



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS  
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS  
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

**IC-TAGGING: PLATAFORMA  
UNIVERSAL PARA LA PRODUCCIÓN DE  
MICROESFERAS PROTEICAS PARA  
APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS**

Natalia Barreiro Piñeiro

**ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR**

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2018





## **DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS**

# **IC-TAGGING: PLATAFORMA UNIVERSAL PARA LA PRODUCCIÓN DE MICROESFERAS PROTEICAS PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS**

Dña. Natalia Barreiro Piñeiro

*Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:*

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

*En Santiago de Compostela, 02 de Julio de 2018*

Fdo.

Natalia Barreiro Piñeiro





## **AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS**

# IC-Tagging: plataforma universal para la producción de microesferas proteicas para aplicaciones biotecnológicas

D. Jose Manuel Martínez Costas  
D. Javier Benavente Martínez

INFORMA/N:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D/ Dña. Natalia Barreiro Piñeiro bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

*En Santiago de Compostela, 02 de Julio de 2018*

Fdo.  
Jose Manuel  
Martínez Costas

Fdo.  
Javier  
Benavente.Martínez



El doctorando declara ser co-autor de las siguientes patentes desarrolladas en el ámbito de esta tesis doctoral:

**Título:** Método de producción de la proteína glucosa-6-fosfatasa2.

**Inventores/autores/obtenedores:** Natalia Barreiro Piñeiro; Rubén Varela Calviño; Jose Manuel Martínez Costas; Javier Benavente Martínez

**Nº de solicitud:** P201830351

**País de inscripción:** España

**Fecha de registro:** 09/04/2018

**C. Autón. / Reg. de explotación:** España

**Título:** Protein muNS that can form inclusions in the endoplasmic reticulum, methods for the use there of and uses of same

**Tipo de propiedad industrial:** Patente de invención

**Inventores/autores/obtenedores:** Natalia Barreiro Piñeiro; Jose Manuel Martínez Costas; Javier Benavente Martínez

**Entidad titular de derechos:** Universidad de Santiago de Compostela

**Cód. de referencia/registro:** P11023EPPC

**Nº de solicitud:** P11023EPPC

**Fecha de registro:** 21/04/2017

**Patente UE:** Si

**Título:** Protein muNS that can form inclusions in the endoplasmic reticulum, methods for the use there of and uses of same

**Tipo de propiedad industrial:** Patente de invención

**Inventores/autores/obtenedores:** Natalia Barreiro Piñeiro; Jose Manuel Martínez Costas; Javier Benavente Martínez

**Entidad titular de derechos:** Universidad de Santiago de Compostela

**Cód. de referencia/registro:**

**Nº de solicitud:** P11023USPC

**Fecha de registro:** 21/03/2017

**Patente internacional no UE:** Si

**Título:** Proteína muNS capaz de formar inclusiones en el retículo endoplasmático, métodos de uso y usos de la misma.

**Tipo de propiedad industrial:** Patente de invención

**Inventores/autores/obtenedores:** Natalia Barreiro Piñeiro; Jose Manuel Martínez Costas; Javier Benavente Martínez

**Entidad titular de derechos:** Universidad de Santiago de Compostela

**Cód. de referencia/registro:** P11023ES00

**País de inscripción:** España

**Fecha de registro:** 22/09/2014

**Fecha de concesión:** 14/11/2016

**Patente española:** Si

**Licencias:** Si



## **RESUMO**

A metodoloxía do IC-Tagging baséase no uso de una proteína, muNS-Mi, que por si soa é capaz de formar estruturas esféricas nas células (microesferas, MS) que son facilmente purificables. Ademais podemos etiquetar calquera proteína con un tag denominado IC co cal provocamos que se modifique a localización e as proteínas etiquetadas queden incluídas nesas microesferas. No presente estudo empregouse este sistema para o desenvolvemento dun sensor de retrotranslocación de proteínas do retículo endoplasmático (RE). Para isto adaptamos o reensamblaxe de fragmentos de EGFP ó sistema IC-Tagging onde os resultados obtidos mostraron que sería un sensor pouco eficaz. Tamén adaptamos o sistema ó interior do RE para intentar desenvolver vacinas contra virus envoltos, producindo e purificando MS formadas no interior do RE cargadas con glicoproteínas. Para intentar expresar proteínas difíciles ou tóxicas, adaptamos o noso sistema para expresar e purificar proteínas en bacterias. Por último intentamos resolver a estrutura da proteína muNS-Mi e descubrir como as proteínas etiquetadas se distribúen nas mesmas.

## **PALABRAS CLAVE**

IC-Tagging, retículo endoplasmático, vacinas, expresión de proteínas

## **RESUMEN**

La metodología del IC-Tagging se basa en el uso de una proteína, muNS-Mi, que por sí sola es capaz de formar estructuras esféricas en las células (microesferas, MS) que son fácilmente purificables. Además podemos etiquetar cualquier proteína con un tag denominado IC con el cual provocamos que se modifique la localización de forma que las proteínas etiquetadas quedan incluidas en las microesferas. En este estudio se utilizó este sistema para el desarrollo de un sensor de retrotranslocación de proteínas del retículo endoplasmático (RE). Para esto adaptamos el reensamblaje de fragmentos de EGFP al sistema IC-Tagging donde los resultados obtenidos mostraron que sería un sensor poco eficaz. También adaptamos el sistema al interior del retículo endoplasmático para intentar el desarrollo de vacunas contra virus envoltos, produciendo y purificando MS formadas en el interior del RE cargadas con glicoproteínas. Para intentar expresar proteínas difíciles, adaptamos el sistema para expresar y purificar proteínas en bacterias. Por último intentamos resolver la estructura de la proteína muNS-Mi y descubrir como las proteínas etiquetadas se distribuyen en las mismas.

## **PALABRAS CLAVE**

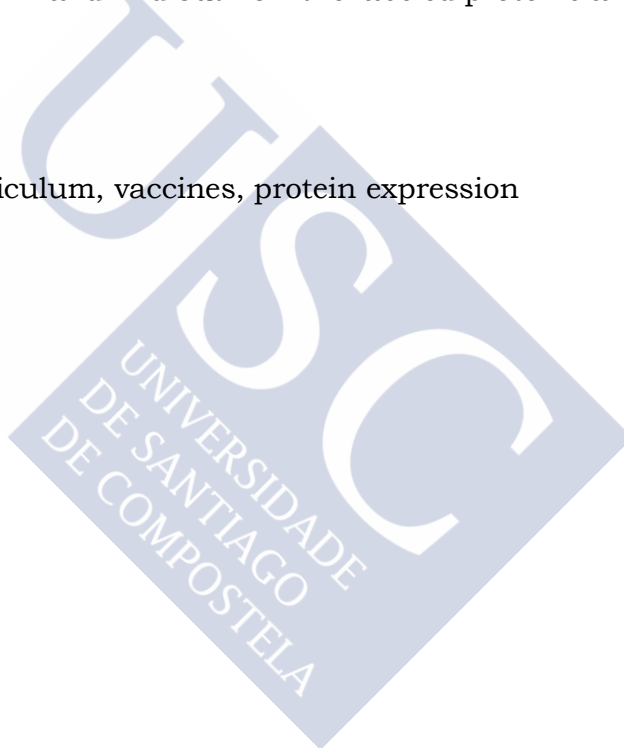
IC-Tagging, retículo endoplasmático, vacunas, expresión de proteínas

## **SUMMARY**

The IC-Tagging methodology is based on the viral protein muNS-Mi, which by itself is able to form spherical structures inside cells (microspheres, MS) that are easily purifiable. We can also tag any protein with the so-called IC-tag, that causes the re-location of the tagged proteins to the microspheres. In this study, we used IC-Tagging for the development of a sensor for endoplasmic reticulum protein retrotranslocation. For this, we adapted the reassembly of EGFP fragments to the IC-Tagging system, and the results obtained showed that it would be an inefficient sensor. We also adapted the system to work inside the endoplasmic reticulum to try to develop vaccines against enveloped viruses, by producing and purifying glycoprotein-loaded MS formed inside the ER. In order to express difficult proteins, we adapted the system to express and purify proteins in bacteria. Finally, we tried to solve the structure of muNS-Mi and find out how the labeled proteins are distributed inside them.

## **KEYWORDS**

IC-Tagging, endoplasmic reticulum, vaccines, protein expression





## **ÍNDICE**



<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>17</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>23</b>
1. FAMILIA REOVIRIDAE .....	25
2. ESTRUCTURA DEL REOVIRUS AVIAR .....	26
2.1    Genoma viral .....	26
2.2    Proteínas del virus .....	27
2.3    Partícula viral .....	28
2.4    Ciclo replicativo del reovirus aviar .....	29
2.4.1    Entrada y decapsidación .....	29
2.4.2    Expresión génica .....	30
2.4.3    Morfogénesis y salida .....	31
3. PROTEÍNA muNS .....	31
3.1    Características de la proteína muNS .....	31
3.2    El sistema IC-Tagging .....	36
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	53
1.1    Células eucariotas .....	53
1.2    Células procariotas .....	53
1.3    Baculovirus .....	53
1.4    Plásmidos parentales .....	54
1.5    Anticuerpos .....	54
1.5.1    Anticuerpos primarios .....	54
1.5.2    Anticuerpos secundarios .....	54
2. MATERIAL NO BIOLÓGICO .....	55
2.1    Medios de cultivo .....	55
2.2    Disoluciones y tampones .....	56
3. MÉTODOS .....	57
3.1    Manipulación de células bacterianas .....	57
3.1.1    Crecimiento y mantenimiento de bacterias .....	57
3.1.2    Obtención de bacterias competentes y transformación .....	57
3.1.3    Fijación de bacterias para microscopía electrónica de transmisión .....	57
3.2    Manipulación de ácidos nucleicos .....	58
3.2.1    Purificación de DNA plasmídico .....	58

## Índice

3.2.2	Reacción en cadena de la polimerasa.....	58
3.2.3	Aislamiento y purificación de fragmentos de DNA.....	58
3.2.4	Corte y unión de fragmentos de DNA.....	59
3.2.5	Mutaciones puntuales del DNA.....	59
3.2.6	Construcciones de plásmidos recombinantes.....	59
3.2.6.1	Generación de fragmentos de GFP.....	59
3.2.6.2	Generación de versiones de proteínas para el interior del RE.....	62
3.3	Expresión y manipulación de proteínas.....	65
3.3.1	Creación de baculovirus recombinantes.....	65
3.3.2	Expresión de proteína con baculovirus.....	67
3.3.3	Generación de plásmidos duales para la expresión en bacterias.....	67
3.3.4	Expresión de proteínas con bacterias.....	69
3.3.5	Purificación de microsferas de bacterias.....	69
3.3.6	Análisis electroforético en geles SDS-PAGE.....	69
3.3.7	Tratamiento con N-Glicosidasa.....	69
3.4	Manipulación de cultivos celulares y virus.....	70
3.4.1	Condiciones de manipulación.....	70
3.4.2	Propagación y conservación de líneas celulares.....	70
3.4.3	Transfección de células eucariotas con plásmidos de expresión transitoria.....	71
3.5	Técnicas inmunológicas.....	71
3.5.1	Transferencia de proteínas e inmunodetección por Western-blot.....	71
3.5.2	Inmunofluorescencia.....	71
3.6	Tratamiento bioinformático de las secuencias.....	72
<b>RESULTADOS</b> .....		<b>73</b>
1.	DESARROLLO DE SENSORES BASADOS EN EL REENSAMBLAJE DE FRAGMENTOS DE GFP UTILIZANDO EL SISTEMA IC-TAGGING.....	75
1.1	Introducción.....	75
1.2	Fragmento CEGFP etiquetado con IC - fragmento NEGFP fusionado a muNS-Mi.....	77
1.3	Ambos fragmentos (CEGFP y NEGFP) etiquetados IC y coexpresados con muNS-Mi.....	81

2. ADAPTACIÓN DEL SISTEMA IC-TAGGING PARA EL INTERIOR DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO (RE).....	87
2.1 Introducción.....	87
2.2 Expresión y formación de MS dentro del RE.....	87
2.3 Glicosilación de sec-Mi y formación de MS.....	90
2.4 Unión de glicoproteínas a MS en el interior del RE.....	96
2.5 Unión de glicoproteínas a MS en el RE - sistema de expresión de baculovirus .....	100
3. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DIFÍCILES.....	102
3.1 Introducción.....	102
3.2 Expresión de IGRP con el sistema de baculovirus.....	103
3.3 Adaptación del sistema IC-Tagging a bacterias.....	104
3.4 Expresión de proteínas difíciles o tóxicas.....	110
4. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS MS .....	115
4.1 Observación al TEM de secciones de MS producidas en Baculovirus.....	115
4.2 Intento de obtención de la estructura tridimensional de muNS-Mi.....	116
4.3 Estudio de la distribución de las proteínas etiquetadas en el interior de las MS mediante microscopía de super-resolución.....	117
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>119</b>
1. DESARROLLO DE SENSORES BASADOS EN EL REENSAMBLAJE DE FRAGMENTOS DE GFP UTILIZANDO EL SISTEMA IC-TAGGING.....	121
2. ADAPTACIÓN DEL SISTEMA IC-TAGGING PARA EL INTERIOR DEL RE.....	122
3. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DIFÍCILES.....	124
4. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS MS.....	126
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>129</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>133</b>





## **ABREVIATURAS**

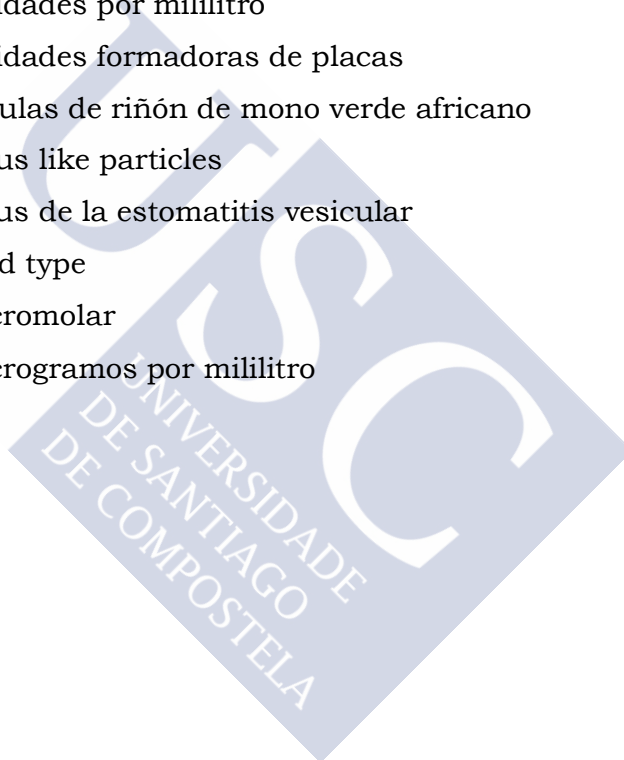


AHSV	Virus de la peste equina africana
ARV	Reovirus aviarios
Bac	Baculovirus
BiFC	Ensayos de complementación de biomoléculas fluorescentes
BSA	Seroalbúmina bovina
BTV	Virus de la lengua azul
C1	Coil 1
C2	Coil 2
CA-C	Extremo C-terminal del dominio de dimerización de la proteína de la cápside del virus VIH
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementario
CGFP/CEGFP	Fragmento carboxiloterminale de la proteína GFP o EGFP
Cos-7	Fibroblastos de riñón de mono
CT	Cola carboxilo terminal
Cys	Cisteínas
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DF-1	Fibroblastos de embrión de pollo inmortalizados
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
Ds-Red	Proteína fluorescente roja de <i>Dicosoma</i>
dsRNA	Ácido ribonucleico de doble cadena
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	Proteína fluorescente verde mejorada
FBS	Suero bovino fetal
GFP	Proteína fluorescente verde
h	Horas
h.p.i.	Horas postinfección
h.p.t.	Horas postransfección
His	Histidinas
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
IC	Intercoil
IFNAR	Ratones deficientes en el receptor de interferón

## **Abreviaturas**

IgG	Inmunoglobulina g
IGRP	Glucosa-6-fosfatasa-2
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
ISVPs	Partículas subvirales intermedias
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertami
Luc	Luciferasa
MCS	Policonectores
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mRFP	Proteína fluorescente roja monomérica
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MRV	Reovirus de mamífero
MS	Microesfera
MVA	Virus vaccinia Ankara modificado
ng	Nanogramo
ng	Nanogramos
NGFP/NEGFP	Fragmento aminoterminal de la proteína GFP o EGFP
NLS	Secuencia de localización nuclear
nm	Nanometros
NOD	Ratones diabéticos no obesos
O.D.	Densidad óptica
°C	Grados Celsius
PBS	Solucion fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RVFV	Virus de la Fiebre del Valle del Rift
SDS	dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
sec	Secuencia señal de entrada en el retículo endoplasmático
seg	Segundos

Sf9	Células de ovario de la oruga de la acelga
SV40	Virus del simio 40
T1D	Diabetes tipo 1
TAE	Tris-acetato-EDTA
TAg	Antígeno T del SV40
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
TRB -	Tampón de resuspensión sin magnesio
TRB +	Tampón de resuspensión con magnesio
TRIS	Tris (hidroximetil)-aminometano
TSS	Solución de transformación
U / ml	Unidades por mililitro
ufp	Unidades formadoras de placas
VERO	Células de riñón de mono verde africano
VLP	Virus like particles
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
WT	Wild type
$\mu$ M	Micromolar
$\mu$ g/ml	Microgramos por mililitro







## **INTRODUCCIÓN**



**1. FAMILIA REOVIRIDAE**

La familia Reoviridae abarca virus capaces de infectar desde insectos y plantas hasta peces y mamíferos, produciendo diversas manifestaciones que pueden ser tanto asintomáticas como mortales.

Los virus de esta familia se caracterizan por poseer un genoma fragmentado de 10 a 12 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) y por ser capaces de replicar en el citoplasma de las células infectadas utilizando estrategias similares tanto para la replicación como para la expresión de su genoma. Carecen de envoltura lipídica y contienen dos o tres cubiertas proteicas dispuestas concéntricamente con un diámetro externo entre 70-80 nm.

Esta familia se puede dividir en doce géneros diferentes (Tabla 1) basándose en la estructura de los viriones, en el número de segmentos que posee el genoma y las estrategias seguidas en el ciclo replicativo. Solo parte de los géneros son capaces de infectar a los humanos y otros vertebrados mientras que el resto infectan a plantas, insectos y peces.

<b>Familia Reoviridae</b>		
<b>Género</b>	<b>Nº de genes</b>	<b>Hospedadores</b>
<i>Subfamilia Spinareovirinae (con torretas)</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 o 12	Hongos
<i>Subfamilia Sedoreovirinae (sin torretas)</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** (Hulo et al., 2011).

## **Introducción**

El género Orthoreovirus está formado por virus que poseen 10 segmentos de dsRNA dentro de una doble cápside proteica, de 70-90 nm de diámetro externo, y unas estructuras en forma de torreta que atraviesan ambas cápsides interna y externa (Day, 2009; Jordan y Mayor, 1962). Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, detectándose en mamíferos, aves, reptiles e insectos. Los dos grupos más importantes de este género son los reovirus de mamífero (MRVs) y los aviares (ARVs). A pesar de que ambos poseen múltiples características morfológicas y físico-químicas similares (Spandidos y Graham, 1976), se diferencian en su patogenicidad, número de proteínas que codifican y propiedades tanto biológicas como serológicas entre las que destaca la capacidad fusogénica de los ARVs y la hemaglutinante de los MRVs (Benavente y Martínez-Costas, 2007).

Los ARVs son patógenos de aves que provocan infecciones generalmente asintomáticas aunque existen cepas con altos índices de mortalidad. La primera enfermedad relacionada con estos virus fue la tenosinovitis viral o artritis infecciosa, que consiste en una inflamación de las articulaciones de las patas con 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 y Kalbac, 1975; Jones, 2000; Van de Zande y Kuhn, 2007). A pesar de que la gran parte de estas infecciones no son letales, provocan un retraso en el crecimiento que reducen la productividad en las explotaciones y generan una pérdida económica.

## **2. ESTRUCTURA DEL REOVIRUS AVIAR**

### **2.1 Genoma viral**

El genoma del reovirus aviar se compone de 10 segmentos de dsRNA, que se dividen a su vez en tres clases según la movilidad electroforética que presentan (Figura 1): L (*large* o grandes), M (*medium* o medianos) y S (*small* o pequeños). Las dos primeras clases presentan 3 segmentos cada una, mientras que la clase S presenta 4 segmentos (Spandidos y Graham, 1976).

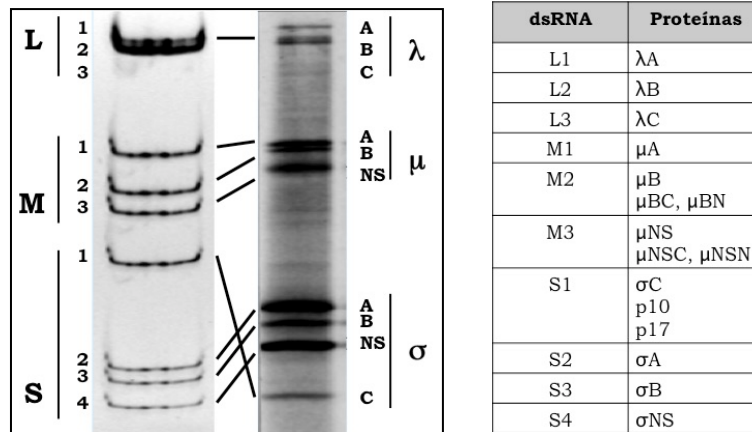
La cadena positiva de cada uno de los segmentos es idéntica al mRNA viral que codifica y presenta un cap tipo 1 en su extremo 5', mientras que la cadena negativa posee un grupo pirofosfato en esa misma posición (Martínez-Costas et al., 1995). En las cadenas positivas encontramos siete nucleótidos (GCUUUUU) en el extremo 5' y cinco (UCAUC) en el 3' que están altamente conservados en todos los segmentos de los ARVs, lo que sugiere que estas secuencias tienen papeles relevantes en procesos como la encapsidación, transcripción o replicación (Benavente y Martínez-Costas, 2007).

### **2.2 Proteínas del virus**

Los 10 segmentos del reovirus codifican al menos para 12 productos de transcripción primarios, de los cuales 8 son proteínas estructurales que forman parte de la partícula viral, y los 4 restantes son no estructurales, que no son incorporadas en la partícula viral. Además existen otras proteínas que se generan debido al procesamiento proteolítico de los productos primarios de traducción. Todos los segmentos son monocistrónicos a excepción del segmento S1, que es tricistrónico, y por lo tanto codifica para tres polipéptidos (Bodelón et al., 2001).

Las proteínas se nombran con una letra griega según el segmento genómico que la codifica: "λ" para el segmento L, "μ" para el M y "σ" para el S. Además, a las proteínas estructurales se les asigna un sufijo alfabético (A, B o C) según su movilidad electroforética, mientras que las proteínas no estructurales llevan como sufijo NS (Figura 1). El virión contiene al menos 10 proteínas estructurales, 8 de las cuales provienen de productos de transcripción primarios (λA, λB, λC, μA, μB, σA, σB, σC) y las otras dos, μBN y μBC, provienen del procesamiento proteolítico de μB (Varela et al., 1996). Las proteínas no estructurales de los reovirus aviares son cuatro: mayoritariamente μNS y σNS (Schnitzer et al., 1982; Varela y Benavente, 1994) y minoritariamente p10 y p17 que están codificadas por los dos primeros cistrones del segmento S1 (Bodelón et al., 2001; Shmulevitz et al., 2002). Además en células infectadas con ARVs se detectan otras dos formas de μNS denominadas μNSC y μNSN (Busch et al., 2011; Tourís-Otero et al., 2004b).

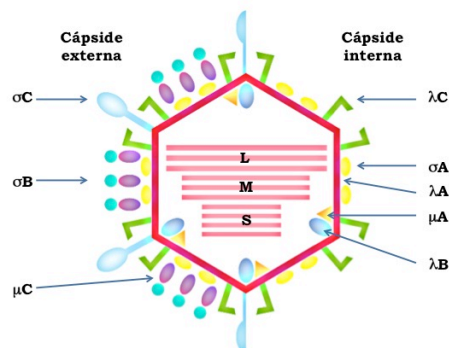
## Introducción



**Figura 1. Relación entre los segmentos genómicos del reovirus aviar y las proteínas que codifican.** En la imagen de la izquierda se observan tanto los genes como las proteínas en un gel de electroforesis donde no podemos observar ni p10 ni p17 debido a su pequeño tamaño. En la tabla de la derecha tenemos la correspondencia entre segmentos genómicos y las proteínas que codifican.

### 2.3 Partícula viral

Los viriones del reovirus aviar son partículas icosaédricas de aproximadamente 85 nm de diámetro externo y una densidad de 1,37 g/ml. Contienen los 10 segmentos de RNA de doble cadena en el interior de la doble cubierta proteica, además de contener múltiples oligonucleótidos de cadena simple de función desconocida (Spandidos y Graham, 1976; Zhang et al., 2005). Varios estudios determinaron la distribución de las diferentes proteínas en la partícula viral o virión (Martínez-Costas et al., 1997). Así, podemos situar a las proteínas λA, λB, μA y σA como componentes de la cápside interna, a μB, μBC, μBN, σB y σC en la cápside externa y λC formando las torretas que atraviesan ambas cápsides (Figura 2).



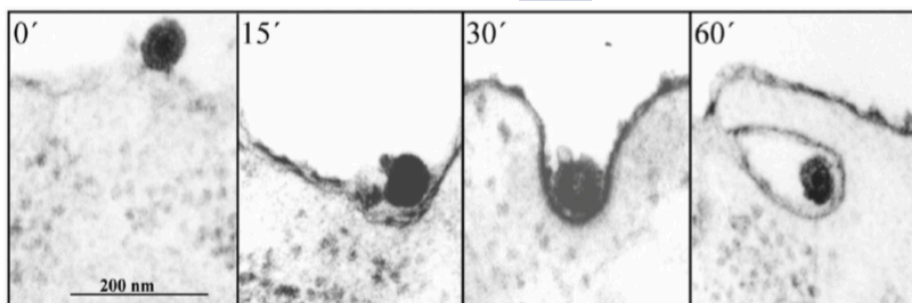
**Figura 2. Representación esquemática de la partícula viral del reovirus aviar.**

Tratando los viriones con proteasas se pueden conseguir partículas subvirales intermedias (ISVPs) y cores (Grande y Benavente, 2000; Martínez-Costas et al., 1997). Las ISVPs no presentan las proteínas de la cápside externa, excepto  $\lambda C$  y  $\sigma C$ , por lo que son partículas infecciosas y transcripcionalmente activas. Los cores se componen únicamente de las proteínas  $\lambda A$ ,  $\lambda B$ ,  $\mu A$ ,  $\sigma A$  y  $\lambda C$  y aunque son transcripcionalmente activas, no son infectivos ya que carecen de  $\sigma C$ , que es la proteína que se encarga de la unión a las células.

### 2.4 Ciclo replicativo del reovirus aviar.

#### 2.4.1 Entrada y decapsidación.

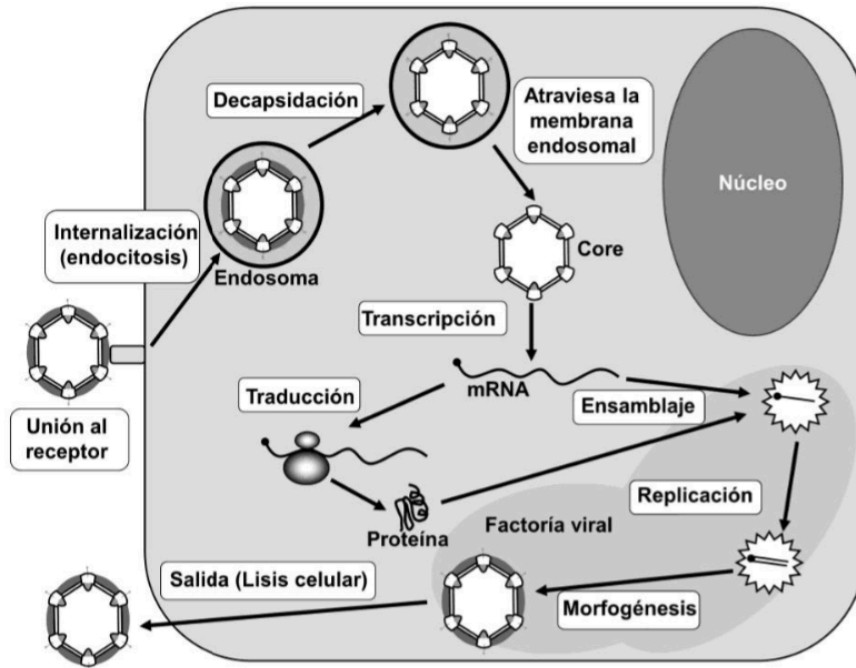
La unión del virus a las células está mediada por interacciones específicas entre la proteína  $\sigma C$  y los receptores de la superficie celular (Grande y Benavente, 2000; Shapouri et al., 1996). El receptor celular para los ARVs todavía no se ha identificado, pero resultados obtenidos hasta el momento sugieren que es una proteína de la superficie celular y que en la unión no participan grupos conjugados, puesto que la adsorción del virus se inhibe únicamente con pretratamiento con proteasas pero no con glicosidasas, lipasas, EDTA o periodato sódico. El receptor parece ser una proteína ubicua, puesto que los ARVs también son capaces de adherirse y replicar en líneas celulares de mamífero. Se han observado al microscopio electrónico fibroblastos embrionarios de pollo infectados con ARV en donde se puede ver que la entrada del virus es a través de endocitosis mediada por receptor (Figura 3).



**Figura 3. Vista al microscopio electrónico de la entrada del reovirus aviar (Adaptada de Benavente y Martínez-Costas, 2006) .**

## Introducción

La decapsidación tiene lugar en el endosoma y es necesario la acidificación del mismo y el procesamiento proteolítico de la proteína  $\mu$ BC que genera los péptidos  $\delta$  y  $\delta'$  (Duncan, 1996; Labrada et al., 2002). El mecanismo mediante el que los cores atraviesan la membrana endosomal y alcanzan el citoplasma todavía se desconoce.



**Figura 4. Modelo propuesto para el ciclo replicativo del reovirus aviar (Adaptada de Benavente y Martínez-Costas, 2007).**

### 2.4.2 Expresión génica

La proteína  $\lambda$ B con su actividad RNA polimerasa es la encargada de la síntesis de los 10 mRNAs utilizando como molde la hebra negativa de los segmentos genómicos. Los mRNA virales se sintetizan en el core y salen a través de las torretas formadas por  $\lambda$ C para posteriormente adquirir un cap tipo 1 en el extremo 5'. Además no están poliadenilados y en ambos extremos presentan unas regiones cortas no codificantes (Martínez-Costas et al., 1995). Estos mRNAs van a tener dos funciones, por un lado serán los encargados de programar la síntesis de proteínas virales mientras que por otro van a servir de molde para la síntesis de las hebras negativas de los genomas de la progenie viral.

### **2.4.3 Morfogénesis y salida**

Los miembros de la familia Reoviridae se ensamblan en inclusiones citoplasmáticas densas denominadas viroplasmas, inclusiones virales o factorías virales. Estas estructuras no están asociadas a orgánulos, membranas ni microtúbulos y presentan tanto proteínas estructurales como no estructurales además de partículas virales parcial o totalmente ensambladas (Rhim et al., 1962; Silverstein y Schur, 1970). Dentro de estas estructuras es donde tiene lugar el ensamblaje de los nuevos viriones siendo la incorporación de las proteínas virales un proceso totalmente controlado y selectivo (Tourís-Otero et al., 2004a). Se cree que la síntesis de las hebras negativas de los segmentos genómicos tiene lugar en el interior de los viriones en formación siendo la RNA polimerasa viral  $\lambda$ B la catalizadora de esta reacción. Se cree que  $\mu$ NS es la responsable de formar el armazón sobre el que se construyen los viroplasmas, reclutando específica y directamente a  $\sigma$ NS,  $\lambda$ A y  $\lambda$ C a dichas inclusiones (ver más adelante).

Aunque se conoce poco sobre la salida de las partículas virales de las células infectadas son dos las formas de diseminación que se esperan. Por un lado la liberación podría ser por lisis celular, mientras que otro de los mecanismos podría ser a través de fusión celular inducida por p10 permitiendo la diseminación entre células adyacentes sin verse expuesto el sistema inmune del organismo hospedador (Bodelón et al., 2002; Shmulevitz y Duncan, 2000). Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la apoptosis desencadenada por el reovirus aviar potencia tanto la diseminación del virus como el procesamiento de la proteína no estructural  $\mu$ NS (Rodríguez-Grille et al., 2014).

## **3. PROTEÍNA $\mu$ NS**

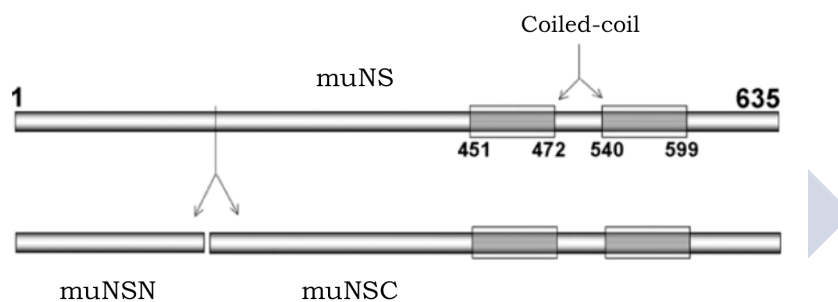
### **3.1 Características de la proteína $\mu$ NS**

Como se ha mencionado anteriormente, en el proceso de formación de las factorías virales está implicada la proteína no estructural  $\mu$ NS de 70 kDa, codificada por el gen M3 del ARV (Tourís-Otero et al., 2004b; Varela y Benavente, 1994). Esta proteína es la única capaz de formar inclusiones cuando se expresa

## Introducción

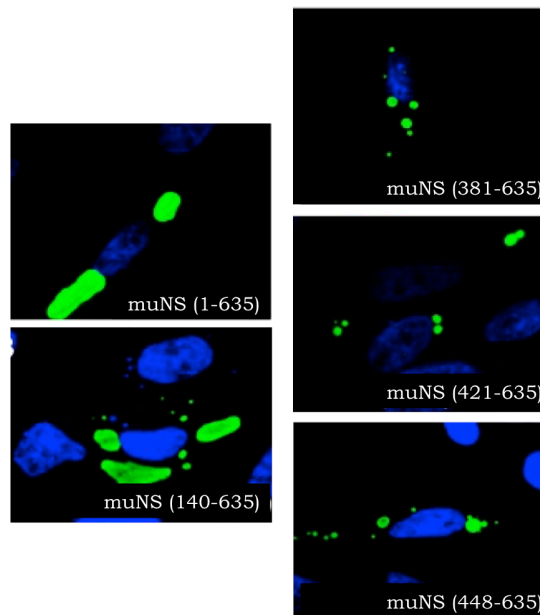
individualmente en las células y puede reclutar a otras proteínas virales a las mismas (Tourís-Otero et al., 2004a; Tourís-Otero et al., 2004b). Las inclusiones formadas por muNS tienen un aspecto globular y aparentemente son agregados ordenados ya que no están poli-ubiquitinadas por la célula ni asociadas a cajas de vimentina (Brandariz-Nuñez et al., 2010b).

Mediante análisis bioinformático, en esta proteína se predicen dos regiones con posible estructura de “coiled-coil”, localizadas entre las posiciones 451-472 y 540-599, que posiblemente estén implicadas en la formación de homo-oligómeros (Brandariz-Nuñez et al., 2010b; Tourís-Otero et al., 2004b). En las células infectadas la proteína muNS sufre un corte proteolítico catalizado por caspasas que da lugar a la formación de dos subproductos denominados como muNSN de 15 kDa, correspondiente a su extremo N-terminal y muNSC de 55 kDa y correspondiente al extremo C-terminal (Figura 5) (Busch et al., 2011; Rodríguez-Grille et al., 2014). Se desconoce la posible función de ambas versiones.



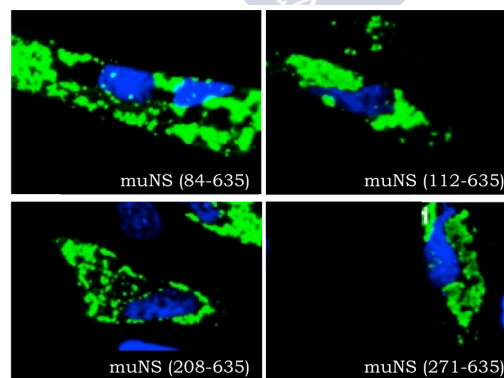
**Figura 5. Procesamiento proteolítico de la proteína (Adaptada de Benavente y Martínez-Costas, 2007).** Aparecen indicados los dos dominios coiled-coil necesarios para la formación de las inclusiones y el lugar donde se produce el procesamiento proteolítico para dar los fragmentos muNSN y muNSC.

Mediante estudios de delección se ha demostrado que la región C-terminal de muNS es totalmente indispensable para la formación de las inclusiones. En la región N-terminal, si eliminamos los primeros 140 aminoácidos la capacidad de formación no se ve afectada mientras que delecciones del aminoácido 380 al 447 provocan la formación de inclusiones más pequeñas y esféricas (Figura 6). A partir del aminoácido 448 cualquier delección provoca que las inclusiones no se formen, por lo que a esta región mínima que es capaz de formarlas (448-635) se la ha denominado muNS-Mi (Brandariz-Nuñez et al., 2010b).



**Figura 6. Inmunofluorescencia de deleciones de muNS y su capacidad para formar inclusiones (Adaptadas de Brandariz-Nuñez et al., 2010b).** Inmunofluorescencia de diferentes versiones de la proteína muNS donde observamos que la deleción de los primeros 140 aminoácidos  $\mu$ NS (140-635) no afecta a la capacidad de formación mientras que deleciones en los aminoácidos 380 a 447 provocan la formación de inclusiones pequeñas y esféricas. Observamos la proteína muNS en verde y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul).

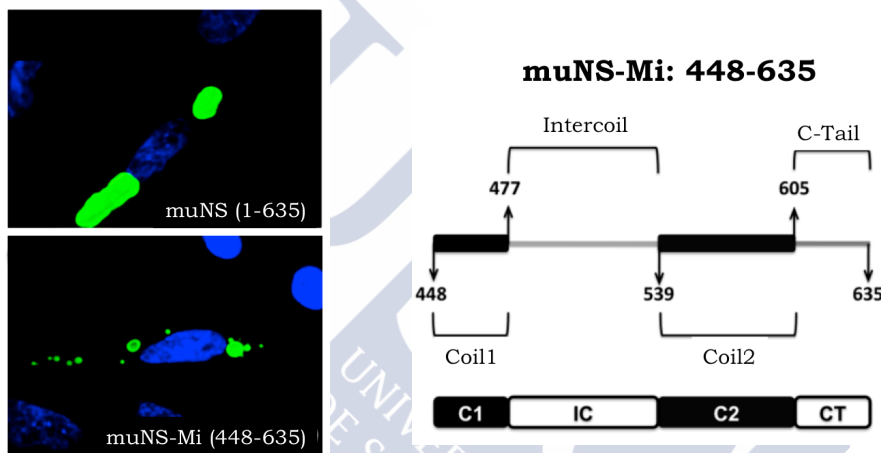
Algunos de los mutantes de deleción ( $\mu$ NS (84-635),  $\mu$ NS (112-635),  $\mu$ NS (208-635) y  $\mu$ NS (271-635)) forman agregados amorfos que son poliubiquitinados por la célula para su posterior degradación (Figura 7). Esto no ocurre con la proteína original ni con las esferas formadas por muNS-Mi, lo que apoya la idea de que ambos tipos de agregados tienen un cierto grado de orden que les hace pasar desapercibidos para la célula.



**Figura 7. Inmunofluorescencia de deleciones de muNS (Adaptadas de Brandariz-Nuñez et al., 2010b).** Deleciones de muNS que provocan la formación de agregados que posteriormente serán degradados por el proteasoma. Observamos la proteína muNS en verde y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul).

## Introducción

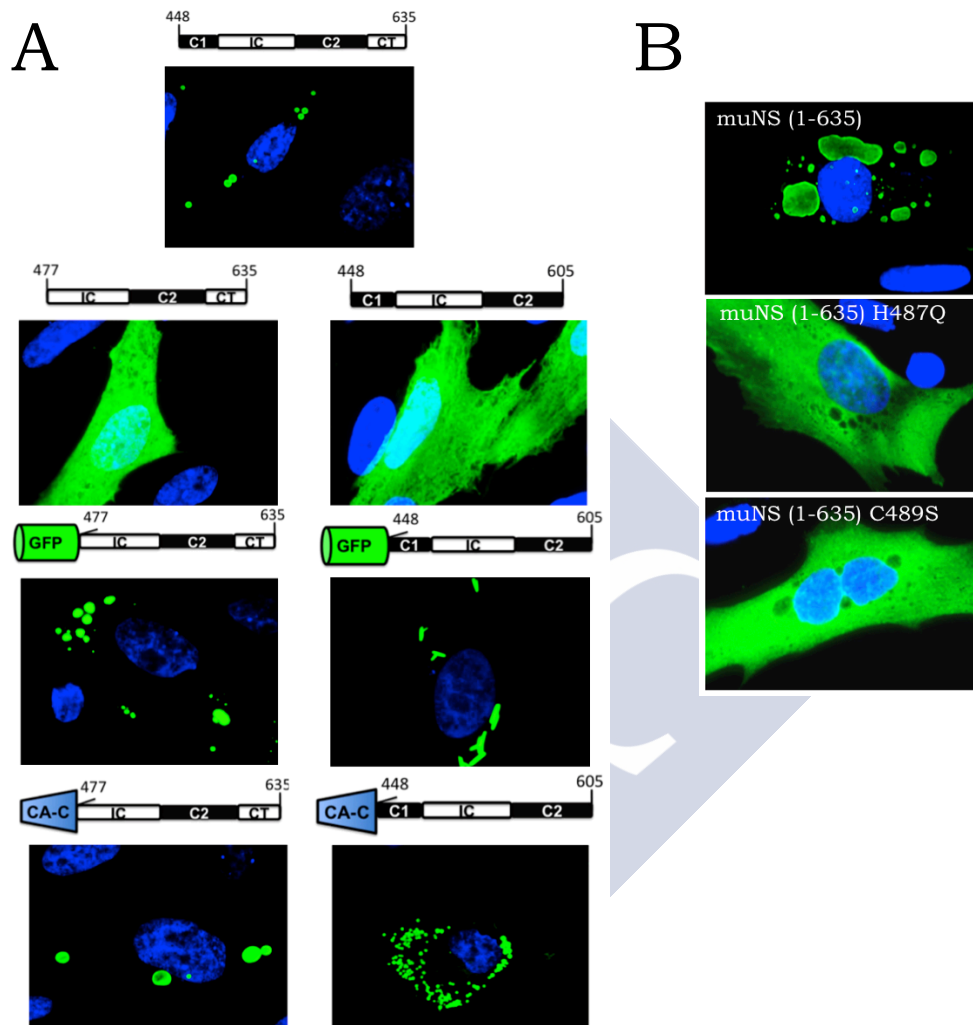
Como se ha comentado, muNS-Mi forma inclusiones mucho más pequeñas y esféricas que las formadas por la proteína completa, que miden entre 1 y 4 micras, por lo que les hemos denominado microesferas (MS) y así nos referiremos a ellas de aquí en adelante (Figura 8). Esta región de muNS puede dividirse en cuatro dominios (Figura 8), basándonos en la presencia de las dos regiones “coiled coil”, a las que denominamos Coil1 (residuos 448-477 o C1) y Coil 2 (residuos 539-605, C2). C1 y C2 están separados por 61 residuos, a los que denominamos dominio Intercoil (residuos 477-539, IC). Por último, a continuación de C2 tenemos la región C-terminal que comprende los residuos 605-635 y que se denomina dominio C-terminal (CT) (Brandariz-Nuñez et al., 2010b).



**Figura 8. Inmunofluorescencia de inclusiones y representación esquemática de los diferentes dominios de la proteína muNS-Mi (Adaptadas de Brandariz-Nuñez et al., 2010b).** En las imágenes de la izquierda podemos observar la diferencia en el tamaño y forma de las inclusiones formadas por la proteína completa muNS en contraposición a las formadas por muNS-Mi. Observamos la proteína muNS/muNS-Mi en verde y los núcleos en azul. La imagen de la derecha muestra un esquema en donde se señalan los cuatro dominios de muNS-Mi y los residuos que comprenden.

En nuestro laboratorio se han realizado estudios para comprobar el papel que juega cada uno de estos dominios en la formación de inclusiones por parte de muNS-Mi. Se ha observado que C1 puede ser reemplazado por un dominio de dimerización como GFP o CA-C (extremo C-terminal del dominio de dimerización de la proteína de la cápside del virus HIV), lo que indica que este dominio contribuye a la generación de los oligómeros y consecuentemente la formación de las microesferas mediante auto-asociación (Figura 9 A). El dominio CT también puede ser substituido por un dominio de dimerización. Sin embargo el fenotipo de las inclusiones generadas va a depender de si el dominio substituto es GFP (inclusiones tubulares) o CA-C

(inclusiones esféricas) lo que indica que CT está involucrado en la orientación de los contactos entre los monómeros (Figura 9 A). Por otra parte, mutagénesis puntual en los residuos His487 y Cys489 que están altamente conservados en el dominio IC provocan que tanto muNS como muNS-Mi pierdan la capacidad de formar microesferas o inclusiones y pasen a distribuirse uniformemente en el citoplasma (Figura 9 B).

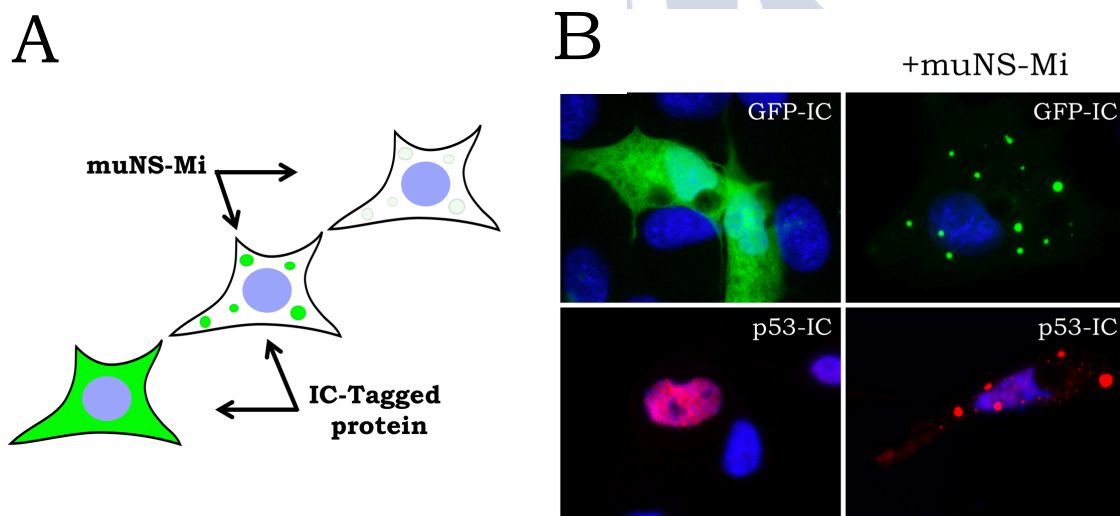


**Figura 9. Influencia de los diferentes dominios de la proteína muNS-Mi sobre la formación de inclusiones. A. Dominios C1 y CT (Adaptadas de Brandariz-Nuñez et al., 2010b).** Monocapas de células CEF se transfectaron con plásmidos que expresan las proteínas indicadas en la parte superior de cada imagen. Las células fueron sometidas a inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo policlonal contra muNS (verde) o se visualizaron directamente gracias a la presencia de GFP. Los núcleos se tiñeron con DAPI. **B. Dominio IC.** Monocapas de células CEF se transfectaron con plásmidos que expresan las proteínas muNS wild type (muNS 1-635) o con las versiones de esta a las que se le ha introducido la mutación puntual indicada en la foto. Las células se sometieron a inmunofluorescencia usando un anticuerpo policlonal contra muNS (verde) y los núcleos está teñidos con DAPI (azul).

## Introducción

### 3.2 El sistema IC-Tagging

Durante el curso de la investigación destinada a determinar qué tipo de interacciones se producían entre los monómeros de muNS, se encontró que el dominio IC tiene una enorme afinidad tanto por las inclusiones de muNS como por las MS formadas por muNS-Mi, lo que condujo al desarrollo de un sistema de etiquetado molecular que tiene múltiples aplicaciones biotecnológicas (Brandariz-Nuñez et al., 2010b). El método tiene dos componentes, por un lado está la proteína muNS-Mi que forma MS cuando se expresa en una célula. Por otra parte, usamos como etiqueta molecular el dominio IC, que fusionamos a una proteína de interés, bien sea en su extremo N o C-terminal. La presencia del IC no cambia las características ni localización de la proteína, pero cuando se expresan simultáneamente en la misma célula una proteína etiquetada con IC y muNS-Mi, la presencia del tag provoca la relocalización de la proteína etiquetada a las MS (esquema en la Figura 10).

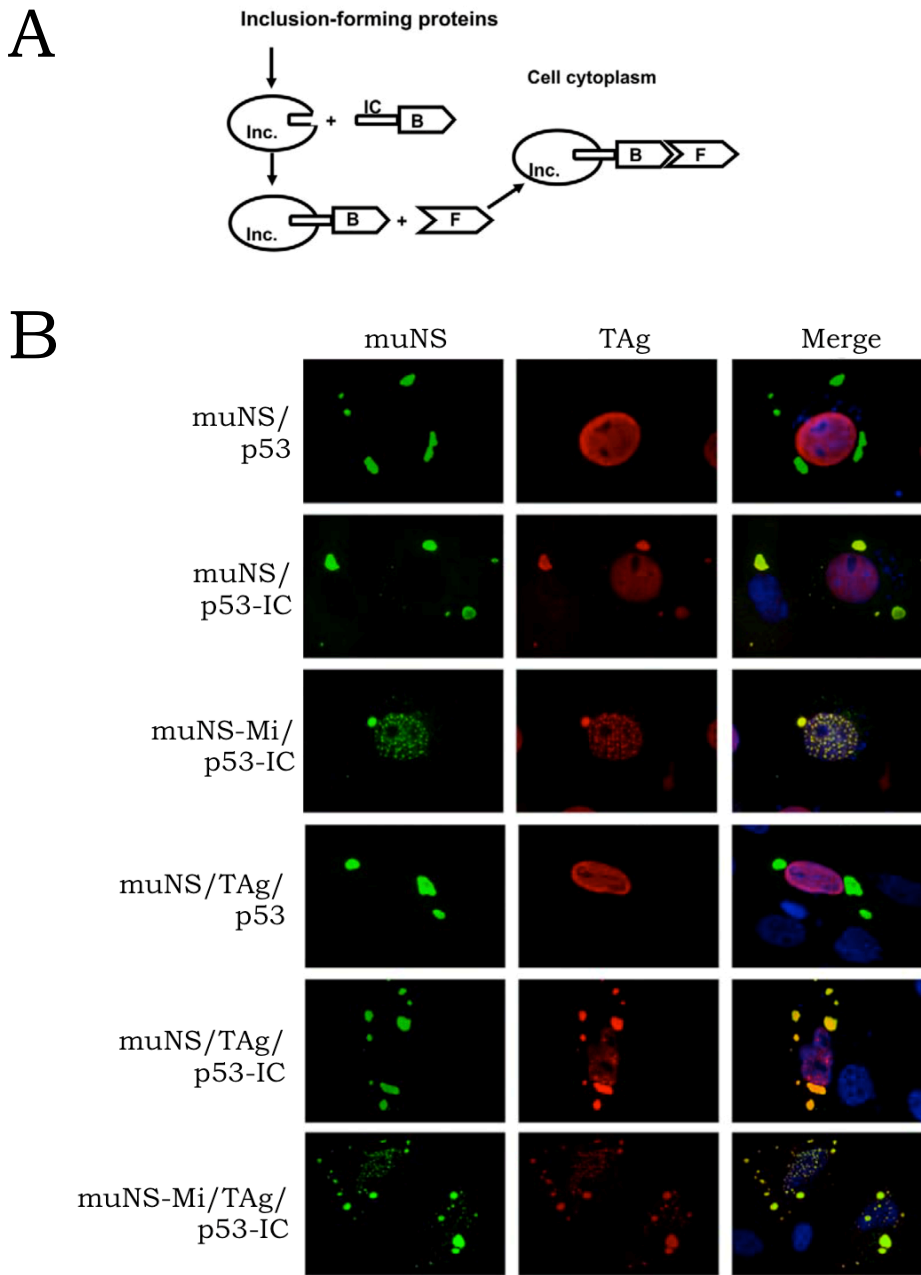


**Figura 10. A. Representación esquemática del sistema.** Si expresamos muNS-Mi en las células se forman MS en su citoplasma mientras que si expresamos una proteína X etiquetada con el IC su distribución no se ve afectada. En la coexpresión de ambas la proteína etiquetada es reclutada por las MS. **B. Inmunofluorescencia donde se muestra el funcionamiento del sistema.** Monocapas de DF-1 se transfectaron con plásmidos que expresan las proteínas GFP-IC y p53-IC en presencia o ausencia del plásmido que expresa muNS-Mi. En el caso de GFP observamos las proteínas por autofluorescencia de GFP (verde). Las células se sometieron a inmunofluorescencia indirecta en el caso de las transfecciones con p53 usando un anticuerpo policlonal contra muNS (rojo) de forma que detectamos ambas proteínas. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Observamos que ambas proteínas etiquetadas con el IC modifican su localización en presencia de las MS.

Una de las aplicaciones de esta metodología de etiquetado molecular es la validación de interacciones de proteínas en el interior de células vivas. Como hemos comentado, el tag IC provoca la reclusión de la proteína etiquetada en las MS. Si otra proteína no etiquetada interaccionase dentro la célula con la primera, podría verse recluida en las MS guiada por dicha interacción (Figura 11 A). De lo contrario, retendría su localización habitual. Estudios realizados en nuestro laboratorio han utilizado las proteínas p53 y el antígeno T del virus SV40 como ejemplos para demostrar esta idea. Así, al etiquetar solamente p53 con el IC provocamos el cambio de distribución de esta proteína, pasando del núcleo a las MS. Utilizando técnicas de inmunofluorescencia comprobamos que el antígeno T, cuya fuerte interacción con p53 está ampliamente descrita, a pesar de no tener IC, también se redistribuye del núcleo a las MS en presencia de muNS (Figura 11 B).



## Introducción

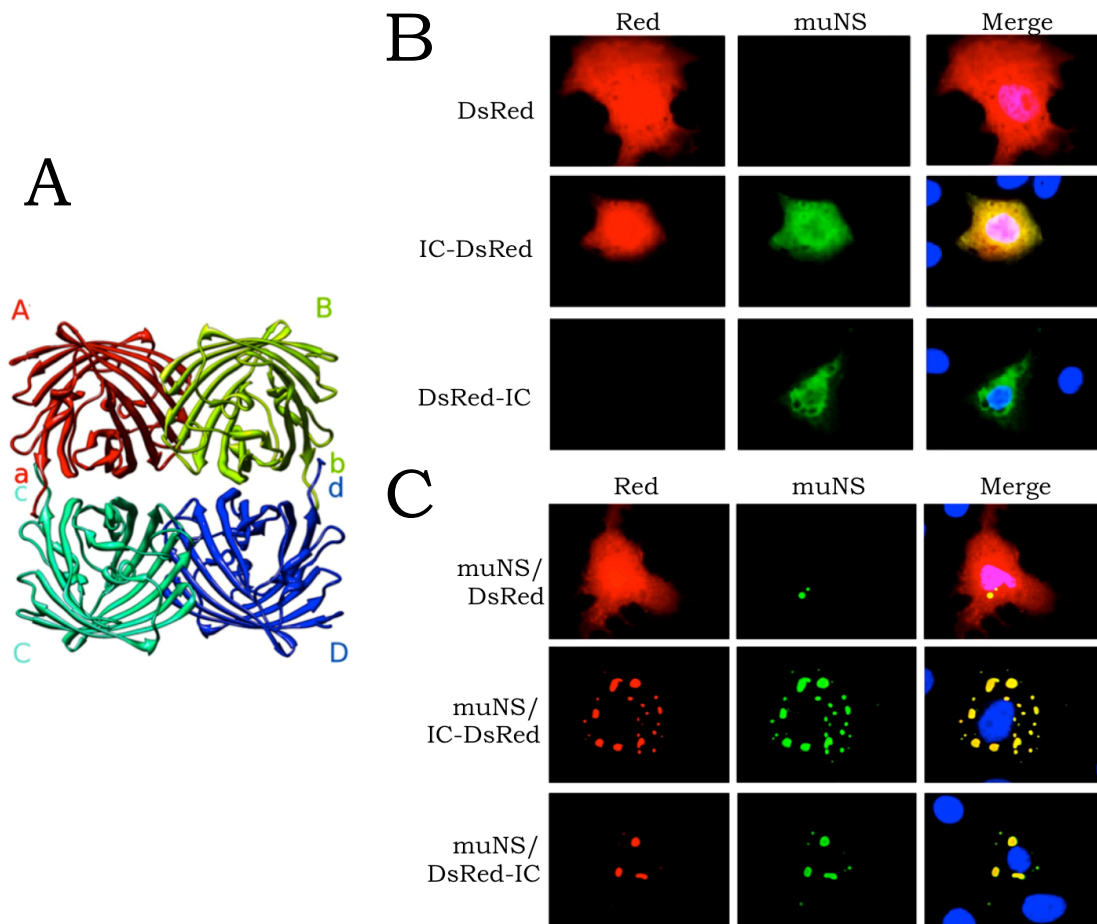


**Figura 11. A. Estrategia para la validación de interacciones entre proteínas mediante IC-Tagging (Adaptadas de Brandariz-Nuñez et al., 2010c).** La proteína muNS o muNS-Mi forman MS o inclusiones (Inc.) en el citoplasma celular que incorporan a su estructura a la proteína B (Bait) etiquetada con el dominio *Intercoil* (IC). La proteína B, secuestrada en las inclusiones, sirve como cebo para reclutar a su ligando F (Fish). **B. Validación de la interacción entre p53 y antígeno T del SV40 en células vivas.** Se transfectaron células Cos-7 semiconfluentes con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de las figuras. En la imagen de la izquierda se muestra el reclutamiento de en antígeno T endógeno de la célula mientras que en la imagen de la derecha se muestra el antígeno T expresado mediante un plásmido. Las células se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra el antígeno T (rojo) y un anticuerpo policlonal contra muNS o muNS-Mi (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul).

Se ha demostrado que añadiendo secuencias de localización nuclear a versiones de muNS, se puede inducir la formación de MS en el núcleo de células vivas. Además, estas inclusiones nucleares también son capaces de reclutar proteínas con el tag IC y sirven para validar interacciones proteína-proteína en el núcleo, como hemos demostrado con el mismo par de proteínas: p53 y antígeno T (Figura 11 B, Brandariz-Nuñez et al., 2010c).

En nuestro laboratorio se ha comprobado que las proteínas etiquetadas con el IC y recluidas en las MS, son capaces de interactuar entre si dentro de estas estructuras. Para ello se ha estudiado como ejemplo la proteína DsRed, una proteína tetramérica que necesita de cuatro monómeros para emitir fluorescencia (Figura 12 A). Los monómeros deben interactuar a través del extremo C-terminal para evolucionar su cromóforo y emitir fluorescencia (Yarbrough et al., 2001). Al etiquetar DsRed en su extremo C-terminal no emite fluorescencia, mientras que etiquetándola en el extremo N-terminal se comporta correctamente (Figura 12 B). Sin embargo, si la proteína etiquetada en el extremo C-terminal, se coexpresa con muNS, se incorpora a las MS liberando los extremos C-terminal y recuperando la fluorescencia, demostrando que dentro de las MS las proteínas pueden interactuar entre sí y llevar a cabo reacciones complejas (Brandariz-Nuñez et al., 2011).

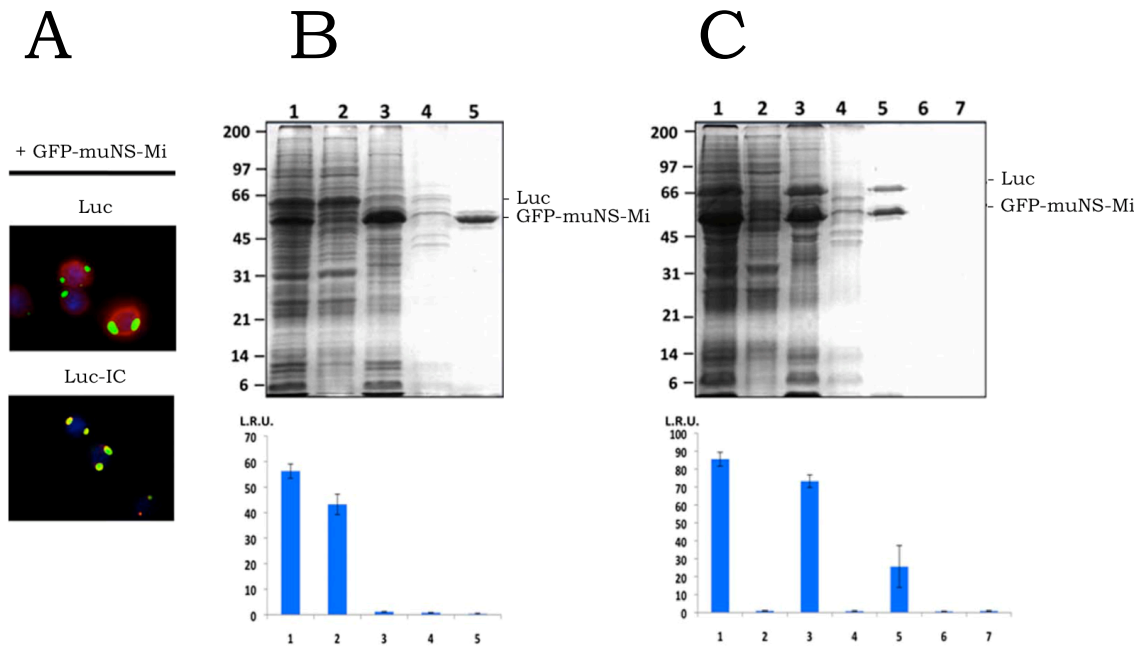
## Introducción



**Figura 12. (Adaptadas de Brandariz-Nuñez et al., 2011).** **A. Representación del tetrámero DsRed.** Los monómeros están representados con letras mayúsculas (A,B,C y D) y los extremos C-terminal que interaccionan entre si están representados con letras minúsculas (a, b, c y d). **B. Distribución de la proteína DsRed en el interior celular en ausencia de microesferas.** Monocapa semiconfluentes de células VERO se transfectaron con plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se sometieron a inmunofluorescencia usando un anticuerpo policlonal contra muNS (verde) y tiñendo los núcleos con DAPI (azul). La proteína DsRed se visualiza sin anticuerpos (rojo). **C. Expresión de la proteína DsRed en presencia de MS.** Monocapas semiconfluentes de células VERO se transfectaron con plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de las imágenes. Las células se sometieron a inmunofluorescencia usando un anticuerpo policlonal contra muNS (verde) y se tiñeron los núcleos con DAPI (azul). La proteína DsRed se visualiza sin anticuerpos (rojo).

Otra de las aplicaciones posibles para este sistema es su uso como método de purificación de proteínas. Gracias a la capacidad de expresión del sistema de baculovirus en células de insecto, somos capaces de obtener una elevada densidad de MS que podemos purificar mediante métodos mecánicos simples. De esta forma, si coexpresamos una proteína de interés etiquetada con IC podemos obtener gran

cantidad de MS cargadas con la proteína etiquetada. Se ha comprobado que este sistema sirve para purificar proteínas con actividad enzimática, como la luciferasa, sin que esta desaparezca por la presencia de la etiqueta IC o por estar asociadas a las MS (Figura 13) (Brandariz-Nuñez et al., 2010a).



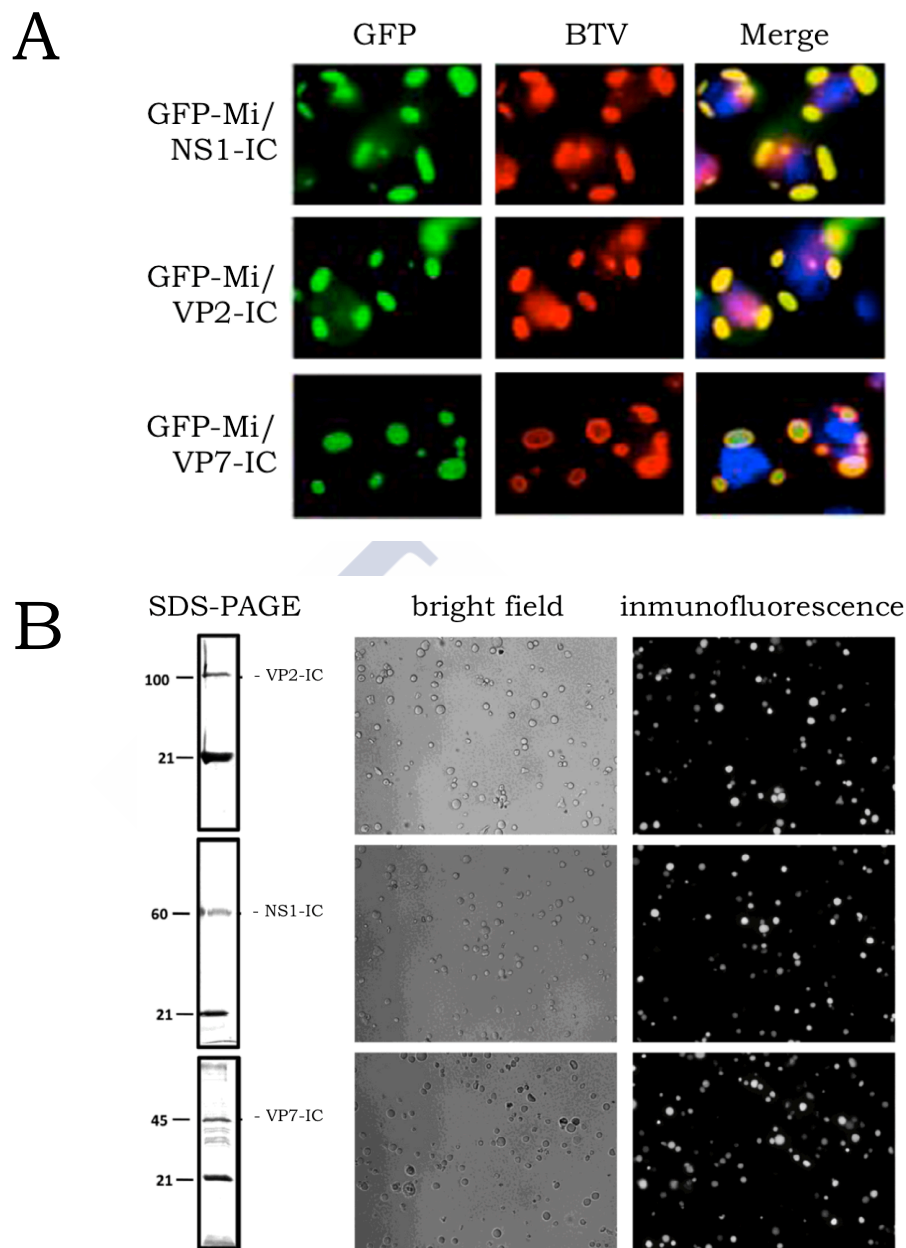
**Figura 13. Ensayos con Luciferasa (Adaptadas de Brandariz-Nuñez et al., 2010a).** **A. Distribución de la Luciferasa (Luc) y Luciferasa etiquetada con el IC (Luc-IC) en presencia de GFP-muNS-Mi en células Sf9.** Coinfectamos células Sf9 con baculovirus recombinantes que expresan las proteínas indicadas en la parte superior de las imágenes. Tras 72 h.p.i. las células fueron sometidas a inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo policlonal contra Luciferasa (rojo), visualizándose las microesferas en verde al estar fusionadas con GFP. Los núcleos fueron teñidos en azul con DAPI. **B. Purificación de Luc-IC a través del sistema IC-Tagging.** Análisis a través del SDS-PAGE del proceso de purificación. Detalles en (Brandariz-Nuñez et al., 2010a). **C. Mantenimiento de la actividad Luciferasa-IC integradas en las microesferas.** Las barras representan los niveles de actividad de luciferasa de las muestras presentadas en los geles de la figura B. Las Unidades Relativas de Luz vienen indicadas a la izquierda de la gráfica.

Hemos demostrado que las MS cargadas con epitopos del virus Bluetongue (BTV) sirven, de forma muy eficaz, como vacuna subunitaria contra BTV en ratones IFNAR (-/-), demostrando una capacidad adjuvante intrínseca, y abriendo la posibilidad de usar el sistema IC-Tagging como un método general de producir vacunas efectivas y seguras (Marín-López et al., 2014).

## **Introducción**

Este método tiene múltiples ventajas que otros, como las vacunas basadas en VLP (virus-like particles) o nanopartículas sintetizadas químicamente, no tienen. Con nuestro método somos capaces de producir material particulado, característica ideal para la inducción de respuesta inmune humoral y celular. Además, son partículas muy estables que se obtienen a través de un protocolo muy simple, barato y rápido de expresión y purificación. Con esta metodología no es necesario la purificación de los epítopos para el posterior acoplamiento a la partícula ya que este es llevado a cabo por la célula. Por último, al contrario que con las VLPs, podemos cargar en las partículas proteínas no estructurales, que se cree que participan en el desarrollo de respuesta inmune para algunos virus como BTV (Marín-López et al., 2014) o African Horsesickness Virus (AHSV).

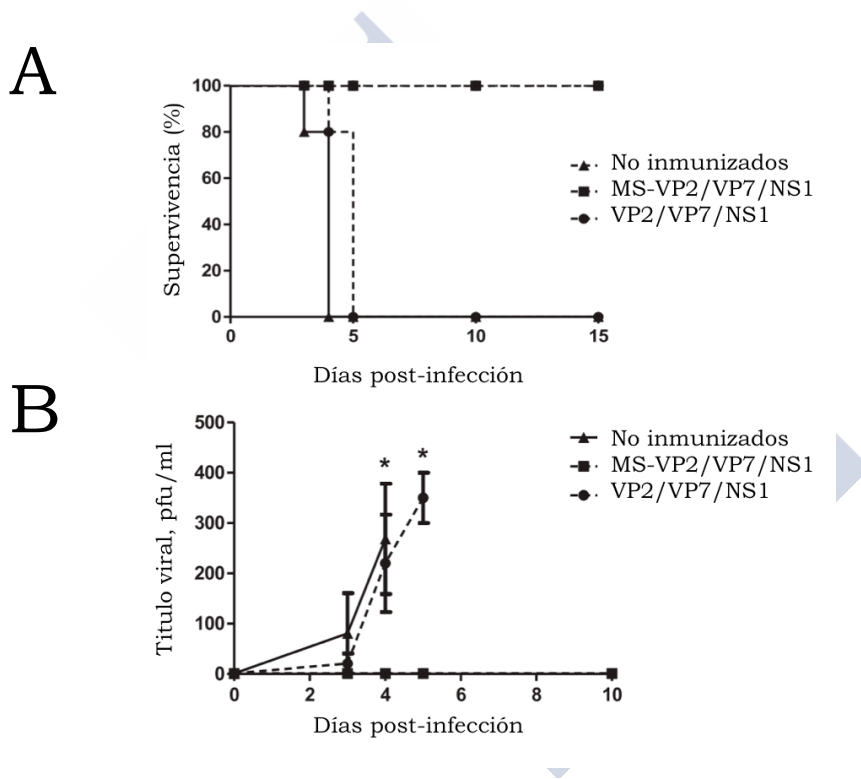
El virus BTV es un virus *Orbivirus* que infecta a rumiantes tanto salvajes como domésticos, provocando en este último caso pérdidas a nivel económico en explotaciones de este tipo de animales. Existen vacunas inactivadas para este virus que debido a los adyuvantes que utilizan, provocan efectos secundarios no deseados, por lo que se está cuestionando su uso (Tomljenovic y A. Shaw, 2011). Distintos estudios han demostrado que el material particulado tiene una actividad adyuvante intrínseca y que induce la respuesta inmune sin necesidad de adyuvantes externos (Allsopp et al., 1996; Plebanski et al., 1998). Ya que nuestro método nos permite producir de manera simple gran cantidad de partículas cargadas con cualquier proteína de interés, decidimos probar si las MS funcionan como vehículos en el desarrollo de vacunas subunitarias. Para ello contactamos con el grupo del Dr. Ortego (CISA-INIA, Valdeolmos, Madrid), que han desarrollado un método para probar vacunas contra BTV utilizando ratones deficientes en el receptor del interferón (IFNAR-/-), en vez de ovejas, lo que resulta más rápido y sencillo. Guiándonos por resultados previos del laboratorio del Dr. Ortego (Calvo-Pinilla et al., 2012; Ortego et al., 2014), decidimos cargar las MS con las proteínas estructurales VP2 y VP7 y la proteína no estructural NS1 del virus de BTV. Para ello se etiquetaron las tres proteínas con IC para dirigir su localización a las MS (Figura 14 A). Posteriormente se purificaron MS cargadas con los tres epítopos del serotipo 4 del virus del BTV (BTV-4) (Marín-López et al., 2014) (Figura 14 B).



**Figura 14. Adaptada de Marín-López et al., 2014. A. Inmunofluorescencia de la coexpresión de GFP-muNS-Mi (GFP-Mi) y las proteínas del BTV-4.** Se coinfectaron células Sf-9 con baculovirus recombinantes que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la imagen. Las células se sometieron a inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo policlonal contra BTV-4 (rojo), las microesferas se detectaron por autofluorescencia de la proteína GFP (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI. **B. Análisis de las MS purificadas.** Las purificaciones se comprobaron por electroforesis tiñendo el gel con azul de Coomassie. Las proteínas BTV-4 copurificadas con muNS-Mi se marcan al lado del gel. Las MS se analizaron por microscopia de campo visible e inmunofluorescencia.

## Introducción

Con las MS purificadas se inmunizaron ratones IFNAR (-/-) junto con dos grupos control: ratones inyectados con MS sin epítomos (grupo no inmunizados) y otros ratones inyectados con los epítomos solubles. Una vez inmunizados, se permitió el desarrollo de una respuesta inmune tras lo que los ratones se inocularon con una dosis letal del virus BTV-4 y se observaron durante 15 días. Se encontró que el grupo inmunizado con MS cargadas de epítomos presentaban un 100% de supervivencia mientras que los otros dos grupos murieron en 4-5 días (Figura 15 A). El análisis de la viremia reveló que los ratones que no sobrevivían estaban cargados de virus, mientras que en el grupo superviviente el virus era indetectable (Figura 15 B) (Marín-López et al., 2014).



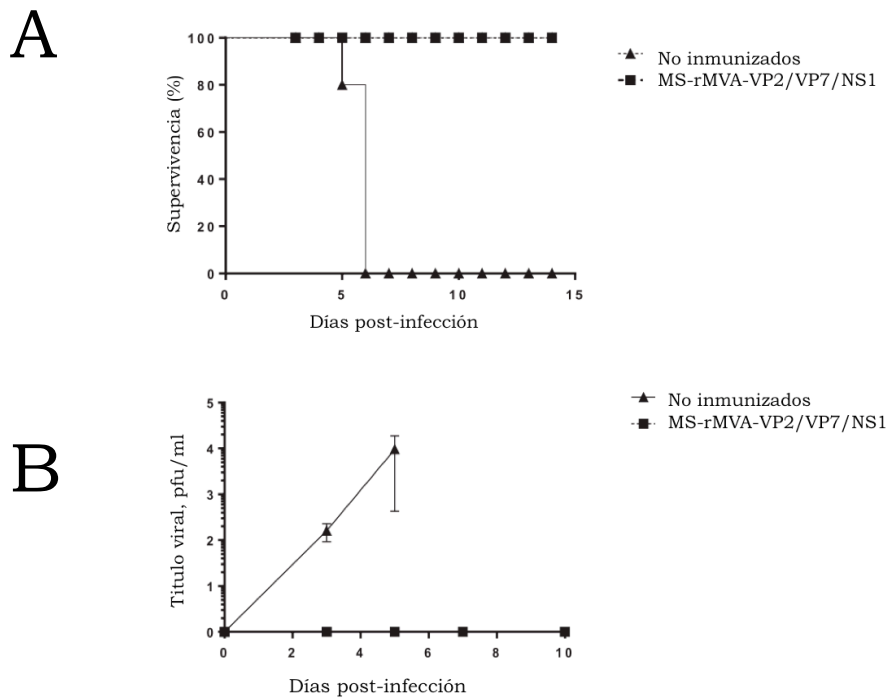
**Figura 15. Protección de los ratones IFNAR (-/-) vacunados con MS-VP2/MS-VP7/MS-NS1 contra dosis letales de BTV-4 (Adaptada de Marín-López et al., 2014).** Ratones inmunizados con proteínas recombinantes solubles (VP2/VP7/NS1) o con las proteínas cargadas en las microesferas (MS-VP2/MS-VP7/MS-NS1). Dos semanas después de la inmunización se inyecta una dosis letal del virus BTV-4. **A. Ratios de supervivencia de los ratones inmunizados y no inmunizados después de la dosis de BTV-4.** **B. Título del virus BTV-4 en sangre de los ratones inmunizados y no inmunizados.**

Además, otro grupo de ratones inmunizados presentaban una protección parcial frente a otro serotipo de BTV diferente (BTV1), resultado que achacamos a la presencia de NS1 en la composición de la vacuna (Marín-López et al.,

2014). NS1 es una proteína no estructural que está absolutamente conservada entre serotipos, mientras que la determinante de serotipo es VP2, que es la que el virus utiliza para contactar con el receptor celular. Hay 29 serotipos diferentes de BTV, lo que implica la existencia de 29 VP2 diferentes. Esto quiere decir que, para obtener una protección total contra BTV con las vacunas que se están utilizando en la actualidad, deberían producirse 29 vacunas diferentes. En un estudio posterior probamos una nueva estrategia de vacunación basada en una inmunización con MS cargadas de epítopos de BTV-4 combinándolas con el vector viral MVA que expresa los mismos antígenos (mostrado como MS-rMVA-VP2/VP7/NS1). Los resultados obtenidos mostraron que el grupo de ratones inmunizado de esta forma presentaban un 100 % de supervivencia al ser infectados con una dosis letal del virus BTV-1 (Figura 16 A). Además analizando la viremia se encontró que los ratones que no sobrevivían presentaban virus en sangre mientras que en los supervivientes no se encontró nada de virus (Figura 16 B) (Marín-López et al., 2017). Estos resultados resultan muy estimulantes en cuanto al desarrollo de una vacuna multi-serotipo contra BTV, aunque deberían repetirse en el huésped real del virus, la oveja.



## Introducción



**Figura 16. Protección de ratones IFNAR (-/-) vacunados con MS-rMVA-VP2/VP7/NS1 contra el serotipo 1 del virus BTV (BTV-1) (Adaptada de Marín-López et al., 2017).** Los ratones fueron inmunizados dos veces con MS-rMVA-VP2/VP7/NS1 mientras que el control solo con MS-rMVA. Dos semanas después de la segunda inmunización se infectaron los ratones con una dosis letal de BTV-1. **A. Ratios de supervivencia de los ratones inmunizados y no inmunizados después de la dosis de BTV-1.** Se encontraron diferencias significativas en la supervivencia. **B. Titulo del virus BTV-4 en sangre de los ratones inmunizados y no inmunizados.** Los asteriscos indican las diferencias significativas.



## **OBJETIVOS**



En el presente trabajo se pretende utilizar el sistema IC-Tagging como plataforma biotecnológica para diferentes aplicaciones. Para esto se plantearon los siguientes objetivos:

1. Desarrollo de un sensor de retrotranslocación de proteínas en el retículo endoplasmático basado en IC-Tagging.
2. Adaptar el sistema IC-Tagging al interior del retículo endoplásmico.
3. Adaptar el sistema IC-Tagging a un sistema de expresión bacteriano para la expresión y purificación de proteínas difíciles.
4. Determinar la estructura de muNS-Mi y cómo se disponen las proteínas etiquetadas en las mismas.







## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1. MATERIAL BIOLÓGICO**

### **1.1 Células eucariotas**

- **DF-1:** línea celular obtenida por transformación espontánea de fibroblastos embrionarios de pollo (*Gallus gallus*).
- **Sf9:** línea celular estable procedente del ovario de la oruga de la acelga (*Spodoptera frugiperda*).
- **Vero:** línea celular originada a partir de células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Chlorocebus aethiops*).

### **1.2 Células procariotas**

- **XL1-Blue (Stratagene):** cepa de *Escherichia coli* empleada para el crecimiento y purificación de plásmidos. Genotipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F<sup>+</sup> *proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)*].
- **BL21 (DE3) Codon Plus-RP (Stratagene):** cepa de *Escherichia coli* empleada para la expresión de proteínas en bacterias a través de la polimerasa T7. Genotipo: B F<sup>-</sup> *ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal λ (DE3) endA Hte* [*argU proLL Cam<sup>r</sup>*].
- **DH10Bac (Invitrogen):** cepa bacteriana de *Escherichia coli* usada para crecer genomas de baculovirus recombinantes. Genotipo: F<sup>-</sup> *mcrA D (mrrhsdRMS-mcrBC) φ80dlacZDM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, 27leu)7697 galU galK λ-rpsL nupG/bMON14272 /pMON7124*.

### **1.3 Baculovirus**

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

## ***Materiales y métodos***

- **Bac-muNS-Mi** es un baculovirus recombinante que expresa la región que comprende los aminoácidos 448 a 635 de la proteína muNS del reovirus aviar S1133.

### **1.4 Plásmidos parentales**

- **pCDNA3.1/Zeo (Invitrogen, Barcelona, España):** vector de expresión eucariota que permite la expresión transitoria de genes clonados bajo el promotor temprano de citomegalovirus.
- **pFastBac I (Invitrogen, Barcelona, España):** vector de expresión del sistema Bac-to-Bac utilizado para generar baculovirus recombinantes.

### **1.5 Anticuerpos**

#### **1.5.1 Anticuerpos primarios**

- En nuestro laboratorio se habían generado anticuerpos policlonales contra la proteína muNS (Tourís-Otero et al., 2004b), mediante la inmunización de conejos con la proteína muNS desnaturalizada y extraída de un gel de SDS-PAGE. Se usaron en Western-blot a diluciones entre 1:5000 y 1: 10000 y en inmunofluorescencia a diluciones entre 1:1000 y 1:5000.
- Anticuerpo monoclonal contra p53 (clon PAB40) (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se usó 1:200 en inmunofluorescencia.
- Anticuerpo monoclonal contra epitopo SV5 (clon 2F11F7) (Thermo Fisher). Se usó a 1:1000 en inmunofluorescencia y 1:5000 en Western-blot.

#### **1.5.2 Anticuerpos secundarios**

- Anticuerpos de cabra contra IgG de conejo y de ratón conjugados con peroxidasa para la detección por Western-blot (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Usados a una dilución 1:10000

- Anticuerpos de cabra contra IgG de conejo y de ratón o anticuerpos de conejo contra IgG de cabra conjugados con diversos fluorocromos: Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Barcelona, España), para la detección por microscopía de fluorescencia. Todos ellos se utilizaron en diluciones que variaron entre 1:1000 y 1:20000.

## **2. MATERIAL NO BIOLÓGICO**

### **2.1 Medios de cultivo**

Para el mantenimiento de la línea celular DF-1 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 µg/ml de estreptomycin (Sigma).

Para las transfecciones se utilizó medio DMEM stock (Gibco)

Para el mantenimiento de la línea celular Sf9 se utilizó el medio SF-900II SFM (Gibco), conteniendo 5% de suero bovino fetal (Gibco), suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin

El crecimiento de *E. coli* se realizó en medio de Luria-Bertani (LB). Para el crecimiento de bacterias transformadas con plásmidos, el medio se suplementó con los antibióticos ampicilina (100 µg/ml) (Sigma, Madrid, España), gentamicina (7 µg/ml) (Sigma, Madrid, España), tetraciclina (10 µg/ml) (Sigma, Madrid, España) o kanamicina (50 µg/ml) (Sigma, Madrid, España), según el método de selección para cada plásmido. Los cultivos de colonias en medio sólido se realizaron en el mismo medio conteniendo 1,5% bacto-agar (Sigma, Madrid, España) y antibióticos a las concentraciones indicadas anteriormente. La composición de estos medios se describe de forma detallada en el manual de protocolos de Sambrook (Sambrook et al., 1989).

## ***Materiales y métodos***

### **2.2 Disoluciones y tampones**

- DAPI: preparado a 100  $\mu\text{g/ml}$  en agua estéril y esterilizado a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .
- Medio de montaje: 6 g de glicerol; 2,4 g de Mowiol; 6 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y 12 ml de 0,2 M Tris-HCl pH 8,5.
- Mowiol (Calbiochem, Madrid, España): empleado para preparar el medio de montaje.
- PBS-T-Leche: PBS-T con 4 % de leche en polvo desnatada
- PBS-T: PBS con 0,05 % de Tween-20.
- PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
- Solución de transformación (TSS): 10% PEG 4000; 5% DMSO; 25 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 10 % de glicerol en LB.
- Tampón de electroforesis para DNA (TAE): 40 mM Tris; 1,1%, ácido acético y 1 mM EDTA, pH 8,3.
- 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 lisis para glucosidasa: 50mM de TrisHCl (pH 8,0), 150mM de NaCl, 0,5% de SDS, inhibidor de proteasa.
- Tampón de muestra de Laemmli (sin  $\beta$ -mercaptoetanol): 60mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% glicerol e 0,024% azul de bromofenol.
- Tampón de muestra para DNA 6x: 15 % Ficoll; 0,25% de azul de bromofenol y 0,25% de xilencianol.
- Tampón de transferencia: 25 mM Tris-HCl pH 8,3; 192 mM glicina y 20% metanol.
- Tampón Laemmli (1x): 10% glicerol; 60 mM Tris-HCl pH 6,8; 5%  $\beta$ -mercaptoetanol; 0,05% azul de bromofenol y 2% SDS.
- Tampón de lisis de bacterias: 20mM Tris pH 7,5; 200mM NaCl; 1mM DTT; 2mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,25% Tween 20; 1mg/ml lisozima y 10mM inhibidor de proteasas.
- Tampón TRB +: 10mM Hepes pH 7,9; 10 mM KCl y 5mM  $\text{MgCl}_2$
- Tampón TRB - : 10mM Hepes pH 7,9 y 10 mM KCl.

### **3. MÉTODOS**

#### **3.1 Manipulación de células bacterianas.**

##### 3.1.1 Crecimiento y mantenimiento de bacterias.

Las bacterias se crecieron con agitación a 37°C en medio LB con el antibiótico correspondiente según el método de selección para cada plásmido. Los antibióticos (Sigma-Aldrich, Madrid, España) se usaron en las siguientes diluciones: ampicilina (100 µg/ml), gentamicina (7 µg/ml), tetraciclina (10 µg/ml) o kanamicina (50 µg/ml). Las bacterias se conservaron a -80°C en el mismo medio suplementado con 20% de glicerol.

##### 3.1.2 Obtención de bacterias competentes y transformación

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

Para su transformación, las bacterias competentes se descongelaron en hielo y se mezcló una alícuota de 100 µl con el DNA transformante (1-10 ng). Después de incubarlo en hielo durante 30 min, se realizó un choque térmico a 42°C durante 1 min. Tras mantenerlas de nuevo en hielo durante 2 min, se añadió 1 ml de LB y se incubaron a 37°C durante 1 h con agitación. Por último se recogieron por centrifugación y se esparcieron en una placa de LB-agar suplementada con el antibiótico correspondiente.

##### 3.1.3 Fijación de bacterias para microscopía electrónica de transmisión

Las bacterias inducidas que expresan la proteína fueron centrifugadas a 2700 g, 5' a 4°C. Se lavaron 3 veces en PBS 1X e incubamos con solución de fijación (2%

## ***Materiales y métodos***

glutaraldehído en PBS) durante 20 min a temperatura ambiente. Las bacterias fueron post fijadas en 1% de O<sub>4</sub>O<sub>s</sub> durante 1 hora e incluidas en 2% de agarosa para formar un pellet compacto. Los pellets fueron deshidratados con concentraciones creciente de etanol e incluidas en EPON. Se hicieron secciones ultrafinas con un ultramicrotomo UCT Ultracut Leica. Las rejillas se tiñeron con 2% de Acetato de Uranilo y Citrato de plomo Reynold y observados en TEM JEOL JEM1001.

### **3.2 Manipulación de ácidos nucleicos.**

#### **3.2.1 Purificación de DNA plasmídico.**

La purificación de DNA a pequeña escala, para el análisis de transformantes, se realizó usando el sistema NucleoSpin® Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel) a partir de 3 ml de cultivo bacteriano. Para la obtención de DNA a mayor escala se aisló el plásmido a partir de 50 ml de cultivo bacteriano usando el sistema PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega, Madrid, España), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

#### **3.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa**

Las reacciones estándar se llevaron a cabo manteniendo constantes las concentraciones de los reactivos y los ciclos de amplificación, a excepción de la temperatura de hibridación y el tiempo de extensión, que variaba en función de los oligonucleótidos empleados y del tamaño del DNA utilizado como molde para iniciar la reacción. Generalmente se utilizó como programa de amplificación: 1 ciclo (2 min. a 94°C), 30 ciclos (30 seg a 94°C, 30 seg entre 55-65°C y 30 seg - 4 min a 72°C) y un ciclo final de 10 min a 72°C. En todos los casos la reacción de amplificación contenía 5 unidades de pfu DNA polimerasa (Thermo scientific) y 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,5 μM de cada cebador y 1 ng de plásmido.

#### **3.2.3 Aislamiento y purificación de fragmentos de DNA**

Los fragmentos de DNA procedentes de reacciones de PCR o de digestiones con enzimas de restricción se separaron mediante electroforesis en geles de 0,8-2% de agarosa en TAE 1X en presencia de 0,5 μg/ml de bromuro de etidio (Sambrook et al.,

1989). La banda de DNA se cortó del gel con una cuchilla, se transfirió a un microtubo y el DNA se purificó mediante el kit comercial NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del proveedor.

### 3.2.4 Corte y unión de fragmentos de DNA

Las digestiones de DNA con enzimas de restricción (Thermo Scientific) se llevaron a cabo según las instrucciones del proveedor, en los tampones suministrados y a la temperatura óptima para cada caso. Las reacciones de ligación se realizaron a temperatura ambiente con la DNA ligasa del fago T4 (Thermo Scientific) con una relación molar entre vector e inserto de 1:7.

### 3.2.5 Mutaciones puntuales del DNA

Para mutar las diferentes proteínas en la región del IC, se usaron como molde diferentes plásmidos recombinantes. La mutación consistió en un cambio de un aminoácido (Asparagina x Serina) en el cual solo era necesario el cambio de un único nucleótido (AAC x AGC). Las secuencias se mutaron usando el correspondiente plásmido recombinante y los siguientes primers: 5'-GGGCCTGCTCGCTCGTTGT**AG**CGTATCTGGTGATTCAATCTCC-3' y 5'-GGAGATTGAATCACCAGATAC**GCT**ACAACGAGCGAGCAGGCC-3' (cambio del nucleótido subrayado, codon que codifica para el aminoácido en negrita). Todas las secuencias fueron mutadas usando QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, California).

### 3.2.6 Construcciones de plásmidos recombinantes

#### 3.2.6.1 Generación de fragmentos de GFP

- pcDNA CEGFP-IC

Para esta construcción se amplificó mediante PCR el extremo C-terminal de la proteína EGFP a partir del plásmido pEGFP-N1 utilizando como cebador positivo 5'-GCGGGTACCATGAAGAACGGCATCAAGG-3' (diana KpnI subrayada y codón

## ***Materiales y métodos***

iniciador doblemente subrayado) y como cebador negativo 5'-GCGTCTAGACTTGTACAGCTCGTCC-3' (diana XbaI subrayada). El fragmento amplificado se clonó entre las dianas KpnI y XbaI de un plásmido recombinante pcDNA 3.1/Zeo (+) muNS 477-542 (Brandariz-Nuñez et al., 2010a) en el que estaba previamente clonado el IC (entre las dianas XbaI y ApaI). De esta forma obtenemos una proteína denominada a partir de ahora como CEGFP-IC con un peso molecular de 17,4 kDa.

- pcDNA IC-CEGFP

En este caso se amplificó mediante PCR el extremo C-terminal de EGFP utilizando como molde el plásmido pEGFP-N1, como cebador positivo 5'-GCGGGTACCATGAAGAACGGCATC-3' (diana KpnI subrayada y codón iniciador doblemente subrayado) y como cebador negativo 5'-GCGTCTAGATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCAAGG-3' (diana XbaI subrayada y codón stop doblemente subrayado). El fragmento amplificado se clonó entre las dianas KpnI y XbaI de un plásmido pcDNA 3.1/Zeo (+) hecho en nuestro laboratorio (datos no mostrados) en el que previamente se había clonado el IC (entre las dianas de restricción HindIII y KpnI). De esta forma obtenemos la proteína denominada a partir de ahora como IC-CEGFP, con un peso molecular de 17,5 kDa).

- pcDNA NEGFP-muNS-Mi

Para esta construcción se amplificó mediante PCR el extremo N-terminal de EGFP utilizando como molde el plásmido pEGFP-N1, como cebador positivo 5'-GCGGCTAGCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3' (diana NheI subrayada y codón iniciados doblemente subrayado) y como cebador negativo 5'-GCGGAATTCCTGCTTGTCGGCCATG-3' (diana EcoRI subrayada). El fragmento amplificado se clonó entre las dianas NheI y EcoRI del plásmido pCI-Neo donde previamente estaba clonado muNS-Mi entre las dianas EcoRI y XbaI (Brandariz-Nuñez et al., 2010b). De esta forma obtuvimos una proteína, denominada en resultados como NEGFP-muNS-Mi, con un peso molecular de 39,8 kDa.

- pcDNA muNS-Mi-NEGFP

En este caso se utilizó como molde para la amplificación el plásmido pEGFP-N1-M3 (Brandariz-Nuñez et al., 2010b), como cebador positivo 5'-GCGGAATTCATCATGCCAGCCGTACTGCTGTCTA-3' (diana EcoRI subrayada y codón iniciador doblemente subrayado) y como cebador negativo 5'-GCGTCTAGATCAATTACTGCTTGTCGGCCATG-3' (diana XbaI subrayada y codón terminador doblemente subrayado). El fragmento amplificado fue clonado en pCI-Neo entre las dianas EcoRI y XbaI. De esta forma obtenemos una proteína denominada en resultados como muNS-Mi-NEGFP, con un peso molecular de 40 kDa.

- pcDNA NEGFP-IC

Para esta construcción amplificamos el extremo N-terminal de la proteína EGFP utilizando como molde el plásmido pEGFP N1, como cebador positivo 5'-GCGGCTAGCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3' (diana NheI subrayada y codón iniciador doblemente subrayado) y cebador negativo 5'-GCGGAATTCCTGCTTGTCGGCCATG-3' (diana EcoRI subrayada). El fragmento amplificado se clonó entre las dianas NheI y EcoRI de un plásmido recombinante pcDNA 3.1 Zeo (+) muNS 477-542 (Brandariz-Nuñez et al., 2010a) en el cual estaba previamente clonado el IC (entre las dianas XbaI y ApaI). De esta forma obtenemos una proteína, denominada en resultados como NEGFP-IC, con un peso molecular de 27,7 kDa.

- pcDNA IC-NEGFP

Para este clonaje se utilizó como molde para la amplificación un plásmido pEGFP-N1-IC hecho previamente en el laboratorio donde estaba clonado el IC entre las dianas XhoI y EcoRI (Brandariz-Nuñez et al., 2010b). Como cebador positivo se utilizó 5'-GCGCCCAAGCTTATCATGGAAGATCACTTGTTGG-3' (diana HindIII subrayada y codón iniciador doblemente subrayado) y como cebador negativo 5'-GCGTCTAGATCATTAATTACTGCTTGTCGGCCATG-3' (diana XbaI subrayada y codón stop doblemente subrayado). El fragmento amplificado se clonó en un plásmido pcDNA 3.1 Zeo (+) entre las dianas HindIII y XbaI. De esta forma obtenemos una proteína denominada en resultados como IC-NEGFP, con un peso molecular de 27,9 kDa.

## **Material es y métodos**

### 3.2.6.2 Generación de versiones de proteínas para el interior del RE.

- pcDNA sec-GFP-muNS-Mi

Para este clonaje utilizamos como molde para la amplificación el plásmido pEGFP-N1-M3 (Brandariz-Nuñez et al., 2010b). Como cebador positivo utilizamos 5'-TTGGCGCGCAAATGGTGAGCAAG-3' (diana PauI subrayada) y como cebador negativo 5'-TTGGCGGCCGCAATCACAGATCATCCACC-3' (diana NotI subrayada y codon stop doblemente subrayado). El inserto amplificado se clonó en el plásmido pcDNA (D-BssH)-secil-BAP-HLA-SV5 cedido por el profesor Óscar Burrone (Trieste, Italia) de forma que eliminamos BAP-HLA-SV5 e insertamos la secuencia de GFP-muNS-Mi a continuación de la secuencia señal sec. De esta forma obtenemos el plásmido pcDNA sec-GFP-muNS-Mi que expresa la proteína que nombraremos en resultados como sec-GFP-Mi.

- pcDNA sec-muNS-Mi

Para este clonaje se utilizó como molde para la amplificación de muNS-Mi el plásmido pCIneo-muNS (448-635) (Brandariz-Nuñez et al., 2010b). Como cebador positivo se utilizó 5'-TTGGCGCGCAAATGCCAGCCGTACTGCTGTC-3' (Diana PauI subrayada) y como cebador negativo 5'-TTGGCGGCCGCAATCACAGATCATCCACC-3' (Diana NotI subrayada y codon stop doblemente subrayado). El inserto amplificado se clonó en el plásmido pcDNA (D-BssH)-secil-BAP-HLA-SV5 cedido por el profesor Óscar Burrone (Trieste, Italia) de forma que eliminamos BAP-HLA-SV5 e insertamos la secuencia de muNS-Mi a continuación de la secuencia señal sec. De esta forma obtenemos el plásmido pcDNA sec-muNS-Mi que expresará la proteína que denominaremos como sec-Mi.

- pcDNA sec-mRFP-IC\*

Para este clonaje se utilizó como molde para la amplificación de mRFP el plásmido comercial ptfLC3 (Adggene). Como cebador positivo se utilizó 5'-TTGGCGCGCAAATGGCCTTCTCCGAGGACGTCATC-3' (Diana PauI subrayada) y como cebador negativo 5'-TTGGCGGCCGCAAGGGCGCCGGTGGAGTGGCGGCC-3'

(Diana NotI subrayada). El inserto amplificado se clonó en el plásmido (D-BssH)-secil-BAP-HLA-SV5, de forma que eliminamos BAP-HLA-SV5 e insertamos la secuencia de mRFP a continuación de la secuencia señal sec. De esta forma obtenemos el plásmido pcDNA sec-mRFP. Para introducir la etiqueta IC\*, utilizamos como molde para la amplificación el plásmido pcDNA sec-muNS-Mi\*. Como cebador positivo utilizamos 5'-TTGCGGCCGCAAGAAGATCACTTGTTGGCTTATC-3' (Diana NotI subrayada) y como cebador negativo 5'-GCGTCTAGATTACGCTTCCACACGGGGTTC-3' (diana XbaI subrayada y codon stop doblemente subrayado). El inserto amplificado se clonó en el plásmido pcDNA sec-mRFP para generar un pcDNA sec-mRFP-IC\*.

- sec-VSV-G-mRFP/ sec-VSV-G-mRFP-IC\*

Para este clonaje se utilizó como molde para la amplificación un plásmido comercial denominado como pCMV-VSV-G (cedido por Bob Weinberg, Addgene plasmid # 8454). Como cebador positivo se utilizó 5'-CGGCTAGCCGATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGC-3' (diana NheI subrayada y ATG iniciador doblemente subrayado) y como cebador negativo 5'-CCCAAGCTTGGGAGAGCTCTTCCAACACTGAAC-3' (diana HindIII subrayada). El producto de PCR se clonó en el plásmido pcDNA 3.1 Zeo + generando el plásmido pcDNA sec-VSV-G. Para introducir la secuencia de mRFP a continuación de VSV-G, se utilizó para la PCR el plásmido ptfLC3 (cedido por Tamotsu Yoshimori, Addgene plasmid #21074). Como cebador positivo se utilizó 5'-CGGAATTCATGGCCTTCTCCGAGGACGTCATCAAGG-3' (Diana EcoRI subrayada) y como cebador negativo 5'-TTGCGGCCGCAAGGCGCCGGTGGAGTGGCGGCC-3' (Diana NotI subrayada -3'. El producto de PCR se clonó en el plásmido pcDNA sec-VSV-G para generar el plásmido pcDNA sec-VSV-G-mRFP. Para introducir la etiqueta IC\* se utilizó como molde para la amplificación el plásmido pcDNA sec-muNS-Mi\*. Como cebador positivo se utilizó 5'-TTGCGGCCGCAAGAAGATCACTTGTTGGCTTATC-3' (Diana NotI subrayada) y como cebador negativo 5'-GCGTCTAGATTACGCTTCCACACGGGGTTC-3' (Diana XbaI subrayada y codon stop doblemente subrayado). El producto de PCR resultante se clonó en el plásmido pcDNA sec-VSV-G-mRFP para generar el plásmido pcDNA sec-VSV-G-mRFP-IC\*.

## ***Materiales y métodos***

- pcDNA sec-VSV-G-SV5 / pcDNA sec-VSV-G-SV5-IC\*

Para esta construcción vamos a sustituir la secuencia de mRFP por la de SV5. Para ello hibridamos dos secuencias de DNA complementarias: 5'-GCCGGAATTCCGAAGGCAAACCAATCCCAAACCCACTGCTGGGCCTGGATTTGCGGC CGCAAAT-3' y 5'-ATTTGCGGCCCGCAAATCCAGGCCAGCAGTGGGTTTGGGATTGGTTTGCCTTCGGAA TTCCGGC-3' (Diana EcoRI subrayada y NotI doblemente subrayada). La hibridación la realizamos a 100°C durante 3 minutos y dejamos enfriar lentamente. Posteriormente se clona este fragmento en el plásmido pcDNA sec-VSV-mRFP o pcDNA sec-VSV-G-mRFP-IC\* para generar los plásmidos pcDNA sec-VSV-G-SV5 o pcDNA sec-VSV-G-SV5-IC\* respectivamente.

- pcDNA sec-SV5-Gn / pcDNA sec-SV5-Gn-IC\*

Para esta construcción se utilizó como molde el plásmido pcDNA3 sec-sv5-bap-BIP cedido por el profesor Oscar Burrone (Trieste, Italia). Como cebador positivo se utilizó 5'-CCCAAGCTTGAGGATGGGCTGGAGCCTG-3' (diana HindIII subrayada y ATG iniciador doblemente subrayado) y como cebador negativo 5'-GGAATTCGGTACCCCATCCAGGCCAGCAG-3' (diana EcoRI subrayada). El inserto amplificado se clonó en el plásmido pcDNA 3.1 Zeo+ para generar un pcDNA sec-SV5. El siguiente paso consistió en amplificar la secuencia del ectodominio de Gn del virus de la Fiebre del valle del Rift. Para ello se utilizó como molde el plásmido pCMV-M4 (Alejandro Brun). Como cebador positivo se utilizó 5'-GGAATTCACCATGGAAGACCCCATCTCAG-3' (Diana EcoRI subrayada) y como cebador negativo 5'-TTGCGGCCCGCAAAGTGTGACTGG-3' (diana NotI subrayada). El fragmento amplificado se clonó en el plásmido pcDNA sec-SV5 para generar un pcDNA sec-SV5-Gn. Por último pasamos a introducir la secuencia del IC mutado. Para ello utilizamos como molde de la amplificación el plásmido sec-muNS-Mi\*. Como cebador positivo utilizamos 5'-TTGCGGCCGCAAGAAGATCACTTGTTGGCTTATC-3' (diana NotI subrayada) y como cebador negativo utilizamos 5'-GCGTCTAGATTACGCTTCCACACGGGGTTC-3' (Diana XbaI subrayada y codon stop doblemente subrayado). El fragmento amplificado se clonó en el plásmido sec-SV5-Gn para generar el plásmido sec-SV5-Gn-IC\* de 60 kDa.

### **3.3 Expresión y manipulación de proteínas**

#### **3.3.1 Creación de baculovirus recombinantes**

Todos los baculovirus recombinantes se generaron transfectando Sf-9 con báculos creados con el sistema Bac-to-Bac (Invitrogen, Barcelona, España). Para ello se clonaron los cDNAs obtenidos por PCR en el plásmido pFastBac1, tal y como se describe más adelante. Los plásmidos recombinantes se comprobaron por análisis de restricción y secuenciación y se utilizaron para transfectar células DH10Bac™ competentes (Invitrogen, Barcelona, España), donde se generan los báculos por transposición. Las colonias positivas se replaquearon y comprobaron por PCR con cebadores comerciales M13 (Invitrogen, Barcelona, España), tal y como recomienda el fabricante en sus instrucciones. La transfección de células Sf-9 se llevó a cabo usando Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher). Transcurridas 72 h el medio de cultivo contiene aproximadamente  $1 \times 10^7$  ufp/ml de baculovirus recombinantes. Luego de realizar varios pases para crecer el virus y aumentar el título viral, se realizaron ensayos de expresión para seleccionar el clon a utilizar. Los stocks baculovirales se almacenaron a 4°C en ausencia de luz.

- Bac-sec-muNS-Mi\*

Para expresar la proteína sec-muNS-Mi\* en el interior del retículo endoplasmático, el plásmido pcDNA sec-muNS-Mi\* se amplificó utilizando los siguientes cebadores: el cebador positivo fue 5'-CGGGATCCACCATGGGCTGGAGCCTGATCC-3' (diana EcoRI subrayada y ATG iniciador doblemente subrayado) y como cebador negativo 5'-TTGCGGCCGCAATCACAGATCATCCACC-3' (diana NotI subrayada y codon stop doblemente subrayado). El producto de PCR resultante se digirió y clonó entre las dianas EcoRI y NotI del pFastBac1 para obtener pFastBac sec-muNS-Mi\*, que se usó para generar el baculovirus recombinante Bac-sec-muNS-Mi que expresará la proteína denominada en resultados como sec-Mi\*

## ***Materiales y métodos***

- Bac-sec-mRFP-IC\*

Para expresar la proteína sec-mRFP-IC\* en el interior del retículo endoplasmático, el plásmido pcDNA sec-mRFP-IC\* se amplificó utilizando los siguientes cebadores: el cebador positivo fue 5'-CGGGATCCACCATGGGCTGGAGCCTGATCC-3' y (diana EcoRI subrayada y ATG iniciador doblemente subrayado) como cebador negativo 5'-GCGTCTAGATTACGCTTCCACACGGGGTTC-3' (diana XbaI subrayada y codon stop doblemente subrayado). El producto de PCR resultante se digirió y clonó entre las dianas EcoRI y XbaI del pFastBac1 para obtener un pFastBac sec-mRFP-IC\*, que se usó para generar el baculovirus recombinante Bac-sec-mRFP-IC\* que expresa la proteína denominada en resultados como sec-mRFP-IC\*

- Bac-IC-IGRP

Para expresar la proteína IGRP etiquetada con el IC en su extremo aminoterminal, se sometió a amplificación el plásmido pCIneo-muNS (448-635) (Brandariz-Nuñez et al., 2010b). Como cebador positivo utilizamos 5'-GCATAAGAATGCGGCCGCTATCATGGCGGAAGATCACTTGTTGGCTTATC-3' (diana NotI subrayada y ATG iniciador doblemente subrayado) y como cebador negativo utilizamos 5'-GCGTCTAGACGCTTCCACACGGGGTTCCTCACTCAG-3' (diana XbaI subrayada). El producto de PCR se clonó en el plásmido pFastBac IGRPHIS, cedido por el profesor Rubén Calviño (Santiago de Compostela, España) para generar el plásmido pFastBac IC-IGRP que se usó para generar el baculovirus recombinante Bac-IC-IGRP

- Bac-Gc-IC

Para expresar el ectodominio de la glucoproteína Gc del virus del Valle del Rift en el citosol, se utilizó como molde para la amplificación el plásmido pcDNA sec-SV5-Gc-IC. Como cebador positivo utilizamos 5'-GGAATTCACCATGTGTTTCAGAACTGATTC-3' (diana EcoRI subrayada y ATG iniciador doblemente subrayado) y como cebador negativo 5'-CCGCTCGAGCGGTTACGCTTCCACACG-3' (diana XhoI subrayada y codón stop

doblemente subrayado). El producto de PCR se clonó en el plásmido pFastBac 1 para generar el plásmido recombinante pFastBac Gc-IC que se usó para generar el baculovirus recombinante Gc-IC.

### 3.3.2 Expresión de proteína con baculovirus

Tras determinar el título de los diferentes baculovirus recombinantes utilizados, infectamos con 5 ufp/célula un frasco con células Sf-9 en suspensión (1,5x10<sup>6</sup> células/ml) con una viabilidad superior al 99%. Las células se mantuvieron en un matraz Erlenmeyer agitándose a 120 rpm durante tres días a 28°C, punto en el cual la expresión de proteínas bajo el promotor de la polihedrina suele alcanzar el máximo.

### 3.3.3 Generación de plásmidos duales para la expresión en bacterias

- pET Duet 1.muNS-Mi

Para expresar la proteína muNS-Mi en bacterias introducimos la secuencia de muNS-Mi en el plásmido pET Duet. El plásmido pCIneo-muNS (448-635) (Brandariz-Núñez et al., 2010b) se sometió a amplificación usando como cebador positivo 5'-CATGCCATGGCACCAGCCGTACTGCTGTC-3' (diana NcoI subrayada) y como cebador negativo 5'-TTGCGGCCGCAATCAGATCATCCACC-3' (diana NotI subrayada y codon stop doblemente subrayado). El producto amplificado se digirió y clonó en el plásmido pETDuet-1 para generar pET Duet 1.muNS-Mi

- pET Duet 1. muNS-Mi 2. HaloTag-IC

Para expresar la proteína HaloTag-IC al mismo tiempo que muNS-Mi, el plásmido recombinante pFastBac HaloTag-IC fue sometido a amplificación usando los siguientes cebadores: como cebador positivo 5'-GGAGATCTCGGATCCGAAATCGGTACAGGC-3' (diana BglII subrayada) y como cebador negativo 5'-CCGATATCTTACGCTTCCACACGGGGTTCC-3' (diana EcoRV subrayada y codón stop doblemente subrayado). El producto de PCR fue sometido a digestión y clonado en plásmido pET Duet 1.muNS-Mi para generar el plásmido pET Duet 1.muNS-Mi 2.HaloTag-IC.

## ***Materiales y métodos***

- pET Duet 1. muNS-Mi 2. IC-IGRP

Para expresar la proteína IC-IGRP al mismo tiempo que muNS-Mi, el plásmido pFastBac IC-IGRP se sometió a amplificación usando como cebador positivo 5'-GGAGATCTCGCGGAAGATCACTTGTGGC-3' (diana BglII subrayada) y como cebador negativo 5'-GGGATATCCTACTGACTCTTCTTCCGC-3' (diana EcoRV subrayada y codon stop doblemente subrayado). El producto amplificado se digirió y clonó en el plásmido pET Duet 1.FM para generar el plásmido pET Duet 1.muNS-Mi 2.IC-IGRP.

- pET Duet 1. muNS-Mi 2. Gc-IC

Para expresar la proteína Gc-IC al mismo tiempo que muNS-Mi, el plásmido pFastBac GC-IC\* se sometió a amplificación usando como cebador positivo 5'-GGAGATCTCGTGTGTTTCAGAACTGATTCAG-3' (diana BglII subrayada) y como cebador negativo 5'-CCGCTCGAGCGGTTACGCTTCCACACG-3' (diana XhoI subrayada y codon stop doblemente subrayado). El producto amplificado se digirió y clonó en el plásmido pET Duet 1.FM para generar el plásmido pET Duet 1.muNS-Mi 2.Gc-IC.

### **3.3.4 Expresión de proteínas con bacterias**

Para la expresión de proteína en bacterias se transforman BL21 DE3 Codon plus-RP (Stratagene) con el plásmido que contengan las secuencias para las proteínas de interés. Posteriormente se pone un precultivo de una colonia de esa placa y se deja en agitación a 37°C overnight. Se diluye y se incuban a 37°C hasta alcanzar una O.D.<sub>600</sub>: 0,4-0,6. Llegados a este punto inducimos las bacterias con 1mM de IPTG e incubamos a 37°C en agitación durante 3 h. Las bacterias inducidas fueron centrifugadas a 3200 g durante 30' a 4°C y lavadas dos veces con PBS 1X. Finalmente el pellet se resuspendió en tampón de lisis y se congeló antes de la purificación al menos 24 h.

**3.3.5 Purificación de microesferas de bacterias**

El pellet de bacterias en tampón de lisis fue sonicado a amplitud máxima, 0,5 ciclos: dos sonicados de 1 min con descanso de 30 seg. Posteriormente se centrifugó a 2700 g, 5min a 4°C. El pellet se lavó en TRB+ con 0,5% Triton X-100 y posteriormente se lavo 5 veces en TRB+. Finalmente el pellet fue resuspendido en TRB+ concentrándolo 10 veces del volumen inicial.

**3.3.6 Análisis electroforético en geles SDS-PAGE**

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) empleadas para el gel separador fueron del 12.5%, y para el gel concentrador del 4%. Después de la electroforesis, las proteínas se fijaron y tiñeron con 0,25% azul de Coomassie en 33% metanol y 10% ácido acético y se destiñeron en la misma disolución sin colorante.

**3.3.7 Tratamiento con N-Glicosidasa**

Las células previamente transfectadas se recogieron en tampón de lisis que contiene 50 mM de TrisHCl (pH 8,0), 150 mM de NaCl y 0,5% de SDS. Para el tratamiento con N-Glicosidasa, se cogieron 10 µl de extracto celular y se añadió al mix: 2 unidades de N-Glicosidasa F (Roche), 6 µl del mismo buffer añadiendo 3 mM DTT, y 2 µl de 10% NP-40. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 1 h y analizadas por Western-blot con los anticuerpos correspondientes.

**3.4 Manipulación de cultivos celulares y virus**

**3.4.1 Condiciones de manipulación**

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

## ***Materiales y métodos***

eliminación definitiva.

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

### **3.4.2 Propagación y conservación de líneas celulares**

En el proceso de congelación, las células de los cultivos confluentes se disgregaron y se centrifugaron durante 5 min a 500 x g. Las células sedimentadas se resuspendieron en 500 µl de medio de cultivo y se añadieron 500 µL de medio de congelación (D-MEM suplementado con 40% de FBS y 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotector). Las suspensiones celulares se dispensaron en alícuotas de 1 ml, en criotubos de conservación estériles. Los viales se mantuvieron a 4°C durante 5 min, transfiriéndose posteriormente a -80°C y, tras mantenerlos al menos 24 h a esa temperatura, se almacenaron en nitrógeno líquido para períodos largos de conservación.

La descongelación de las células se realizó sumergiendo los viales en un baño de agua a 37°C para conseguir una descongelación rápida. Posteriormente, el contenido del vial se transfirió a tubos que contenían medio de cultivo completo previamente calentado a 37°C, y se centrifugaron durante 5 min a 500 x g para eliminar el medio de congelación. A continuación, las células sedimentadas se resuspendieron en medio de cultivo, se transfirieron a frascos de cultivo celular con medio y se incubaron a 37°C. El medio se renovó antes de las 24 h para eliminar las posibles trazas de agente crioprotector y evitar una elevación de pH.

### **3.4.3 Transfección de células eucariotas con plásmidos de expresión transitoria**

Se crecieron monocapas semiconfluentes de células (aproximadamente 70% de confluencia), en placas de 12 pocillos. La transfección se llevó a cabo con complejos de DNA-liposomas empleando el sistema Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se mantuvieron a 37°C durante 4 h. Al cabo de ese tiempo, se retiró la mezcla de transfección y se añadió medio suplementado con 10% FBS.

### **3.5 Técnicas inmunológicas**

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

Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana PVDF/Inmobilon-P (Millipore) en tampón de transferencia, durante 1 h a 100 voltios utilizando el sistema MiniProtean III (BioRad). Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con 5% de leche desnatada en PBS-T (PBS conteniendo 0,05% Tween). La inmunodetección se realizó con los anticuerpos diluidos en PBS-T-leche con incubaciones entre 60-90 min y lavados 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 Chemiluminiscent HRP Substrate (Millipore).

#### **3.5.2 Inmunofluorescencia**

En el caso de inmunofluorescencia indirecta con 4% paraformaldehído (Sigma, Madrid, España) a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación se lavaron con PBS, y se permeabilizaron con 0,5% Tritón X-100 en PBS durante 5 min. Se lavaron con PBS y se incubaron en presencia de 2% BSA en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación se incubaron con una solución del anticuerpo primario diluido en 2% BSA en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Tras tres lavados con PBS, se incubaron con una solución del segundo anticuerpo y DAPI 100 µg/ml (tinción nuclear) diluidos en 2% BSA en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron cinco veces con PBS y se montaron sobre una gota de medio de montaje (ver soluciones y tampones) en un portaobjetos, para su observación al microscopio de fluorescencia.

Cuando se quiso observar al microscopio de fluorescencia la proteína GFP o proteínas fusionadas a la GFP, el procedimiento fue el siguiente. Las células se fijaron con 4% paraformaldehído y tras lavar con PBS y permeabilizar con Tritón X-100 se montaron sobre una gota de medio de montaje en un portaobjetos.

## ***Materiales y métodos***

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

Las imágenes de confocal fueron obtenidas con un sistema confocal Andor Dragonfly con spinning disk montado sobre un microscopio Nikon TiE equipada con una cámara Zyla 4.2 (Andor). Las imágenes fueron procesadas con Imaris (Oxford Instruments), NIS elements (Nikon) o Adobe Photoshop (Adobe System, California, USA).

### **3.6 Tratamiento bioinformático de las secuencias**

Todas las construcciones fueron comprobadas por secuenciación de Sanger (Stab Vida, Portugal)

Para el análisis básico de las secuencias obtenidas (sitios de restricción, secuencia que codifican las pautas de lectura, pesos moleculares teóricos, etc.) se utilizó el programa ApE - A plasmid Editor V2.0.53c (M. Wayne Davis).

El alineamiento de secuencias de proteínas se llevó a cabo con el programa ApE - A plasmid Editor V2.0.53c (M. Wayne Davis).



## **RESULTADOS**



## **1. DESARROLLO DE SENSORES BASADOS EN EL REENSAMBLAJE DE FRAGMENTOS DE GFP UTILIZANDO EL SISTEMA IC-TAGGING.**

### **1.1 Introducción**

La proteína GFP es una proteína aislada de *Aequorea victoria* que está formada por 238 aa y que tiene la característica de emitir fluorescencia verde de forma espontánea. Es una proteína conformada por 11 cadenas  $\beta$  antiparalelas que forman un barril  $\beta$  con una hélice  $\alpha$  dentro. En esta hélice  $\alpha$  está localizado el cromóforo, que está formado por 3 residuos modificados por la propia proteína. A pesar de que GFP es muy estable dentro de la célula, una modificación de su secuencia consistente en la introducción de un residuo de valina en posición 2 generó la variante que se conoce con el nombre de proteína fluorescente verde mejorada o EGFP. Esta proteína es la que se utiliza actualmente debido a que su fluorescencia es mayor y más estable y resulta menos tóxica para la célula (Yang et al., 1996).

En la bibliografía hay varios estudios denominados “ensayos de complementación de biomoléculas fluorescentes” (BiFC) que se basan en la complementación estructural entre dos fragmentos no fluorescentes, amino y carboxilo terminal, de una proteína que sí es fluorescente. En este tipo de ensayos ambos fragmentos son capaces de reensamblarse y recuperar su función de emitir fluorescencia cuando se coexpresan en células eucariotas. El reensamblaje se facilita gracias a una unión no covalente y antiparalela, por ejemplo a través de cremalleras de leucina fusionadas en la zona de separación de ambos fragmentos, de tal forma que permiten su re-asociación (Kodama y Hu, 2012).

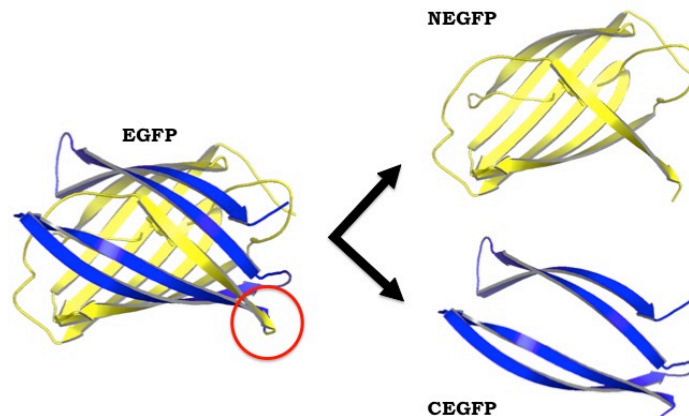
Este ensayo se ha probado con la proteína GFP, que se cortó entre los residuos 157 y 158 generando un extremo al que se denominó NGFP de 157 aa (que contiene el extremo N-terminal) y un extremo CGFP de 81 aa (que contiene el extremo C-terminal). La cremallera de leucina se dispuso en los extremos C-terminal y N-terminal de ambos fragmentos NGFP y CGFP respectivamente, formando NZGFP y CZGFP. En este ensayo se estudió el reensamblaje tanto in vitro como in vivo obteniendo como resultado que únicamente se reconstituye la proteína, y por tanto se emite fluorescencia verde, en el caso donde están presente al mismo tiempo los

## Resultados

fragmentos que poseen la cremallera de leucinas NZGFP y CZGFP (Ghosh et al., 2000).

En nuestro laboratorio intentamos comprobar si el sistema podría utilizarse para reconstituir la proteína EGFP, previamente cortada. Esta idea surgió de una colaboración con el profesor Óscar Burrone (Trieste, Italia) que estudia la retrotranslocación de proteínas desde el retículo endoplasmático al citosol. Con este trabajo intentamos desarrollar un sensor de retrotranslocación utilizando el sistema. De esta forma, si tenemos en el citosol microesferas (MS) con uno de los fragmentos de GFP (no brilla) y fusionamos la otra mitad de GFP a una proteína expresada en el RE (no brilla), que además está etiquetada con el IC, podríamos observar in vivo la posible retrotranslocación de esa proteína recombinante al reconstituirse la fluorescencia en las MS de muNS-Mi. El diseño de estos sensores se hizo, por tanto, teniendo en cuenta los estudios BiFC y los datos previamente obtenidos en nuestro laboratorio donde se ha demostrado que dentro de las MS de muNS-Mi (MS) las proteínas etiquetadas pueden interactuar entre sí (Brandariz-Nuñez et al., 2011).

Decidimos fragmentar la proteína EGFP de la misma forma que se había hecho en los estudios mencionados con cremalleras de leucina. Así, dividimos la proteína EGFP entre los aminoácidos 158-159 generando un fragmento que contiene el extremo N-terminal denominado como NEGFP (158 aa) y un fragmento que contiene el extremo C-terminal denominados como CEGFP (81 aa) (Figura 17).



**Figura 17. Representación esquemática de la proteína EGFP.** Observamos donde se produce el corte (rodeado en rojo) y los dos fragmentos generados.

Para comprobar si el sistema permite el reensamblaje de los dos fragmentos de EGFP y consecuentemente la reconstitución de la fluorescencia se siguieron dos estrategias diferentes:

### **1.2 Fragmento CEGFP etiquetado con IC - fragmento NEGFP fusionado a muNS-Mi.**

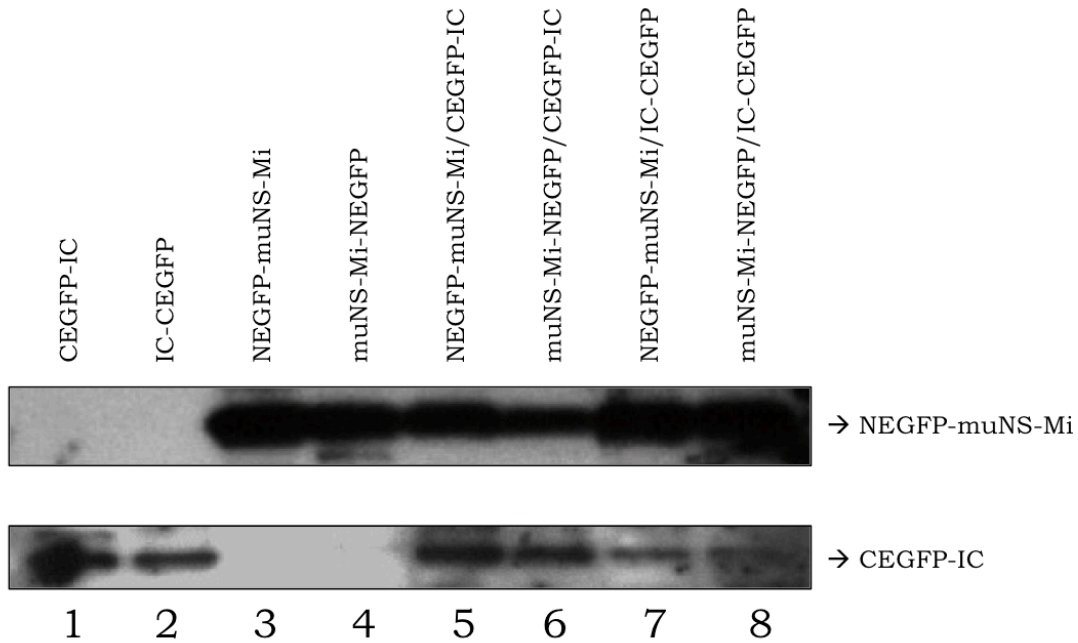
Decidimos etiquetar el fragmento CEGFP con el dominio IC tanto en su extremo C-terminal como N-terminal, generando las construcciones CEGFP-IC e IC-CEGFP. Por otro lado fusionamos NEGFP a la secuencia de muNS-Mi tanto en su extremo C-terminal como en su extremo N-terminal, generando las construcciones NEGFP-muNS-Mi y muNS-Mi-NEGFP. De esta forma tenemos cuatro construcciones que vamos a expresar mediante transfección en células en cultivo (Tabla 2). Al coexpresar ambos fragmentos en las células, gracias al IC el extremo CEGFP se reclutará a las MS formadas por la proteína muNS-Mi fusionada al extremo NEGFP: si ambos extremos están lo suficientemente cerca, podrían interactuar y reconstituir la fluorescencia de la proteína GFP.

Construcción	Peso molecular
CEGFP-IC	17 kDa
IC-CEGFP	17 kDa
NEGFP-muNS-Mi	40 kDa
muNSMi-NEGFP	40 kDa

**Tabla 2.** Construcciones para el reensamblaje de fragmentos de GFP (estrategia I)

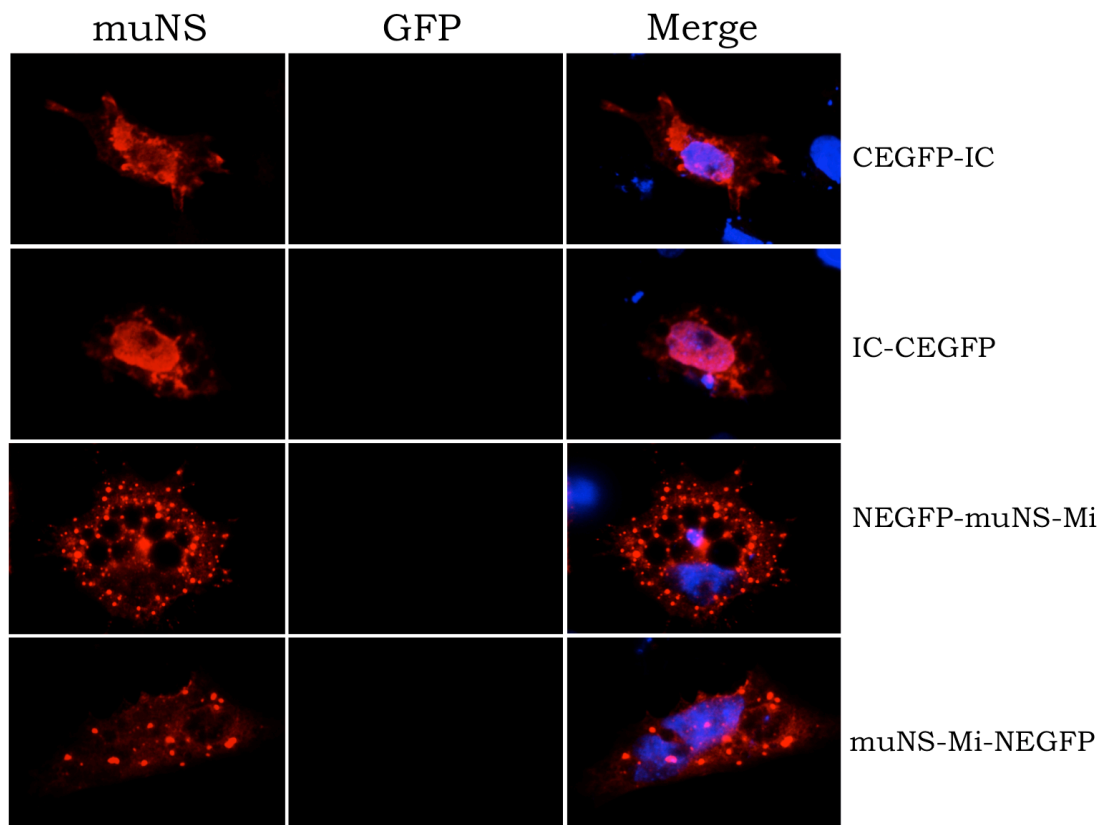
Una vez tenemos todas las construcciones analizamos la expresión mediante Western-blot. Observamos expresión de las proteínas solas en los primeros cuatro carriles y las coexpresiones en los últimos cuatro carriles (Figura 18). El fragmento CEGFP etiquetado con el IC tiene un peso molecular aproximado de 17 kDa mientras que el fragmento NEGFP fusionado a muNS-Mi pesa aproximadamente 40 kDa.

## Resultados



**Figura 18. Análisis por Western-blot de la expresión de los diferentes fragmentos de GFP.** Se transfectaron o cotransfectaron monocapas semiconfluentes de células DF-1 con plásmidos de expresión para las versiones de las proteínas indicadas en la parte superior de la figura. Tras 18 h.p.t. se lisaron las células y el extracto fue sometido a electroforesis y detección por Western-blot utilizando un anticuerpo policlonal contra muNS. Las proteínas detectadas se indican en la parte derecha de la imagen.

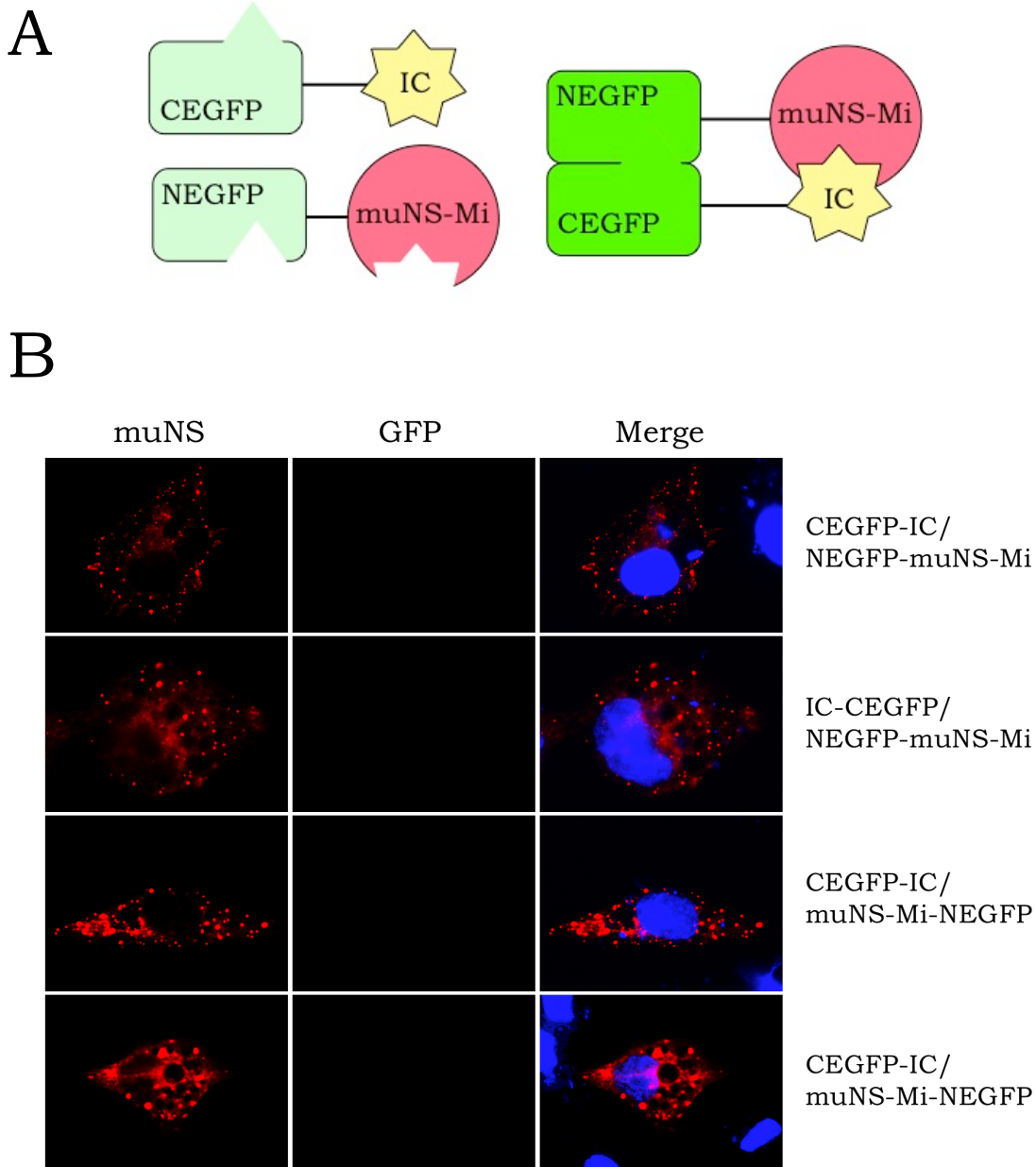
Una vez observamos que las proteínas se expresaban correctamente, pasamos a comprobar por microscopía de fluorescencia si la coexpresión de ambos fragmentos permitían que la proteína EGFP se reconstituyera. En primer lugar comprobamos como se ve la expresión de los fragmentos por separado. Para ello transfectamos células DF-1 con los plásmidos de expresión correspondientes a cada fragmento y se analizaron las células por inmunofluorescencia indirecta observando que existía expresión de todos los fragmentos y si las distintas fusiones con muNS-Mi seguían formando MS (Figura 19).



**Figura 19. Análisis por inmunofluorescencia de la expresión individual de los fragmentos de EGFP.** Se transfectaron monocapas semiconfluentes de células DF-1 con plásmidos de expresión que codifican para las proteínas indicadas a la derecha del panel. Tras 18 h.p.t. las células se fijaron y sometieron a inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo policlonal contra muNS (rojo). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI.

Posteriormente analizamos la coexpresión del fragmento CEGFP etiquetado con el IC y muNS-Mi fusionada a NEGFP (Figura 20 A). Para esto se transfectaron células DF-1 usando diferentes combinaciones de los plásmidos de expresión y se analizaron las células por inmunofluorescencia indirecta. Los resultados obtenidos en esta parte del estudio demostraron que la fusión del extremo NEGFP a muNS-Mi (tanto a su extremo N-terminal como C-terminal) no impide la formación de las MS en el citoplasma celular, observando MS en todas las fotos de la imagen. Por otro lado en ninguno de los casos vimos que las células emitiesen fluorescencia, por lo que concluimos que a pesar de acercar ambos fragmentos en las MS, GFP no se reconstituye (Figura 20 B).

## Resultados



**Figura 20. Estrategia I para el reensamblaje de fragmentos de GFP. A. Representación esquemática de la estrategia I. B. Análisis mediante inmunofluorescencia indirecta del reensamblaje de fragmentos de GFP.** Se cotransfectaron monocapas semiconfluentes de células DF-1 con plásmidos de expresión que codifican para las proteínas indicadas a la derecha del panel. Tras 18 h.p.t. las células se fijaron y sometieron a inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo policlonal contra muNS (rojo) mientras que el reensamblaje de GFP se detectó por autofluorescencia de GFP (verde). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI.

**1.3 Ambos fragmentos (CEGFP y NEGFP) etiquetados IC y coexpresados con muNS-Mi.**

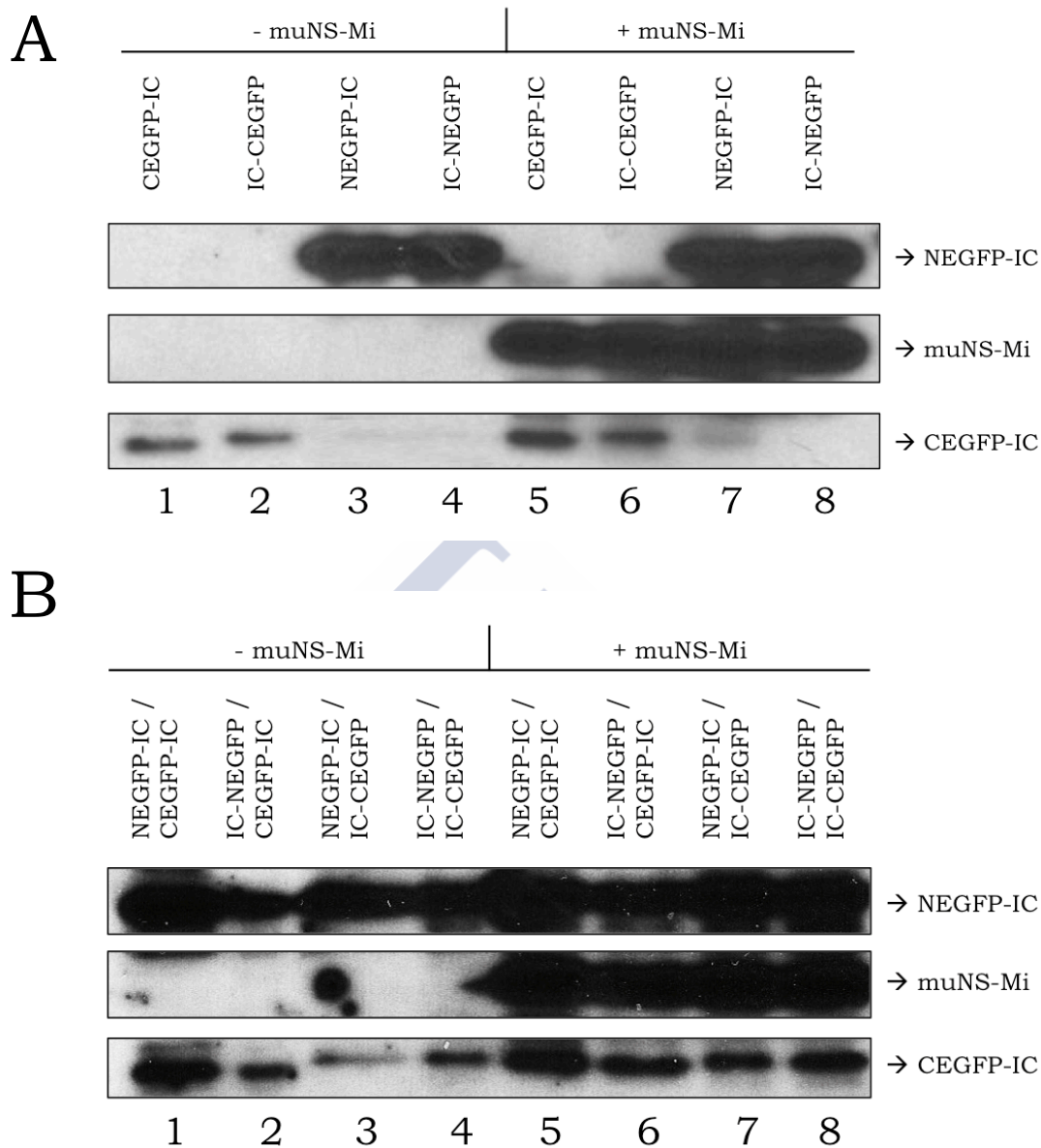
Los resultados mostrados en el apartado anterior pueden deberse a que muNS-Mi es una proteína demasiado grande y podría impedir que el fragmento NEGFP estuviera totalmente accesible para reensamblarse de forma correcta con CEGFP y reconstituir la fluorescencia, o que la fusión le impida plegarse correctamente. Por ello se diseñó una segunda estrategia donde ambos fragmentos de EGFP se etiquetaron con IC, tanto en su extremo N-terminal como C-terminal (Tabla 3). Ambos se encontrarán dentro de las MS cuando se expresen junto con muNS-Mi.

Construcción	Peso molecular
CEGFP-IC	17 kDa
IC-CEGFP	17 kDa
NEGFP-IC	28 kDa
IC-NEGFP	28 kDa

**Tabla 3.** Construcciones para el reensamblaje de fragmentos de GFP (estrategia II).

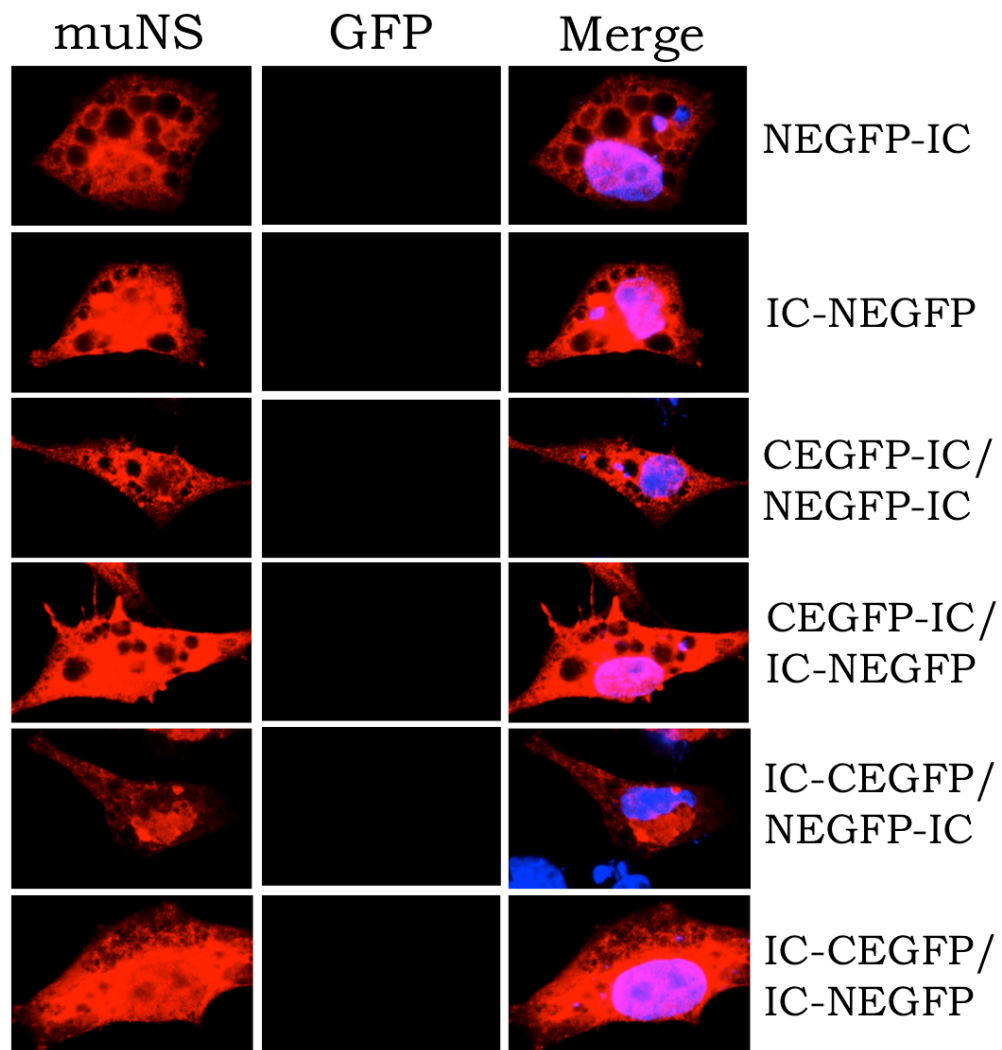
En primer lugar comprobamos por Western-blot la expresión de las proteínas, tanto individualmente y en presencia o ausencia de muNS-Mi (Figura 21 A) como la expresadas conjuntamente, en presencia o ausencia de muNS-Mi (Figura 21 B). Los resultados obtenidos mostraron la correcta expresión de todas las versiones de los fragmentos en todas las circunstancias. Además se observó que los fragmentos CEGFP etiquetados con el IC se expresan a un nivel más bajo (Figura 21 A, carriles 1 y 2), que parece aumentar ligeramente cuando se coexpresan con muNS-Mi (Figura 21 A, carriles 5 y 6) lo que podría indicar que la proteína en el interior de las MS se estabiliza de alguna forma.

## Resultados



**Figura 21. Análisis por Western-blot de la expresión de los diferentes fragmentos de GFP. A. Expresión de fragmentos individualmente en presencia y ausencia de muNS-Mi.** Monocapas semiconfluentes de células DF1 se transfectaron con plásmidos que codifican para las diferentes versiones de fragmentos de GFP etiquetados con IC que se indican en la parte superior de la figura. Los fragmentos se expresaron en ausencia (carriles 1-4) o presencia (carriles 5-8) de muNS-Mi. Tras 18 h.p.t. se lisaron las células y los extractos fueron sometidos a Western-blot utilizando un anticuerpo contra muNS. **B. Coexpresión de las diferentes versiones de los fragmentos individualmente en presencia y ausencia de muNS-Mi.** Monocapas semiconfluentes de células DF-1 se cotransfectaron con las combinaciones de fragmentos de EGFP indicados en la parte superior de la figura, en ausencia (carriles 1-4) o presencia (carriles 5-8) de muNS-Mi. Tras 18 h.p.t. se lisaron las células y los extractos fueron sometidos a Western-blot utilizando un anticuerpo contra muNS.

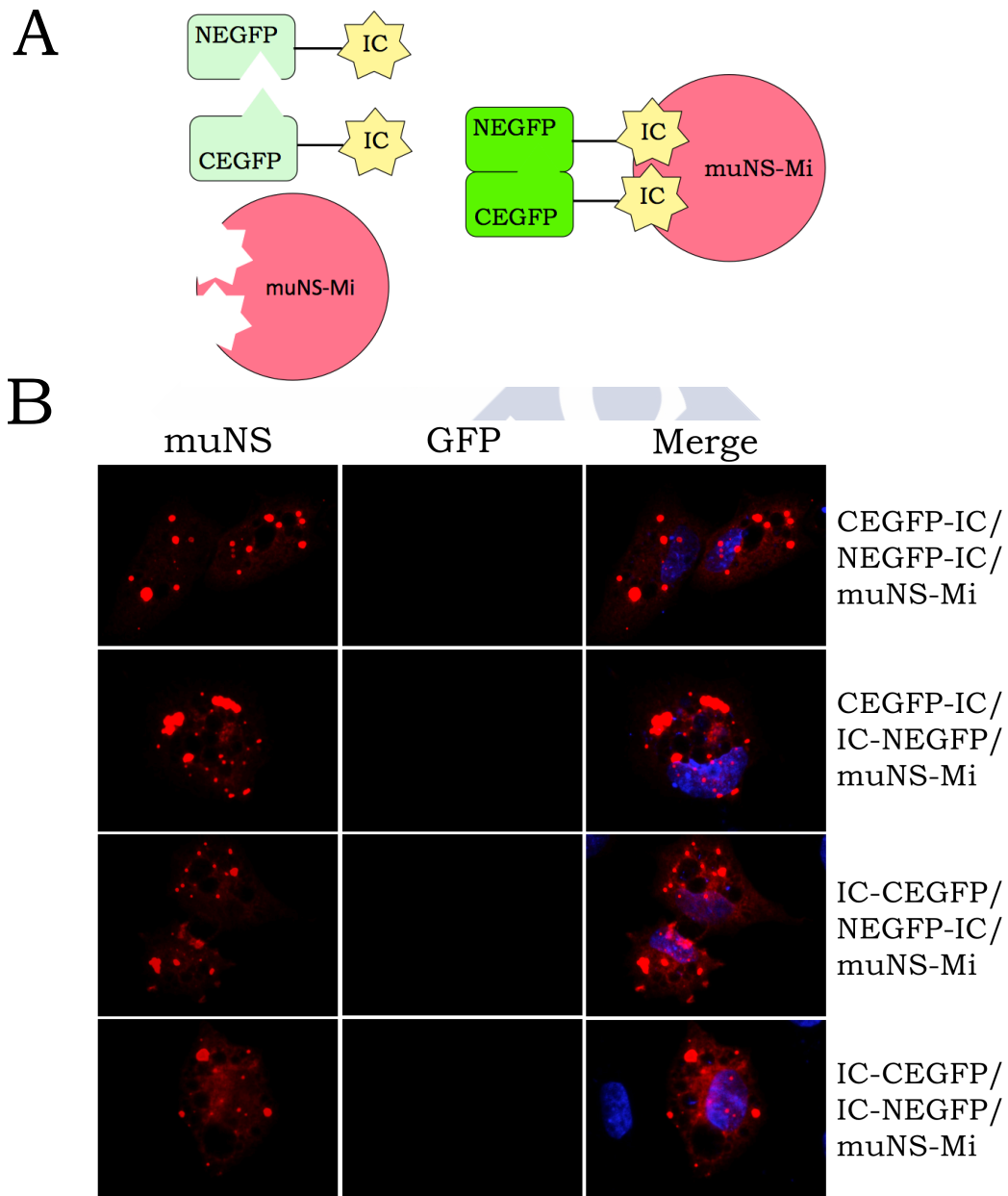
Una vez comprobamos que la expresión de las proteínas es correcta, pasamos a analizar por microscopía de fluorescencia lo que ocurre al cotransfectar los fragmentos etiquetados con el IC en presencia de muNS-Mi. En primer lugar comprobamos la expresión por inmunofluorescencia de los fragmentos por separado y de las coexpresiones de los mismos en ausencia de muNS-Mi. Las células se sometieron a inmunofluorescencia indirecta y los resultados obtenidos mostraron expresión de todos los fragmentos tanto individualmente como en las diferentes combinaciones (Figura 22).



**Figura 22. Análisis por inmunofluorescencia de la expresión individual y coexpresión de los fragmentos de EGFP en ausencia de muNS-Mi.** Se transfectaron o cotransfectaron monocapas semiconfluentes de células DF-1 con plásmidos de expresión que codifican para las proteínas indicadas a la derecha del panel. Tras 18 h.p.t. las células fueron fijadas y sometidas a inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo policlonal contra muNS (rojo). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI.

## Resultados

A continuación coexpresamos las diferentes combinaciones de ambos fragmentos de EGFP en presencia de muNS-Mi para comprobar si en la MS la proteína reconstituye su fluorescencia. Los resultados obtenidos de la inmunofluorescencia indirecta mostraron que a pesar de que las MS se formaban en todos los casos, en ninguna de las transfecciones encontramos fluorescencia verde, lo que nos indica que no hay reconstitución de ambos fragmentos de la proteína EGFP (Figura 23 B).

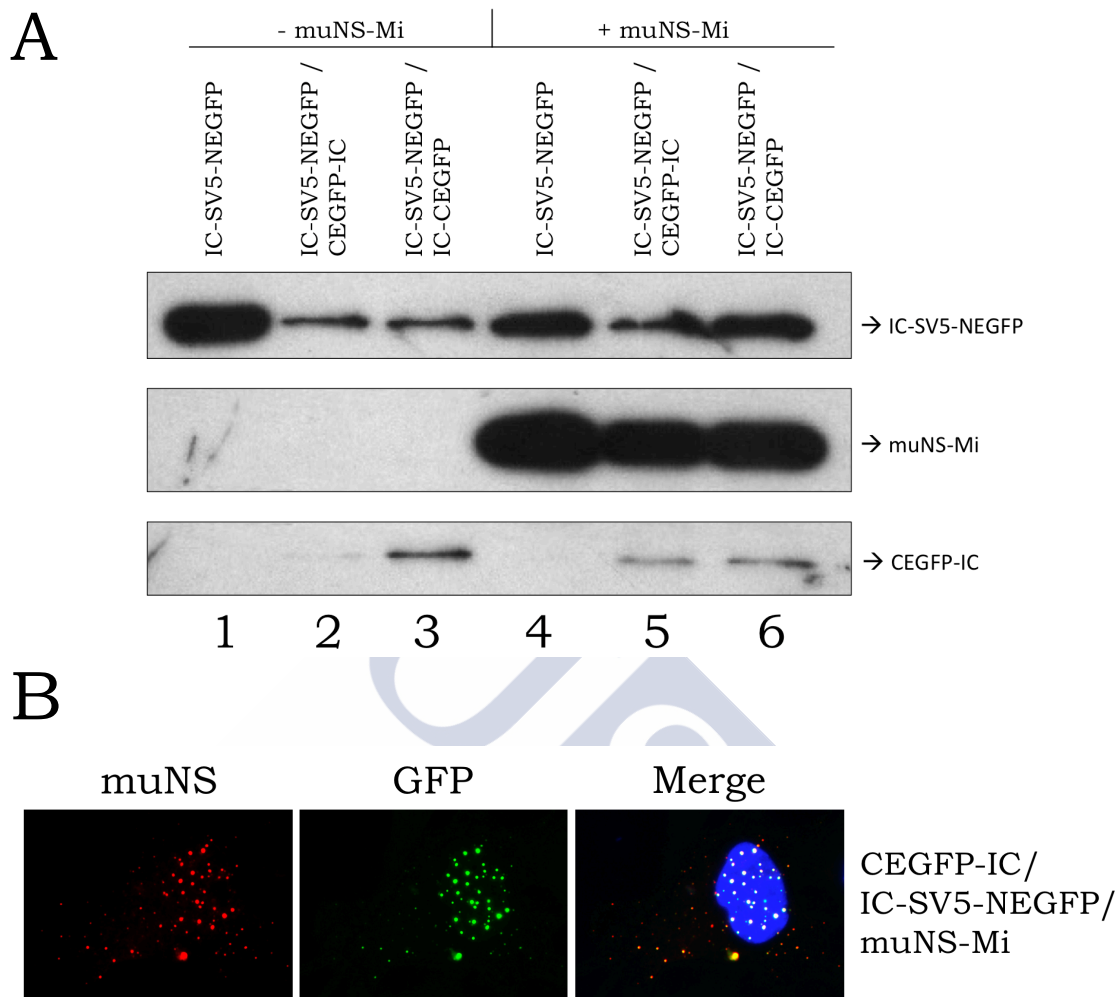


**Figura 23. Estrategia II para el reensamblaje de fragmentos de GFP. A. Representación esquemática de la estrategia II. B. Análisis mediante inmunofluorescencia del reensamblaje de fragmentos de GFP. Se cotransfectaron monocapas semiconfluentes de**

células DF-1 con plásmidos que codifican para las proteínas indicadas a la derecha del panel. Tras 18 h.p.t. las células se fijaron y sometieron a inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo policlonal contra muNS (rojo) mientras que el reensamblaje de GFP se detecta por autofluorescencia de la propia proteína al reensamblarse (verde). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI.

Observando estos resultados pensamos en la posibilidad de introducir una secuencia de aminoácidos entre el IC y uno de los fragmentos de EGFP de forma que sirva como conector proporcionando mayor flexibilidad al fragmento de GFP correspondiente cuando esté incluido en las MS. En el laboratorio del profesor Óscar Burrone (Trieste, Italia) realizaron una construcción en la cual se introdujo una secuencia de aminoácidos correspondiente al epítipo SV5 entre el IC y el fragmento NGFP de forma que tenemos una nueva versión de uno de los fragmentos, IC-SV5-NEGFP. En primer lugar comprobamos su expresión a través de Western-blot. Observamos una buena expresión individual de la proteína IC-SV5-NEGFP (Figura 24 A, carril 1) que disminuye considerablemente en las cotransfecciones con ambos fragmentos de CEGFP, teniendo estos últimos un nivel de expresión bastante bajo (Figura 24 A, carril 2 y 3). En este caso volvemos a observar que la expresión del fragmento CEGFP etiquetado aumenta en presencia de muNS-Mi (Figura 24 A, carril 4-6). Una vez comprobamos que las proteínas se expresaban, observamos por inmunofluorescencia indirecta si los fragmentos de EGFP se reensamblaban y emitían fluorescencia. Los resultados de la inmunofluorescencia mostraron que únicamente una célula de las transfectadas con los plásmidos que expresaban IC-CEGFP, IC-SV5-NEGFP y muNS-Mi, mostraba fluorescencia verde y esta colocalizaba con las MS formadas por muNS-Mi (Figura 24 B). Estos datos nos llevan a pensar que el sistema funciona, pero en el estado actual no parece ser muy eficiente, por lo que no serviría para utilizar como un sensor de retrotranslocación eficaz.

## Resultados



**Figura 24. Reensamblaje de fragmentos de EGFP (III). A. Análisis por Western-blot de la expresión de las proteínas.** Se transfetaron monocapas semiconfluentes de DF-1 con plásmidos que expresan las proteínas indicadas en la parte superior de la imagen. Tras 18 h.p.t. se lisaron las células y los extractos fueron sometidos a análisis por Western-blot usando un anticuerpo contra muNS. **B. Análisis del reensamblaje de fragmentos de EGFP por inmunofluorescencia.** Se transfetaron capas semiconfluentes de células DF-1 con plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la derecha de la imagen. Tras 18 h.p.t. se fijaron las células y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo contra muNS (rojo) y detectando el reensamblaje de EGFP por autofluorescencia de la propia proteína (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI.

## **2. ADAPTACIÓN DEL SISTEMA IC-TAGGING PARA EL INTERIOR DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO (RE)**

### **2.1 Introducción**

Las cápsides de los virus envueltos están rodeadas por una envoltura lipídica. Esta envoltura está cargada de glicoproteínas víricas, que se sintetizan dentro del lumen del RE, donde adquieren una serie de modificaciones como la adición de azúcares que son modificados posteriormente a través de la ruta secretora. Aunque la composición y la estructura final del azúcar añadido es importante para la función de las proteínas, la presencia de azúcares complejos en la envoltura lipídica de los virus envueltos también puede ser utilizada para evitar el sistema inmune del huésped (Dias et al., 2012; Murin et al., 2014). Sin embargo, la adición inicial del azúcar y el ambiente que presenta el RE, en algunas ocasiones influye en el plegamiento de la proteína (Braakman y Bulleid, 2011).

En este trabajo nos propusimos adaptar nuestro método de etiquetado para el interior del RE. Como las MS se pueden usar como vacunas subunitarias libres de adjuvantes, la versión del RE abre la posibilidad de producir vacunas subunitarias seguras y estables contra virus envueltos, cuya estructura externa los convierte en un reto en el desarrollo de vacunas subunitarias.

### **2.2 Expresión y formación de MS dentro del RE**

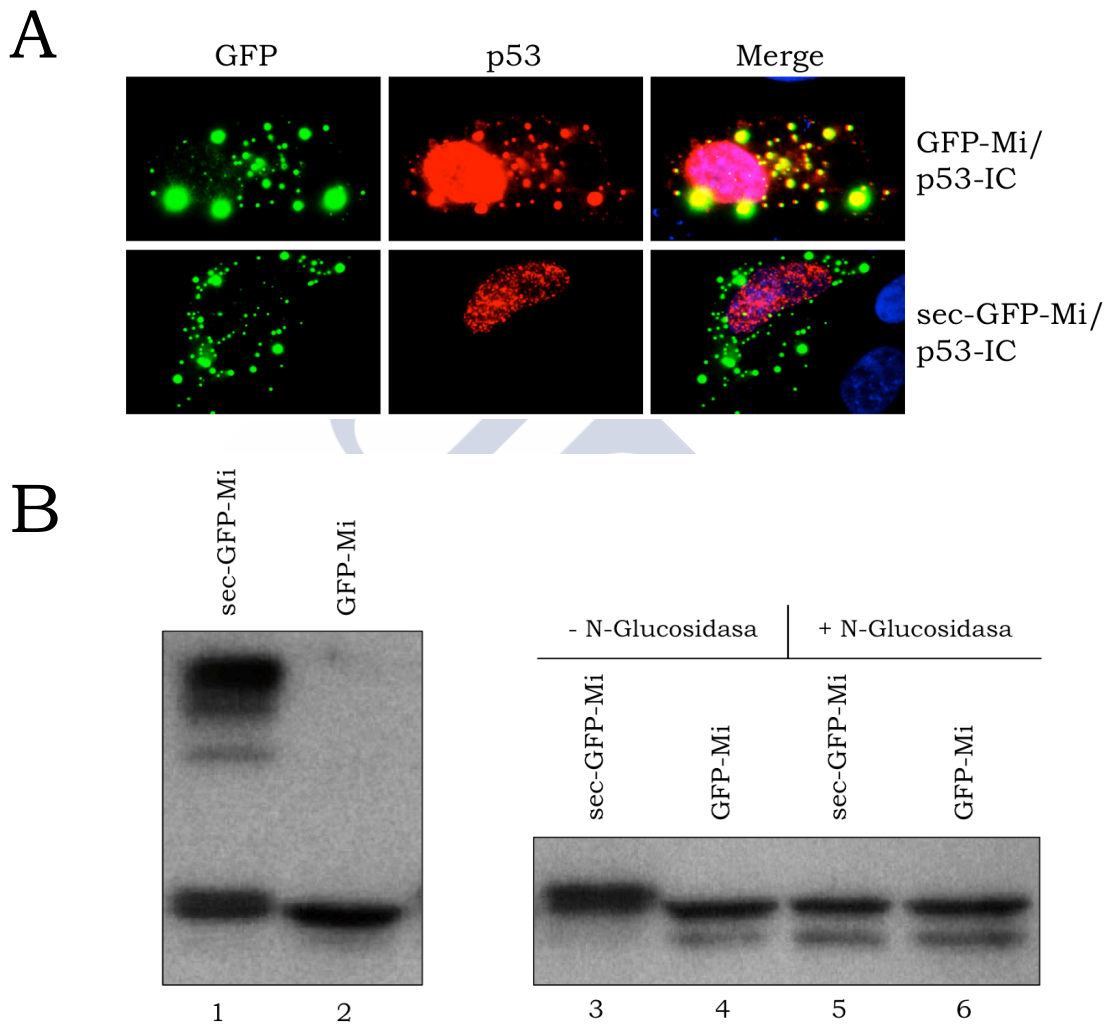
Para la adaptación del sistema a este compartimento, lo primero que hicimos fue comprobar si la proteína muNS-Mi se podía expresar para formar MS en el interior del RE. En estudios anteriores en nuestro laboratorio se había comprobado que añadiendo a la secuencia de muNS-Mi una secuencia de localización nuclear (NLS) la hacía capaz de formar MS en el núcleo (Brandariz-Nuñez et al., 2010c). Como primera aproximación decidimos utilizar una versión de la muNS-Mi que lleva EGFP fusionada a su extremo N-terminal, GFP-muNS-Mi, para evitar el uso de anticuerpos y cualquier posible artefacto en la detección de las MS. Además, añadimos una secuencia señal o péptido señal en el extremo amino-terminal de la secuencia de GFP-muNS-Mi para dirigir la expresión de esta proteína hacia el RE. La secuencia

## **Resultados**

señal de entrada que utilizamos fue MGWSLILLFLVAVATGVHSQ y pasamos a denominar esta versión de la proteína sec-GFP-Mi (sec por “secretora”), que tiene un peso molecular de 52 kDa. El siguiente paso consistió en comprobar mediante microscopía de fluorescencia si sec-GFP-Mi dirige la formación de MS dentro del RE. Como control adicional, coexpresamos p53 etiquetada con IC que expresa en el citosol (Brandariz-Nuñez et al., 2010a) de modo que, si las MS están en el mismo compartimento citosólico, p53 quedará recluida en ellas, mientras que si están en el RE no habrá asociación entre ambas. Los resultados mostraron en primer lugar que sec-GFP-Mi forma MS perfectamente, que aparentemente son más pequeñas que las formadas por GFP-Mi (Figura 25 A, comparar los paneles superiores con los inferiores). En el caso de la cotransfección con GFP-Mi, p53-IC colocaliza con las MS además de aparecer en el núcleo como es de esperar (Figura 25 A, panel superior). Sin embargo, sec-GFP-Mi no muestra ningún tipo de colocalización con p53-IC, que se muestra en su totalidad en el núcleo celular (Figura 25 A, panel inferior), indicando que ambas proteínas están en compartimentos diferentes.

Cuando una proteína se expresa dentro del RE sufre una serie de modificaciones propias de este orgánulo, fundamentalmente glicosilaciones o formación de puentes disulfuro. Para comprobar si sec-GFP-Mi presentaba alguna de estas modificaciones postraduccionales se transfectaron células DF-1 con plásmidos que expresan las proteínas sec-GFP-Mi y GFP-Mi. Las células se lisaron y los extractos obtenidos se trataron de tres formas diferentes antes de someterlos a electroforesis y Western-blot: i) en condiciones no reductoras utilizando tampón de carga de Laemmli para PAGE sin  $\beta$ -mercaptoetanol, ii) en condiciones reductoras, con el tampón de carga de Laemmli sin modificar y iii) en condiciones reductoras, con tampón de carga de Laemmli sin modificar y además tratándolos con N-Glicosidasa F. Los extractos fueron entonces sometidos a PAGE y análisis por Western-blot, donde observamos que en condiciones no reductoras, además de aparecer la banda correspondiente al peso molecular esperado para sec-GFP-Mi (52 kDa), aparecían otras bandas de peso molecular superior, que podrían corresponder con la formación de dímeros, trímeros y tetrámeros de la proteína debido a la formación de puentes disulfuro (Figura 25 B, carril 1). Sin embargo, estas bandas no aparecían en la proteína expresada en el citosol (Figura 25 B, carril 2), lo que nos indicó que sec-GFP-Mi estaba en el interior del RE. Además, en las muestras incubadas en condiciones reductoras pudimos comprobar que sec-GFP-Mi presenta

un peso molecular aparentemente mayor del esperado (Figura 25 B, comparar carriles 3 y 4). Sin embargo, al tratar las muestras con N-Glicosidasa F el tamaño aparente se redujo, lo que indica que sec-GFP-Mi sufre una glicosilación que es eliminada por el enzima, lo que apoya la idea de que se encuentra en el interior del RE (Figura 25 B, comparar carriles 5 y 6).

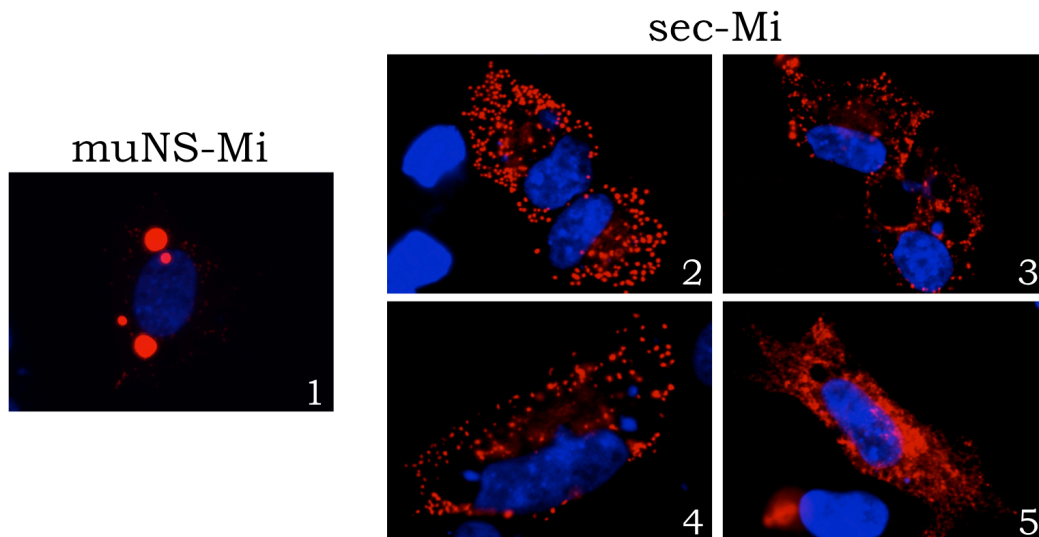


**Figura 25. Expresión de la proteína sec-GFP-Mi en el interior del RE. A. Análisis por inmunofluorescencia de la formación de MS.** Se transfectaron monocapas semiconfluentes de células DF-1 con plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la derecha de la imagen. Tras 18 h.p.t. se fijaron las células y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo monoclonal contra p53 (rojo) y observando las MS por autofluorescencia de GFP (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI. **B. Análisis por Western-blot de la proteína sec-GFP-Mi dentro del RE.** Se transfectaron monocapas semiconfluentes de células DF-1 con plásmidos que expresan las proteínas indicadas en la parte superior de la imagen. Tras 18 h.p.t. se lisaron las células y fueron tratadas en condiciones no reductoras (carriles 1 y 2) y condiciones reductoras (carriles 3-6) siendo en este caso no tratadas (carriles 3 y 4) o tratadas (carriles 5 y 6) con la enzima N-Glicosidasa F. La detección de la proteína se realizó usando un anticuerpo contra muNS.

## Resultados

### 2.3 Glicosilación de sec-Mi y formación de MS

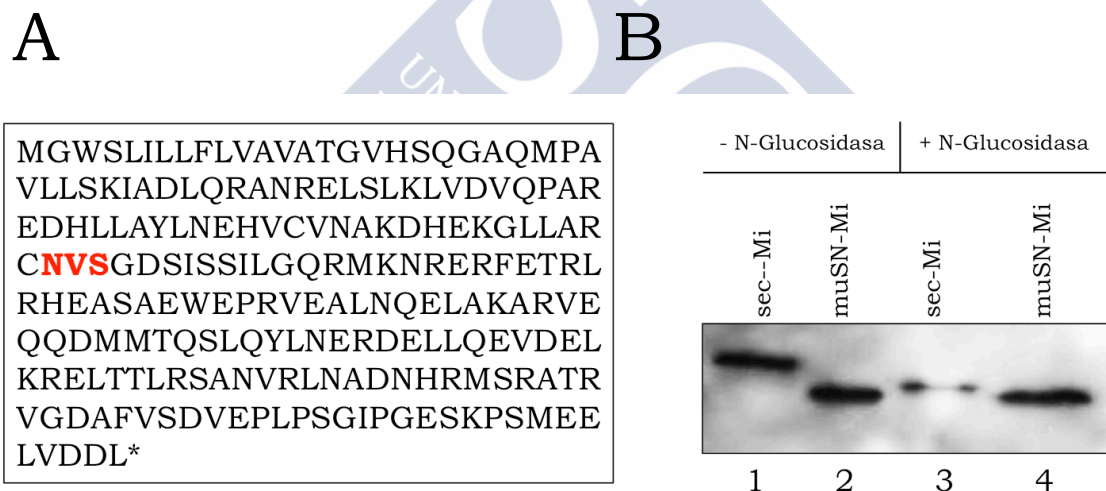
A continuación pasamos a expresar la proteína muNS-Mi sin GFP en el interior del RE. Para ello añadimos la misma secuencia señal usada en el apartado anterior en el extremo aminoterminal de muNS-Mi, para obtener la versión que denominamos sec-Mi que pesa aproximadamente 24 kDa. Cuando expresamos esta construcción comprobamos que sec-Mi forma unas MS mucho más pequeñas (Figura 26, imagen 2) que las formadas por muNS-Mi (Figura 26, imagen 1). Sin embargo, la eficiencia en la formación de MS es baja, encontrándonos que son menos del 50% de las células transfectadas las que presentan MS con aspecto regular. En algunas células, no toda la señal correspondiente a muNS estaba contenida en las MS sino que también había proteína distribuida de manera difusa y en otras, había agregados amorfos en lugar de MS (Figura 26, imagen 3 a 5).



**Figura 26. Formación de MS por la proteína sec-Mi dentro del RE.** Se transfectaron monocapas semiconfluentes de células DF-1 con plásmidos que expresan las proteínas indicadas en la parte superior de las figuras. Tras 18 h.p.t. se fijaron las células y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo policlonal contra muNS (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI.

Estos resultados nos llevaron a pensar que alguna modificación postraduccional podría estar afectando a la capacidad de muNS-Mi de formar MS en el RE. Este razonamiento estaba también apoyado por los resultados obtenidos con sec-GFP-Mi que indicaban que muNS-Mi podría estar siendo modificada mediante la

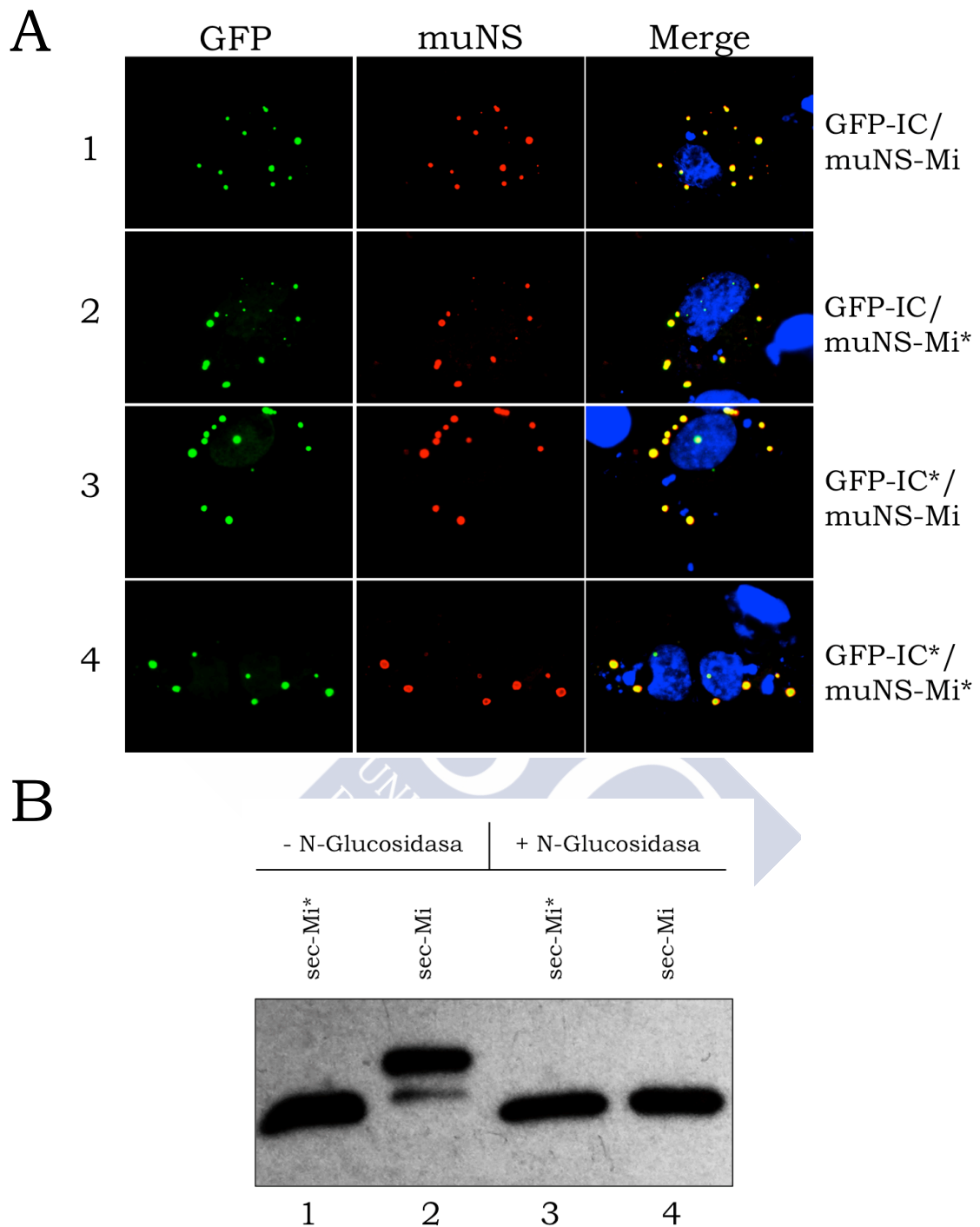
formación de enlaces disulfuro o la adición de azúcares que podrían estorbar la formación de MS en el RE. En primer lugar comprobamos que sec-Mi no sufre la formación de enlaces S-S, ya que al analizarla mediante PAGE y Western-blot en condiciones no reductoras no obtuvimos ninguna evidencia de ello (no mostrado). Por tanto decidimos analizar la secuencia de sec-Mi en busca de posibles señales de glicosilación, encontrando que las posiciones aminoacídicas 81-83 constituyen eran una diana estándar de glicosilación (Figura 27, A). Además, esta diana coincide justo en el dominio IC, que es esencial en la capacidad de agregación de muNS y no solo forma parte de muNS-Mi, sino que también constituye la etiqueta molecular base del sistema. Para comprobar si realmente se estaba glicosilando, analizamos por Western-blot las versiones citosólicas y del RE, comprobando que esta última tenía un peso molecular aparente superior a la versión citosólica. (Figura 27, comparar el carril 1 con el 2). Sin embargo, el tamaño aparente de sec-Mi disminuye claramente al ser tratada con N-Glicosidasa F (Figura 27, carril 3), mientras que la movilidad electroforética de muNS-Mi no se ve alterada en absoluto (Figura 27, comparar carriles 2 y 4).



**Figura 27. Análisis de la glicosilación de sec-Mi. A. Análisis informático de la secuencia de sec-Mi.** Se muestra en rojo la diana de glicosilación de la proteína **B. Análisis por Western-blot de la glicosilación de sec-Mi en el interior del RE.** Monocapas semiconfluentes de células DF-1 se transfectaron con plásmidos que expresan las proteínas indicadas en la parte superior de la imagen. Tras 18 h.p.t. se lisaron las células en tampón de lisis de glicosidasa y se trataron en condiciones reductoras (carriles 1-4) siendo en este caso tratadas (carriles 3 y 4) o no (carriles 1 y 2) o con el enzima N-Glicosidasa F. La detección de la proteína se realizó usando un anticuerpo contra muNS.

## **Resultados**

Estos resultados confirman que sec-Mi entra dentro del RE donde adquiere una modificación postraducciona por la incorporación de grupos glucídicos. Estos grupos suelen ser voluminosos, lo que podría afectar a la interacción de los monómeros de sec-Mi y por tanto a la formación correcta de MS. Para comprobarlo y solucionarlo, decidimos eliminar esa diana de glicosilación y comprobar si de esta forma aumentábamos la eficiencia en la formación de las MS. Para ello mutamos la Asparagina (N) en la posición 81 de sec-Mi por una Serina (S) de forma que cambiamos la secuencia NVS por SVS eliminando de esta forma la diana. Como hemos comentado, esta región es indispensable en la formación de MS y mutaciones puntuales de algunos residuos en este dominio impiden la formación de MS (Brandariz-Nuñez et al., 2010b). Con estos precedentes decidimos comprobar en primer lugar que la mutación para eliminar la diana de glicosilación no afecta a la capacidad de formar MS, para lo que en primer lugar mutamos de igual manera la versión citosólica, muNS-Mi. Añadimos un asterisco al nombre de todas las versiones que llevan la mutación puntual NVS-SVS. Además, para comprobar que la mutación tampoco influye en la incorporación de una proteína etiquetada con el IC a las MS, mutamos el IC de la proteína GFP-IC, de forma que obtenemos la versión GFP-IC\*. Al expresar estas proteínas mutadas comprobamos que tanto la versión original de muNS-Mi (Figura 28 A, paneles 1 y 3) como la versión mutada (Figura 28 A, paneles 2 y 4) poseen la capacidad de formar MS. Además tanto la proteína GFP con el IC original (Figura 28 A, paneles 1 y 2) como con la versión de IC mutado (Figura 28 A, paneles 3 y 4) se incorporan correctamente a las MS. Con estos resultados podemos afirmar que la mutación de la diana de glicosilación no bloquea la capacidad de la proteína muNS-Mi para formar MS, ni la capacidad del IC para interaccionar con las mismas. A continuación decidimos comprobar si la mutación elimina la glicosilación en sec-Mi. Los resultados obtenidos mostraron que la versión no mutada de la proteína en presencia de la N-Glicosidasa F modificaba su movilidad electroforética (Figura 28 B, comparar carriles 2 y 4). Sin embargo, en el caso de la versión mutada, encontramos que, además de que su movilidad electroforética es mayor que la de la versión no mutada (Figura 28 B, comparar carriles 1 y 2), no existe cambio en la movilidad en presencia de la enzima N-Glicosidasa F (Figura 28 B, comparar carriles 1 y 3). Estos resultados confirman que la diana mutada era en efecto funcional y que la mutación puntual la ha desactivado en sec-Mi\*.



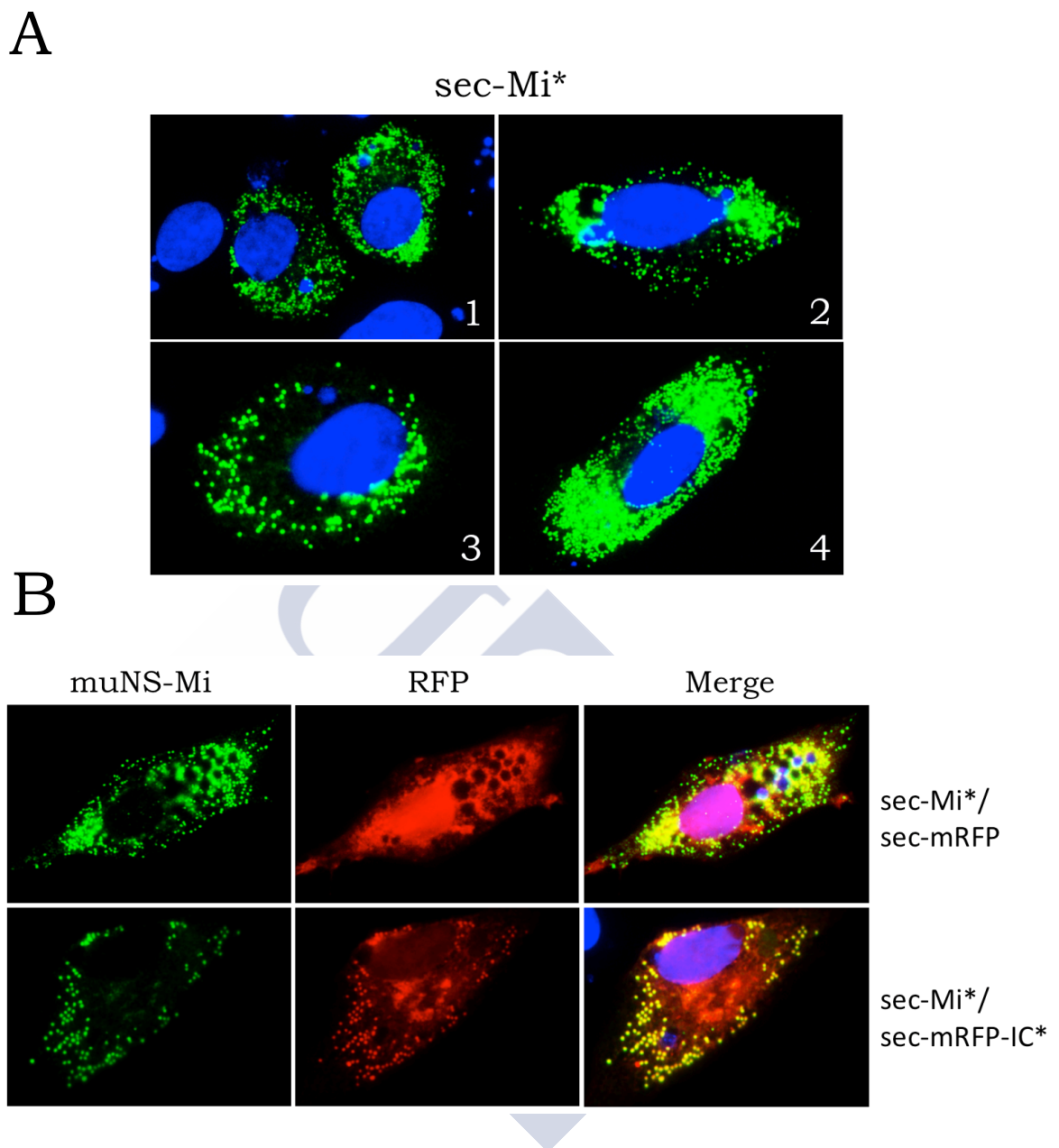
**Figura 28. Mutaciones en muNS-Mi y sec-Mi. A. Análisis por inmunofluorescencia de la capacidad de formar MS por parte de muNS-Mi\*.** Se transfectaron monocapas semiconfluentes de células DF-1 con plásmidos que expresan las proteínas indicadas en la parte derecha de la imagen. Tras 18 h.p.t se fijaron las células y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo policlonal contra muNS (rojo), la proteína etiquetada con IC se ve por autofluorescencia de GFP (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI. **B. Análisis por Western-blot de la eliminación de la diana de glicosilación en sec-Mi.** Se transfectaron células DF-1 con plásmidos de expresión para las proteínas

## **Resultados**

indicadas en la parte superior de la imagen. Tras 18 h.p.t se lisaron las células en tampón de lisis de glicosidasa y se trataron en ausencia (carriles 1 y 2) o presencia (carriles 3 y 4) de la enzima N-glicosidasa F. Las proteínas se detectaron usando un anticuerpo policlonal primario contra muNS.

El siguiente paso fue comprobar si la mutación generada aumenta la eficiencia en la formación de las MS por sec-Mi\*. A partir de este momento, todas las proteínas que se expresen en el interior del RE van a estar mutadas en la región IC, para evitar la glicosilación por lo que se les añadirá un asterisco a sus nombres. Para ello expresamos sec-Mi\* en células en cultivo y detectamos la formación de MS por inmunofluorescencia. Los resultados obtenidos mostraron que todas las células que expresaban sec-Mi\* formaban MS (Figura 29 A, imágenes 1-4) que además, son mucho más pequeñas que las formadas tanto por muNS-Mi como por sec-Mi. También se observó que en algunas células el número de MS era muy elevado, llegando a llenar totalmente el citosol (Figura 29 A, imagen 4). Esto nos indica que efectivamente la glicosilación en IC estorbaba en gran medida la formación de MS en el RE.

A continuación quisimos comprobar si el sistema funciona en el interior del RE, esto es, si podíamos cargar proteínas etiquetadas con IC dentro del RE. Para ello decidimos etiquetar en su extremo C-terminal con IC\* la proteína monomérica fluorescente roja (mRFP), a la que le añadimos una secuencia señal en el extremo aminoterminal para dirigirla al RE. Denominamos sec-mRFP-IC\* a esta construcción, que nos permite comprobar su incorporación a las MS sin utilizar anticuerpos. A continuación cotransfectamos células con los plásmidos que expresan sec-Mi\* y la proteína sec-mRFP con (sec-mRFP-IC\*) y sin etiqueta IC (sec-mRFP). Los resultados obtenidos mostraron que la proteína sec-mRFP no presentaba colocalización con las MS dentro del RE (Figura 29 B, panel superior) mientras que la versión etiquetada si colocalizaba con las MS, lo que nos indica claramente que el método funciona también en el interior del RE. Además, encontramos que no toda la mRFP se unía a las MS, posiblemente porque parte de la proteína sigue la ruta secretora hacia el aparato de Golgi (Figura 29 B, panel inferior) que se puede observar como una señal más densa próxima al núcleo.



**Figura 29. Sistema IC-Tagging en el interior del RE. A. Formación de MS.** Monocapas semiconfluentes de células DF-1 se transfectaron con plásmido de expresión para la proteína que aparece indicada en la parte superior de la imagen. Tras 18 h.p.t. se fijaron las células y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo policlonal contra muNS (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI. **B. Unión de proteínas etiquetadas a las MS.** Monocapas semiconfluentes de células DF-1 se transfectaron con plásmido de expresión para la proteína que aparece indicada en la derecha de la imagen. Tras 18 h.p.t. se fijaron las células y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo policlonal contra muNS (verde). La proteína etiquetada se detecta por autofluorescencia de la propia proteína (rojo) Los núcleos se tiñeron con DAPI.

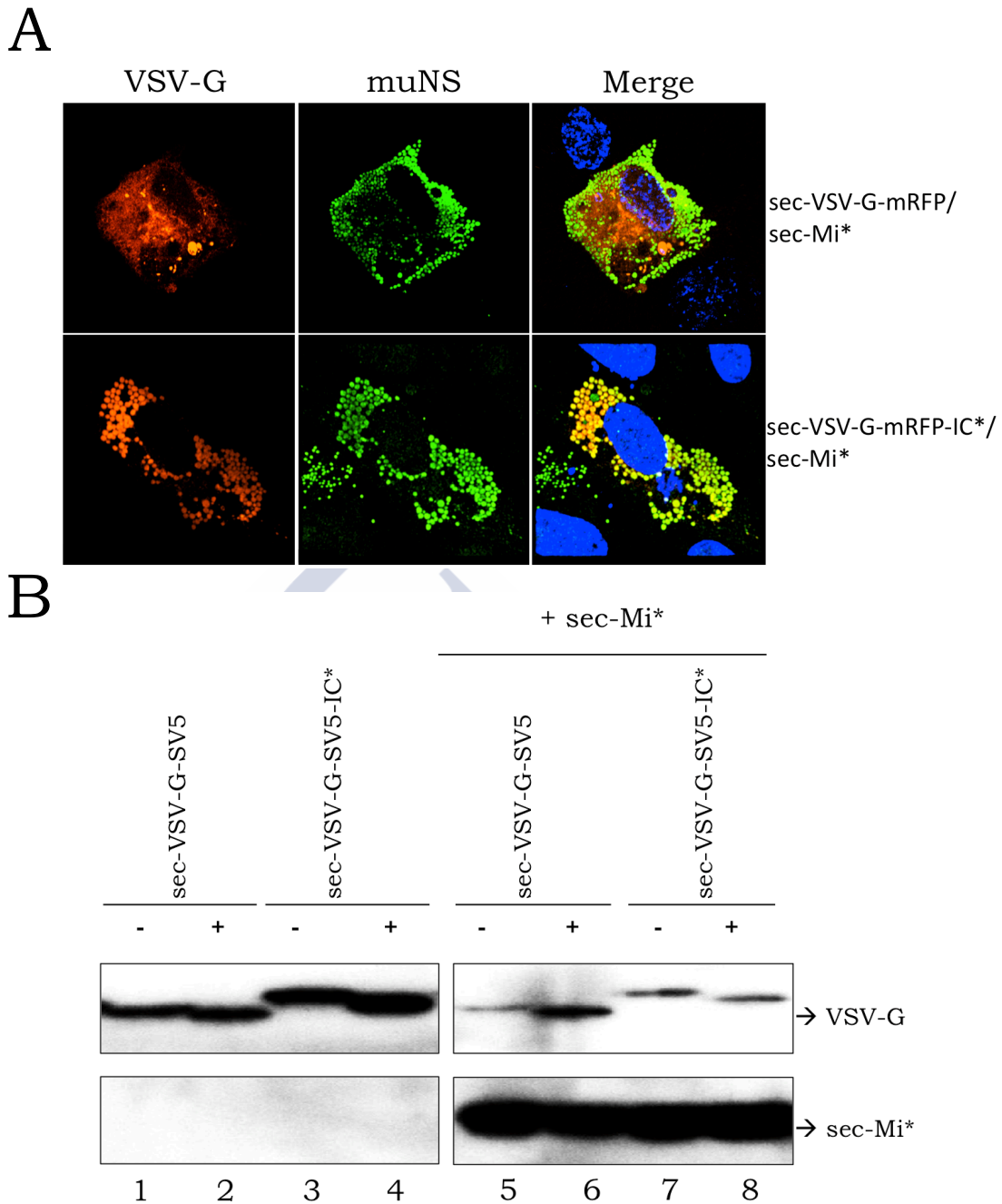
## **Resultados**

### **2.4 Unión de glicoproteínas a MS en el interior del RE**

Una de las ideas que condujeron a este trabajo fue el desarrollo de vacunas contra virus envueltos, que poseen una envoltura lipídica cargada con glicoproteínas víricas. Estas glicoproteínas adquieren los azúcares tras pasar por la ruta secretora. Nuestra idea es cargar glicoproteínas víricas en las MS del RE para imitar la superficie de estos virus y así comprobar en el futuro si, al igual que las MS citosólicas, estas funcionan bien como vacunas.

Para comprobarlo escogimos dos glicoproteínas diferentes: la glicoproteína G del Virus de la estomatitis vesicular (VSV) y la glicoproteína Gn del Virus de la Fiebre del Valle del Rift (RVFV). Para cargarlas en las MS decidimos sustituir sus respectivas regiones transmembrana por IC\* y coexpresarlas con sec-Mi\*.

Para expresar el ectodominio de la glicoproteína VSV-G en el RE utilizamos su propia secuencia señal seguida del ectodominio. Además para la detección de esta proteína por inmunofluorescencia indirecta, para evitar el uso de anticuerpos, dispusimos la proteína mRFP en su extremo carboxilo terminal, y a continuación el dominio IC\*. Además construimos otra versión de la proteína con la secuencia del epítipo SV5 en lugar de mRFP, lo que nos facilitaba su detección por Western-blot. Estas dos versiones de la glicoproteína las llamamos: sec-VSV-G-mRFP-IC\* de 87 kDa y sec-VSV-G-SV5-IC\* de 63 kDa. Una vez tenemos los plásmidos analizamos la expresión y unión de la proteína etiquetada a las MS en el interior del RE. Los estudios mediante microscopía confocal de células transfectadas mostraron que la proteína sec-VSV-G no colocalizaba con las MS (figura 30 A, panel superior), mientras que sec-VSV-G-IC\* mostraba una colocación perfecta con las mismas (Figura 30 A, panel inferior). Observando estos resultados pasamos a analizar por Western-blot si la glicoproteína se glicosilaba de igual forma cuando se asociaba con las MS. Los resultados obtenidos mostraron que el patrón de glicosilación observado es exactamente igual en ausencia de las MS, esté etiquetada con el IC\* (Figura 30 B, carriles 3 y 4) o no (Figura 30 B, carriles 1 y 2). Puede observarse como la movilidad electroforética cambia cuando la proteína se trata con N-Glicosidasa F (Figura 30 B, comparar carriles 1 con 2 y 3 con 4). Cuando observamos la glicosilación en presencia de MS (Figura 30 B, carriles 5 a 8), el patrón es exactamente igual (Figura 30 B, comparar carriles 5 con 6 y 7 con 8). Esto nos indica que la glicosilación de la proteína en las MS ocurre de igual forma que cuando la proteína está libre en el RE.



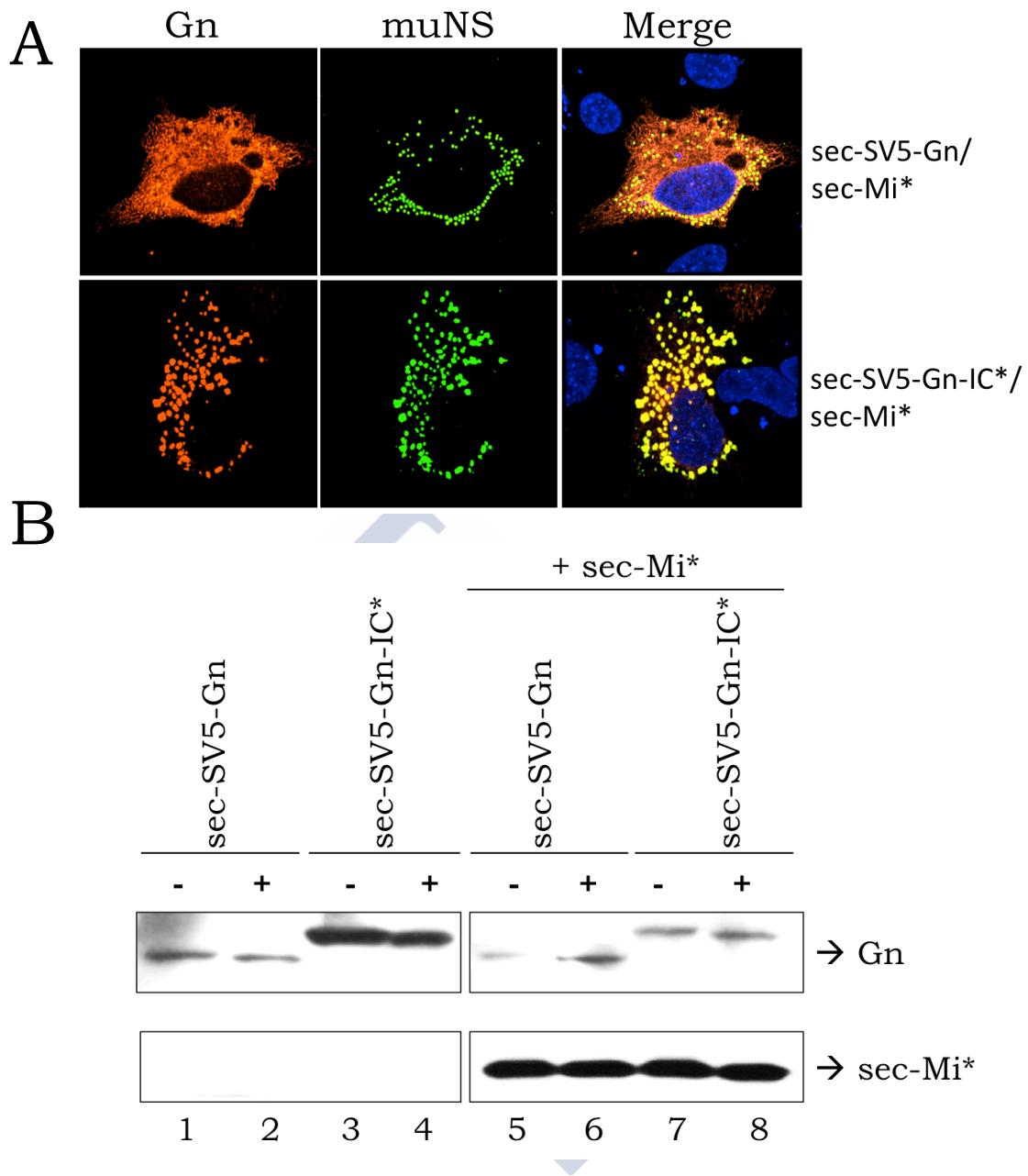
**Figura 30. Expresión y unión a MS de la proteína VSV-G en el RE. A. Análisis por microscopía confocal de la unión de la glicoproteína VSV-G a MS.** Se transfectaron monocapas semiconfluentes de células DF-1 con plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la derecha de las imágenes. Tras 18 h.p.t. fijamos las células y las sometemos a inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo policlonal contra muNS (verde) y detectando VSV-G por autofluorescencia de la proteína mRFP (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI. **B. Análisis de la glicosilación de la proteína VSV-G.** Monocapas semiconfluentes de células DF-1 se transfectaron con plásmidos que expresan las proteínas indicadas en la parte superior de la figura. Tras 18 h.p.t. se lisaron las células en tampón de lisis de glicosidasa y se trataron en condiciones de presencia (+) o ausencia (-) de N-Glicosidasa F. La detección de la proteína sec-muNS-Mi\* se realizó usando un anticuerpo policlonal contra

## **Resultados**

muNS, en cuanto a la detección de la glicoproteína VSV-G se detectó usando un anticuerpo monoclonal contra el tag SV5.

Como un segundo ejemplo de la incorporación de proteínas víricas a MS en el RE utilizamos, como hemos comentado, el ectodominio de la glicoproteína Gn del Virus de la Fiebre del Valle del Rift. Para introducir el ectodominio en el interior del RE lo que hicimos fue disponer una secuencia señal seguida del epítipo SV5 en el extremo aminoterminal de la proteína. Posteriormente añadimos el IC\* al extremo C-terminal de la proteína. En primer lugar comprobamos el nivel de expresión de la proteína y su asociación a las MS por microscopía confocal. Los resultados obtenidos mostraron que la glicoproteína Gn se expresaba en el interior del RE perfectamente, además cuando no estaba etiquetada con IC\* no mostraba colocalización con las MS (Figura 31 A, panel superior) mientras que la versión etiquetada mostró una colocalización total con las mismas (Figura 31 A, panel inferior). A continuación analizamos mediante Western-blot su patrón de glicosilación en presencia o ausencia de MS. Los resultados obtenidos mostraron que la proteína sin etiquetar presentaba un cambio en la movilidad electroforética al ser tratada con la enzima N-Glicosidasa F, tanto en ausencia (Figura 31 B, comparar carriles 1 y 2) como en presencia (Figura 31 B, comparar carriles 5 y 6) de sec-Mi\*. En el caso de la proteína etiquetada, vemos como igualmente tanto en presencia como ausencia de la proteína sec-Mi\*, Gn cambia la movilidad electroforética al ser tratada con la enzima N-Glicosidasa F (Figura 31 B, comparar carriles 3 con 4 y 7 con 8) y los patrones electroforéticos son exactamente iguales.

Los resultados obtenidos tanto con VSV-G como con Gn nos permiten afirmar que se pueden cargar glicoproteínas en las MS dentro del RE y que los patrones de glicosilación no parecen verse afectados por su inclusión en MS.

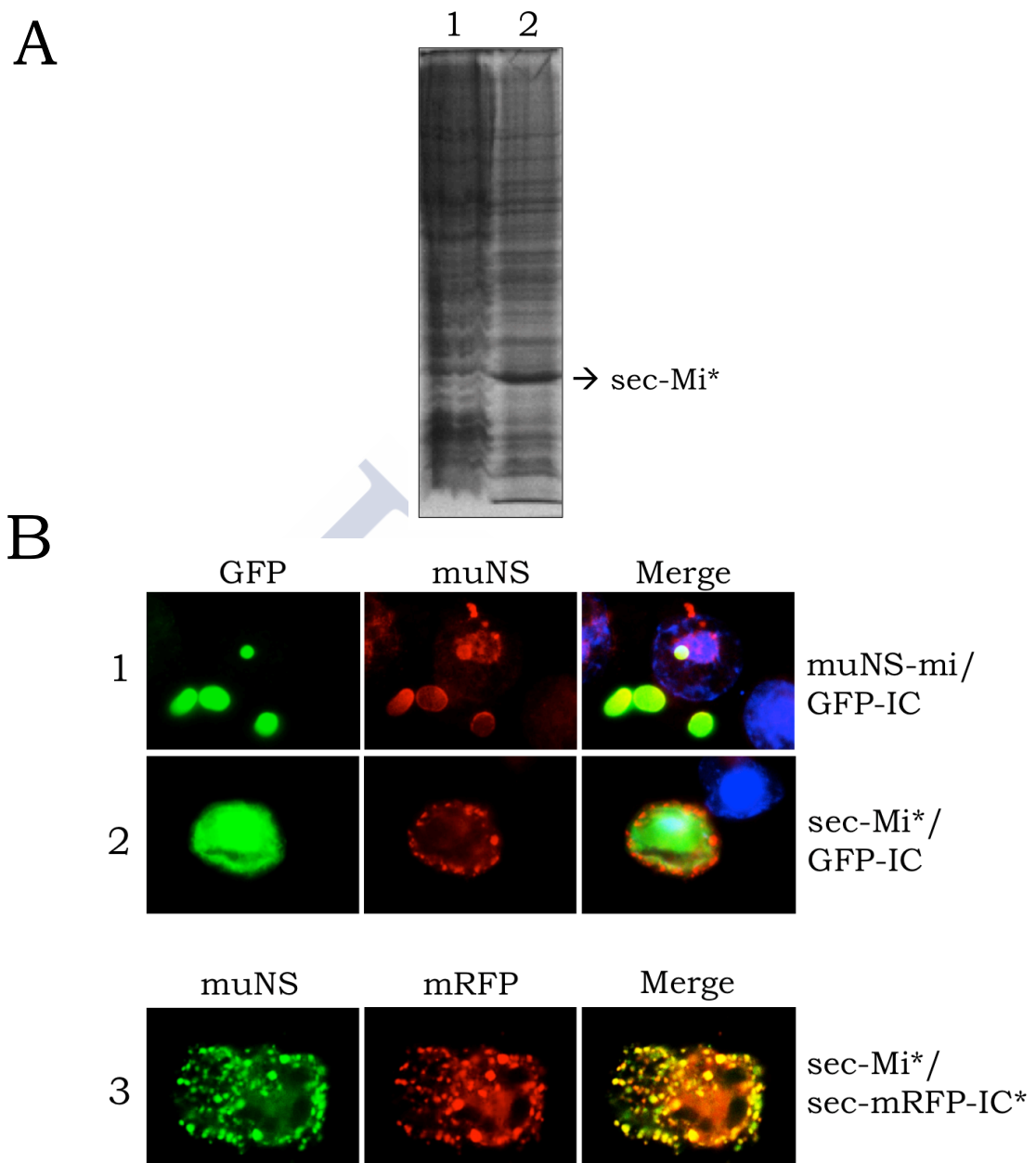


**Figura 31. Expresión y unión a MS de la proteína Gn en el interior de RE. A. Análisis por microscopía confocal de la unión de la glicoproteína a las MS en el interior del RE.** Monocapas semiconfluentes de células DF-1 se transfectaron con plásmidos que expresan las proteínas indicadas en la parte derecha de la imagen. Tras 18 h.p.t se fijaron las células y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo policlonal contra muNS para detectar las MS (verde), un anticuerpo monoclonal contra SV5 para la detección de la proteína Gn (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI. **B. Análisis por Western-blot de la glicosilación de la proteína Gn.** Monocapas semiconfluentes de células DF-1 se transfectaron con plásmido que expresan las proteínas indicadas en la parte superior de la imagen. Tras 18 h.p.t. se lisaron las células con el tampón de lisis para glicosidasa y se trataron en ausencia (-) o presencia (+) del enzima N-Glicosidasa F. Para la detección de sec-Mi\* se utilizó un anticuerpo policlonal contra muNS mientras que para la detección de Gn se utilizó un anticuerpo monoclonal contra el epítipo SV5.

## **Resultados**

### **2.5 Unión de glicoproteínas a MS en el RE - sistema de expresión de baculovirus**

Como una de nuestras intenciones era el posible desarrollo de vacunas contra virus envueltos, decidimos reproducir todo el sistema en el sistema de expresión de baculovirus y células de insecto, con objeto de producir cantidades suficientes de proteína para poder realizar ensayos de vacunación en el futuro, como se hizo con las MS citosólicas (Marín-López et al., 2014). Para este fin, en primer lugar creamos un baculovirus para expresar la proteína sec-Mi\* en células de insecto. Una vez generado el baculovirus, infectamos células Sf9 y tras 72 h.p.i. analizamos la expresión a través de inmunofluorescencia y electroforesis. Observamos que en comparación con las células infectadas con el baculovirus WT, los extractos de células infectadas con el nuevo baculovirus recombinante presentan una proteína con un peso molecular aparente de 20 kDa, que corresponde al peso de sec-Mi\* (Figura 32 A, comparar carriles 1 y 2). Al analizar las células infectadas por microscopía de fluorescencia comprobamos que mientras muNS-Mi genera unas microesferas citosólicas de un tamaño considerable y que se asocian con GFP etiquetada con el IC (Figura 32 B, 1), la proteína del interior del RE genera unas microesferas mucho más pequeñas que, al estar en un compartimento diferente, no colocaliza en absoluto con la GFP-IC (Figura 32 B, 2). A continuación coinfectamos células de insecto con los baculovirus que dirigen la expresión de sec-Mi\* y sec-mRFP-IC\* y observamos mediante microscopía confocal que la proteína etiquetada colocaliza perfectamente con las microesferas del RE (Figura 32 B, 3) al igual que lo observado con plásmidos de expresión. Estos resultados demuestran que podemos reproducir el sistema del RE usando el sistema de expresión de baculovirus y células de insecto.



**Figura 32. Sistema en el RE de células de insecto.** A. Análisis electroforético de la expresión de sec-Mi\*. Se infectaron monocapas semiconfluentes de células SF-9 con BV WT (carril 1) y BV sec-Mi\* (carril 2). Tras 72 h.p.i. recogemos las células y las lisamos. Cargamos el extracto en un gel de electroforesis y posteriormente teñimos con azul de Coomassie. B. Inmunofluorescencia de células SF-9. Se infectaron monocapas de células SF-9 con los baculovirus que expresan las proteínas indicadas a la derecha de la imagen. Tras 72 h.p.i se fijaron las células y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo policlonal contra muNS (rojo en paneles 1 y 2 verde en panel 3) y observando las proteínas etiquetadas con el IC por autofluorescencia verde (paneles 1 y 2) o roja (panel 3). Los núcleos se tiñeron con DAPI.

### **3. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DIFÍCILES**

#### **3.1 Introducción**

La obtención de proteínas de membrana tanto de eucariotas como de procariontes es un proceso extremadamente difícil. Normalmente la cantidad de estas proteínas en las células es bastante pequeña, de forma que la única manera de obtener grandes cantidades de ellas para diversas aplicaciones, como determinar su función, estructura o ser empleadas en estudios inmunológicos, pasa por su clonación en diversos vectores y la introducción de éstos en organismos que permitan expresar grandes cantidades como bacterias o levaduras. Sin embargo, la gran mayoría de estas proteínas son tóxicas una vez que se induce su sobreexpresión en distintos organismos, limitando enormemente la posibilidad de obtener cantidades apreciables de éstas.

La proteína glucosa-6-fosfatasa-2 ("Islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein", IGRP) es un antígeno importante en el desarrollo de la diabetes tipo 1 (T1D) o diabetes insulino-dependiente. En esta enfermedad, el sistema inmunitario de los pacientes diabéticos destruye específicamente las células productoras de insulina de los islotes de Langerhans pancreáticos. Para que dicha destrucción tenga lugar, los linfocitos de estos pacientes son activados por distintas proteínas o antígenos expresadas por las células productoras de insulina como son la propia insulina, la isoforma de 65 kDa de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD65), el antígeno 2 asociado a insulinoma (IA-2) o, más recientemente IGRP, antígeno que fue identificado al descubrirse que era el objetivo reconocido por un linfocito T CD8 murino altamente diabetogénico, el clon 8.3 (Lieberman et al., 2003). Más importante es el hecho de que el número de linfocitos específicos para este antígeno en sangre periférica de ratones NOD ("Non-Obese Diabetic" mice), el modelo murino de la T1D humana, es capaz de predecir el desarrollo de síntomas clínicos de la enfermedad (Trudeau, 2003) y que en el páncreas de ratones NOD diabéticos la presencia de linfocitos T CD8 específicos para este antígeno es la población más prevalente en los primeros estadios del rechazo de trasplantes de islotes (Wong et al., 2006). Además de en el ratón NOD, este antígeno es también un objetivo de la respuesta inmunitaria en pacientes diabéticos humanos (Jarchum et al., 2008), lo

que hace necesaria su producción y purificación para poder realizar, entre otras cosas, estudios de la respuesta autoinmune en pacientes diabéticos o incluso su posible uso en el futuro como vacuna que pudiese prevenir el desarrollo de la enfermedad.

La incapacidad de producir cantidades apreciables de IGRP han limitado en gran medida los estudios acerca de cuáles son los segmentos (péptidos) reconocidos durante la respuesta autoinmune, algo necesario para diseñar en el futuro posibles vacunas basadas en éstos. Además, al no tener proteína purificada no es posible comprobar en modelos animales, como el ratón NOD, la efectividad de una terapia a la hora de prevenir el desarrollo de síntomas clínicos de la enfermedad.

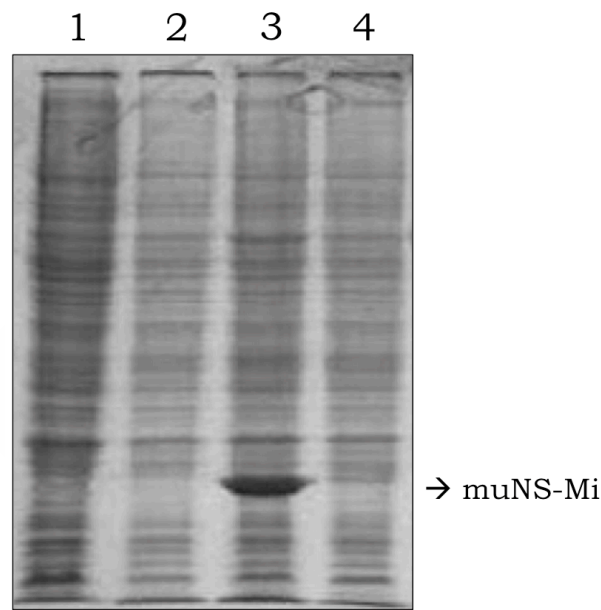
Hoy en día apenas existen publicaciones donde se mencione la expresión y purificación de esta proteína. Un trabajo mencionan haber clonado la pauta de lectura abierta correspondiente a la IGRP murina y expresado dicha proteína como una proteína de fusión con la beta-galactosidasa, indicando que la proteína se encuentra en cuerpos de inclusión que los autores dicen purificar mediante electroforesis preparativa y emplear dicha proteína para obtener anticuerpos por inmunización de conejos (Martin et al., 2001). Otro grupo de investigación describe la expresión y purificación de IGRP con el sistema de baculovirus (Petrolonis et al., 2004). En ninguno de estos trabajos se describe la producción de IGRP en cantidades significativas. Por tanto, existe la necesidad de nuevos métodos para la expresión y purificación de esta proteína.

### **3.2 Expresión de IGRP con el sistema de baculovirus**

Como nuestro método consiste en incluir proteínas etiquetadas en MS, esto podría ayudar a disminuir el efecto nocivo que pudiera presentar la expresión de una proteína citotóxica, especialmente si la citotoxicidad depende de una localización celular concreta. Por tanto decidimos utilizar nuestro sistema para intentar expresar la proteína IGRP etiquetada con el IC en su extremo aminoterminal que la reclute a las MS. Para ello generamos un baculovirus que exprese la proteína IC-IGRP, que tiene un peso molecular calculado de 50 kDa. Para comprobar la expresión de la proteína infectamos células Sf9 con el baculovirus IC-IGRP o las coinfectamos con IC-IGRP y el baculovirus de muNS-Mi. Al analizar mediante PAGE los extractos de las células infectadas, comprobamos que no había expresión alguna de IC-IGRP al

## Resultados

expresarla individualmente, ya que no aparecía ninguna banda en comparación con los extractos de las células infectadas con el baculovirus WT (Figura 33, comparar carriles 1 y 2). Es más, sorprendentemente nos encontramos con que, en la coinfección de los BV de muNS-Mi e IGRP, no solo no se expresaba en absoluto la proteína IGRP, sino que la coinfección con el baculovirus que dirige su expresión provoca la total inhibición de la expresión de muNS-Mi (Figura 33, comparar el carril 3 con el 4), lo que a su vez impide incluir la proteína tóxica en el interior de las microesferas.

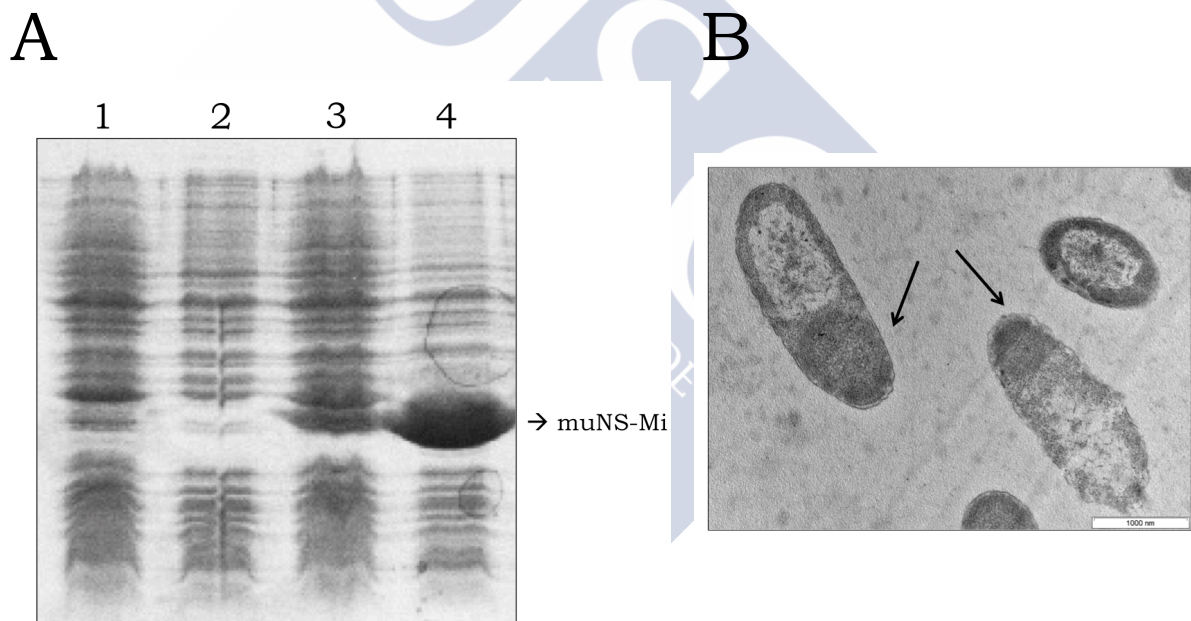


**Figura 33. Expresión de IC-IGRP en con el sistema de baculovirus y células de insecto.** Se infectaron células de insecto con los BV WT (carril 1) IC-IGRP (carril 2), muNS-Mi (carril 3) y se coinfectaron con IC-IGRP y muNS-Mi (carril 4). A las 72 h.p.i. se lisaron las células y se cargó el extracto en un gel de electroforesis que posteriormente se tiñó con azul de Coomassie. La banda correspondiente a la proteína está indicada a la derecha de la imagen.

### 3.3 Adaptación del sistema IC-Tagging a bacterias

Como el sistema de expresión de baculovirus y células de insecto parecía no servir para esta proteína, decidimos probar un sistema de expresión diferente, con células más resistentes como las bacterias, que además tienen un sistema metabólico completamente diferente. Para desarrollar el sistema en bacterias necesitamos de la expresión simultánea de dos proteínas. Por ello decidimos utilizar un plásmido de expresión Dual denominado pDuet-1 (Novagen) que presenta dos policonectores (MCS) diferentes, ambos controlados por el promotor T7. Lo primero que comprobamos fue si éramos capaces de expresar la proteína muNS-Mi en bacterias,

y si una vez expresada formaba microesferas. Para ello introdujimos la secuencia de muNS-Mi en el primer MCS del plásmido pET Duet-1. Una vez generado el plásmido, comprobamos la expresión de la proteína induciendo bacterias BL21 (DE3) Codon Plus-RP transformadas con el mismo. Tras 3 horas de inducción lisamos las bacterias y las analizamos mediante electroforesis. Los resultados obtenidos mostraron que, a diferencia de las bacterias sin plásmido donde el IPTG no inducía la expresión de proteína alguna (Figura 34 A, comparar carriles 1 y 2), las bacterias que contenían el plásmido de expresión, al ser inducidas con IPTG presentaban una banda a la altura de 20 kDa que se corresponde con el peso calculado de muNS-Mi (Imagen 34 A, comparar carriles 3 y 4). Cuando analizamos por microscopía electrónica las bacterias donde se había inducido la expresión de muNS-Mi, observamos la presencia de unas estructuras esféricas en su interior con un diámetro aproximado de 0,4  $\mu\text{m}$ , que podrían corresponder con MS, aunque mucho más pequeñas que las observadas en las células eucariotas (Figura 34 B).

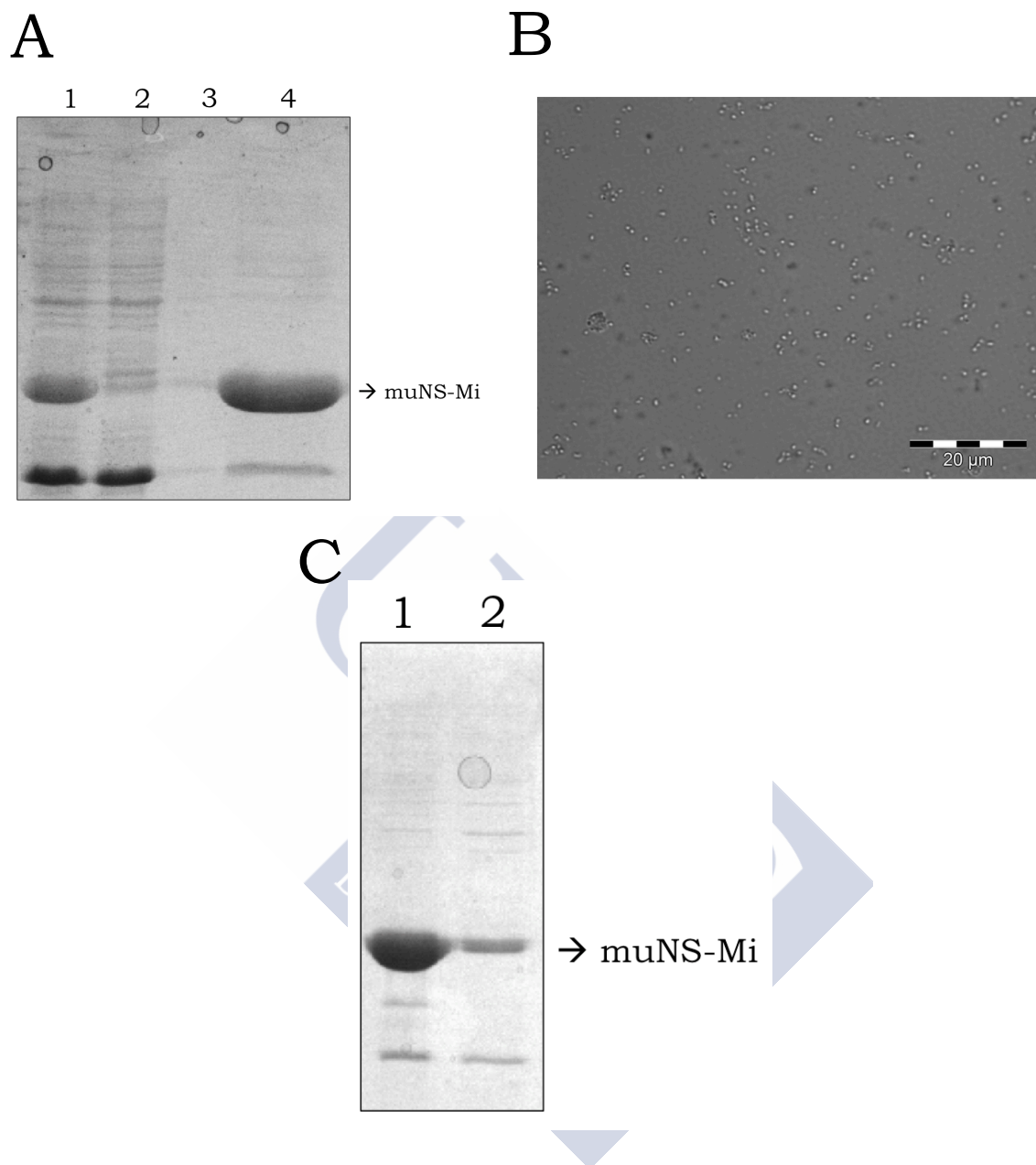


**Figura 34. Expresión de muNS-Mi en bacterias. A. Análisis electroforético de la expresión de muNS.** Bacterias transformadas (carriles 3 y 4) y no transformadas (carriles 1 y 2) con el plásmido de expresión de muNS-Mi se indujeron con IPTG durante 3 horas a 37°C en agitación. Posteriormente se lisaron y se cargó el lisado en un gel de electroforesis que se tiñó con azul de Coomassie. Las muestras inducidas están cargadas en los carriles 2 y 4. **B. Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).** Bacterias con el plásmido de expresión de muNS-Mi inducidas con IPTG. Las estructuras esféricas se señalan con flechas.

## **Resultados**

Una vez comprobamos que se formaban estructuras esféricas, pasamos a desarrollar un protocolo de purificación que nos permita aislarlas. Hicimos una adaptación del protocolo de purificación de microesferas producidas en células de insecto, teniendo en cuenta la diferencia de tamaño. Las bacterias transformadas con el plásmido de expresión correspondiente e inducidas se centrifugan. Posteriormente lisamos mediante sonicación y a continuamos se lleva a cabo una serie de centrifugaciones y lavados para finalmente aislar las microesferas (ver detalles en métodos). Los resultados obtenidos mostraron que con nuestro protocolo de purificación obtenemos un rendimiento muy bueno de proteína muNS-Mi (Figura 35 A, carril 4) y que se pierde apenas proteína en los sobrenadantes generados en el transcurso de la purificación (Figura 35 A, carriles 2 y 3). Para comprobar el aspecto del material purificado, observamos una pequeña muestra al microscopio óptico, donde pudimos comprobar la presencia de múltiples estructuras posiblemente esféricas de un tamaño menor de una micra, que coinciden con las esferas observadas en el interior de las bacterias (Figura 35, B).

A continuación, quisimos comprobar si los agregados purificados correspondían a estructuras ordenadas típicas de las microesferas formadas por muNS-Mi o por el contrario eran cuerpos de inclusión típicos de bacterias que aparecen comúnmente al sobre-expresar proteínas foráneas con plásmidos de expresión. Estudios anteriormente realizados en nuestro laboratorio mostraron que las microesferas de menor tamaño formadas en el sistema de baculovirus podían ser desmontadas cuando no existen cationes divalentes en el tampón en el que están resuspendidas. Este hecho no ocurre en el caso de cuerpos de inclusión bacterianos, cuya solubilización necesita condiciones mucho más fuertes, como altas concentraciones de urea o cloruro. De este modo, incubamos los agregados producidos en bacterias y purificados con un tampón que no presentaba cationes divalentes, al que además añadimos 0,5mM EDTA. Después de 4 horas de incubación observamos que la mayor parte de la proteína se había solubilizado (figura 35 C, carril 1). Comprobamos que incrementando el volumen de buffer y tiempo de incubación producía una solubilización completa sin necesidad de usar detergentes ni agentes desnaturizantes, demostrándose de esta forma que las estructuras esféricas que purificamos corresponden con las microesferas formadas por muNS-Mi.

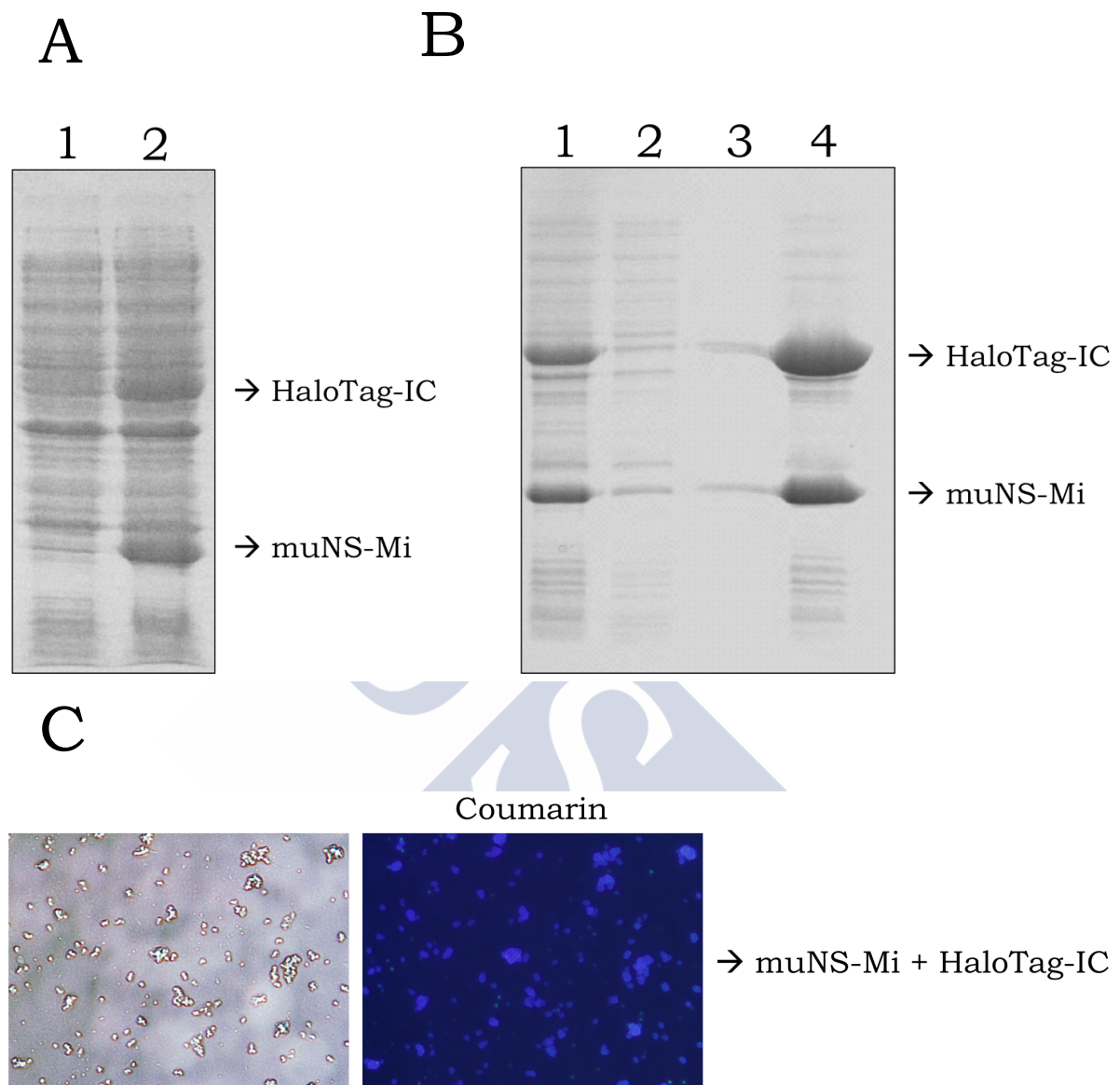


**Figura 35. Purificación de microesferas de bacterias. A. Análisis electroforético de la purificación.** Una vez inducidas las bacterias, las lisamos por sonicación y cogemos una muestra del extracto total (carril 1). Una vez sonificado centrifugamos a 2700xg durante 5 min a 4°C y cogemos una muestra del sobrenadante (carril 2). El pellet se resuspende en TRB+ con 0,5% Triton X-100, se vuelve a centrifugar y se coge una muestra del sobrenadante (carril 3). Se repite el paso anterior 5 veces y el pellet final se resuspende en 1/10 del volumen inicial (carril 4). El gel se tiñó con azul de Coomassie. La posición de la proteína está indicada a la derecha de la imagen. **B. Imagen de microscopía óptica de las estructuras purificadas.** Se muestra la barra de la escala en la parte inferior derecha de la imagen. **C. Análisis electroforético de las MS desmontadas.** Los agregados purificados se incubaron en TRB- con 0,5mM de EDTA durante 4 h a 4°C en agitación. A continuación se centrifugó a 2700xg durante 5' a 4°C y se separó el sobrenadante (carril 1) del pellet (carril 2) que se resuspendió en un volumen igual a la inicial. El gel se tiñó con azul de Coomassie. La posición de la proteína aparece indicada a la derecha de la imagen.

## **Resultados**

A continuación nos dispusimos a comprobar si la etiqueta IC también dirige la relocalización de las proteínas etiquetadas en las células procariotas. Para ello decidimos introducir la secuencia del dominio HaloTag (Urh, 2013), etiquetado en su extremo carboxilo terminal, en el segundo polilinker del plásmido pETDuet 1.muNS-Mi. La inducción con IPTG de las bacterias transformadas con el plásmido dual recombinante mostraron la expresión de dos bandas que corresponden con el peso molecular esperado de ambas proteínas (Figura 36 A, carril 2). A continuación comprobamos que tanto muNS-Mi como la proteína etiquetada HaloTag-IC se purifican conjuntamente (Figura 36 B, carril 4), mostrando que existe una asociación entre la proteína etiquetada con IC y las microesferas. Para comprobar si la proteína incluida en la microesfera conservaba su función, incubamos la muestra purificada con ligando de HaloTag marcado con cumarina. Así comprobamos que las microesferas que contenían HaloTag brillaban en azul debido a la unión de su ligando (Figura 36 C), mientras que las microesferas formadas únicamente por muNS-Mi no mostraban ninguna asociación con el ligando (resultados no mostrados).





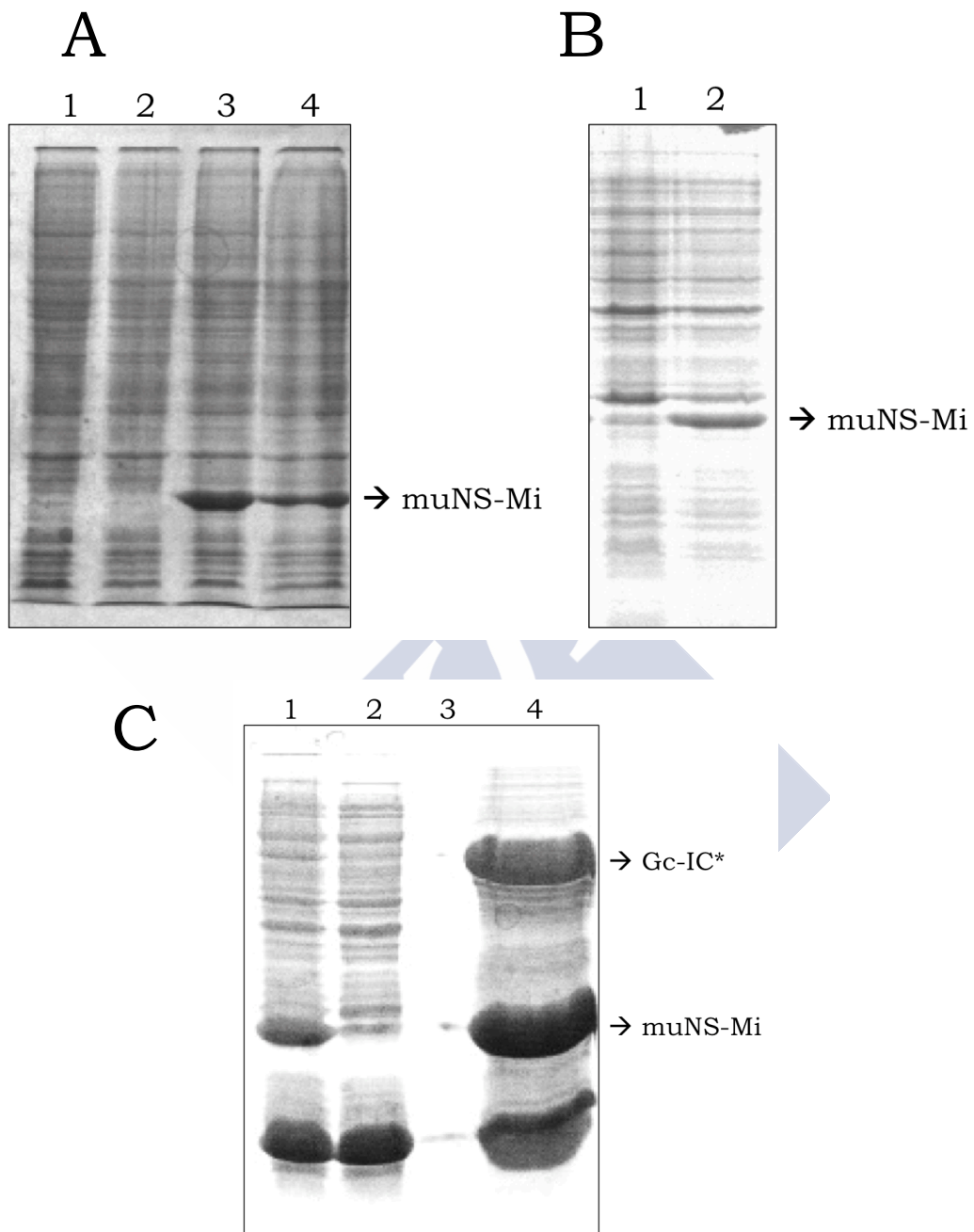
**Figura 36. Expresión de la proteína HaloTag-IC en microesferas. A. Análisis electroforético de la coexpresión de muNS-Mi y HaloTag-IC.** Bacterias BL21 transformadas con el plásmido de expresión dual que dirige la expresión de muNS-Mi y HaloTag-IC se indujeron (carril 2) o no (carril 1) con 1mM de IPTG durante 3 h en agitación a 37°C. La posición de las dos proteínas se indica en la parte derecha de la imagen. El gel se tiñó con azul de Coomassie. **B. Purificación de muNS-Mi y HaloTag-IC.** A partir de extractos similares a los mostrados en y carril 2 de A, se purificaron MS siguiendo el método descrito en la figura anterior. En el gel se cargaron cantidades similares del extracto total de las bacterias (carril 1), el sobrenadante después del lisado (carril 2), el sobrenadante del primer lavado (carril 3) y por último las MS purificadas (carril 4). **C. Análisis de microscopía de fluorescencia la presencia de HaloTag funcional en las MS.** Las microesferas purificadas como en B se incubaron en TRB+ con 100  $\mu$ M de Cumarina-ligando de HaloTag a 30 min, en oscuridad y en agitación. Transcurrido ese tiempo se centrifugaron a 2700g durante 5 min y se lavaron 1 vez con TRB+. A continuación se tomaron fotos con el microscopio óptico (izquierda) y de fluorescencia (derecha).

## **Resultados**

### **3.4 Expresión de proteínas difíciles o tóxicas**

Una de las glicoproteínas del virus de la fiebre del valle del Rift (RVFV), denominada Gc, se expresa en el interior del RE, donde sufre una serie de modificaciones propias de este orgánulo. En nuestro laboratorio y otros hemos intentado expresar Gc en el citosol, pero hemos sido incapaces. En la bibliografía hemos encontrado varias publicaciones que muestran su expresión en el interior del RE, pero en ningún caso en el citosol. Tras haber intentado su expresión mediante métodos convencionales (baculovirus, bacterias), intentamos expresar esta proteína en el citosol utilizando el sistema IC-Tagging mediante el sistema de expresión de baculovirus y células de insecto. Para ello generamos un baculovirus que dirija la expresión de esta proteína etiquetada con IC. Una vez generado el baculovirus, probamos, bien a expresar la proteína sola, o a coexpresarla con muNS-Mi. Para ello infectamos o coinfectamos células Sf9 con los baculovirus correspondientes y tras 3 d.p.i se lisaron las células y se analizaron por electroforesis tiñendo posteriormente con azul de Coomassie. Los resultados mostraron que la infección con el baculovirus Gc-IC\* no presentaba la aparición de ninguna banda de expresión de la proteína (Figura 37 A, carril 2) en comparación con la infección del baculovirus WT (Figura 37 A, carril 1). La coinfección con el baculovirus muNS-Mi no producía expresión de Gc-IC\* a pesar de que muNS-mi sí se estaba expresando (Figura 37 A, carril 4). Al ser una proteína destinada al RE, pudiera suceder que las modificaciones postraduccionales de alguna manera la estabilicen, o las chaperonas del RE induzcan su plegamiento correcto, mientras que en el citosol esto no ocurra correctamente. Aunque no habíamos tenido éxito en los intentos de expresión de la proteína sola en bacterias, dado que las características y metabolismo procariota es radicalmente diferente en muchos aspectos al de las células eucariotas, decidimos probar si el sistema IC-Tagging en bacterias nos permitía expresar Gc. Para ello generamos un plásmido de expresión dual donde expresemos tanto muNS-Mi como Gc-IC. Posteriormente comprobamos la expresión induciendo bacterias BL21. Observamos que, además de la banda que corresponde a muNS-Mi, no existía la presencia de ninguna banda en las bacterias inducidas que corresponda con Gc-IC\* (Figura 37 B, carril 2). A pesar de no ver expresión de la proteína etiquetada, probamos a hacer una expresión en un volumen mayor, purificar y comprobar si al concentrar las microesferas podemos detectar la expresión de la otra proteína. Cuando analizamos la purificación mediante un gel de acrilamida observamos la aparición de una banda

muy notable con un peso molecular que corresponde con el de Gc-IC\* de aproximadamente 60 kDa (Figura 37, carril 4).

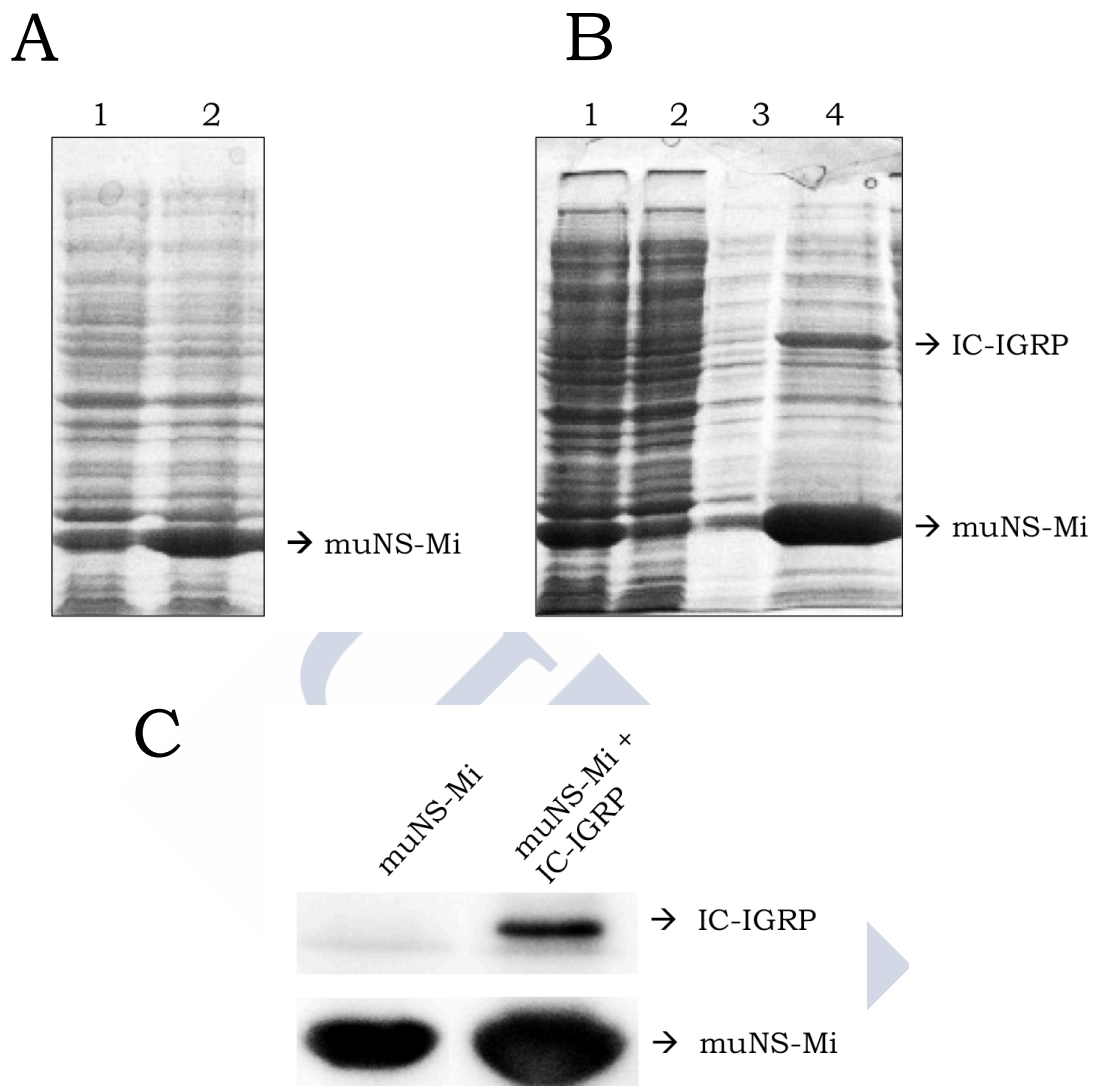


**Figura 37. Expresión de Gc-IC en diferentes sistemas de expresión. A. Análisis electroforético de la expresión de Gc-IC con baculovirus.** Se infectaron células Sf9 con los siguientes baculovirus: WT (carril 1), Gc-IC (carril 2), muNS-Mi (carril 3) y Gc-IC + muNS-Mi (carril 4). Tras 3 d.p.i se lisaron las células y se analizaron mediante electroforesis. Las posiciones correspondientes a las dos proteínas se indican en la derecha de la imagen. **B. Análisis electroforético de la expresión de Gc-IC en bacterias.** Se indujeron (carril 2) o no (carril 1) bacterias BL21 con 1mM de IPTG durante 3 h a 37°C en agitación. Transcurrido ese tiempo se recogieron y lisaron las bacterias para analizar por electroforesis. Las posiciones

## **Resultados**

correspondientes a las proteínas se indican a la derecha de la imagen. **C. Análisis electroforético de la purificación de muNS-Mi y Gc-IC en bacterias.** Extractos de bacterias inducidas se purificaron siguiendo el mismo protocolo descrito en la figura 30. El gel de se tiñó con azul de Coomassie. Las muestras cargadas corresponden al extracto total de las bacterias (carril 1), el sobrenadante después del lisado (carril 2), el sobrenadante del primer lavado (carril 3) y por último el material purificado.

Viendo que nuestro sistema servía para expresar y purificar una proteína cuya expresión por métodos convencionales resulta complicada, quisimos comprobar si podíamos utilizarlo para expresar la proteína de membrana IGRP cuya expresión provocaba el bloqueo de la expresión de muNS-Mi en células de insecto. Lo primero fue generar un plásmido dual de expresión en bacterias para expresar conjuntamente muNS-Mi y IC-IGRP. A continuación comprobamos si existía expresión induciendo las bacterias transformadas con dicho plásmido. En principio no observamos la aparición de ninguna banda que corresponda a IC-IGRP; sin embargo, al contrario de las células Sf9, en este caso sí encontramos que había expresión de muNS-Mi (Figura 38 A, carril 2). Decidimos entonces purificar las microesferas y concentrarlas para comprobar si podíamos detectar la expresión de IC-IGRP. Cuando analizamos las MS purificadas, encontramos que además de la banda de muNS-Mi, aparecía una banda a la altura del peso molecular que corresponde a IC-IGRP (Figura 38 B, carril 4). Para comprobar si dicha banda corresponde con la proteína etiquetada, decidimos analizar mediante Western-blot utilizando un anticuerpo contra muNS que detectó esa banda de 50 kDa, lo que indicaba que se trataba de IC-IGRP. Para confirmarlo definitivamente, lavamos el gel varias veces con agua Milli-Q. Posteriormente cortamos la banda del gel de acrilamida y la analizamos mediante espectroscopia de masas CID/ETD, que os permitió obtener la secuencia de varios péptidos correspondientes a la proteína IGRP.



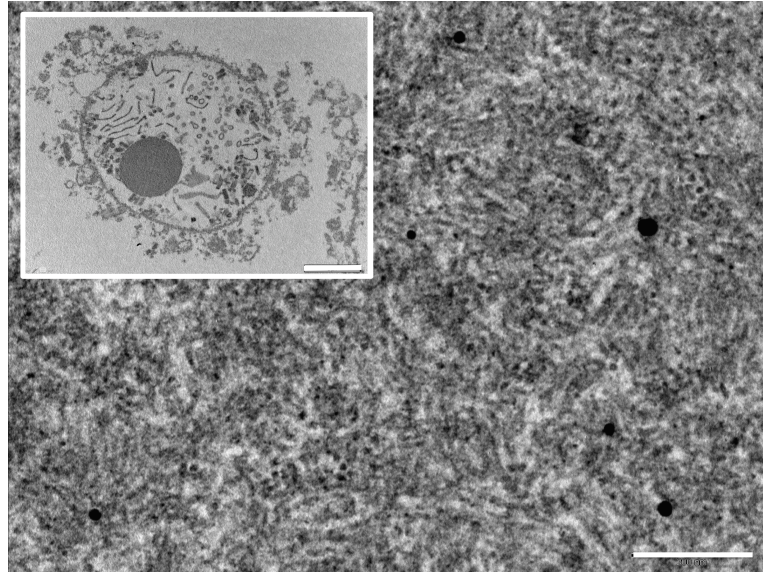
**Figura 38. Análisis electroforético de la expresión de IC-IGRP en bacterias. A. Prueba de expresión.** Bacterias transformadas con el plásmido de expresión dual se indujeron con 1mM de IPTG durante 3 h a 37°C en agitación. Posteriormente se lisaron las bacterias y se analizaron mediante electroforesis que se tiñó con azul de Coomassie. Observamos las bacterias no inducidas en el carril 1 y las inducidas en el carril 2. Las bandas correspondientes a las proteínas se indican a la derecha de la imagen. **B. Purificación de muNS-Mi + IC-IGRP.** Bacterias inducidas se purificaron siguiendo el mismo protocolo descrito en la figura X. El gel de se tiñó con azul de Coomassie. Observamos el extracto total de las bacterias (carril 1), el sobrenadante después del lisado (carril 2), el sobrenadante del primer lavado (carril 3) y por último el purificado concentrado 10 veces el volumen inicial y desmontado con 10% SDS durante 15 min a RT. **C. Western-blot de la purificación de muNS-Mi+IC-IGRP.** Muestras de purificaciones de muNS-Mi y muNS-Mi + IC-IGRP desmontadas con 10% de SDS. Para detectar ambas proteínas se utilizó un anticuerpo policlonal primario contra muNS. Los plásmidos de expresión utilizados están indicados en la parte superior de la imagen y las proteínas están indicadas a la derecha de la imagen.

### **4. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS MS**

Con el objeto de conocer a fondo el funcionamiento de nuestro método, para poder así sacarle el mayor partido posible, nos propusimos obtener la mayor cantidad de información estructural posible de muNS-Mi, de su ensamblaje en microesferas y de cómo se asocian las proteínas etiquetadas con IC a ellas.

#### **4.1 Observación al TEM de secciones de MS producidas en baculovirus**

En primer lugar nos propusimos ver qué aspecto presentaban al microscopio electrónico secciones de MS obtenidas con el sistema de baculovirus. Para ello, células Sf9 incubaron durante siete días tras haber sido infectadas con el baculovirus que expresa muNS-Mi, se centrifugaron y fijaron con glutaraldehído, tras lo cual se incluyeron en EPON, se hicieron cortes ultrafinos que se observaron al microscopio electrónico. En las imágenes obtenidas parecen observarse haces de fibras que se disponen en varias orientaciones en el espacio (Figura 39), aunque tampoco permiten sacar demasiadas conclusiones. La observación de esferas que contenían una proteína etiquetada no fue concluyente a la hora de inferir cómo se asocian las proteínas etiquetadas a las MS (no mostrado). Se generaron también MS conteniendo metalotioneína y tras incubarlo con oro (Risco et al., 2012) se observaron sin contrastar con objeto de visualizar posibles clústeres de oro que nos indicasen las posiciones de la proteína etiquetada, pero desafortunadamente no fuimos capaces de detectar nada reseñable (no mostrado).

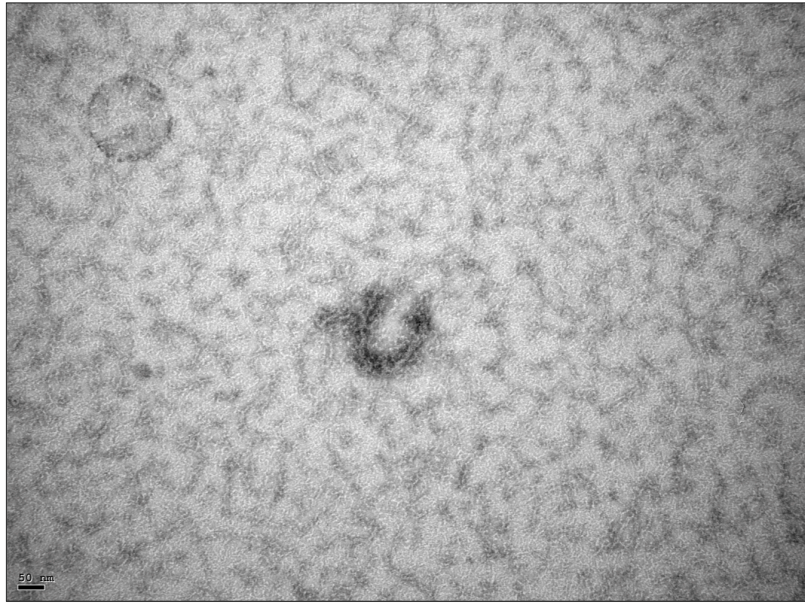


**Figura 39. Microscopia electrónica de transmisión de las MS.** Secciones de células Sf9 conteniendo MS (ver texto). Las imágenes muestran una célula completa conteniendo una MS (imagen superior izquierda) la barra blanca corresponde a 2  $\mu\text{m}$ . La imagen más ampliada corresponde a un corte de la MS (imagen grande) la barra blanca corresponde a 200 nm.

#### **4.2 Intento de obtención de la estructura tridimensional de muNS-Mi**

Como hemos comentado en la sección 3.3, somos capaces de producir muNS-Mi en gran cantidad y podemos solubilizarla retirándole los iones divalentes. Nos pusimos en contacto con los doctores Mark van Raaij y Carmen San Martín (CNB-CSIC Madrid), para intentar resolver su estructura mediante las técnicas de cristalografía de rayos X y/o reconstrucción de partícula única por cryo-EM. La cristalografía fue imposible ya que la proteína tenía una fuerte tendencia a agregarse al concentrarla, lo que imposibilitaba la formación de cristales. La observación al EM de la proteína concentrada produjo imágenes que mostraban unas estructuras en forma fibrosa (Figura 40), pero no eran lo suficientemente regulares para poder obtener información estructural detallada.

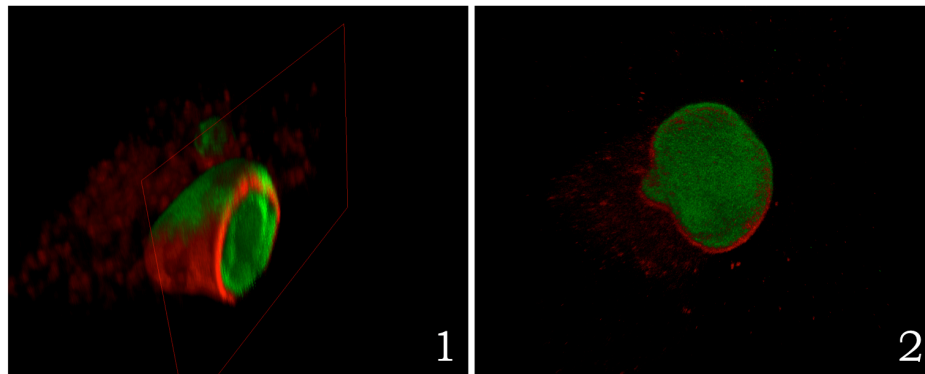
## Resultados



**Figura 40. TEM de la proteína concentrada.** La proteína expresada en bacterias tiende a agregarse lo que impide la formación de cristales. La imagen muestra lo que observamos haciendo microscopía electrónica de transmisión de la proteína concentrada.

### 4.3 Estudio de la distribución de las proteínas etiquetadas en el interior de las MS mediante microscopía de super-resolución

Para obtener información sobre la distribución que las proteínas etiquetadas con IC tienen en las MS, nos propusimos detectar la proteína verde fluorescente etiquetada por microscopía de super-resolución. Para ello cotransfectamos células Vero simultáneamente con los plásmidos que dirigen la expresión de muNS-Mi y GFP-IC. Tras 24 horas de incubación, las células se fijaron y la proteína muNS se detectó mediante inmunofluorescencia indirecta y las muestras se observaron en un microscopio de super-resolución STED (en colaboración con el Dr. Francisco Rodríguez CNB-CSIC, Madrid). Como puede verse en la Figura 41, GFP-IC se distribuye por todo el volumen de la esfera, no solo en la superficie, sino que forma parte de toda la estructura de la esfera. Esto está en consonancia con nuestros resultados al purificar proteínas asociadas a esferas, donde habitualmente encontramos una relación 1:1 entre muNS-Mi y la proteína etiquetada. El anticuerpo contra muNS solo marca la corteza exterior de la esfera. Esto se debe a que las muestras se fijaron antes del marcaje y el anticuerpo es incapaz de acceder al interior.



**Figura 41. Microscopia de super-resolución de las MS.** Se transfectaron monocapas de células Vero con plásmidos de expresión para las proteínas muNS-Mi y GFP-IC. Tras 18 h.p.t. se fijaron las células y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo policlonal contra muNS (rojo) y observando GFP-IC por autofluorescencia de la propia proteína (verde). Las muestras se observaron en un microscopio de super-resolución. La imagen 1 muestra una reconstrucción en 3D de la microesfera mientras que en la imagen 2 observamos un corte transversal de la misma.







**DISCUSIÓN**



## **1. DESARROLLO DE SENSORES BASADOS EN EL REENSAMBLAJE DE FRAGMENTOS DE GFP UTILIZANDO EL SISTEMA IC-TAGGING.**

La idea del reensamblaje de EGFP o de otras proteínas fluorescentes para estudiar la interacción entre proteínas, se basó en los ensayos de complementación de biomoléculas fluorescentes. Estos utilizaban cremalleras antiparalelas de leucina dispuestas de tal forma que inducen el reensamblaje de la molécula fluorescente (Figura 42). Además, estas cremalleras de leucina presentan una serie de residuos ácidos y básicos que favorecen la heterodimerización, y otros que impiden la homodimerización. Las cremalleras se unen a los fragmentos de EGFP a través de un conector que presenta un número de residuos tal que permite la flexibilidad necesaria para un buen acoplamiento (Ghosh et al., 2000; Kodama y Hu, 2012).

Uno de los objetivos de este trabajo fue la adaptación de esta estrategia de reensamblaje de EGFP a partir de versiones truncadas para intentar crear un sensor de retrotranslocación de proteínas del retículo endoplasmático. En nuestro caso los fragmentos de EGFP no estaban unidos a cremalleras de leucina, sino que se aproximaban a través de la relocalización provocada por nuestro método IC-Tagging. De esta manera, la reclusión de los fragmentos en MS no solo serviría para forzar el re-ensamblaje de EGFP, sino también para concentrar la señal fluorescente en las MS, proporcionando así un resultado claro, nítido e inequívoco. En primer lugar intentamos etiquetar uno de los fragmentos con el IC mientras que el otro estaba fusionado a muNS-Mi de forma que cuando el IC se une a las MS, provoca que ambos fragmentos se acerquen para la reconstrucción de la proteína fluorescente. Los resultados que obtuvimos mostraron que no existía reensamblaje, bien porque la unión del IC a la inclusión no permite que los fragmentos queden lo suficientemente cercanos para interactuar, que la fusión de uno de los fragmentos a muNS-Mi estorbe al plegamiento del fragmento o a la interacción con su complementario, o al conjunto de todas esas causas. Lo siguiente que intentamos fue etiquetar los dos fragmentos con la región IC y enviarlos conjuntamente a las MS formadas por muNS-Mi. En este caso si encontramos reensamblaje cuando en una de las construcciones etiquetadas con el IC disponíamos un linker entre el fragmento de EGFP y el IC de forma que dábamos más flexibilidad a la molécula. Sin embargo encontramos que la eficiencia en el reensamblaje era muy baja. Esto puede deberse a varias causas, la

## **Discusión**

primera de ellas apunta nuevamente a la falta de cierta flexibilidad, ya que al ponerle un conector a uno de los fragmentos posibilita el re-ensamblaje, probablemente la eficiencia mejorase al ponerle un conector al otro fragmento. La optimización de la longitud y composición aminoacídica de los conectores podría también mejorar la eficiencia. Hay que considerar también la posibilidad de que la expresión de alguna de las construcciones resulte tóxica para la célula, porque sus niveles de expresión son muy bajos y mejoran al incluirse en MS. Entonces, cambiando los reactivos de transfección y/o las líneas celulares empleadas pudiéramos mejorar la eficiencia del sistema. La optimización total de este sistema sensor no se optimizó por la falta de financiación para este tema concreto y la pérdida del interés original de nuestros colaboradores al obtener unas eficiencias tan bajas de reconstitución.

## **2. ADAPTACIÓN DEL SISTEMA IC-TAGGING PARA EL INTERIOR DEL RE**

Gracias a la metodología IC-Tagging somos capaces de producir gran cantidad de MS muy estables y fácilmente purificables (Barreiro-Piñeiro et al., 2016). Además, es un método que puede ser potencialmente utilizado para diferentes aplicaciones desde la producción e inmovilización de enzimas para uso industrial, concentración de componentes de complejos de multiproteínas, etc. (Brandariz-Nuñez et al., 2010a; Brandariz-Nuñez et al., 2010c; Brandariz-Nuñez et al., 2011). Estudios recientes han demostrado que este material particulado también puede ser utilizado como vacunas con actividad adyuvante intrínseca (Marín-López et al., 2014). Muchas de las ventajas de las MS como vacunas sobre otros métodos conocidos, como por ejemplo las VLPs (virus like particles), es su falta de limitaciones estructurales, el método simple de purificación, la alta estabilidad y la capacidad de cargar proteínas virales no estructurales, que no forman parte de la cápside viral. Las proteínas no estructurales de los virus están normalmente más conservadas que las estructurales (componentes de las partículas virales), y en algunos casos producen una respuesta inmune más amplia contra diferentes serotipos del virus (Marín-López et al. manuscrito en preparación). En el caso concreto de BTV y AHSV, la protección que confieren la vacunación con VLPs es específica de serotipo (Dennis et al., 2018). En este estudio generamos MS cargadas con glicoproteínas en el interior del RE, que pueden ser usadas para múltiples aplicaciones. Teniendo en cuenta los resultados de estudios anteriores, una de las aplicaciones más llamativas de las MS del RE es

el desarrollo de vacunas subunitarias contra virus envueltos. El desarrollo de vacunas subunitarias contra virus envueltos es un reto debido a la presencia de glicoproteínas virales en la envoltura lipídica de estos virus. Por lo tanto estas glicoproteínas de la envoltura deben ser coexpresadas con proteínas estructurales para producir VLPs envueltas contra estos virus (Metz et al., 2013). Como alternativa, en particular para el virus influenza, se ha publicado la producción de “virosoomas” vacíos, vesículas de membrana que provienen de la separación de la envoltura viral de virus purificados reales, eliminando la cápside proteica viral y el genoma (Wilschut, 2009). Sin embargo, ni las VLPs o virosoomas son una solución práctica para la producción industrial de vacunas contra esos virus, ya que son difíciles de generar, no son fáciles de purificar y la presencia de lípidos de membrana hace que sean inestables para su almacenamiento. En este trabajo mostramos la formación de MS dentro del RE y como estas pueden ser cargadas con glicoproteínas, estableciendo las bases para su uso en la producción de vacunas subunitarias particuladas contra virus envueltos de forma simple y efectiva, así como otras aplicaciones diferentes que puedan necesitar el uso de glicoproteínas. La expresión inicial de sec-Mi dentro del RE produjo inicialmente dos tipos de agregados, por un lado tenemos la formación de MS pequeñas y regulares y por otro la formación de agregados más irregulares. Detectamos que sec-Mi adquiere una glicosilación cuando se expresa en el interior del RE, y que la diana de glicosilación está situada en el dominio IC, que forma parte de muNS-Mi y que actúa como etiqueta molecular en la metodología IC-Tagging. Una mutación puntual de una asparagina por una serina (NVS-SVS) elimina completamente la glicosilación, restaurando la capacidad de sec-Mi para formar MS dentro del RE. Por otro lado, esta mutación no tiene efectos negativos en el sistema IC-Tagging ya que, como hemos demostrado, tanto la versión mutada como la wild-type de muNS-Mi son capaces de capturar sin ningún tipo de diferencia proteínas etiquetadas tanto con IC mutado como con el wild-type. Usando una versión de la proteína fluorescente roja (mRFP) que se translocaba al interior del RE (sec-mRFP), hemos demostrado que podemos cargar proteínas en las MS dentro del RE etiquetándolas con el IC. La forma salvaje de sec-Mi está completamente glicosilada en el interior del RE lo que ya demuestra que la glicosilación y la inclusión en MS del RE son compatibles. Sin embargo, hemos demostrado que podemos cargar en las MS ectodominios etiquetados con el IC, de dos glicoproteínas (Gn de RVFV y VSV-G) observando que están completamente glicosiladas. Además, el nivel de glicosilación observado es independiente de la presencia o ausencia de un exceso de sec-Mi\*,

## **Discusión**

indicando que la inclusión en las MS no afecta al grado de glicosilación de la proteína etiquetada con el IC, al menos en el caso de estas dos glicoproteínas.

### **3. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DIFÍCILES**

La proteína IGRP es un importante antígeno en el desarrollo de la diabetes tipo 1 (TD1) en humanos, enfermedad donde el sistema inmune del paciente destruye específicamente las células que producen insulina en los islotes de Langerhans (Jarchum et al., 2008). Por lo tanto, es importante su producción y purificación con el fin de llevar a cabo estudios de respuesta autoinmune en pacientes diabéticos o incluso es posible su uso como vacuna tolerogénica que pueda prevenir el desarrollo de TD1. La incapacidad para producir cantidades apreciables de IGRP ha limitado estos estudios.

Apenas existen publicaciones que mencionen la expresión y purificación de estas proteínas, y en ningún caso la proteína producida se muestra en cantidades apreciables. En uno de estos estudios (Martin et al., 2001), los autores mencionan que han clonado y expresado la proteína IGRP murina fusionada a la  $\beta$ -galactosidasa. Aunque los autores afirman purificar IGRP para obtener anticuerpos para la inmunización de conejos, no mostraron ninguna prueba de la expresión y/o purificación. La mayoría de los estudios usaron la expresión transitoria en diferentes líneas celulares para determinar los elementos genómicos que controlan la expresión del gen o para determinar la hipotética actividad enzimática de la proteína, pero sin realizar ningún intento de purificación ni mostrar ningún nivel de expresión.

Ninguno de los estudios realizados han podido detectar un aumento de actividad fosfatasa debida a IGRP, con la excepción de uno de ellos donde los autores afirman haber expresado y posteriormente purificado IGRP usando el sistema de expresión en baculovirus, indicando que la proteína presenta actividad fosfatasa (Petrolonis et al., 2004). Los autores muestran un análisis por Western-blot usando anticuerpos contra histidinas y sin mostrar un gel teñido, para demostrar la expresión de IGRP, lo que indica que el nivel de expresión y purificación usando este sistema debe ser muy bajo. En el estudio también se indica que sus diversos intentos de purificar la proteína produjeron una pérdida de la actividad enzimática observada que, junto con el hecho de que los ensayos se realizaron con extractos de células de

insecto infectadas con baculovirus que generalmente están llenos de actividad fosfatasa, cuestionan estos resultados.

Nuestros primeros intentos de expresar IGRP por los métodos convencionales usando los sistemas de expresión bacteriana o baculovirus no produjeron resultados positivos, indicando que puede tener efectos tóxicos en las células cuando se sobreexpresa. Además, cuando intentamos expresarla utilizando nuestra metodología IC-Tagging en el sistema de expresión de baculovirus, no solo no pudimos detectar expresión de IGRP sino que además la expresión de las MS formadas por la proteína muNS-Mi era completamente nula, reafirmando la toxicidad de IGRP. El secuestro de proteínas etiquetadas podría en teoría ayudar en la expresión de proteínas tóxicas debido a la relocalización en las MS, siempre que dicha toxicidad dependa de la localización intracelular de la proteína. Sin embargo, dicha relocalización debe ser rápida y eficiente para evitar lo antes posible el efecto nocivo de la proteína. Las bacterias tienen un espacio intracelular pequeño y no compartimentalizado además de poseer un metabolismo completamente diferente a las células eucariotas. Por lo tanto pensamos en la posibilidad de que esas diferencias puedan influir en la expresión de proteínas difíciles como IGRP. Primero demostramos que el sistema IC-Tagging funcionaba en el interior de las bacterias observando que muNS-Mi formaba MS y las proteínas etiquetadas con el IC se reclutaban en ellas permitiendo a su vez una fácil copurificación. También demostramos que las MS no eran cuerpos de inclusión típicos que se forman en las bacterias ya que, al igual que las MS producidas con baculovirus, estas se desmontan fácilmente cuando se retira del medio los cationes divalentes. Es posible que la ausencia de cationes divalentes modifique las condiciones del tampón de forma que se alteren las interacciones electrostáticas entre los monómeros de muNS-Mi que son cruciales para la formación de MS. Lo primero que observamos cuando coexpresamos IGRP y muNS-Mi en bacterias fue que la expresión de muNS-Mi no se veía afectada, demostrando que la toxicidad de IGRP era diferente en el sistema procariota. Sin embargo, incluso en presencia de una buena cantidad de muNS-Mi, inicialmente no observamos una buena expresión de IGRP después de la inducción con IPTG. La presencia de muNS-Mi, indicando que las MS se estaban formando, nos impulsó a purificarlas y concentrarlas en un intento de rescatar cualquier posible IGRP etiquetada con el IC que pudiera estar recluida en ellas. Después de concentrar las MS y analizarlas por PAGE encontramos una banda correspondiente al peso

## **Discusión**

molecular calculado de IGRP. La identidad de dicha banda se confirmó en primer lugar mediante análisis por Western-blot y posterior y definitivamente por espectrometría de masas, que reveló la presencia de varios péptidos correspondientes a la secuencia de IGRP. Esta es la primera vez que se ha observado cantidades apreciables de IGRP en un gel teñido, abriendo la posibilidad de realizar los estudios mencionados anteriormente sobre la implicación de la proteína en la diabetes tipo 1 y la posibilidad de desarrollar una posible vacuna tolerogénica contra esta enfermedad.

Aunque somos conscientes de que el sistema IC-Tagging podría no funcionar como un método universal para expresar proteínas tóxicas, queríamos probar su capacidad con al menos una segunda proteína de difícil expresión. En el transcurso de la producción de glicoproteínas con la metodología IC-Tagging, nos enfrentamos a problemas cuando intentamos expresar el ectodominio de la glicoproteína RVFV Gc fuera del RE para usarlo como control de algunos experimentos. Este ectodominio se ha expresado con éxito anteriormente, e incluso se ha resuelto su estructura (Dessau y Modis, 2013), pero siempre expresando la proteína en el interior del RE manteniéndose en su localización natural. Nosotros no fuimos capaces de expresar el ectodominio de Gc en el exterior del RE con el sistema de baculovirus, ya sea en ausencia o en presencia de MS, posiblemente reflejando un efecto estabilizador de la glicosilación que ocurre en el interior del RE o del plegamiento de la proteína gracias a las chaperonas residentes en este compartimento (Braakman y Bulleid, 2011). Como se muestra en los resultados, de nuevo fuimos capaces de expresar buenas cantidades del ectodominio de Gc con la versión de nuestra metodología en bacterias, lo que refuerza su capacidad de producción de proteínas cuya expresión es inherentemente difícil.

## **4. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS MS**

Para conocer y entender como ocurría la formación de las MS en el interior de las células y como se disponían las proteínas etiquetadas en las mismas, decidimos intentar diversas estrategias. En primer lugar analizamos MS formadas con el sistema de baculovirus y células de insecto por microscopía electrónica. Observamos estructuras esféricas perfectamente formadas que al ampliar diferentes secciones de las mismas mostraban un patrón de haces de fibras enrollados. Al observar esta

disposición bastante regular, pensamos en la posibilidad de identificar cómo se disponen las proteínas etiquetadas con IC en el interior de las MS. La metalotioneína es una proteína que tiene la capacidad de capturar diversos metales por coordinación. Este hecho se ha aprovechado para detectar la posición intracelular de proteínas de fusión a metalotioneína que habían sido incubadas con oro. De esta manera, los clústeres del oro capturados por esta proteína se visualizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (Risco et al., 2012). Nosotros quisimos utilizar este método para identificar en qué lugar de las MS se disponen las proteínas etiquetadas con IC y si esta disposición adquiere algún tipo de patrón regular. Para ello cargamos MS con metalotioneína etiquetada con IC, pero no fuimos capaces de distinguir ningún tipo de patrón en la disposición de la proteína. De hecho, ni siquiera distinguimos bien ningún tipo de señal o estructura dentro de las MS que revelase la presencia de la metalotioneína en comparación con otras MS que no tenían esta proteína o tenían otra proteína etiquetada distinta. No sabemos si esto se debe a que a metalotioneína no fue capaz de captar oro y hacer clústeres en las condiciones utilizadas por nosotros, o porque el método no es lo suficientemente resolutivo, al menos para este caso.

Pensamos en la posibilidad de resolver la estructura cristalina de la proteína muNS-Mi, dado que conocíamos las condiciones en las que debemos tratarla para mantenerla en solución. Previamente habíamos intentado cristalizar la proteína obtenida de la expresión con baculovirus en células de insecto pero no se habían conseguido formar cristales. En nuestro grupo se ha descrito que la proteína muNS sufre múltiples fosforilaciones en diferentes posiciones de su secuencia. Pudiera ser que la proteína obtenida a través de la expresión con el sistema de baculovirus contuviese poblaciones de la proteína con diversos grados de fosforilación, y que esta variabilidad impidiese la formación de cristales. La proteína obtenida en el sistema de expresión bacteriano podría solucionar este problema. En colaboración con el profesor Mark van Raaij y Carmen San Martín observamos que al concentrar la proteína por encima de 5mg/ml, empezaba a agregarse y gelificar, lo que imposibilitaba la cristalización. Tras optimizar las condiciones de solubilización, se consiguieron condiciones concretas en las que dejaba de agregar, pero en estas condiciones no se obtuvo ningún cristal de proteína. Se decidió a continuación observar mediante cryo-EM la proteína solubilizada a altas concentraciones, para determinar si se formaba algún tipo de agregado regular del que pudiésemos obtener información estructural mediante reconstrucción estructural a partir de partículas

## **Discusión**

individuales. Lo que observamos, sin embargo, fueron agregados fibrosos irregulares, lo que coincidía con lo observado en los cortes de MS formadas en células de insecto.

Finalmente, y a través de una colaboración con el Dr. Francisco Rodriguez (CNB-CSIC, Madrid) realizamos microscopia de super-resolución a MS formadas en células eucariotas que integraban la proteína EGFP etiquetada con IC, con objeto una vez más, de identificar en qué zona o zonas de las MS se disponían las proteínas etiquetadas. Si las proteínas están solamente en el interior, solo en exterior o en toda la esfera es un dato a tener en cuenta a la hora de su uso como vacunas. Gracias a la microscopia de super-resolución encontramos que la proteína GFP-IC se dispone por todo el volumen de la MS, tanto en su interior como en la superficie, tal y como esperábamos.

En nuestro intento de conseguir resolver la estructura cristalina de esta proteína estamos estudiando la posibilidad de utilizar otras versiones de muNS-Mi. En nuestro laboratorio hemos encontrado que eliminando uno de los dominios de muNS, bien sea el C1 como el CT, la nueva versión truncada es incapaz de formar MS o cualquier tipo de inclusiones en las células transfectadas. Por tanto, es de esperar que estas versiones tampoco tengan tanta tendencia a agregarse a concentraciones altas, lo que las convierte en candidatas ideales para intentar cristalizarla y resolver la estructura parcial por cristalografía de rayos X. También pretendemos obtener información estructural de como se pliegan diferentes regiones y dominios de la proteína mediante difracción circular a partir de estas versiones de muNS-Mi soluble. Con la información obtenida, aunque parcial, esperamos obtener las pistas suficientes que nos revelen las bases de las interacciones monómero-monómero de muNS que conducen a la formación de estas inclusiones ordenadas.



## **CONCLUSIONES**



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

1. El reensamblaje de fragmentos de GFP necesita que ambos fragmentos tengan buena movilidad para que se reconstituya la proteína.
2. La expresión de sec-GFP-Mi y sec-Mi en el interior del retículo endoplasmático provoca que la proteína se glicosile.
3. La glicosilación de sec-Mi provoca una baja eficiencia en la formación de MS que se soluciona con la mutación del sitio de glicosilación de la proteína.
4. Es posible cargar las MS formadas en el RE con glicoproteínas de forma que estas adquieren las mismas modificaciones que si son expresadas de forma individual.
5. Podemos expresar y formar MS en el interior de bacterias que son fácilmente desmontables en ausencia de cationes divalentes
6. El IC-Tagging en bacterias permite la expresión y purificación de proteínas difíciles y tóxicas cuya expresión no es posible con otros métodos convencionales.
7. Las proteínas etiquetadas con el IC se disponen tanto en la superficie de las MS como en su interior.





## **REFERENCIAS**



- Allsopp, C.E.M., Plebanski, M., Gilbert, S., Sinden, R.E., Harris, S., Frankel, G., Dougan, G., Hioe, C., Nixon, D., Paoletti, E., Lajton, G. y Hill, A.V.S.** (1996). Comparison of numerous delivery systems for the induction of cytotoxic T lymphocytes by immunization. *Eur. J. Immunol.*, 26(8), pp.1951-1959.
- Barreiro-Piñeiro, N., Menaya-Vargas, R., Brandariz-Núñez, A., Otero-Romero, I., Lostalé-Seijo, I., Benavente, J. y Martínez-Costas, J.M.** (2016). Using IC-Tagging Methodology for Production and Purification of Epitope-Loaded Protein Microspheres for Vaccination. *Methods Mol. Biol.*, 1349, pp.25-34.
- Benavente, J. y Martínez-Costas, J.** (2007). Avian reovirus: Structure and biology. *Virus Res.*, 123(2), pp.105-119.
- Benavente, J. y Martínez-Costas, J.** (2006). Early steps in avian reovirus morphogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 309, pp.67-85.
- Bodelón, G., Labrada, L., Martínez-Costas, J. 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.181-91.
- Bodelón, G., Labrada, L., Martínez-Costas, J. 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.17789-17796.
- Braakman, I. y Bulleid, N.J.** (2011). Protein Folding and Modification in the Mammalian Endoplasmic Reticulum. *Annu. Rev. Biochem.*, 80(1), pp.71-99.
- Brandariz-Núñez, A., Menaya-Vargas, R., Benavente, J. y Martínez-Costas, J.** (2010a). A versatile molecular tagging method for targeting proteins to avian reovirus muNS inclusions. use in protein immobilization and purification. *PLoS One*, 5(11), p.e13961.
- Brandariz-Núñez, A., Menaya-Vargas, R., Benavente, J. y Martínez-Costas, J.** (2010b). Avian Reovirus uNS Protein Forms Homo-Oligomeric Inclusions in a Microtubule-Independent Fashion, Which Involves Specific Regions of Its C-Terminal Domain. *J. Virol.*, 84(9), pp.4289-4301.
- Brandariz-Núñez, A., Menaya-Vargas, R., Benavente, J. y Martínez-Costas, J.** (2010c). IC-tagging and protein relocation to ARV muNS inclusions: a method to study protein-protein interactions in the cytoplasm or nucleus of living cells. *PLoS One*, 5(11), p.e13785.
- Brandariz-Núñez, A., Otero-Romero, I., Benavente, J. y Martínez-Costas, J.M.** (2011). IC-tagged proteins are able to interact with each other and perform complex reactions when integrated into muNS-derived inclusions. *J. Biotechnol.*, 155(3), pp.284-6.

## Referencias

- Busch, L.K., Rodr??guez-Grille, J., Casal, J.I., Mart??nez-Costas, J. y Benavente, J.** (2011). Avian and mammalian reoviruses use different molecular mechanisms to synthesize their ??NS isoforms. *J. Gen. Virol.*, 92(11), pp.2566-2574.
- Calvo-Pinilla, E., Navasa, N., Anguita, J. y Ortego, J.** (2012). Multiserotype protection elicited by a combinatorial prime-boost vaccination strategy against bluetongue virus. *PLoS One*, 7(4), pp.1-11.
- Day, J.M.** (2009). The diversity of the orthoreoviruses: Molecular taxonomy and phylogenetic divides. *Infect. Genet. Evol.*, 9(4), pp.390-400.
- Dennis, S.J., Meyers, A.E., Guthrie, A.J., Hitzeroth, I.I. y Rybicki, E.P.** (2018). Immunogenicity of plant-produced African horse sickness virus-like particles: implications for a novel vaccine. *Plant Biotechnol. J.*, 16(2), pp.442-450.
- Dessau, M. y Modis, Y.** (2013). Crystal structure of glycoprotein C from Rift Valley fever virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110, pp.1696-1701.
- Dias, J.M., Kuehne, A.I., Abelson, D.M., Bale, S., Wong, A.C., Kawaoka, Y., Chandran, K., Dye, J.M. y Ollmann, E.** (2012). A Shared Structural Solution for Neutralizing Ebolaviruses. *Nat Struct Mol Biol.*, 73(4), pp.389-400.
- Duncan, R.** (1996). The Low pH-Dependent Entry of Avian Reovirus Is Accompanied by Two Specific Cleavages of the Major Outer Capsid Protein &mu;2C. *Virology*, 219(0042-6822 (Print)), pp.179-189.
- Ghosh, I., Hamilton, A.D. y Regan, L.** (2000). Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: Application to the green fluorescent protein [12]. *J. Am. Chem. Soc.*, 122(23), pp.5658-5659.
- 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.
- van der Heide, L. y Kalbac, M.** (1975). Infectious tenosynovitis (viral arthritis): characterization of a Connecticut viral isolant as a reovirus and evidence of viral egg transmission by reovirus-infected broiler breeders. *Avian Dis.*, 19(4), pp.683-8.
- 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(SUPPL. 1), pp.576-582.
- Jarchum, I., Nichol, L., Trucco, M., Santamaria, P. y DiLorenzo, T.P.** (2008). Identification of novel IGRP epitopes targeted in type 1 diabetes patients. *Clin. Immunol.*, 127(3), pp.359-365.
- Jones, R.C.** (2000). Avian reovirus infections. *Rev. Sci. Tech.*, 19(2), pp.614-25.
- Jordan, L.E. y Mayor, H.D.** (1962). The fine structure of reovirus, a new member of the icosahedral series. *Virology*, 17(4), pp.597-599.
- Kodama, Y. y Hu, C.-D.** (2012). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives. *Biotechniques*, 53(5), pp.285-98.

- Labrada, L., Bodelo, G., Vin, J. y Benavente, J.** (2002). Avian Reoviruses Cause Apoptosis in Cultured Cells: Viral Uncoating, but Not Viral Gene Expression, Is Required for Apoptosis Induction. , 76(16), pp.7932-7941.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680-685.
- Lieberman, S.M., Evans, A.M., Han, B., Takaki, T., Vinnitskaya, Y., Caldwell, J.A., Serreze, D. V., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Nathenson, S.G., Santamaria, P. y DiLorenzo, T.P.** (2003). Identification of the beta cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8+ T cells in autoimmune diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(14), pp.8384-8388.
- Marín-López, A., Calvo-Pinilla, E., Barriales, D., Lorenzo, G., Benavente, J., Brun, A., Martínez-Costas, J.M. y Ortego, J.** (2017). Microspheres-prime/rMVA-boost vaccination enhances humoral and cellular immune response in IFNAR(-/-) mice conferring protection against serotypes 1 and 4 of bluetongue virus. *Antiviral Res.*, 142, pp.55-62.
- Marín-López, A., Otero-Romero, I., de la Poza, F., Menaya-Vargas, R., Calvo-Pinilla, E., Benavente, J., Martínez-Costas, J.M. y Ortego, J.** (2014). VP2, VP7, and NS1 proteins of bluetongue virus targeted in avian reovirus muNS-Mi microspheres elicit a protective immune response in IFNAR(-/-) mice. *Antiviral Res.*, 110, pp.42-51.
- Martin, C.C., Bischof, L.J., Bergman, B., Hornbuckle, L.A., Hilliker, C., Frigeri, C., Wahl, D., Svitek, C.A., Wong, R., Goldman, J.K., Oeser, J.K., Leprêtre, F., Froguel, P., O'Brien, R.M. y Hutton, J.C.** (2001). Cloning and Characterization of the Human and Rat Islet-specific Glucose-6-phosphatase Catalytic Subunit-related Protein (IGRP) Genes. *J. Biol. Chem.*, 276(27), pp.25197-25207.
- Martínez-Costas, J., 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.
- Martinez-Costas, J., Varela, R. y Benavente, J.** (1995). Endogenous enzymatic activities of the avian reovirus S1133: identification of the viral capping enzyme. *Virology*, 206(2), pp.1017-1026.
- Metz, S.W., Gardner, J., Geertsema, C., Le, T.T., Goh, L., Vlak, J.M., Suhrbier, A. y Pijlman, G.P.** (2013). Effective Chikungunya Virus-like Particle Vaccine Produced in Insect Cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 7(3).
- Murin, C.D., Fusco, M.L., Bornholdt, Z.A., Qiu, X., Olinger, G.G., Zeitlin, L., Kobinger, G.P., Ward, A.B. y Sapphire, E.O.** (2014). Structures of protective antibodies reveal sites of vulnerability on Ebola virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 111(48), pp.17182-17187.
- Ortego, J., De la Poza, F. y Marín-López, A.** (2014). Interferon  $\alpha/\beta$  receptor knockout mice as a model to study bluetongue virus infection. *Virus Res.*, 182, pp.35-42.

## Referencias

- Petrolonis, A.J., Yang, Q., Tummino, P.J., Fish, S.M., Prack, A.E., Jain, S., Parsons, T.F., Li, P., Dales, N.A., Ge, L., Langston, S.P., Schuller, A.G.P., An, W.F., Tartaglia, L.A., Chen, H. y Hong, S.B.** (2004). Enzymatic Characterization of the Pancreatic Islet-specific Glucose-6-Phosphatase-related Protein (IGRP). *J. Biol. Chem.*, 279(14), pp.13976-13983.
- Plebanski, M., Gilbert, S.C., Schneider, J., Hannan, C.M., Layton, G., Blanchard, T., Becker, M., Smith, G., Butcher, G., Sinden, R.E. y Hill, a V** (1998). Protection from Plasmodium berghei infection by priming and boosting T cells to a single class I-restricted epitope with recombinant carriers suitable for human use. *Eur. J. Immunol.*, 28(12), pp.4345-4355.
- 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(2), pp.342-355.
- Risco, C., Sanmartín-Conesa, E., Tzeng, W.-P., Frey, T.K., Seybold, V. y de Groot, R.J.** (2012). Specific, Sensitive, High-Resolution Detection of Protein Molecules in Eukaryotic Cells Using Metal-Tagging Transmission Electron Microscopy. *Structure*, 20(5), pp.759-766.
- Rodríguez-Grille, J., Busch, L.K., Martínez-Costas, J. y Benavente, J.** (2014). Avian reovirus-triggered apoptosis enhances both virus spread and the processing of the viral nonstructural muNS protein. *Virology*, 462-463(1), pp.49-59.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schnitzer, T.J., Ramos, T. y Gouvea, V.** (1982). Avian reovirus polypeptides: analysis of intracellular virus-specified products, virions, top component, and cores. *J. Virol.*, 43(3), pp.1006-14.
- Shapouri, M.R.S., Arella, M. y Silim, A.** (1996). Evidence for the multimeric nature and cell binding ability of avian reovirus  $\sigma 3$  protein. *J. Gen. Virol.*, 77(6), pp.1203-1210.
- Shmulevitz, M. y Duncan, R.** (2000). A new class of fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins encoded by the non-enveloped fusogenic reoviruses. *EMBO J.*, 19(5), pp.902-912.
- Shmulevitz, M., Yameen, Z., Dawe, S.J., Shou, J., O'Hara, D., Holmes, I. y Duncan, R.** (2002). Sequential Partially Overlapping Gene Arrangement in the Tricistronic S1 Genome Segments of Avian Reovirus and Nelson Bay Reovirus: Implications for Translation Initiation. *J. Virol.*, 76(2), pp.609-618.
- Silverstein, S.C. y Schur, P.H.** (1970). Immunofluorescent localization of double-stranded RNA in reovirus-infected cells. *Virology*, 41(3), pp.564-6.
- Spandidos, D. y Graham, A.** (1976). Physical and chemical characterization of an avian reovirus. *J. Virol.*, 19(3), pp.968-976.

- Tomljenovic, L. y A. Shaw, C.** (2011). Aluminum Vaccine Adjuvants: Are they Safe? *Curr. Med. Chem.*, 18(17), pp.2630-2637.
- Tourís-Otero, F., Cortez-San Martín, M., Martínez-Costas, J. y Benavente, J.** (2004a). Avian Reovirus Morphogenesis Occurs Within Viral Factories and Begins with the Selective Recruitment of  $\sigma$ NS and  $\lambda$ A to  $\mu$ NS Inclusions. *J. Mol. Biol.*, 341(2), pp.361-374.
- Tourís-Otero, F., Martínez-Costas, J., Vakharia, V.N. y Benavente, J.** (2004b). Avian reovirus nonstructural protein microNS forms viroplasm-like inclusions and recruits protein sigmaNS to these structures. *Virology*, 319(1), pp.94-106.
- Trudeau, J.** (2003). Prediction of spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice by quantification of autoreactive T cells in peripheral blood. *J. Clin. ...*, 111(2), pp.217-223.
- Urh, M.** (2013). HaloTag, a Platform Technology for Protein Analysis. *Curr. Chem. Genomics*, 6(1), pp.72-78.
- 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.
- Wilschut, J.** (2009). Influenza vaccines: The virosome concept. *Immunol. Lett.*, 122(2), pp.118-121.
- Wong, C.P., Li, L., Frelinger, J.A. y Tisch, R.** (2006). Early Autoimmune Destruction of Islet Grafts Is Associated with a Restricted Repertoire of IGRP-Specific CD8+ T Cells in Diabetic Nonobese Diabetic Mice. *J. Immunol.*, 176(3), pp.1637-1644.
- Yang, F., Moss, L.G. y Phillips, G.N.** (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.*, 14(10), pp.1246-51.
- Yarbrough, D., Wachter, R.M., Kallio, K., Matz, M. V. y Remington, S.J.** (2001). Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98(2), pp.462-467.
- 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, 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.