19), pp.10163–75.
- Vázquez-Iglesias, L., Lostalé-Seijo, I., Martínez-Costas, J.M. y Benavente, J.** (2012). Different intracellular distribution of avian reovirus core protein σ A in cells of avian and mammalian origin. *Virology*, 432(2), pp.495–504.
- Ventoso, I., Sanz, M.A., Molina, S., Berlanga, J.J., Carrasco, L. y Esteban, M.** (2006). Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2 α phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes Dev.*, 20(1), pp.87–100.
- Vitour, D., Doceul, V., Ruscanu, S., Chauveau, E., Schwartz-Cornil, I. y Zientara, S.** (2013). Induction and control of the type I interferon pathway by Bluetongue virus. *Virus Res.*, 182, pp.59–70.
- Waibler, Z., Anzaghe, M., Frenz, T., Schwantes, A., Pöhlmann, C., Ludwig, H., Palomo-Otero, M., Alcamí, A., Sutter, G. y Kalinke, U.** (2009). Vaccinia virus-mediated inhibition of type I interferon responses is a multifactorial process involving the soluble type I interferon receptor B18 and intracellular components. *J. Virol.*, 83(4), pp.1563–71.
- Walsh, D.** (2010). Manipulation of the host translation initiation complex eIF4F by DNA viruses. *Biochem. Soc. Trans.*, 38(6), pp.1511–6.

Weidner, J.M., Jiang, D., Pan, X., Chang, J., Block, T.M. y Guo, J. (2010). Interferon-induced cell membrane proteins, IFITM3 and tetherin, inhibit vesicular stomatitis virus infection via distinct mechanisms. *J. Virol.*, 84(24), pp.12646–57.

White, J.P. y Lloyd, R.E. (2012). Regulation of stress granules in virus systems. *Trends Microbiol.*, 20(4), pp.175–83.

Wiener, J.R., Bartlett, J.A. y 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(2), pp.293–304.

Williams, B.R.G. (1999). PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene*, 18(45), pp.6112–20.

Winship, T.R. y Marcus, P.I. (1980). Interferon induction by viruses. VI. Reovirus: virion genome dsRNA as the interferon inducer in aged chick embryo cells. *J. Interferon Res.*, 1(1), pp.155–167.

Wreschner, D.H., James, T.C., Silverman, R.H. y Kerr, I.M. (1981). Ribosomal RNA cleavage, nuclease activation and 2-5A(ppp(A2'p)nA) in interferon-treated cells. *Nucleic Acids Res.*, 9(7), pp.1571–81.

Wu, Y.F., Liu, H.J., Shien, J.H., Chiou, S.H. y Lee, L.H. (2008). Characterization of interleukin-1beta mRNA expression in chicken macrophages in response to avian reovirus. *J. Gen. Virol.*, 89(Pt 4), pp.1059–68.

Xu, W. y Coombs, K.M. (2008). Avian reovirus L2 genome segment sequences and predicted structure/function of the encoded RNA-dependent RNA polymerase protein. *Virol. J.*, 5, p.153.

Yang, Z., Reynolds, S.E., Martens, C. a, Bruno, D.P., Porcella, S.F. y Moss, B. (2011). Expression profiling of the intermediate and late stages of poxvirus replication. *J. Virol.*, 85(19), pp.9899–908.

Yin, H.S., Shien, J.H. y Lee, L.H. (2000). Synthesis in Escherichia coli of avian reovirus core protein sigmaA and its dsRNA-binding activity. *Virology*, 266(1), pp.33–41.

Yoon, C., Lee, E., Lim, D. y Bae, Y. (2009). PKR , a p53 target gene , plays a crucial role in the tumor-suppressor function of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106(19), pp.7852–7857.

Van de Zande, S. y Kuhn, E.-M. (2007). Central nervous system signs in chickens caused by a new avian reovirus strain: a pathogenesis study. *Vet. Microbiol.*, 120(1-2), pp.42–9.

Zhang, F., Romano, P.R., Nagamura-Inoue, T., Tian, B., Dever, T.E., Mathews, M.B., Ozato, K. y Hinnebusch, A.G. (2001). Binding of double-stranded RNA to protein kinase PKR is required for dimerization and promotes critical autophosphorylation events in the activation loop. *J. Biol. Chem.*, 276(27), pp.24946–58.

Zhang, X., Tang, J., Walker, S.B., O'Hara, D., Nibert, M.L., Duncan, R. y Baker, T.S. (2005). Structure of avian orthoreovirus virion by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *Virology*, 343(1), pp.25–35.

Zhou, A., Paranjape, J.M., Der, S.D., Williams, B.R. y Silverman, R.H. (1999). Interferon action in triply deficient mice reveals the existence of alternative antiviral pathways. *Virology*, 258(2), pp.435–40.

Zurney, J., Kobayashi, T., Holm, G.H., Dermody, T.S. y Sherry, B. (2009). Reovirus mu2 protein inhibits interferon signaling through a novel mechanism involving nuclear accumulation of interferon regulatory factor 9. *J. Virol.*, 83(5), pp.2178–87.



