Efecto de la infección de *Newcastle Disease Virus* en distintas fases del ciclo celular

Trabajo Fin de Máster

Máster en Biología y Clínica del Cáncer

Elena Martín Doncel

Curso 2013/2014

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

VNiVERSiDAD D SALAMANCA
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

CIC
CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER

D. Pedro A. Lazo-Zbikowski Taracena, Profesor de investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

D. Enrique Villar Ledesma, catedrático de Bioquímica de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la memoria titulada "**Efecto de la infección de *Newcastle Disease Virus* en distintas fases del ciclo celular**" presentada por la licenciada en Biología **Elena Martín Doncel**, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al título de **Máster en Biología y Clínica del Cáncer** por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca, a 17 de junio de 2014.

Fdo. Pedro A. Lazo-Zbikowski Taracena

Fdo. Enrique Villar Ledesma

Elena Martin Doncel

INTRODUCCIÓN

Newcastle Disease Virus (NDV), también conocido como paramixovirus aviar tipo 1 (APMV-1), es una especie del género *Avulavirus* de la subfamilia *Paramyxovirinae*, miembro de la familia *Paramyxoviridae* (según la clasificación del *International Committee on Taxonomy of Viruses*, actualizada en el año 2013). Se trata de un virus de RNA monocatenario de polaridad negativa. Presenta una nucleocápsida con simetría helicoidal, constituida por el genoma y proteínas asociadas, y una envuelta proteolipídica procedente de la célula hospedadora (Alexander et al., 2012). NDV causa el proceso infeccioso conocido como enfermedad de Newcastle (ND), enfermedad viral y zoonótica altamente contagiosa que afecta tanto a aves silvestres como aves de corral, causando alteraciones en el sistema respiratorio, nervioso y digestivo.

La enfermedad de Newcastle fue descrita por primera vez en 1926 en Java (Indonesia) y en Newcastle-upon-Tyne (Inglaterra) (Alexander et al., 2012). Según la *World Organization for Animal Health* (OIE), es una enfermedad distribuida por todo el mundo, aunque es endémica en algunos países. Se ha visto que NDV puede aislarse de todos los tipos de aves silvestres, en especial de aquellas migratorias acuáticas, aunque en estos animales la virulencia es baja. También se puede identificar en aves domésticas enjauladas. La transmisión ocurre por inhalación del virus, ingestión, o por contacto con las membranas mucosas (el virus se encuentra en las heces, secreciones respiratorias, en todas las partes del cuerpo de las aves muertas, comida, agua, instrumentos avícolas, etc.) (Capua and Alexander, 2009).

La enfermedad de Newcastle se puede diagnosticar por síntomas respiratorios o nerviosos, como tos o movimientos anormales, interrupción de la puesta o puesta de huevos aberrantes, problemas intestinales e hinchazón en ojos y cuello. También pueden aparecer edemas y hemorragias.

Se han descrito nueve serogrupos de NDV, de APMV-1 a APMV-9 (el más importante para las aves de corral y el conocido como NDV es APMV-1). Existen tres cepas con distinto grado de virulencia, las más agresivas son las velogénicas, las cuales pueden provocar el 90% de mortalidad de los animales infectados (el embrión muere entre 40 y 60 días tras la inyección de la dosis mínima letal), suponiendo graves pérdidas económicas tanto por la muerte de las aves de corral como por la considerable disminución de la puesta. Las cepas mesogénicas producen la muerte del embrión entre 60 y 90 días, y las lentogénicas, también conocidas como formas "Hitchner", tardan más de 90 días. Son las utilizadas en este trabajo.

El genoma de NDV consta de una molécula de RNA (-) de unas 15 kb que codifica para seis proteínas: en la envuelta lipídica se encuentran las proteínas HN (hemaglutinina-neuraminidasa) y F (glicoproteína de fusión), que están embebidas en la membrana lipídica, y M (matriz), que se encuentra en la cara interna de la membrana. En el interior del virión encontramos NP (proteína de la nucleocápsida), P (fosfoproteína) y L (proteína *large polymerase*). Estas tres proteínas constituyen el complejo transcriptasa viral (Ganar et al., 2014) (figura 1).

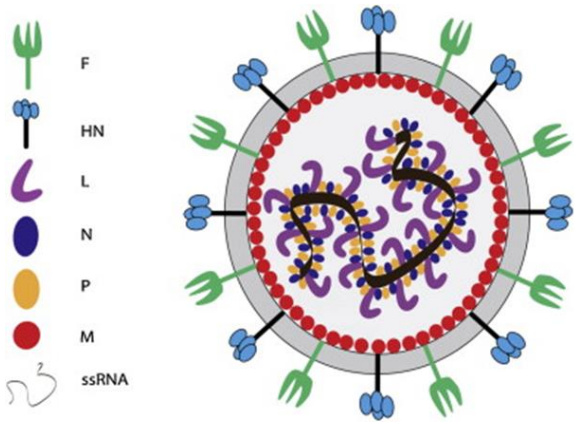

Figura 1: Representación esquemática de la estructura de Newcastle Disease Virus, (Ganar, Das et al. 2014)

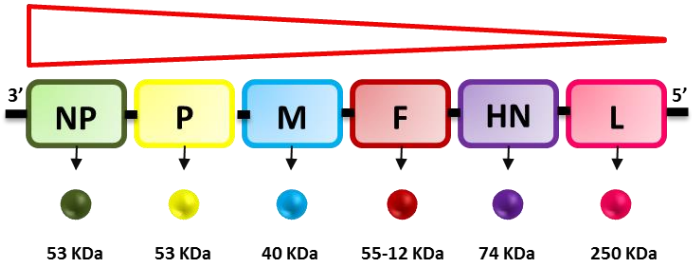

Figura 2: Representación esquemática del genoma de NDV. (Elaboración propia).

La cadena de RNA presenta en los extremos dos secuencias no codificantes, *leader* en 3' y *trailer* en 5', esenciales para la transcripción y la replicación. Los genes se encuentran posicionados en el mismo orden en el que van a ser transcritos (figura 2). La transcripción tiene lugar en el citosol de la célula hospedadora, el complejo transcriptasa viral reconoce los sitios de inicio y fin de cada ORF, transcribiendo el mRNA de forma continua de principio a fin. Durante el proceso, el complejo transcriptasa puede soltarse del molde, debiendo comenzar a traducir el mRNA desde el principio. Como consecuencia, se origina un gradiente de transcritos, de forma que las proteínas codificadas por los genes situadas en el extremo 3' serán las más abundantes y las situadas en el 5' las menos abundantes. Esto supone un ahorro energético para el virus, puesto que así solo sintetiza las cantidades de proteínas que necesita. Las características de las proteínas víricas son las siguientes:

- NP: La nucleoproteína es la proteína mayoritaria, encontramos 2600 copias por cada molécula de RNA, interaccionando con ésta cada 6 nucleótidos. Protege al genoma de ser degradado por nucleasas celulares.
- P: La fosfoproteína es esencial para la formación del complejo transcriptasa viral, interaccionando con la proteína L de forma tetramérica.
- M: La proteína de la matriz forma un recubrimiento que rodea por la parte interior a la envuelta lipídica para estabilizar la estructura del virión. Es fundamental para la liberación de los viriones de la célula hospedadora. Esta proteína interacciona con NP y con el RNA.
- F: Es una glicoproteína de membrana tipo I. Se sintetiza en forma de precursor inactivo F_0, que es procesado proteolíticamente por una proteasa celular, generándose dos subunidades, F_1 y F_2, unidas entre sí por puentes disulfuro, y formando homotrímeros. Es la proteína que lleva a cabo la fusión entre las membranas celular y viral.
- HN: Es una glicoproteína transmembrana tipo II que se dispone formando tetrámeros. Es una proteína multifuncional encargada de reconocer el receptor del virus (actividad hemaglutinante), liberar al virus de los receptores (actividad sialidásica/neuraminidásica) y promover la actividad de la proteína F mediante interacción directa.

- L: Subunidad catalítica de la RNA polimerasa RNA dependiente. Es la proteína minoritaria del virión, sólo se sintetizan entre 30 y 50 copias por nucleocápsida.

NDV se une a las células hospedadoras mediante el reconocimiento de receptores específicos. Estos receptores son restos de ácidos siálicos, que interaccionan con HN gracias a la capacidad hemaglutinante de esta proteína. Parece ser que los gangliósidos y las N-glicoproteínas son las que actúan como receptores de NDV (Ferreira et al., 2004). El virus tiene como principales hospedadores las aves, aunque también se han descrito infecciones en el hombre, que derivan de accidentes de laboratorio o de manipulación de animales enfermos. Los síntomas son leves catarros o conjuntivitis; es decir, el virus no tiene efecto patológico. Esto es debido a que NDV no tiene la capacidad de multiplicarse en células humanas, aunque se ha descrito que en células tumorales humanas es capaz de multiplicarse rápidamente (Cassel and Garrett, 1965). Se ha comprobado que NDV tiene efecto oncolítico *in vitro* en al menos 9 líneas celulares tumorales humanas, y que no tiene ningún efecto en al menos 9 líneas celulares de fibroblastos humanos. *In vivo*, tiene la capacidad de hacer regresar totalmente tumores inoculados en cepas de ratones inmunodeprimidos (Reichard et al., 1992). Este potencial oncolítico, que se encuentra también en otros virus, se relaciona con los defectos en el sistema del interferón que presentan muchos tumores (Heiber and Barber, 2012).

Así, NDV causa la muerte de células susceptibles mediante apoptosis. En las células existen dos rutas apoptóticas posibles (D'Amelio et al., 2010):

- Ruta intrínseca: Distintos estímulos apoptóticos provocan una permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) mediada por los miembros de la familia Bcl-2, dentro de la que se establecen dos grupos, proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak, y Bid, entre otras) y proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-XL entre otras). Los estímulos apoptóticos inducen cambios conformacionales en Bax y Bak, que oligomerizan y forman poros en la membrana externa mitocondrial, lo que permite la salida desde el espacio intermembrana mitocondrial de ciertos factores, entre ellos el citocromo C, que en el citoplasma induce la formación del complejo del apoptosoma mediante la interacción con la proteína Apaf1. Este complejo reconoce y procesa a la pro-caspasa 9, que se activa a caspasa 9, reclutando y activando a las caspasas efectoras 3 y 7, que mediante procesamiento proteolítico activan distintos factores implicados en el desmantelamiento de la célula, entre ellos PARP.
- Ruta extrínseca: Distintas señales ambientales interaccionan con receptores de muerte (FAS) que se encuentran en la superficie de las células. Cuando el receptor se activa, trimeriza y recluta a una serie de proteínas adaptadoras que a su vez reclutan proteínas efectoras que procesan y activan a la pro-caspasa 8, que activa a las caspasas efectoras 3 y 7. Además, la caspasa 8 procesa proteolíticamente a Bid, activándolo para que éste transloque a la mitocondria, donde induce la liberación del citocromo C. De este modo, la ruta extrínseca converge con la intrínseca.

Los virus RNA (-) generalmente se asocian a inducción de apoptosis inicialmente por la vía intrínseca, y finalmente por ambas, de tal forma que NDV tiene la capacidad de inducir apoptosis en las células

hospedadoras mediante las dos vías (Elankumaran et al., 2006). Se ha descrito que algunas de las proteínas del virus presentan regiones similares a los dominios BH contenidos en los miembros de la familia Bcl-2, pudiendo interaccionar con estas proteínas (Molouki et al., 2011) (figura 3).

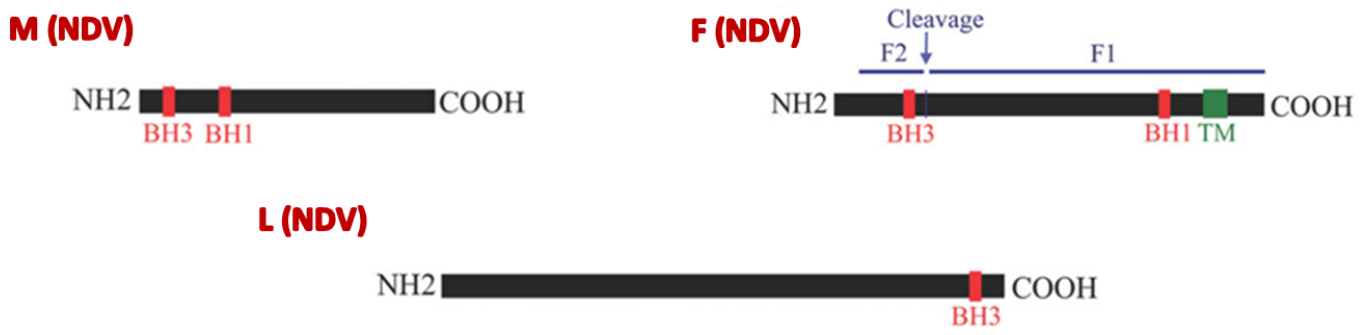

Figura 3: Diagrama esquemático donde se muestra la localización de varias regiones similares a los dominios BH en distintas proteínas de NDV (imagen adaptada) (Molouki et al., 2011).

Se ha demostrado que la proteína M de NDV es capaz de interaccionar con el dominio BH3 de la proteína celular Bax. Esta interacción podría explicar la habilidad de *Newcastle Disease Virus* para inducir apoptosis en las células susceptibles, pero se desconoce el efecto que NDV pueda tener sobre el ciclo celular de una célula tumoral.

OBJETIVOS:

La finalidad de este trabajo es comprobar si el ciclo celular de células tumorales se ve influenciado por la infección con *Newcastle Disease Virus*, y si éste tiene capacidad oncolítica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de líneas celulares:

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo se especifican en la tabla 2. Todas ellas se cultivaron en *flasks* y placas *Petri* p100 (*BD Falcon*) en un incubador a 37ºC, en una atmósfera con un 5% de CO_2 y 98% de humedad relativa. Los medios de cultivo estaban suplementados con 2 mM L-glutamina, y con los antibióticos penicilina (50 unidades/ml) y estreptomicina (50 µg/ml), y cuando se utilizaron medios completos también se suplementaron con 10% FBS (suero fetal bovino). Para levantar las células se utilizó tripsina-EDTA. Los medios de cultivo fueron obtenidos de *SIGMA-ALDRICH* y el suero y los suplementos de *GIBCO-life technologies*. Las líneas celulares se observaron con un microscopio óptico invertido *Zeiss Axiovert* 25.

Ensayo de ciclo celular:

Para determinar si el efecto de NDV sobre el ciclo celular era diferente en función del estadío del ciclo en el que las células se encuentren, se llevó a cabo un ensayo de ciclo, infectando a células HeLa con NDV en fase G_0, S, G_2/M y G_1 (asincrónicas).

- Parada en G_0: Cuando el cultivo celular adquirió un 40% de confluencia, las placas se lavaron una vez con PBS^+ (Na^+, K^+) y se añadió DMEM al 0% FBS. Tras 72 horas, las células se lisaron y se procesaron los extractos para su análisis mediante *Western Blot*.
- Parada en S: Cuando el cultivo celular adquirió un 40% de confluencia, se añadió medio de cultivo DMEM completo con 2 mM de timidina. La timidina estuvo en contacto con las células 24 horas. Posteriormente se eliminó la timidina y se lavaron las placas una vez con PBS^+ (Na^+, K^+). En este punto las células se encuentran paradas en fase S. Las células se lisaron y los lisados se procesaron para llevar a cabo un análisis de sus proteínas mediante *Western Blot.*
- Parada en G_2/M: Desde la parada de las células en S, después de tres horas, se añadió al medio de cultivo 100 ng/mL *Nocodazole*, que estuvo en contacto con las células durante 12 horas, tras las cuales se eliminó y las placas se lavaron con PBS^+ una vez. Estas células fueron lisadas y procesadas para llevar a cabo un *Western Blot*.
- Asincrónicas, G_1: No se realizó ningún tratamiento adicional, las células se cultivaron con DMEM completo hasta el momento en el que se lisaron.
- Células sincronizadas: Para conseguir que la mayoría de la población celular que estaba creciendo en la placa *Petri* estuviera en la misma fase del ciclo y progresara a través de éste al mismo tiempo, se llevó a cabo una parada de las células en G_0. Cuando las células estuvieron paradas fueron infectadas con NDV, y posteriormente se indujo la continuación del ciclo celular al mismo tiempo en todas las placas utilizadas para el experimento, tanto en las control como en las infectadas. Para iniciar la progresión del ciclo a partir de la fase G_0, se aspiró el medio DMEM con 0% FBS, y se añadió nuevo medio de cultivo DMEM enriquecido con 10% FBS.

Obtención de huevos:

Los huevos utilizados fueron dos tandas cada una de 25 huevos embrionados de pollo libres de patógenos específicos (SPF) obtenidos el día 0 post-fecundación, cedidos por la Granja Avícola de Multiplicación Rodríguez Serrano (Alba de Tormes).

Cultivo NDV:

Para cultivar *Newcastle Disease Virus*, al ser un virus aviar, se utilizaron huevos embrionados de pollo libres de patógenos específicos. El día 0 post-fecundación, fueron recogidos e incubados a 37,7ºC en una atmósfera con un 40% de humedad en un incubador de huevos Σ 210- Σ 252 (Maino). La temperatura y la humedad se mantuvieron constantes hasta el día 8 post-fecundación, cuando se aumentó la humedad al 70% con el objetivo de que los huevos desarrollaran una mayor cantidad de líquido alantoideo.

El día 10 post-fecundación se inyectó el virus NDV. Para ello, se diluyó un *stock* de virus de la cepa B_1 mantenido a -80ºC (se encontraba a una concentración desconocida) 200 veces en PBS^+ estéril conservado a 4ºC. Se inyectaron 100 µL de dilución por huevo.

Para inyectar los huevos, dentro de una campana de cultivo con la luz apagada se buscó con una linterna la posición de la cámara de aire de cada huevo y se marcó con un rotulador. La dilución de NDV se inyectó desde un extremo de la cámara hacia el interior del huevo (hacia el líquido alantoideo) (figura 4). Para hacer un orificio en la cáscara se utilizó un punzón esterilizado en la llama. Se utilizaron jeringas de insulina de 0,3 ml. Para cubrir el orificio manteniendo condiciones de esterilidad y evitando que el huevo se seque, se utilizó parafina derretida en la llama. Una vez infectados, los huevos se devolvieron al incubador.

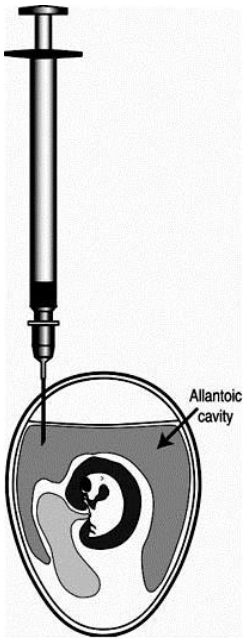

Figura 4: Método de inyección de virus en el líquido alantoideo de un huevo.

Dos días después, el día 12 post-fecundación, se colocaron los huevos en la cámara fría (4ºC) sacrificando de este modo al embrión, y coagulando su sangre para evitar la contaminación del líquido alantoideo a la hora de extraerlo.

El día 13 post-fecundación se extrajo el líquido alantoideo. Para hacerlo se eliminó la cáscara que cubre la zona de la cámara de aire con ayuda de unas pinzas estériles, se eliminaron las membranas testáceas y se presionó al

embrión hacia la parte posterior del huevo para conseguir que la mayor parte del líquido alantoideo subiera a la superficie. De cada huevo, se extrajeron unos 5-10 ml.

Purificación de NDV desde el líquido alantoideo:

Se estudiaron varios protocolos de purificación y finalmente se realizaron los explicados a continuación. Se llevaron a cabo dos métodos de purificación, uno en gradiente de sacarosa, y otro en gradiente de tartrato potásico, para así obtener la mayor cantidad posible de NDV. Como paso previo a ambas purificaciones, se cargó el líquido alantoideo en tubos de ultracentrífuga para el rotor basculante SW28 (*Beckman*), y se centrifugó a 10000 rpm 1h 30min a 4ºC. El pellet obtenido se resuspendió en 2 ml de buffer Tris (HCl 10mM, NaCl 100mM, EDTA 2mM, pH 7,4) y se mantuvo a 4ºC hasta el día siguiente.

Purificación de virus en gradiente de tartrato potásico:

El pellet obtenido se resuspendió en 2 ml de buffer Tris (HCl 10mM, NaCl 100mM, EDTA 2mM, pH 7,4) y se mantuvo a 4ºC hasta el día siguiente.

Se creó un gradiente de tartrato potásico en tubos de ultracentrífuga con ayuda de un mezclador de gradiente (figura 5). Para ello se prepararon dos soluciones de 10 ml de tartrato potásico, una al 50% y otra al 10%. En el lado izquierdo del mezclador se cargó la solución más ligera, y en el derecho la más pesada. En el lado derecho se colocó un imán, y se abrió la llave del mezclador para que las soluciones se fueran mezclando creándose así el gradiente en el tubo de ultracentrífuga.

Figura 5: Mezclador de gradiente.

Se cargó el pellet resuspendido en Tris sobre los gradientes, y se centrifugó a 21000 rpm en el rotor SW28 de la ultracentrífuga *o/n*. Tras la centrifugación, el virus se puede observar como un halo blanquecino en la mitad del gradiente. El virus se extrajo aspirando con una jeringuilla.

El contenido aspirado desde el gradiente se pasó a un tubo para un rotor de ángulo fijo de ultracentrífuga 70Ti, y se añadió ¼ de Tris del volumen de virus obtenido. Los tubos se centrifugaron a 35000 rpm durante 1h 30min.

El pellet corresponde con el virus precipitado, se resuspendió en *buffer* KNP (KCl 120 mM, NaCl 30mM, NaH_2PO_4 10mM, pH 7,4), y se guardó como nuevo *stock* a -80ºC. Este será el *stock* que utilizaremos para los experimentos.

Purificación de virus en gradiente de sacarosa:

Del sobrenadante obtenido de la primera centrifugación se trató de purificar virus utilizando un gradiente de sacarosa.

Primero se preparó un colchón de sacarosa de 9 ml al 30% en *buffer* NTE (0,5M NaCl, 10mM Tris HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) en un tubo de ultracentrífuga para el rotor SW28. Sobre la pared del tubo se dejó deslizar el sobrenadante hasta conseguir llenar ¾ partes. Se centrifugó a 25000 rpm durante 1h 30min a 4ºC. El pellet obtenido se resuspendió en 100 µL de PBS^+ (Na^+, K^+).

Cuantificación de proteínas:

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método *Bradford*. Este método se basa en el empleo del colorante azul brillante G-250 Coomassie, que se une a las proteínas provocando un cambio de color de marrón a rojo-azulado, cambiando el máximo de absorción de 465 a 595. El reactivo utilizado fue *Bio-Rad Protein Assay* (*Bio-Rad*), y se realizó una curva patrón utilizando BSA (albúmina sérica bovina).

Para las proteínas celulares se utilizaron cubetas de espectrofotómetro. Para las proteínas virales, se utilizaron placas multipocillo P96.

Titulación de Paramixovirus:

Titulación *p.f.u*. (unidades formadoras de placas):

Este ensayo de titulación se hizo en células Vero, en placas de 12 pocillos, de 24 y de 96. Cuando se consiguió una monocapa confluente de células, se prepararon diluciones seriadas del virus (10^{-1}-10^{-8}), y se procedió a la infección. Tras la infección, se añadió a cada pocillo agarosa 1% preparada en DMEM completo, con 5 µg/ml de acetiltripsina de soja durante diez minutos, y luego añadiendo un inhibidor de acetiltripsina, 7,5 µg/ml. La agarosa se dejó solidificar durante 30 minutos en oscuridad, y las células se incubaron a 37ºC durante 48-72 horas. Posteriormente las células se fijaron con formaldehído 4% en PBS pH 7,4 y se tiñeron con cristal violeta al 1%.

Análisis de la formación de sincitios:

Se llevó a cabo con células HeLa, las cuales fueron infectadas con NDV. Tras la infección se activó la proteína F del virus poniendo en contacto a las células con acetiltripsina de soja 5 µg/ml durante diez minutos, y luego añadiendo un inhibidor de acetiltripsina, 7,5 µg/ml. Posteriormente las placas se tiñeron con cristal violeta y se intentó cuantificar el número total de sincitios utilizando un microscopio invertido de fluorescencia *Olympus 1X51*.

Titulación por inmunofluorescencia:

Se intentó un ensayo de inmunofluorescencia en placas p24 y p35, con células ELL-0, HeLa y A549. Para ello, se lavaron las placas dos veces con PBS^{++} (PBS^{+} con $MgCl_2$ 1mM y $CaCl_2$ 0,1mM), y se fijaron con paraformaldehído al 3%. Se lavaron tres veces con PBS^{++} y se permeabilizaron con Triton-X100 al 0,1% en PBS^{++} durante 10 minutos. Posteriormente se incubaron con solución de bloqueo (PBS^{++} 1% BSA) durante 30 minutos, y se incubaron con el anticuerpo primario en solución de bloqueo durante una hora. Tras lavar tres veces con PBS^{++} se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora en solución de bloqueo, se lavaron dos veces con PBS^{++}, y se añadió DAPI 1:1000 en PBS^{+}. Las células se observaron en el microscopio invertido de fluorescencia *Olympus* 1x51 y en el microscopio invertido de fluorescencia *Axiovert 135* (*Carl Zeiss*).

Infección de células:

Para llevar a cabo el estudio sobre la progresión del ciclo celular, se utilizaron células HeLa y A549. Estas células se infectaron cuando alcanzaron una confluencia del 60%. Para ello, se utilizaron dos diluciones de virus, una de 10^{-3} y otra de 10^{-4}. El virus que se utilizó fue el cultivado en el líquido alantoideo de los huevos y purificado mediante un gradiente de tartrato potásico, el cual se encontraba a una concentración de 0,9 µg/µL.

Electroforesis SDS-PAGE:

Para obtener los extractos proteicos totales de células en cultivo en placas p100, se procedió de dos formas:

- Se absorbió el sobrenadante de dos p100 y se lavaron las células con PBS 1X Na^{+} K^{+} frío. Se lisaron utilizando 300 µL/p100 *buffer* de lisis suave + inhibidores, con ayuda de un *scrapper*. Se recogieron los 600 µL en un *eppendorf*.
- Se recogió el sobrenadante en un *falcon* y se tripsinizaron las placas con 2ml/p100 con TrypLE™ Express (*Gibco*), unos diez minutos a 37ºC. Se recogieron los 4ml y se adicionaron al sobrenadante. El total se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm, se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se lisó en 600 µL *buffer* de lisis suave + inhibidores.

A partir de este punto el procedimiento fue el mismo: se mantuvieron los *eppendorf* 30 minutos en hielo, y se centrifugaron 20 minutos a 13200 rpm. El sobrenadante se cuantificó el contenido proteico utilizando el método *Bradford*, haciendo una curva patrón con BSA (Albúmina Sérica Bovina).

El *buffer* de lisis suave + inhibidores contiene: 10m mM NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 10% glicerol, 4 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 50 mM Hepes pH 7,4, más los inhibidores de proteasas y fosfatasas (NaF 0,5 mM, PMSF 100 mM, Aprotinina 10 mg/mL, Leupectina 10 mg/mL, Ortovanadato de sodio 1 M).

Para separar las proteínas en función de su tamaño se llevó a cabo una electroforesis vertical en geles SDS-PAGE (*Sodium Dodecylsulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*). El SDS es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas y se une a ellas para enmascarar su carga y crear una distribución uniforme de cargas negativas sobre las proteínas gracias a los grupos sulfato que lleva. De este modo todas las proteínas presentarán una relación carga/masa uniforme, y así las proteínas de menos masa migrarán más rápido a través del poro del gel, creándose un gradiente de proteínas de mayor a menor masa.

Una vez obtenidos y cuantificados los extractos, las muestras se procesaron para cargar en el gel. Para ello todas las muestras se prepararon con la misma cantidad de extracto proteico (25-35 µg) procesado con tampón de carga (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, 10% glicerol, 2,3% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 5% β-mercaptoetanol), y se hirvieron durante 5 minutos.

El gel, del porcentaje de acrilamida adecuado para el tamaño de proteína a analizar, se corrió en condiciones desnaturalizantes utilizando 1 L tampón de electroforesis SDS-PAGE 1x en una cubeta para electroforesis. Como marcadores de masa molecular se utilizaron marcadores preteñidos "Precision Plus Protein™ Standars Dual Color" de *Biorad*, y "PageRuler Plus Prestained Protein Ladder", de *Thermo*.

Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF (Immobilion®-FL; *millipore*) mediante transferencia húmeda en tampón de transferencia (25 mM Tris, 19,2 mM glicina, 10% metanol) (Towbin et al., 1979).

Para llevar a cabo el *Western Blot* la membrana se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente en 5% de leche en polvo desnatada disuelta en el tampón TBS-T (25 mM Tris, 50 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,1% Tween-20). Después de lavar la leche, la membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido en TBS-T a la dilución adecuada (tabla 1). La incubación se realizó *o/n* a 4ºC utilizando un *Navigator*. El anticuerpo primario se lavó tres veces cada 10 minutos con TBS-T en agitación. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos secundarios *Goat Anti-Rabbit IgG, DyLight™ 800* y *Goat Anti-Mouse IgG, DyLight™ 680* (*Thermo SCIENTIFIC*) diluidos en TBS-T a una dilución de 1:10000, se dejaron incubando 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Las membranas se lavaron tres veces con TBS-T cada 10 minutos. Finalmente, se revelaron utilizando *Odyssey® Intrared Imaging System* (*LI-COR Biosciences*).

Citometría de flujo:

Para evaluar el efecto apoptótico del virus NDV utilizamos el citómetro *FACScalibur* (*Becton-Dickinson*). Las células se obtuvieron de placas p100 infectadas y como control negativo se utilizaron células sin infectar. De cada p100 se recogió el sobrenadante, y las células adheridas se tripsinizaron con 2ml/p100 de *TrypLE™ Express* (*Gibco*) a 37ºC. La tripsina con las células se adicionó al sobrenadante recogido y el conjunto se centrifugó a temperatura ambiente 5 minutos a 1500 rpm. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de PBS 1X Na^+ K^+ frío. Se dividió la muestra en dos tubos de citómetro, 500 µL/tubo, y se centrifugó de nuevo 5 min a 1500 rpm a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 500 µL de etanol frío al 70%. Los tubos se taparon con parafilm y se conservaron a 4ºC hasta su procesamiento para el citómetro. A cada tubo se le añadió 5 µL/mL de ioduro de propidio, y 0,5 µL/mL de *RNasa*. Se dejaron agitando a temperatura ambiente durante una hora, tapados con aluminio, y las muestras se pasaron por el citómetro. La adquisición de los datos se llevó a cabo mediante el programa *Cell Quest (Becton-Dickinson*) y se analizaron mediante el programa *FCS Express 4 Plus Research Edition* para determinar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.

Inmunofluorescencia y microscopía confocal:

Para observar si el citocromo C cambia de posición de la mitocondria al citosol en células infectadas, se llevó a cabo una inmunofluorescencia. Las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio estériles.

Para poder observar la mitocondria con el microscopio, se utilizó *Mitotracker® Mitochondrion-Selective Probes (invitrogen)* a una concentración de 100 nM en medio de cultivo RPMI no suplementado con FBS. El *Mitotracker®* se dejó en contacto con las células 15 minutos, y posteriormente se comenzó con la fijación.

Se pasaron los cubres a placas de 24 pocillos y se lavaron con PBS^+ (Na^+, K^+). Las células se fijaron con paraformaldehído 3% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió glicina 200 nM durante 15 minutos, para así reducir la reactividad de los grupos aldehído del paraformaldehído. Después se permeabilizaron las células con Tritón-X100 al 0,2% en PBS^+ durante 30 minutos, y se añadió solución de bloqueo con BSA 1% en PBS^+ (2x).

Los cubres se incubaron con el anticuerpo primario α-citocromo C preparado a una dilución de 1:200 y a una de 1:500 en PBS^+ (2x) con BSA 1% (de las dos diluciones, utilizamos la de 1:200 para analizar las imágenes). Se usaron 250 µL/pocillo, *o/n* a 4ºC. Se lavaron los cubres 3 veces con PBS, y se preparó el anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo de cianina Cy3 (Cy™ 3-*conjugated AffiniPure Goat anti-Mouse IgG (H+L)* de *Jackson ImmunoResearch)*, 250 µL/pocillo en PBS 2x y BSA 1%. Se dejó actuar 1 hora a temperatura ambiente, y posteriormente los cubres se lavaron tres veces con PBS^+. Los núcleos se tiñeron durante 15 minutos con DAPI, se utilizó en una dilución 1:1000 en PBS^+. Se lavaron 3 veces con PBS^+, se realizó un último lavado con agua destilada y se colocaron los cubres en portaobjetos con *MOWIOL®4-88* (*Calbiochem*).

La localización subcelular de las proteínas se analizó por microscopía confocal utilizando el microscopio *Leica TCS SP5*.

Tabla 1

Anticuerpo	PM proteína	Dilución WB	Casa comercial	Hospedador
α-Phospho-Rb	≈ 120 KDa	1:1000 (en 5% BSA)	Cell Signaling	Conejo
α-Rb	≈ 120 KDa	1:1000	Santa Cruz Biotec.	Conejo
α-PARP	113-89 KDa	1:1000	BD Biosciences	Ratón
α-PARP	113-89 KDa	1:1000		
α-p53 DO-1 ***α-p53 Pab***	53 KDa	1:500 1:1000	Santa Cruz Biotec.	Ratón
α-Cytochrome C	15 KDa	1:1000	BD Biosciences	Ratón
α-Bax (2D2)	21 KDa	1:1000	Enzo Life Sciences	Ratón
α-Ciclina A	≈ 45 KDa	1:1000	Santa Cruz Biotec.	Conejo
α-Ciclina D1 (M20)	≈ 40 KDa	1:1000	Santa Cruz Biotec.	Conejo
α-β-Actina	42 KDa	1:10000	Santa Cruz Biotec.	Ratón
α-Phospho-p53	53 KDa	1:1000		Conejo
α-NDV Policlonal	HN: 74 KDa F_1: 55 KDa NP/P: 53 KDa M: 40 KDa	1:1000	Cell Signaling	Conejo

Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas celulares y virales.

Tabla 2:

Línea celular	Organismo	Procedencia	Medio de cultivo
Vero	Mono verde africano	Epitelio renal	DMEM, 10% FBS
A549	Humano	Carcinoma de pulmón	RPMI, 10% FBS
HeLa	Humano	Adenocarcinoma de cérvix	DMEM, 10% FBS
ELL-0	Gallo	Fibroblastos embrionarios transformados espontáneamente	DMEM, 10% FBS

Líneas celulares utilizadas.

RESULTADOS:

Puesta a punto de protocolos de cultivo, purificación y titulación de paramyxovirus:

Para llevar a cabo este trabajo se disponía de un *stock* de virus de la cepa lentogénica etiquetada como cepa B_1, de concentración desconocida, y sin titular. Primero se cultivó el virus utilizando huevos de gallina como medio de cultivo (ver materiales y métodos), para disponer de la cantidad suficiente de NDV. A partir del líquido alantoideo extraído de los huevos infectados, se pusieron a punto dos protocolos de purificación, y las proteínas virales se cuantificaron utilizando el método *Bradford*:

- NDV purificado en gradiente de sacarosa: 0,29 µg/µL.
- NDV purificado en gradiente de tartrato potásico: 0,9 µg/µ.

Una vez obtuvimos los *stock* de virus, procedimos a la puesta a punto de tres protocolos diferentes de purificación, pero no se consiguieron resultados con ninguno de los tres:

- Ensayo de formación de calvas: se utilizaron placas de cultivo de distinto tamaño y la técnica se modificó a distintos niveles, pero no se consiguió llevar a cabo la cuantificación.
- Análisis de formación de sincitios: en esta técnica el problema pudo ser que las células se debían infectar con una cantidad de virus de 1 m.o.i (*Multiplicity of infection*), y nosotros desconocíamos la multiplicidad del virus.
- Titulación por inmunofluorescencia: en un principio se utilizó un anticuerpo primario α-F 2A6 cedido por el Dr. Adolfo García Sartre, y un anticuerpo secundario *AlexaFluor 488* cabra anti-conejo (*Molecular Probes*). El anticuerpo primario no funcionó para *Western Blot*, por lo que es posible que tampoco funcionara para inmunofluorescencia y el problema de esta técnica fuera el anticuerpo. También se probó con el anticuerpo policlonal α-NDV a una dilución de 1:1000. No se obtuvieron resultados porque para una inmunofluorescencia este anticuerpo se debería haber utilizado a una dilución de 1:100 y no pudimos hacerlo al no disponer de la cantidad suficiente.

Efecto de NDV sobre el ciclo celular:

Para ver la capacidad de *Newcastle Disease Virus* de infectar células tumorales y comprobar si el efecto de la infección es dependiente del momento del ciclo en el que la célula se encuentre, se llevó a cabo un ensayo de ciclo utilizando la línea celular HeLa.

Las células se infectaron en G_0 (0% FBS), S (timidina), G_2/M (timidina + nocodazol) y asincrónicas (la mayoría de las células estarán en fase G_1) con NDV utilizando una dilución de 10^{-4} (Figura 6).

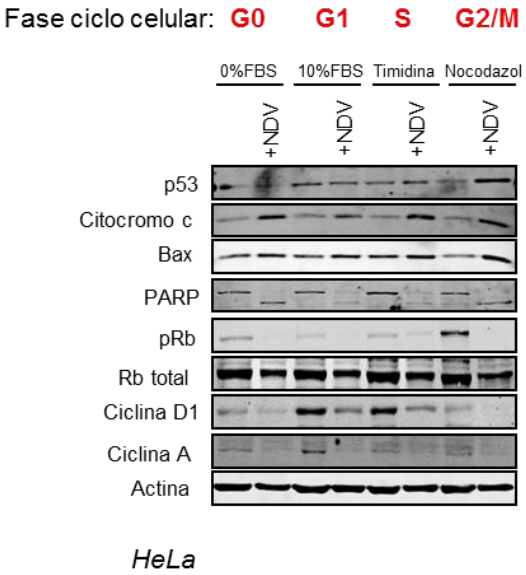

Figura 6: Distintas fases del ciclo celular de células HeLa infectadas con NDV. En cada punto del ciclo, el primer carril corresponde con el control negativo (células sin infectar), y el segundo con células infectadas con NDV.

En el resultado podemos observar que, respecto al control, la infección de células HeLa con NDV parece provocar un descenso de los niveles de la ciclina D1. Esta proteína regula la transición de la fase G_1 a la fase S del ciclo celular, por lo que alcanza sus mayores niveles en estas fases, como se puede observar en la figura 6 en los carriles control de los puntos con timidina (fase S) y en los que las células son asincrónicas (fase G_1). En estos dos puntos, la infección con NDV parece provocar un descenso de los niveles de la proteína. La ciclina D1 se activa como consecuencia de la llegada de estímulos mitogénicos a la célula, mediante fosforilación regulada por la ruta de las MAP quinasas. Una vez activada, se une a las quinasas CDK4 y CDK6, encargadas de fosforilar a Rb y a otros miembros de la familia (p107 y p130), inactivándolo y permitiendo así la disociación de E2F, factor de transcripción que permite la expresión de genes que estimularán la replicación del DNA (Massague, 2004) (figura 7).

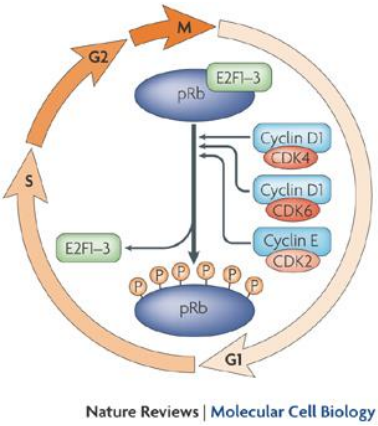

Figura 7: Rol de la ciclina D1 en la progresión del ciclo celular (Coller, 2007)

Estos resultados parecen indicar que cuando las células están infectadas por NDV hay una parada del ciclo en la fase G_1.

En los carriles control cabría observar como consecuencia de un aumento de la ciclina D1, un concomitante aumento de Rb fosforilado, pero en el *Western Blot* (figura 6) no se puede apreciar esta correlación. Esto puede ser debido a que aunque la inactivación de Rb mediante fosforilación se lleve a cabo principalmente por las quinasas dependientes de ciclinas CDK4/CDK6 en asociación con la ciclina D1, en realidad es consecuencia de una cascada de eventos de fosforilación en la que participa una maquinaria compleja constituida por ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas e inhibidores de ciclinas, entre las que no solo se incluye la ciclina D1-CDK4/CDK6, sino también la ciclina A-CDK2 y la ciclina E-CDK2 (Singh et al., 2010).

En todas las fases del ciclo celular parece observarse un descenso de Rb fosforilado cuando las células se infectan con NDV. Esto podría indicar también parada de ciclo, ya que se relacionaría con un secuestro de E2F por parte de Rb, y por tanto con la inhibición de la expresión de sus genes diana, implicados en proliferación celular.

La ciclina A interviene en la fase S y el inicio de la mitosis. En fase S contribuye a la estimulación de la síntesis de DNA, y en el inicio de la mitosis promueve la iniciación de la condensación de los cromosomas y la rotura de la envuelta nuclear (Mateo et al., 2010). En la figura 6 parece observarse un aumento en la fase G_1, lo que no corresponde con la descripción de sus funciones, por lo que aunque respecto al carril control las células infectadas con NDV muestren un descenso en los niveles de la expresión de la proteína, no podemos sacar una conclusión de este experimento.

PARP es una polimerasa encargada de la síntesis de polímeros de poli-ADP ribosa (PAR) a partir de NAD^+. Cataliza la unión covalente de los polímeros PAR entre ellos o a distintas proteínas aceptoras, como histonas, proteínas de reparación del DNA, factores de transcripción y moduladores de la cromatina. Es una enzima de localización nuclear que se activa principalmente como consecuencia del daño al DNA (normalmente rotura de doble cadena), pero también puede activarse de forma independiente de daño a través de ciertas quinasas, como JNK-1 (Virag et al., 2013). Las caspasas 3 y 7 (forman parte de las vías intrínseca y extrínseca de la señalización de apoptosis) son las encargadas de inactivar a PARP-1 mediante procesamiento proteolítico generando dos fragmentos, uno de 89 KDa que corresponde con el extremo C-terminal de la proteína, y otro de 24 KDa, el extremo N-terminal. Cuando PARP-1 es procesada pierde su actividad proteolítica y el DNA no se puede reparar. El procesamiento de PARP-1 se utiliza como un claro marcador de células apoptóticas (Soldani and Scovassi, 2002).

En la figura 6 podemos ver en los carriles de las células control, una banda que corresponde con PARP sin procesar; es decir, activa, de 113 KDa. En los carriles de células infectadas con NDV, vemos una banda inferior (corresponde con el fragmento de 89 KDa) y la desaparición de la superior, lo que indica que ha habido un procesamiento proteolítico de PARP. Este resultado muestra que en todas las fases del ciclo celular la infección de células tumorales con NDV induce apoptosis.

Bax es una proteína pro-apoptótica que junto con Bak forma poros en la membrana mitocondrial externa, provocando la permeabilización de la membrana, lo que permite la salida al citosol del citocromo C. En la figura 6 parece observarse un ligero aumento de los niveles de Bax en las células infectadas con NDV respecto a las células control, lo que refuerza la afirmación realizada anteriormente, NDV induce apoptosis.

El citocromo C es una proteína pequeña hidrosoluble que forma parte de los complejos respiratorios mitocondriales. Actúa como transportador de electrones, aceptando electrones del complejo II de la cadena respiratoria, y cediéndolos a la citocromo C oxidasa, que los transfiere al oxígeno para generar agua. Por tanto en condiciones normales el citocromo C se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria. Durante el proceso apoptótico, como consecuencia de la formación de poros en la membrana mitocondrial por la oligomerización de Bax y Bak, el citocromo C sale al citosol, donde interacciona con Apaf-1 promoviendo la formación del apoptosoma, que activa la caspasa 9, encargada de activar las caspasas efectoras (Dibrova et al., 2013).

Podemos ver que en todos los puntos del ciclo celular cuando las células se infectan con NDV hay un aumento de los niveles de citocromo C. Lo que se esperaría en relación a la capacidad apoptótica del virus sería un cambio de localización de esta proteína, no un aumento de su expresión. Este resultado nos lleva a pensar que quizá el virus esté induciendo la expresión del citocromo C o estabilizando de algún modo los niveles de la proteína.

El gen supresor de tumores *p53* codifica para una proteína de 53 KDa, factor de transcripción que activa la expresión de genes relacionados con la inhibición del crecimiento y genes pro-apoptóticos. Tiene un papel esencial en la regulación de la respuesta celular ante distintas señales de estrés. Es considerada como "el guardián del genoma", su activación induce un arresto del ciclo celular en la fase G_1 o G_2/M cuando el DNA de ésta se encuentra dañado, dando un tiempo a la célula para tratar de reparar el daño (Nag et al., 2013). Si la célula no puede repararlo, o si éste es muy severo, p53 induce apoptosis. La fosforilación de p53 por distintas quinasas disocia a la proteína de su inhibidor, Mdm2, proteína que interacciona con ubiquitín-ligasas para marcar a p53 para su degradación en el complejo del proteosoma. La fosforilación de p53 por tanto promueve su acumulación y estabilización (Antoni et al., 2007).

En células infectadas con NDV solo se aprecia una diferencia clara de los niveles de p53 respecto a las células control en la fase G_2/M, donde podemos ver un marcado aumento de p53, lo que podría indicar que esta proteína está estabilizada y actuando como agente pro-apoptótico (figura 6).

En conjunto, de las observaciones de los niveles de expresión de proteínas de ciclo celular y proteínas apoptóticas en células HeLa infectadas con NDV, podemos decir que la consecuencia de la infección podría ser una parada del ciclo en G_1 y un proceso apoptótico.

Para verificar el potencial apoptótico de *Newcastle Disease Virus*, se analizó el ciclo celular mediante FACS (citometría de flujo). Las células se procesaron para citometría 48 horas después de la infección con NDV,

porque está descrito que las cepas de NDV lentogénicas tardan entre 24 y 48 horas en llevar a cabo la oncolisis, liberando la nueva progenie viral (Wheelock and Tamm, 1961).

Podemos observar que efectivamente, la infección de células HeLa con NDV causa apoptosis (figura 8).

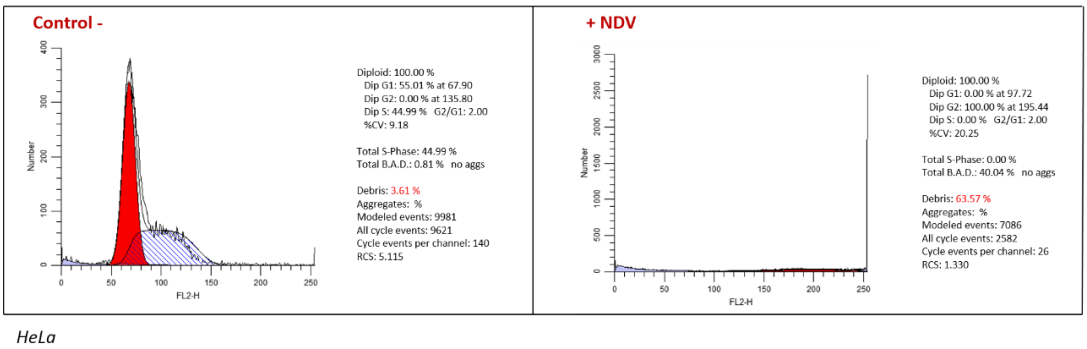

Figura 8: Análisis mediante FACS del efecto apoptótico de Newcastle Disease Virus en células HeLa a las 48 horas post-infección.

Time Course de células HeLa sincronizadas infectadas con NDV:

Como vimos anteriormente que el efecto de NDV sobre el ciclo celular es independiente de la fase del ciclo en el que las células se infecten, decidimos llevar a cabo un experimento con células HeLa sincronizadas, para tratar de observar si la infección provoca un aumento o una disminución de la velocidad de progresión del ciclo. En este caso, pudimos marcar las proteínas virales para hacer un seguimiento del ciclo infectivo del virus y verificar que las células a las que se les ha inoculado el virus efectivamente están infectadas.

Tras la infección con NDV, se indujo la progresión del ciclo y se estudiaron los niveles de expresión de proteínas celulares relacionadas con ciclo celular y apoptosis y de proteínas virales, a distintos tiempos post-infección (figura 9).

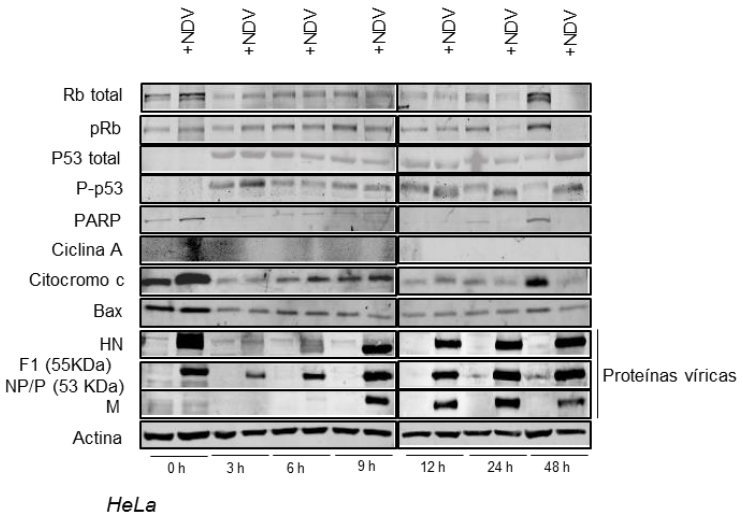

Figura 9: Time Course de células HeLa sincronizadas a partir de G_0 (0 horas). En cada punto, el carril izquierdo corresponde con células control, y el derecho con células infectadas con NDV.

De este experimento no se pudo sacar ninguna conclusión clara, ya que como se puede observar, las proteínas celulares de ciclo y las apoptóticas no se pueden comparar entre células control e infectadas porque las bandas del *Western Blot* no son nada claras. Este ensayo se repitió varias veces, pero no se obtuvieron mejores resultados.

Respecto a las proteínas virales, parece que es a las 9 horas post-infección cuando se empiezan a expresar las proteínas de NDV en la célula, y sus niveles se mantienen estables a lo largo del tiempo.

Cabe destacar el aumento claro de los niveles de citocromo C en el punto 0 h post-infección, en las células infectadas con NDV respecto a las células control.

También se llevó a cabo un análisis del ciclo celular mediante FACS de los distintos puntos establecidos en el *Time Course* para tratar de observar diferencias en el porcentaje de células apoptóticas entre las células control y las infectadas con NDV (figura 10).

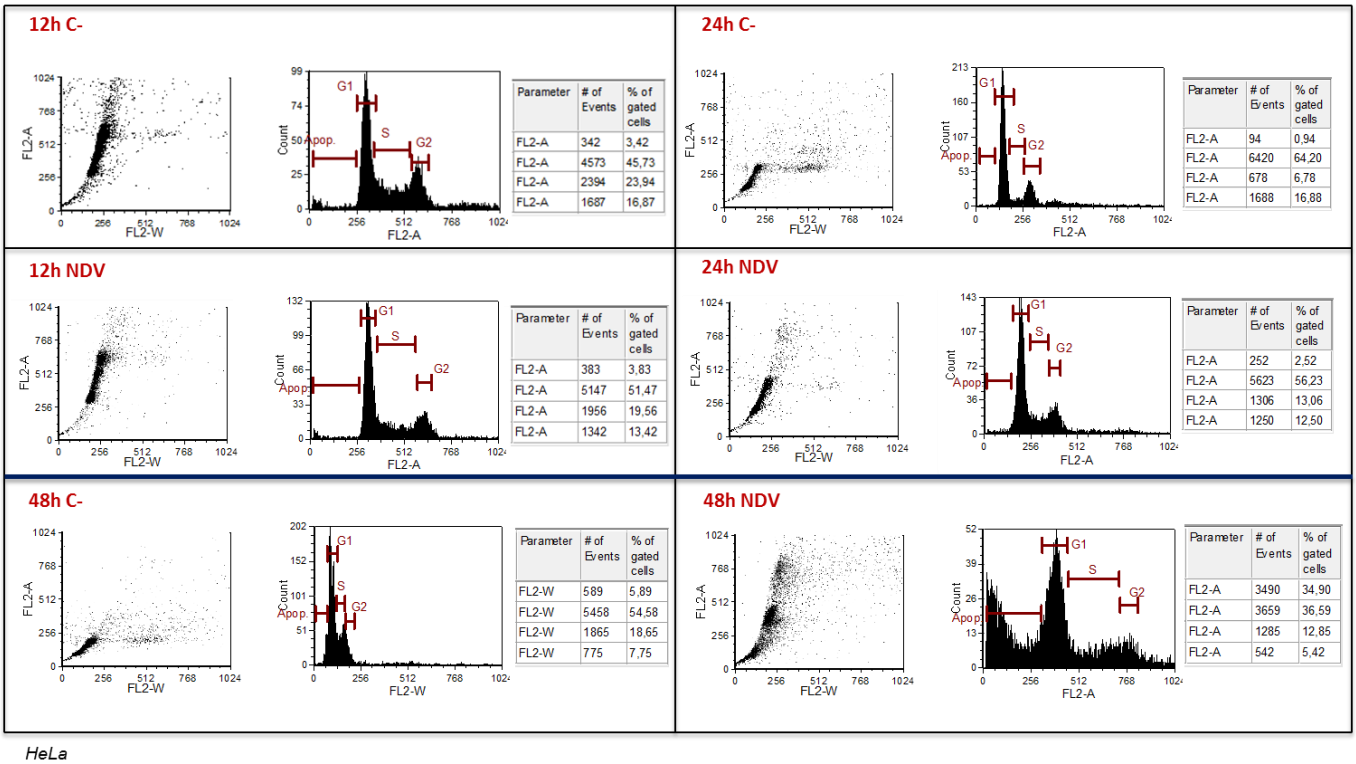

Figura 10: Análisis mediante citometría de flujo del ciclo celular de células HeLa control y HeLa infectadas con NDV. La imagen solo muestra los puntos del Time Course desde las 12h hasta las 48h.

El incremento de apoptosis parece observarse a partir de las 12 horas (de 0,94% en células control a 2,52% en células infectadas), pero es a las 48 horas post-infección donde hay un claro aumento del porcentaje de células apoptóticas, en las células control hay un 5,89% de células apoptóticas, y en las infectadas con NDV un 34,9%.

Con estos resultados podemos de nuevo verificar el efecto apoptótico de NDV en células tumorales, pero no podemos decir nada acerca del efecto de NDV sobre la progresión del ciclo celular.

Time Course de células A549 asincrónicas infectadas con NDV:

Está descrito que las células HeLa presentan una inserción del virus del papiloma humano HPV18 en el cromosoma 8 (Macville et al., 1999). Esa inserción codifica para la proteína viral E6, que forma un complejo con p53 promoviendo su ubiquitinación, marcándola para su degradación por el proteasoma. De esta forma, las células HeLa tienen deficiencias en los niveles de p53, lo que las hace más resistentes a la apoptosis respecto a otras líneas celulares (Scheffner et al., 1990). Podría ser éste el motivo de la dificultad de obtener resultados utilizando HeLa, por lo que decidimos cambiar a la línea celular A549 y llevar a cabo el mismo experimento con células asincrónicas (figura 11).

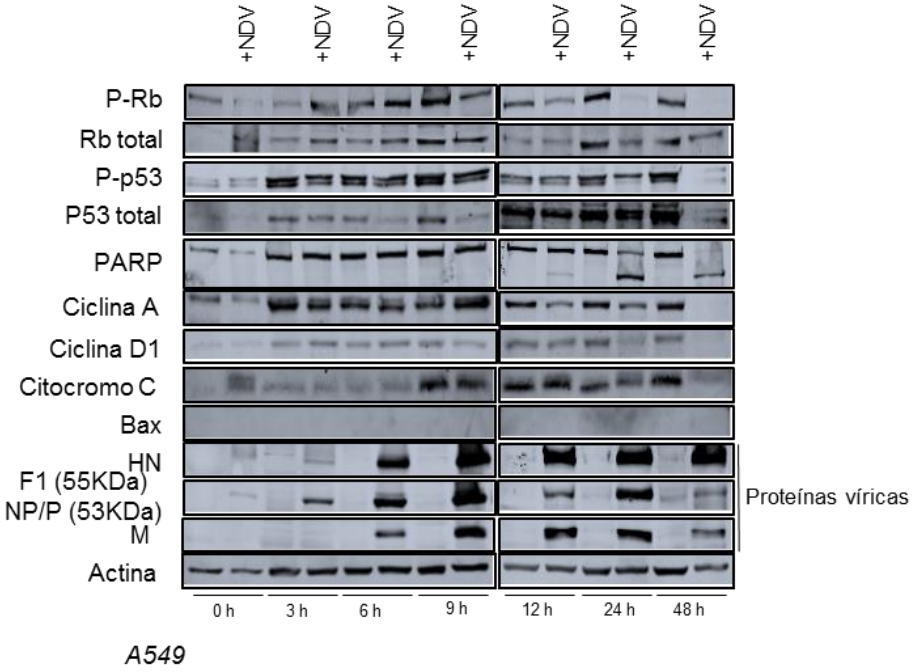

Figura 11: Time Course de células A549 asincrónicas. En cada punto, el carril izquierdo corresponde con células control, y el derecho con células infectadas con NDV.

Respecto a las proteínas celulares de progresión de ciclo, podemos ver que la ciclina D1 parece disminuir en células infectadas respecto a células control a partir de las 24 horas post-infección, lo que podría indicar que NDV comienza a inducir parada del ciclo celular entre las 12 y las 24 horas después de haber infectado a las células. Los niveles de expresión de ciclina A también disminuyen a partir de las 12 horas de la infección con NDV respecto al control, reforzando la posibilidad de que el virus esté induciendo una parada de ciclo. A partir de Rb no se pueden sacar conclusiones, porque para poder observar subidas y bajadas de activación de esta proteína los niveles de Rb total se deberían mantener constantes. Aun así, parece haber una tendencia en las primeras 9 horas a un aumento de Rb activo en las células infectadas con NDV respecto a las células control, y a partir de las 12 horas, una disminución de p-Rb en células infectadas respecto a las control. En cuanto a las proteínas apoptóticas, se observa un procesamiento proteolítico de PARP en las células infectadas a partir de las 12 horas respecto al control, lo que es indicativo de apoptosis.

En este *Western Blot* no se observa el aumento del citocromo C que vimos anteriormente, y a partir del patrón de bandas no se puede sacar ninguna conclusión. En repeticiones del experimento los resultados no mejoraron.

En A549 asincrónicas parece que las proteínas virales comienzan a expresarse 6 horas tras la infección.

Se hizo un análisis del ciclo celular mediante FACS de todos los puntos establecidos en el *Time Course* (figura 12).

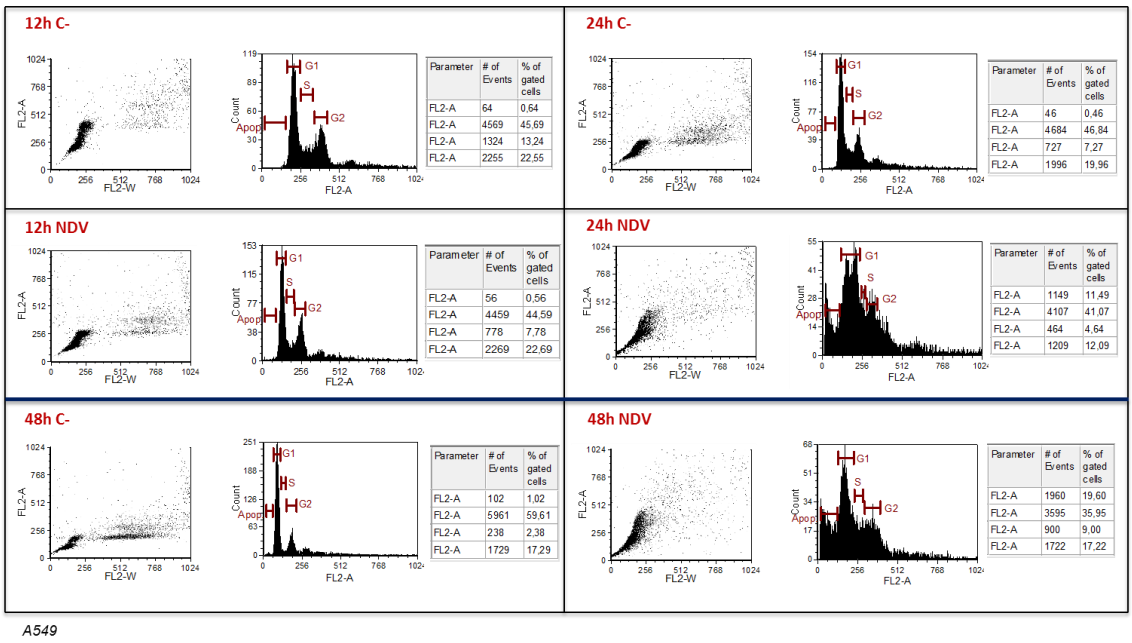

Figura 12: Análisis mediante citometría de flujo del ciclo celular de células A549 control y A549 infectadas con NDV. La imagen solo muestra los puntos del Time Course desde las 12h hasta las 48h.

El incremento de apoptosis ocurre a partir de las 24 horas, donde la infección con NDV provoca un aumento del porcentaje de células apoptóticas del 0,46% al 11,49%. A las 48 horas post-infección, el porcentaje de apoptosis en células infectadas es de 19,60%, y en el control es de 1,02%.

En este experimento vimos de nuevo el efecto apoptótico de NDV, y además parece observarse una parada del ciclo celular como consecuencia de la infección con NDV.

Time Course de células A549 asincrónicas y sincronizadas infectadas con NDV:

Como en los experimentos anteriores el punto de inflexión a partir del cual las proteínas virales comienzan a expresarse se sitúa entre las 6 y las 9 horas post-infección, decidimos llevar a cabo de nuevo un *Time Course* de 0 h a 9 h utilizando células sincronizadas (figura 13) y células asincrónicas (figuras 14).

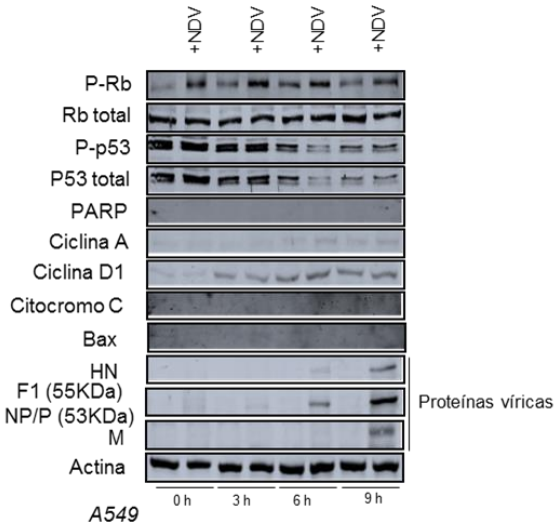

Figura 13: Time Course de células A549 sincronizadas. En cada punto, el carril izquierdo corresponde con células control, y el derecho con células infectadas con NDV.

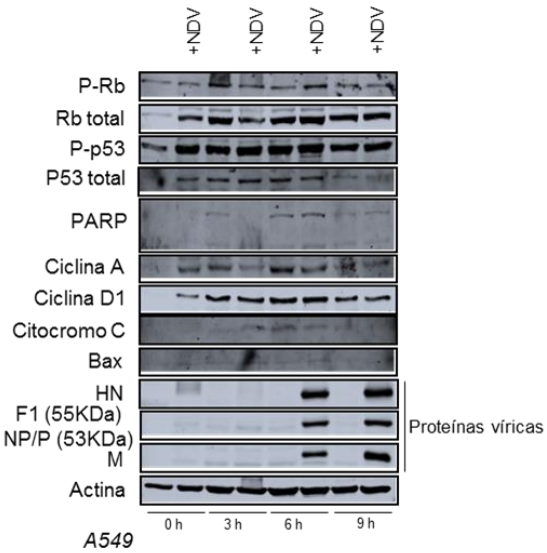

Figura 14: Time Course de células A549 asincrónicas. En cada punto, el carril izquierdo corresponde con células control, y el derecho con células infectadas con NDV.

Los niveles de expresión de la ciclina A y ciclina D1 no nos permiten hacer ninguna observación, ya que solo se han conseguido identificar en células asincrónicas (figura 14). No se han visto cambios en la expresión de la ciclina D1 como consecuencia de la infección con NDV respecto a las células control. Respecto a la ciclina A, parece haber una tendencia a disminuir en las células infectadas respecto a los controles, pero los resultados no son claros. En repeticiones de estos experimentos no se consiguió mejorar la resolución. Tampoco se puede interpretar el patrón de bandas de p-p53 y p53, pues no se observan diferencias entre las células infectadas y los controles. La proteína p53 está sujeta a regulación por muchos factores (Morgan and Kastan, 1997), por lo que observar cambios en los niveles de activación en relación con un único evento, que en nuestro caso sería la infección por NDV, no sería representativo de su función. Respecto a Rb total, parece que Rb inactivo (p-Rb) tiende a aumentar en las células infectadas con NDV respecto al control, al menos hasta las 9 horas post-infección. Esta observación fortalece la apreciación de que la inactivación de Rb, y por tanto la activación de la proliferación, parece incrementarse como consecuencia de la infección por NDV hasta las 9 horas.

Las proteínas apoptóticas no fueron detectadas en estos experimentos, por lo que no se puede sacar ninguna conclusión.

Parece que cuando las células están sincronizadas (figura 13) las proteínas virales tardan más en expresarse respecto a las células asincrónicas (figura 14).

Se llevó a cabo un análisis de ciclo celular mediante FACS pero en este *Time Course* de 0 h a 9 h no se observaron cambios en el porcentaje de células apotóticas como consecuencia de la infección con NDV respecto al control (datos no mostrados).

Localización del citocromo C en la mitocondria:

Sabemos que el citocromo C es una proteína hidrosoluble de localización mitocondrial que durante el proceso apoptótico sale al citosol promoviendo la formación del complejo del apoptosoma. Por tanto, en condiciones normales el citocromo C debe colocalizar con la mitocondria, y en condiciones apoptóticas debería aparecer libre en el citosol (Arnoult et al., 2002). Para tratar de ver la pérdida de colocalización se llevó a cabo un *Time Course* de células infectadas con NDV y se trató de localizar las proteínas mediante inmunofluorescencia (figura 15).

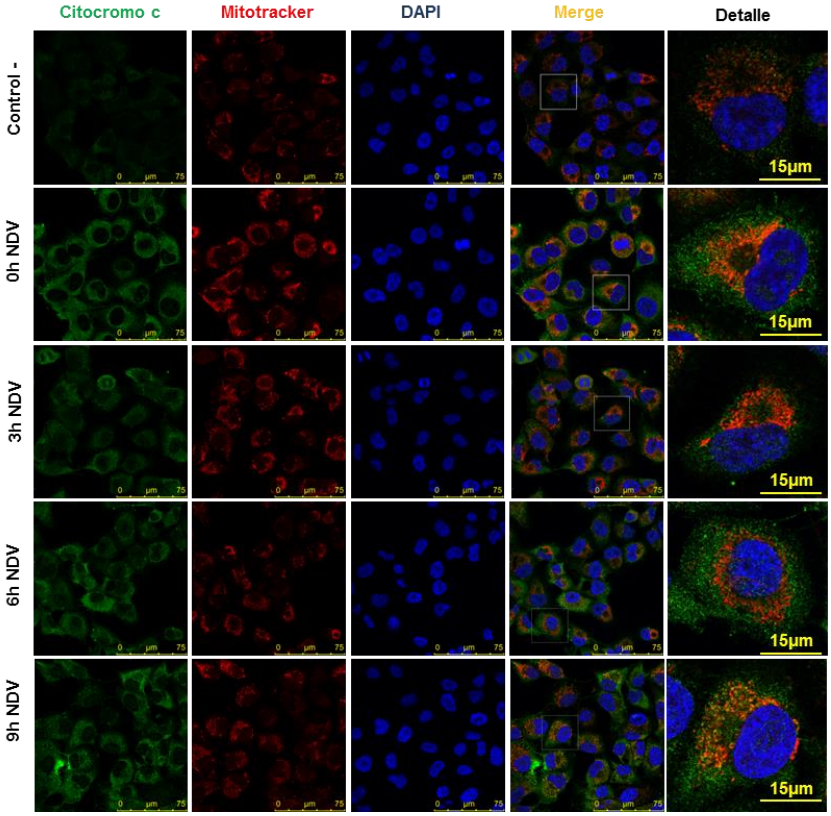

Figura 15: Inmunofluorescencia de células A549 control e infectadas con NDV a distintas horas post-infección, utilizando un anticuerpo para marcar el citocromo C y Mitotracker® para localizar las mitocondrias.

Estos resultados indican que no parece haber cambios en la localización del citocromo C 9 horas después de la infección con NDV, comparándolos con los obtenidos por otros autores en cuanto a la distribución del citocromo C en respuesta a estímulos apoptóticos (Arnoult et al., 2002). Se puede observar que la intensidad de fluorescencia verde correspondiente con el citocromo C en células control es muy baja, y que aumenta inmediatamente después de que las células se infecten con NDV, y ese aumento se mantiene constante a lo largo del tiempo, al menos hasta las 9 horas.

En estudios previos sobre el tiempo que necesita NDV para infectar células, se ha visto que cuando se utiliza una multiplicidad del virus de 500:1, todas las células del cultivo se infectan a los 30 segundos de la inoculación. Cuando la multiplicidad utilizada es de 5:1, todas las células se infectan 20 minutos tras la inoculación, y la mayoría de las células en 10 minutos estarán infectadas (Wheelock and Tamm, 1961). Por multiplicidad se

entiende el número de partículas infectivas adsorbidas por célula. Como la multiplicidad del virus que estamos utilizando es desconocida, no podemos saber el tiempo que éste requiere para ser adsorbido y comenzar a tener efectos en la célula, y utilizamos un tiempo de adsorción de 1 hora. Es posible que antes de que pase ese tiempo el virus ya haya empezado a infectar a las células y por eso a las 0 horas se observe ese drástico aumento del citocromo C.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN:

De forma global, todos los experimentos realizados hasta ahora muestran una disminución de los niveles de expresión de la ciclina D1 en células infectadas con *Newcastle Disease Virus*, que en el análisis de las distintas fases del ciclo celular, se observa en G_1 y S, lo que indica un secuestro del ciclo celular en G_1. En el *Time Course* esos cambios en ciclina D1 ocurren entre las 12 y 24 horas post-infección con NDV. También la ciclina A parece disminuir a las 12 horas post-infección. En cuanto a Rb, los experimentos parecen indicar un aumento de p-Rb como consecuencia de la infección por NDV hasta las 9 horas post-infección, y una disminución a partir de las 12 horas. Recordamos que Rb es un regulador negativo de E2F, factor de transcripción que promueve la expresión de genes tanto pro-proliferativos como pro-apoptóticos. Se ha descrito que cuando p-Rb está relacionado con apoptosis la fosforilación ocurre mediante rutas independientes de las ciclinas-CDKs, las posibles quinasas implicadas son p38, ASK1 y JNK1 (Padmanabhan, 2006 #19). En el primer resultado, el aumento de p-Rb se observaba en la fase G_2/M, donde no pudimos ver un concomitante aumento de la ciclina A ni de la ciclina D1, por lo que es posible que en este punto del ciclo la inactivación de Rb sea indicadora de un proceso apoptótico.

En conjunto, estos datos sugieren que la infección de células tumorales por NDV podría dividirse en dos etapas: en un principio (0h-9h) NDV induciría una aceleración del ciclo celular, y posteriormente (12h) promovería una parada de ciclo. Además es a partir de las 12 horas cuando se observa el procesamiento proteolítico de PARP, por lo que NDV ejerce un claro efecto apoptótico, lo que coincide con los resultados obtenidos por FACS. Esto podría deberse a que el virus en un principio para poder llevar a cabo la replicación de sus proteínas necesita de una potente maquinaria de replicación celular, utilizándola para la síntesis de sus viriones. Cuando los viriones se han formado la célula ha tenido la maquinaria replicativa secuestrada por el virus el tiempo suficiente para que se inicie el programa de apoptosis.

Hemos observado el mismo fenotipo en todas las etapas del ciclo en las que las células se infectan, NDV induce apoptosis y parada de ciclo, por lo que no parece que el estadío en el que la célula se encuentre sea relevante para la infección. Aunque en estos experimentos se ha visto que cuando las células están sincronizadas, la expresión de las proteínas de NDV se retrasa respecto a las células asincrónicas. En las células sincronizadas la inoculación del virus se lleva a cabo cuando están paradas en G_0, y es tras la inoculación y adsorción cuando se induce la progresión del ciclo. Esta explicación podría indicar que el virus necesita de un ciclo celular totalmente activo para poder replicarse correctamente. Al estar las células paradas en el momento de la infección, hasta

que éstas no inician correctamente el ciclo el virus no puede iniciar su ciclo infectivo, pues necesita de la maquinaria de replicación celular para llevar a cabo la suya propia.

En cuanto al citocromo C, no hemos conseguido ver un cambio de localización, pero sí hemos observado un drástico incremento de sus niveles tras la infección con NDV. Sería conveniente realizar estudios del estado de la mitocondria tras la infección con el virus, por ejemplo observando cambios en el potencial de membrana, y tratar de dilucidar a qué se debe ese aumento de citocromo C. Se podría llevar a cabo una RT-qPCR para analizar si el virus induce un aumento de su expresión, o si lo que provoca es una aglutinación anormal del citocromo C, o si el efecto apoptótico de NDV es muy grande y se forman muchos complejos de apoptosoma, y al estar la proteína concentrada en grandes complejos en un análisis de *Western Blot* se observe como aumento en los niveles de expresión. Se debería tener en cuenta si el citocromo C sufre algún cambio conformacional cuando forma los complejos de apoptosoma, o si el paso del microambiente del que se ve rodeado en el espacio intermembrana de la mitocondria al microambiente citosólico (por ejemplo distintos niveles de pH) provoca alguna modificación en su estructura que dificulte su detección mediante el uso de anticuerpos específicos.

Considero que en adelante el análisis debería centrarse entre las 24 y las 48 horas post-infección, ya que es en este intervalo de tiempo donde parece que NDV ejerce su efecto en parada de ciclo y apoptosis. También se podría estudiar si la proteína M viral mimetiza el efecto de la proteína Bak en el proceso apoptótico de la célula tumoral, ya que se ha descrito la presencia de una región capaz de unirse al dominio BH de Bax, es posible que la apoptosis observada no sea debida a una respuesta de la célula ante una infección viral, sino a que el virus por sí mismo inicie el programa de apoptosis.

BIBLIOGRAFÍA

1 Alexander, D.J., Aldous, E.W., and Fuller, C.M. (2012). The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. Avian pathology : journal of the WVPA *41*, 329-335.
2 Antoni, L., Sodha, N., Collins, I., and Garrett, M.D. (2007). CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin? Nature reviews Cancer *7*, 925-936.
3 Arnoult, D., Parone, P., Martinou, J.-C., Antonsson, B., Estaquier, J., and Ameisen, J.C. (2002). Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. The Journal of cell biology *159*, 923-929.
4 Capua, I., and Alexander, D.J. (2009). Avian Influenza and Newcastle Disease: A Field and Laboratory Manual (Springer).
5 Cassel, W.A., and Garrett, R.E. (1965). Newcastle disease virus as an antineoplastic agent. Cancer *18*, 863-868.
6 Coller, H.A. (2007). What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. Nature reviews Molecular cell biology *8*, 667-670.
7 D'Amelio, M., Cavallucci, V., and Cecconi, F. (2010). Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. Cell death and differentiation *17*, 1104-1114.
8 Dibrova, D.V., Cherepanov, D.A., Galperin, M.Y., Skulachev, V.P., and Mulkidjanian, A.Y. (2013). Evolution of cytochrome bc complexes: from membrane-anchored dehydrogenases of ancient bacteria to triggers of apoptosis in vertebrates. Biochimica et biophysica acta *1827*, 1407-1427.

9 Elankumaran, S., Rockemann, D., and Samal, S.K. (2006). Newcastle disease virus exerts oncolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death. Journal of virology *80*, 7522-7534.
10 Ferreira, L., Villar, E., and Munoz-Barroso, I. (2004). Conformational changes of Newcastle disease virus envelope glycoproteins triggered by gangliosides. European journal of biochemistry / FEBS *271*, 581-588.
11 Ganar, K., Das, M., Sinha, S., and Kumar, S. (2014). Newcastle disease virus: current status and our understanding. Virus research *184*, 71-81.
12 Heiber, J., and Barber, G. (2012). Evaluation of Innate Immune Signaling Pathways in Transformed Cells. In Oncolytic Viruses, D.H. Kirn, T.-C. Liu, and S.H. Thorne, eds. (Humana Press), pp. 217-238.
13 Macville, M., Schrock, E., Padilla-Nash, H., Keck, C., Ghadimi, B.M., Zimonjic, D., Popescu, N., and Ried, T. (1999). Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. Cancer research *59*, 141-150.
14 Massague, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. Nature *432*, 298-306.
15 Mateo, F., Vidal-Laliena, M., Pujol, M.J., and Bachs, O. (2010). Acetylation of cyclin A: a new cell cycle regulatory mechanism. Biochemical Society transactions *38*, 83-86.
16 Molouki, A., Hsu, Y.T., Jahanshiri, F., Abdullah, S., Rosli, R., and Yusoff, K. (2011). The matrix (M) protein of Newcastle disease virus binds to human bax through its BH3 domain. Virology journal *8*, 385.
17 Morgan, S.E., and Kastan, M.B. (1997). p53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer. Advances in cancer research *71*, 1-25.
18 Nag, S., Qin, J., Srivenugopal, K.S., Wang, M., and Zhang, R. (2013). The MDM2-p53 pathway revisited. Journal of biomedical research *27*, 254-271.
19 Reichard, K.W., Lorence, R.M., Cascino, C.J., Peeples, M.E., Walter, R.J., Fernando, M.B., Reyes, H.M., and Greager, J.A. (1992). Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells. The Journal of surgical research *52*, 448-453.
20 Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., and Howley, P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. Cell *63*, 1129-1136.
21 Singh, S., Johnson, J., and Chellappan, S. (2010). Small molecule regulators of Rb-E2F pathway as modulators of transcription. Biochimica et biophysica acta *1799*, 788-794.
22 Soldani, C., and Scovassi, A.I. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: An update. Apoptosis *7*, 321-328.
23 Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *76*, 4350-4354.
24 Virag, L., Robaszkiewicz, A., Rodriguez-Vargas, J.M., and Oliver, F.J. (2013). Poly(ADP-ribose) signaling in cell death. Molecular aspects of medicine *34*, 1153-1167.
25 Wheelock, E.F., and Tamm, I. (1961). Effect of multiplicity of infection on Newcastle disease virus-HeLa cell interaction. The Journal of experimental medicine *113*, 317-338.

26 García-Sastre A. (1990). Estudio sobre las proteínas del virus de la enfermedad de Newcastle y del virus de la gripe C. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Salamanca.

27 Barasoain J. A. (2009). El virus de la enfermedad de Newcastle: Modelo de interacción virus-célula y vector de expresión.