



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA 3A DEL VIRUS
DE LA FIEBRE AFTOSA. ESTUDIO DE SU
DIMERIZACIÓN, CAPACIDAD DE UNIÓN A
MEMBRANAS Y DINÁMICA CELULAR**

TESIS DOCTORAL

MÓNICA GONZÁLEZ MAGALDI

Madrid, 2012

Memoria presentada por la Licenciada Mónica González Magaldi para optar al grado de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, Octubre 2012

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el “Centro de Biología Molecular Severo Ochoa” (CSIC-UAM) bajo la dirección del Doctor Francisco Sobrino Castelló.

A Diego y Sofía

Agradecimientos

Son muchas las personas y los grupos a los que quisiera agradecer por haber participado de una u otra manera en la realización de esta Tesis Doctoral. Primero quiero dar las gracias a Pachi, mi Director, muchos años han pasado desde que recibí su llamada para trabajar en su labo, en el edificio de biología cuando todavía no teníamos aún ni cubetas de electroforesis, y me recibieron con Charo desde ese día con un cariño y afecto muy especial. Gracias por haberme apoyado todo este tiempo y haber hecho posible la realización de esta tesis.

Quiero agradecer especialmente también a Leo, por su dedicación e implicación en el proyecto, por la paciencia y las horas dedicadas a consultas y discusiones científicas, gracias por todos tus consejos.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, con los que hemos compartido muchas cosas, muchas horas y que hacen que sea una alegría venir a trabajar cada día; a los que están: mi gran amigo Miguel, mi apoyo técnico y moral en tantos experimentos, fue una alegría que volvieras al CBM, mi hermanita postiza Angelita, gracias por tu amistad incondicional, por aguantarme y animarme cada día, a Flavi, mi italiana favorita, a Yuri por ser tan sincero, a Marga por su capacidad de aportar siempre preguntas a nuestras investigaciones, a Miguel R por tantas charlas matinales, a Belén con su constancia para venir a los seminarios y darnos su punto de vista; a los que han estado: Maite todavía te echamos de menos, Raúl compañero de tema, Mónica G mi tocaya compañera de escritorio, Marina con la que purificábamos proteínas entre risas; los estudiantes, Cristina, María y Adriana; y los que han venido de fuera: Brian, Marianne, Jacob, Berta y tantos más.

Gracias a todas las personas del CBM con los que convivimos cada día, a todos los servicios en general y en particular al servicio de cultivos especialmente M^a Angeles, Anuncia y Alfonso, nos hacen más fácil nuestro trabajo, son personas estupendas y sin ellos la vida en cultivos no se si sería posible, también incluyo a Mercedes que ha mejorado más aún muchas cosas; el servicio de microscopía óptica y confocal, por su excelente trabajo, su colaboración a las técnicas *in vivo* y su buena predisposición para trabajar, sacarme dudas y ayudarme a ponerlas a punto, a Carlos, M^a Angeles, Vero, Maite; al servicio de microscopía electrónica, siempre dispuestos a ayudarnos, a Maite y Milagros y en el nuevo edificio a Germán; al servicio de proteómica, a Marina y Mercedes; al servicio de bioinformática, a Paulino por colaborar con el modelo y darnos

su punto de vista. A los investigadores que hemos consultado: Miguel Angel Martínez por sus consejos, y a Juanfra por ayudarme con el aislamiento de lipid rafts; a Ignacio Sandoval por escuchar nuestro proyecto y aconsejarnos sobre nuestra proteína; a Amelia Nieto por colaborar cediéndonos su sistema de doble híbrido en células de mamífero y a Ariel por ayudarme en lo que necesité; a Encarna Martínez Salas por su ayuda con las mediciones de la Act Luc en particular a Jorge por pasarme sus protocolos; a Benno Wok por cedernos el plásmido de retículo para las técnicas *in vivo*; a David Andreu, que ha colaborado con los péptidos, sintetizando y resintetizando cuando ha hecho falta; a Emiliana Brocchi por los anticuerpos; E.Giralt por su colaboración con los análisis estructurales; a Elena del laboratorio de Javier Dominguez del INIA por ayudarme con la purificación del Ac.; a Javier del animalario por su ayuda con las inmunizaciones.

A mis amigos de cafés y mejicanos, que también han ido yendo y viniendo, Ester, Desi, Cristina, Ana O, Bruno, Elena. A mis compañeros de cultivos de antes y de ahora de la tríada 205, 105, 121: del 205: Eva, Mila, Verónica, Alicia; del 121: Mónica H, Maca, Samuel, Armando, Vero, Hector, Ana, Nacho, Isabel, Celia; a Carola, Pepa y Patricia.

A mis chicas del CNB, a mi gran amiga Carmen, que fue quien se sentó conmigo a hacer mi primer clonaje en España y reavivó mi vena investigadora, a la dulce y paciente Marta y a Astrid que nos hizo parte de su familia.

A mi "familia postiza de Valdemoro", en particular mis amigos Paloma y Gonzalo, Jesús y Queca, que siempre han estado para lo que hemos necesitado.

A tantísimos amigos y mi familia en Uruguay, mis abuelos, mis compañeros de laboratorio del hospital, de carrera, mis amigas Natalia y Carla. A mis padres, gracias por tantas cosas..., por apoyarme en todo lo que he emprendido desde haber elegido una carrera "no convencional" allí hasta emigrar y vivir tan lejos de casa. Gracias. A mis hermanas, que sigo echando mucho de menos, por quererme tanto y darme unos sobrinos hermosos.

Finalmente gracias a mis pequeños niños, Diego y Sofía, a quienes dedico esta Tesis y fueron una parte muy especial de ella y a mi querido Martín, sin duda no hubiera llegado hasta aquí sin tí.

Índice*

Abreviaturas

..... 1

Resumen en inglés

..... 7

Introducción

..... 11

- I1. La enfermedad y su diagnóstico 11
- I2. El agente etiológico de la fiebre aftosa 13
- I3. Organización genómica 14
- I4. Ciclo infeccioso 20
 - I4.1. Unión al receptor y entrada a la célula 20
 - I4.2. Traducción de proteínas virales..... 21
 - I4.3. Replicación del genoma 22
 - I4.4. Encapsidación y maduración 23
- I5. Reorganización de membranas celulares por virus 25
- I6. Proteína 3A..... 26
 - I6.1. Poliovirus 26
 - I6.2. Coxsackievirus..... 29
 - I6.3. Virus de la Fiebre Aftosa 30

Objetivos

..... 35

Materiales y métodos

..... 39

- M1. Líneas celulares eucarióticas 39
- M2. Virus..... 39
- M3. Clones infecciosos..... 40
- M4. Plásmidos 41
- M5. Cepas bacterianas de *E.coli* 42
- M6. Anticuerpos 43
- M7. Clonaje, expresión y purificación de las proteínas 3A, N-ter 3A, C-ter 3A, C-ter 3AB1, C-ter 3AB3..... 44

M7.1. Metodología de clonaje	44
M7.2. Expresión de proteínas.....	46
M7.3. Purificación	46
• M8. Técnicas de análisis y detección de proteínas.....	47
M8.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.....	47
M8.2. <i>Western blot</i>	47
M8.3. <i>Dot blot</i>	48
M8.4. Cuantificación de proteínas	48
M8.5. Inmunoprecipitación	48
M8.6. Filtración por centrifugación en membranas de celulosa (Centricón)	49
M8.7. Análisis por espectrometría de masas (Maldi-TOF)	50
• M9. Análisis microscópico de células bacterianas que expresan la proteína 3A y derivados	51
M9.1. Inmunomicroscopía de bacterias.....	51
M9.2. Microscopía electrónica de bacterias	51
• M10. Producción de anticuerpos policlonales frente a los extremos N-ter y C- ter de la proteína 3A.....	52
• M11. Sistema de doble híbrido en células de mamífero.....	53
• M12. Clonaje en el plásmido de expresión eucariota pEGFP-C2	56
• M13. Clonaje del doble mutante 3AL38EL41E en pRSV.....	58
• M14. Secuenciación	59
• M15. Tratamientos bioquímicos para caracterizar interacciones de la proteína 3A con membranas celulares.....	60
M15.1. Transfección y preparación de lisados de monocapas.....	60
M15.2. Centrifugación y tratamientos bioquímicos	60
M15.3. Fraccionamiento de membranas en gradientes de densidad por centrifugación de equilibrio.....	60
• M16. Péptidos sintéticos.....	61
• M17. Inmunofluorescencia indirecta.....	62
• M18. Técnicas de microscopía <i>in vivo</i>	63
M18.1. Microscopía <i>Time lapse</i>	63
M18.2. Recuperación de la fluorescencia luego del <i>photobleaching</i>	63

M18.3. Pérdida de fluorescencia durante el <i>photobleaching</i>	64
• M19. Ensayo de ligación por proximidad <i>in situ</i>	65
• M20. Métodos bioinformáticos para predicción de la estructura de la región N-ter de la proteína 3A de VFA	66
• M21. Métodos estadísticos y análisis de los datos	66

Resultados

.....	71
• R1. Cinética de expresión de proteínas no estructurales en el ciclo viral del VFA	71
• R2. Estudio de la proteína 3A de VFA: caracterización de su capacidad de dimerización	72
R2.1. Expresión de proteína 3A completa en <i>E.coli</i>	72
R2.1.1. Filtración por centrifugación en membranas de celulosa	74
R2.1.2. Análisis por espectrometría de masas (Maldi-Tof)	75
R2.2. Expresión y purificación de los distintos fragmentos de la proteína 3A	77
R2.2.1. Expresión de G1, G2, G3, y G4	77
R2.2.2. Purificación de distintos fragmentos de la proteína 3A	79
R2.2.3. Cuantificación de proteína G4 purificada	82
R2.3. Análisis por microscopía de células bacterianas que expresan los fragmentos G1, G2, G3 y G4	83
R2.3.1. Microscopía óptica	83
R2.3.2. Análisis ultraestructural por microscopía electrónica	85
R2.4. Obtención de anticuerpos frente al extremo N-ter y C-ter de la proteína 3A	87
• R3. Modelo de la estructura de la región N-ter de la proteína 3A de VFA	90
• R4. Expresión transitoria en células eucariotas la proteína 3A y de mutantes que se predice interfieren en su dimerización	93
• R5. Análisis de la capacidad de dimerización de la proteína 3A empleando un Sistema de doble híbrido en células de mamífero	94
• R6. Ligación <i>in situ</i> por proximidad para detectar homodimerización de la proteína 3A	98

• R7. Estudio de la dimerización de la proteína 3A empleando péptidos sintéticos de su región N-terminal.....	102
• R.8. Estudio <i>in vivo</i> de la dinámica de la proteína 3A en células eucariotas...	104
R8.1. Caracterización de las proteínas de fusión	105
R8.2. Caracterización <i>in vivo</i> de células transfectadas con pEGFP3Awt	109
R8.3. Análisis biofísico de la dinámica de las proteínas.....	111
R8.3.1. Análisis por microscopía FRAP	111
R8.3.2. Análisis por microscopía FLIP	114
• R9. Caracterización bioquímica de la unión de la proteína 3A a membranas celulares.....	118
• R10. Análisis de la asociación de 3A con membranas ricas en <i>lipid rafts</i>	123
<u>Discusión</u>	127
<u>Conclusiones</u>	143
<u>Bibliografía</u>	147
<u>Anexos</u>	169

* Para facilitar su lectura, en la presente Tesis Doctoral, cuando se haga referencia a cada uno de los apartados, se utilizará la primera letra y el número correspondiente, e.g. materiales y métodos 1.2 se citará como M1.2.

Abreviaturas

aa	Aminoácido
Ac	Anticuerpo/s
AcMo	Anticuerpo Monoclonal/es
AcPo	Anticuerpo Policlonal/es
ANOVA	Análisis de la varianza (<i>Analysis Of Variance</i>)
BFA	Brefeldina A
BHK	Línea celular derivada de riñón de hamster (<i>Baby Hamster Kidney</i>)
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CCD	Dispositivo de carga acoplada (<i>Charge-coupled device</i>)
<i>cre</i>	Elemento de replicación en <i>cis</i> (<i>Cis-acting Replication Element</i>)
C-ter/ terminal	Carboxilo-terminal
CVB	Coxsackievirus B
Da	Dalton
DAPI	4'-6 diamidina-2-fenilindol (<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DEPC	Diethylpirocarbonato
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
dNTP	2'-desoxinucleósido-5'-trifosfato
EDTA	Etilen-Diamino-Tetraacetato
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECP	Efecto Citopático
EMCV	Virus de la encefalomiocarditis
EV	Enterovirus
EVB	Enterovirus bovino
eIF4G	Factor eucariótico de iniciación de la traducción (<i>eukaryotic translation Initiation Factor 4G</i>)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay</i>)

FA	Fiebre aftosa
FLIP	Pérdida de fluorescencia durante el <i>photobleaching</i> (<i>Fluorescent Loose In Photobleaching</i>)
FRAP	Recuperación de la fluorescencia después del <i>photobleaching</i> (<i>Fluorescent Recovery After Photobleaching</i>)
g	Valor de aceleración de la gravedad
GBF1	Factor de intercambio de nucleótidos de guanosina resistente a brefeldina A específico de Golgi (<i>Golgi-specific Brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange Factor 1</i>)
GEF	Factor de intercambio de nucleótidos de guanosina (<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
h	hora/s
IF	Inmunofluorescencia
IFN	Interferón
IRES	Sitio interno de entrada de ribosomas (<i>Internal Ribosome Entry Site</i>)
ITAF	Factor trans-activante del IRES (<i>IRES Trans-Acting Factor</i>)
kDa	kilodalton
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
M	Molar
m.d.i.	Multiplicidad de infección
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
min	minuto/s
ml	mililitro
mm	milímetro
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal (Oficina Internacional de Epizootias)
p.i.	post-infección
p.t.	post-transfección
Ni-NTA	Níquel-Ácido nitriloacético
nt	Nucleótido/s

N-ter/ terminal	Amino-terminal
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PCBP	Proteína de unión a poli-C (<i>Poli-C Binding Protein</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Proteína/s Estructurales
PCBP	Proteína de unión a poli C (<i>Poli-C Binding Protein</i>)
PI4P	Fosfatidil inositol-4-fosfato (<i>Phosphatidil inositol-4-phosphate</i>)
PI4PKB	Fosfatidil inositol-4-fosfato kinasa III β (<i>Phosphatidil inositol-4-phosphate kinase III β</i>)
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro (<i>PhenylMethylSulfonylFluoride</i>)
PNE	Proteína/s No Estructural/es
PTBP	Proteína de unión a tramo de polipirimidinas (<i>Polypyrimidine Tract Binding Protein</i>)
PV	Poliovirus
RHA	RNA helicasa A (<i>RNA Helicase A</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico
R.O.I	Región de interés (<i>region of interest</i>)
RT-PCR	Reacción de retrotranscripción seguida de una amplificación por PCR
r.p.m	Revoluciones por minuto
s	segundo
S	Svedberg
SDS	Dodecil Sulfato Sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SFB	Suero Fetal Bovino
SL	<i>Steem Loop</i>
SV40	Virus simio 40 (<i>Simian Virus 40</i>)
U	Unidades
UTR	Región no codificante (<i>UnTranslated Region</i>)
V	Voltio

VFA	Virus de la Fiebre Aftosa (<i>foot-and-mouth disease virus, FMDV</i>)
WAHID	Interfaz de la base de datos del sistema mundial de información zoonosanitaria (<i>world animal health information databank</i>)
wt	Tipo silvestre (<i>wild type</i>)
µl	microlitro
Ø	Diámetro

Códigos de una y tres letras para los aminoácidos

Alanina	Ala, A	Leucina	Leu, L
Arginina	Arg, R	Lisina	Lys, K
Ácido aspártico	Asp, D	Metionina	Met, M
Asparagina	Asn, N	Fenilalanina	Phe, F
Cisteína	Cys, C	Prolina	Pro, P
Ácido glutámico	Glu, E	Serina	Ser, S
Glicina	Gly, G	Tirosina	Tyr, Y
Glutamina	Gln, Q	Treonina	Thr, T
Histidina	His, H	Triptófano	Trp, W
Isoleucina	Ile, I	Valina	Val, V

RESÚMEN EN INGLÉS

Resumen en inglés

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) is a positive single strand RNA virus that belongs to the *Picornaviridae* family and causes a highly transmissible and damaging livestock disease. Its genome codes for structural and non structural (NSP) viral proteins. NSP 3A can play different roles in picornavirus replication and growth, including interactions with cell membranes through its hydrophobic region. FMDV 3A is unique among picornaviruses in that its C-terminal region is considerably longer and it is linked to three tandem-copies of 3B, instead of a single one. Homodimerization of 3A has been shown to be relevant for its biological activity in enteroviruses such as poliovirus and coxsackie virus B3.

In this study, we have attempted to gain insight into the poorly understood structure-function relationship of FMDV 3A. Structural analyses from FMDV 3A expressed in *E.coli* were impaired by the difficulties found for its purification. Nevertheless, these experiments provided the first evidence on the 3A capacity to form dimers. In addition, the analysis of the effect of the expression of 3A and fragments of this protein revealed that its N-terminal fragment induced membrane alterations in bacterial cells.

Homodimerization of FMDV 3A in susceptible cultured cells was evidenced by an *in situ* protein fluorescent ligation assay in infected cells, as well as in cells transiently expressing this protein. A molecular model of the N-terminal fragment of FMDV 3A protein, derived from the structure of the poliovirus 3A protein, predicted a hydrophobic interface spanning residues 25 to 44 as the main determinant for 3A dimerization. Replacements L38E and L41E, involving charge acquisition at residues predicted to contribute to the hydrophobic interface, reduced the dimerization signal in the protein ligation assay, and prevented the detection of dimer/multimers species in both transiently expressed 3A proteins and in synthetic peptides reproducing the N-terminus of 3A.

On the other hand, transiently expressed FMDV 3A behaved in a polyvalent manner in experiments aimed to study its interactions with cell membranes. Thus, only about 50% of the protein was recovered in the soluble fraction of transfected cells and treatment of the insoluble protein with different agents rendered two fractions with different solubilization patterns, each corresponding to peripheral and integral membrane proteins, respectively.

Finally, biophysical studies of protein dynamics in living cells using fusions with GFP revealed that 3A showed a confined movement, with a mobile fraction determined by FRAP analyses of about 40%. In addition, 3A exhibited characteristics of a protein mainly associated to a continuous compartment in the cell, as revealed by FLIP analyses.

INTRODUCCIÓN

Introducción

1. La enfermedad y su diagnóstico

La fiebre aftosa (FA) es una importante enfermedad vírica del ganado, sumamente contagiosa y de repercusiones económicas considerables (Sobrino y col., 2001a; 2004). El VFA (virus de la FA) infecta a miembros del orden *Artiodactyla* (mamíferos de pezuña hendida), como también a unas pocas especies en otros órdenes. Cada especie afectada varía en el grado de susceptibilidad a la infección y a la enfermedad clínica, así como en la capacidad de transmitir el virus a otros animales. El ganado susceptible a la FA incluye bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, búfalos y renos. Llamas, alpacas y camellos pueden ser infectados experimentalmente. El VFA también puede infectar al menos 70 especies de animales silvestres incluyendo búfalos africanos (*Syncerus caffer*), bisontes (*Bison spp.*), alces, gamuza, jirafas, ñúes, facóqueros, kudus, impalas, y varias especies de ciervos, antílopes y gacelas. Las especies susceptibles de pezuña no hendida incluyen erizos, armadillos, canguros, nutrias, capibaras, cobayas, ratas y ratones. Se han reportado infecciones en elefantes africanos y asiáticos en parques zoológicos; sin embargo, los elefantes africanos no se consideran susceptibles a la fiebre aftosa en condiciones naturales (Alexandersen y col., 2005; Bhattacharya y col., 2003; Letshwenyo y col., 2006; Thomson y col., 2003). Su transmisión a humanos se considera muy infrecuente, estando incluso sometida a controversia (David y col., 2001). Los pocos casos descritos, hace décadas, se han asociado con el consumo de leche no pasteurizada, productos cárnicos de animales infectados así como con el contacto directo con animales infectados. (Capella, 2001).

En las poblaciones susceptibles del ganado doméstico, la morbilidad es de casi un 100%, siendo los animales de cría intensiva más susceptibles que las razas tradicionales. La enfermedad es rara vez fatal en los animales adultos pero la mortalidad entre los animales jóvenes suele ser alta debido a la miocarditis o a la falta de amamantamiento si la madre está afectada por la enfermedad. Ésta se caracteriza por la aparición de fiebre y úlceras en forma de ampollas o vesículas en la lengua, labios, boca, ubres y entre las pezuñas. La FA ocasiona graves pérdidas de producción y aunque la mayoría de animales afectados se recupera, la enfermedad a menudo los deja debilitados (Kahn C.M., 2005).

El principal mecanismo de propagación del virus es la vía aérea, ya sea en forma de aerosoles o por la saliva de animales infectados. También se puede propagar por contacto indirecto mediante personal o materiales contaminados; de esta manera el virus alcanza el tracto respiratorio (Alexandersen y col., 2005). La infección inicial ocurre preferentemente en la superficie epitelial del paladar blando y la nasofaringe adyacente, con la subsiguiente propagación del virus a través de los nodos linfáticos cercanos (Klein, 2009).

La FA es una enfermedad incluida en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres, 2011 de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (capítulo 1.2 artículo 1.2.3) y debe ser declarada a la OIE (capítulo 1.1 – Notificación de enfermedades y datos epidemiológicos). Es la primera enfermedad para la cual la OIE ha establecido una lista oficial de países y zonas reconocidos como libres con o sin vacunación. (<http://www.oie.int>).

La FA hoy en día es endémica en diferentes partes de Asia, África, Oriente medio y América del Sur (Fig.1). Siendo una de las enfermedades animales mas contagiosas y transmisibles (Sobrino y col., 2001b), por lo que está considerada como ejemplo de enfermedad transfronteriza (Leforban y col., 2002). En aquellos países declarados libres de FA, su aparición provoca la inmovilización y sacrificio de animales, así como el cierre de mercados ganaderos y derivados, lo que hace que la enfermedad tenga un gran impacto en el comercio nacional e internacional (Rweyemamu y col., 1999; Sutmoller y col., 2003).

En áreas donde la FA es endémica, el control de la enfermedad incluye la inmunización regular de los animales expuestos con vacunas producidas a partir de virus inactivados (Doel, 2003; Golde y col., 2005).

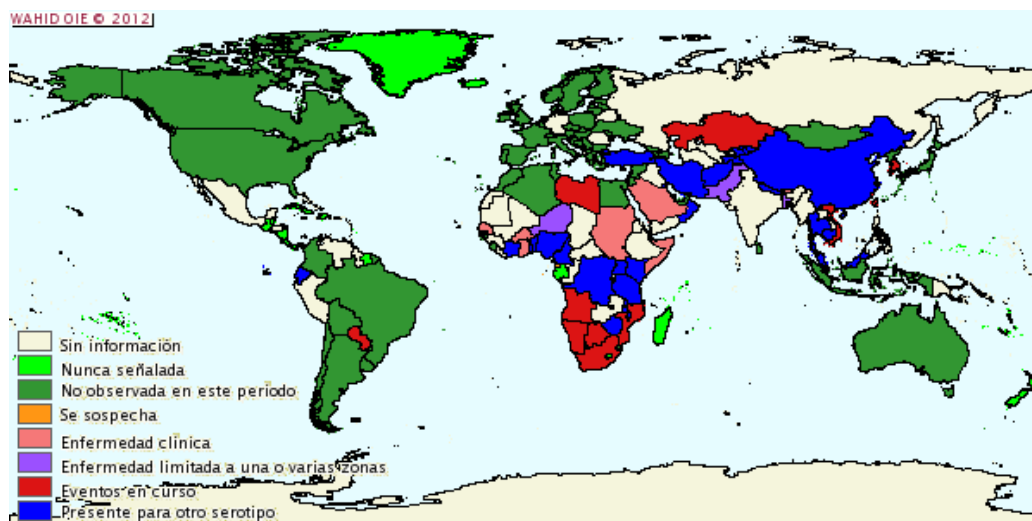


Figura 1. Distribución mundial de casos de FA del segundo semestre del año 2011. Obtenido de la interfaz de la base de datos del sistema mundial de información zoonosaria (WAHID).

La FA no puede ser clínicamente diferenciada de otras enfermedades vesiculares animales como la enfermedad vesicular del cerdo, la estomatitis vesicular y el exantema vesicular. Por ello, el diagnóstico diferencial de laboratorio de cualquier caso sospechoso de FA se considera de urgencia.

Su diagnóstico requiere el aislamiento del virus, o la demostración de la presencia de antígeno o de ácido nucleico viral en las muestras de tejidos o fluidos. También puede utilizarse para su diagnóstico la detección de anticuerpos específicos contra el virus dirigidos frente a las proteínas no estructurales (PNE); estos Ac se consideran indicadores de la infección, independientemente del estado de vacunación de los animales (Manual de pruebas de diagnóstico y Vacunas para animales terrestres, 2012 OIE capítulo 2.1.5).

2. El agente etiológico de la fiebre aftosa

La enfermedad fue descrita por primera vez hacia 1546, cuando H. Fracastorio relata una epidemia con las características de la FA (Fracastorius, 1546). Ya en 1897, Loeffler y Frosch demuestran que el causante de la enfermedad es un agente infeccioso, más pequeño que las bacterias y que se podía filtrar (Loeffler F., 1897): el virus de la fiebre aftosa (VFA).

El VFA pertenece a la familia *Picornaviridae* y es el miembro prototipo del género *Aphthovirus* (Rueckert, 1996), al cual pertenecen también el virus de la rinitis equina A

(Li y col., 1996) y el virus de la rinitis bovina 2 (Hollister y col., 2008). La alta variabilidad antigénica y genética del VFA (Domingo y col., 1980) ha originado su clasificación en siete serotipos: O, A, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3 y Asia 1 (Pereira, 1976); existiendo en cada uno de ellos numerosos subtipos (Knowles y col., 2003). La infección con un serotipo no confiere inmunidad frente a otros serotipos (Rweyemamu y col., 2008). Esta alta variabilidad ha hecho que el VFA sea un modelo de estudio de la variación genética y antigénica de los virus RNA. Los resultados obtenidos con este virus han contribuido decisivamente a entender que las estructuras de las poblaciones virales son cuasiespecies, compuestas por RNA correspondientes a virus con un amplio espectro de eficacia biológica (*fitness*) frente a las diferentes presiones selectivas del ambiente (Domingo y col., 1985; Ojosnegros y col., 2011). Esta característica constituye la base de la elevada adaptabilidad de los virus RNA a diferentes cambios en el entorno (Domingo y col., 1997). Una de las consecuencias de las cuasiespecies es la rápida selección de variantes virales frente a diferentes presiones selectivas, como tratamientos farmacológicos (Sierra y col., 2007) o cambios en la presión inmunológica (Baranowski y col., 2003; Lea y col., 1994). Esta última característica constituye uno de los problemas principales para el control de la FA mediante vacunación (Barteling y col., 1991).

3. Organización genómica

El virión del VFA está formado por una partícula de coeficiente de sedimentación de 140S que contiene una molécula de RNA monocatenario de polaridad positiva y 60 copias de cada una de las 4 proteínas estructurales (PE) (VP1, VP2, VP3 y VP4) que se asocian formando una cápsida icosaédrica de 30 nm de Ø. Su organización genómica es similar a la del resto de los picornavirus (Rueckert y col., 1984). Como muestra en la Fig. 2, el RNA de VFA está formado por aproximadamente 8500 nucleótidos (nt) y contiene un único marco de lectura abierto (*open reading frame*, ORF) que está flanqueado en sus extremos por regiones 5' y 3' no codificantes (*untranslated region*, UTR). La poliproteína traducida a partir del ORF del RNA viral se puede dividir, atendiendo a los productos de procesamiento iniciales, en cuatro regiones: L, P1, P2 y P3 (Belsham y col., 2004). Las proteínas maduras se originan por el procesamiento de la poliproteína realizado por las proteasas virales L^{pro}, 2A y 3C^{pro}, como se detalla en la Fig. 3.

Comenzando por el extremo 5' del RNA, la región L codifica para el extremo N-ter de la poliproteína, contiene dos codones de iniciación AUG en fase a partir de los cuales se traducen dos proteínas L, Lab y Lb, ambas con la función de catalizar la proteólisis que permite la escisión entre L y P1 (Medina y col., 1993).

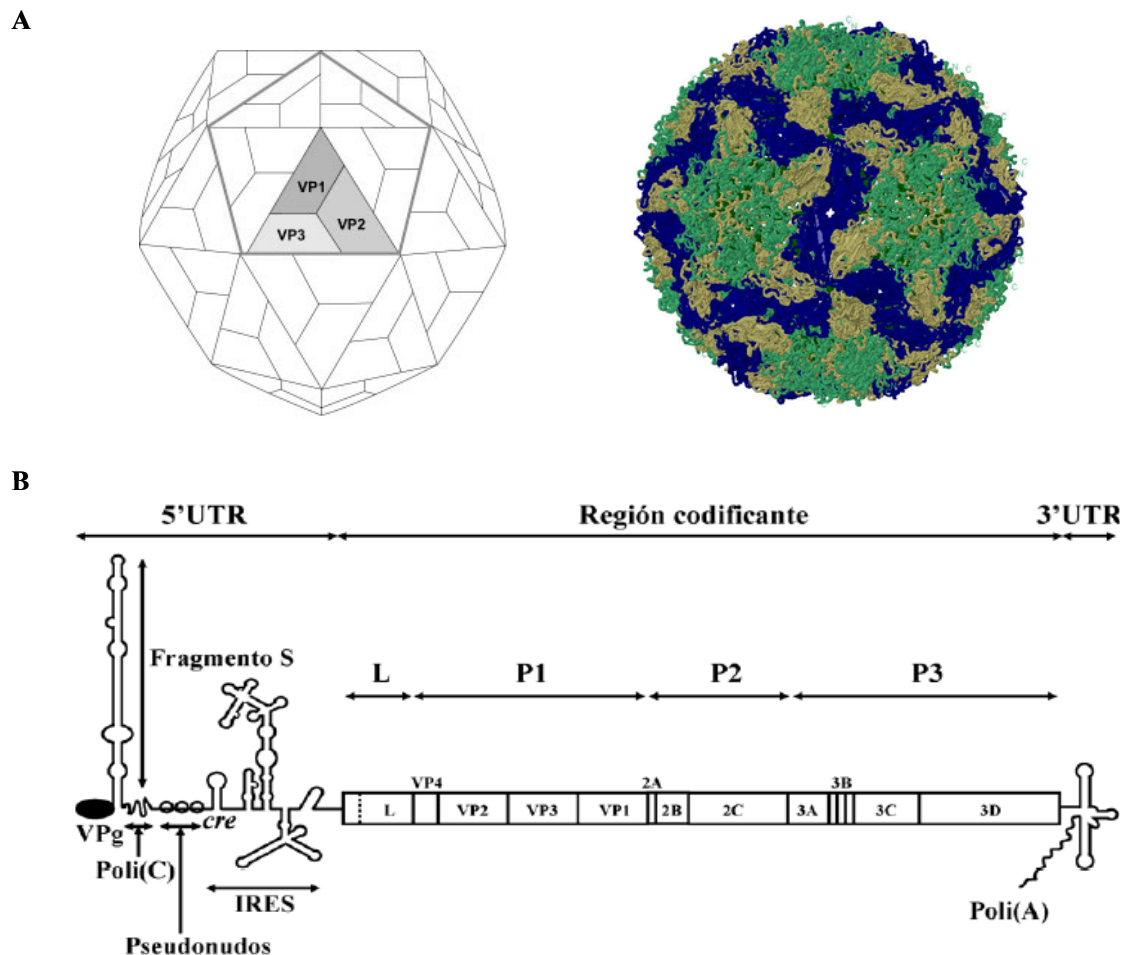


Fig. 2. Esquema de la cápsida del virión y de la organización del genoma de VFA. **A)** Diagrama de la cápsida del virión. Las cuatro proteínas estructurales VP1-4 forman una subunidad proteica o protómero. Cinco protómeros juntos forman un pentámero y una cápsida se forma ensamblando 12 pentámeros. La proteína VP4 se localiza internamente por debajo de las otras tres proteínas. Representación en 3D de la partícula viral obtenida mediante Jmol (visor Java de código abierto para macromoléculas en tres dimensiones. <http://www.jmol.org/>) basándose en las coordenadas atómicas de la cápsida del aislado C-S8c1 (Lea y col., 1994). **B)** Diagrama del genoma viral. Se representan las regiones 5' y 3' no codificantes (UTR) con sus elementos más relevantes, así como los cuatro fragmentos en los que se divide la poliproteína viral luego de su procesamiento inicial: L, P1 (que incluye las proteínas estructurales), P2 y P3 (formados por las proteínas no estructurales).

Varias publicaciones sugieren que el segundo AUG es el más frecuentemente utilizado por el virus cuando infecta células en cultivo (Cao y col., 1995; Clarke y col., 1985; Piccone y col., 1995). L es una proteasa tipo papaína (L^{pro}) que cataliza su escisión de la poliproteína en su extremo C-terminal (Strebel y col., 1986a). Esta proteasa juega un papel importante como factor de virulencia viral ya que produce el corte del factor de iniciación de la traducción celular eIF4G, inhibiendo así la síntesis de proteínas celulares dependiente de cap (Devaney y col., 1988; Gradi y col., 2004). Asimismo L^{pro} corta varias proteínas celulares como PABP (Rodríguez Pulido y col., 2007) y bloquea la expresión de IFN- β que se produce como respuesta a la infección por VFA, siendo antagonista de la respuesta inmune innata celular inducida tras la infección (de los Santos y col., 2009).

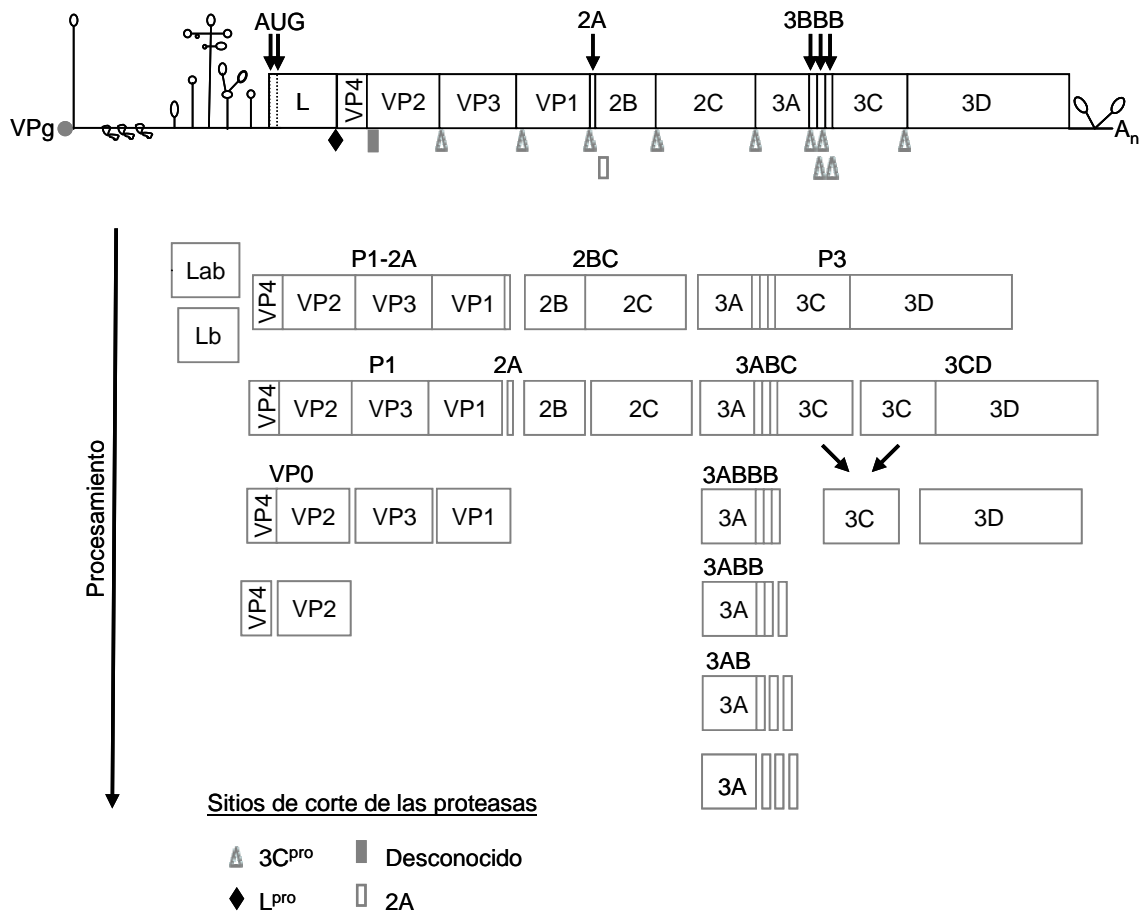


Figura 3. Procesamiento de la poliproteína de VFA por medio de las proteasas virales L^{pro} , $3C$ y $2A$. Se representa el genoma viral indicando las regiones que codifican para las distintas proteínas. Durante el procesamiento, las proteínas traducidas son escindidas de la poliproteína por la acción de las proteasas virales indicadas, dando lugar a precursores y proteínas maduras.

A continuación, en la región P1, se encuentran las proteínas estructurales (PE), que constituyen la cápsida viral (Fig. 2). Las proteínas: VP4 unida a VP2 (también llamada VP0), VP1 y VP3 constituyen los protómeros de la cápsida, cinco protómeros juntos forman un pentámero y una cápsida se forma ensamblando 12 pentámeros. La estructura de la cápsida ha sido determinada mediante cristalografía de rayos X para distintos serotipos del virus (Acharya y col., 1989; Lea y col., 1995; Lea y col., 1994).

La proteína VP1 contiene uno de los principales sitios antigénicos de la partícula viral, denominado sitio A (Mateu, 1995) el cual está localizado en el bucle G-H, que se encuentra expuesto en la superficie de la cápsida. En un estudio en el que se compararon las secuencias de 103 aislados de VFA incluyendo representantes de los siete serotipos, solamente el 26% de los residuos de VP1 se mantuvo invariable, lo cual demuestra la presión selectiva a la que está sometida esta proteína (Carrillo y col., 2005). Así, la secuencia de aminoácidos del sitio A presenta un nivel de variación muy alto entre los distintos aislados de VFA. Dentro del bucle G-H se encuentra el triplete RGD, que media la interacción del virus con sus receptores conocidos, integrinas celulares, ya que mimetiza la secuencia de interacción de algunos ligandos celulares con moléculas de la familia de las integrinas (Takada y col., 2007) para iniciar su internalización en la célula hospedadora. El motivo RGD se encuentra altamente conservado, lo cual refleja su requerimiento *in vivo* para la interacción con el receptor viral (Baxt y col., 1990; Fox y col., 1989).

La proteína 2A está formada por 18 aminoácidos y cataliza su separación de 2B. Históricamente 2A se ha venido considerado parte de P2 pero evidencias recientes indican que 2A se escinde autocatalíticamente formando el precursor P1-2A (de Felipe y col., 2003; Donnelly y col., 2001) como se observa en la Fig. 3.

La región P2 está formada por las PNE 2B y 2C. El precursor 2BC es procesado por la proteasa 3C para dar las proteínas maduras 2B y 2C. Para ambas proteínas se predice que poseen regiones hidrofóbicas de anclaje a membranas; la proteína 2C, además, contiene un dominio común con helicasas (Forss y col., 1984). Tanto 2B y 2C como su precursor 2BC participan en el reordenamiento de membranas celulares durante la infección viral, contribuyendo a la formación de los complejos de replicación asociados a membranas, e inhibiendo la secreción de proteínas celulares (Knox y col., 2005; Moffat y col., 2005; Moffat y col., 2007).

El precursor P3 es procesado por la proteasa 3C en las siguientes PNE: 3A, tres copias de la proteína 3B o VPg, la proteasa 3C y la RNA polimerasa 3D, además de distintos precursores que se esquematizan en la Fig. 3, como 3ABC y 3CD.

La proteína 3A de VFA ha sido el principal objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral. Está formada por 153 aminoácidos, siendo la proteína 3A de mayor longitud de la familia *Picornaviridae*. Esta diferencia se debe, fundamentalmente, a que posee un extremo C-ter considerablemente más largo, al que preceden un dominio hidrofóbico que le posibilita su anclaje a membranas (O'Donnell y col., 2001) y un extremo N-ter de longitud similar a la de otros picornavirus (Fig. 4). La proteína 3A está implicada en el rango de hospedador, ya que la sustitución de un único aminoácido (Q44R) en su secuencia confiere al virus la capacidad de originar lesiones en cobayas (Nunez y col., 2001). En aislados virales del serotipo O atenuados para bovinos e hipervirulentos para porcinos, se han encontrado deleciones en la región C-ter de 3A que contribuyen a este fenotipo (Beard y col., 2000). Se ha propuesto, también, que la proteína 3A interaccionaría con la RNA helicasa A (RHA) celular, formando, junto con el extremo 5' UTR y la proteína 2C, un complejo con la proteína celular PABP, teniendo un rol fundamental en la replicación de VFA (Lawrence y col., 2009). Por otro lado, también se ha descrito la colocalización intracelular de la proteína 3A con marcadores de autofagosomas, en un estudio que sugiere que la autofagia puede tener implicaciones en la replicación de VFA (O'Donnell y col., 2011).

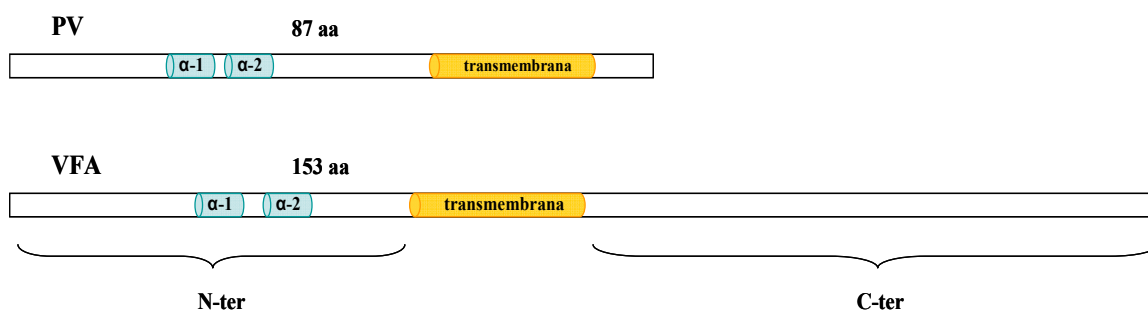


Figura 4. Esquema de la proteína 3A de PV y VFA. Se representan esquemáticamente, indicando los extremos C- y N- terminales, las regiones hidrofóbicas de anclaje a membranas (amarillo) así como las hélices α presentes en PV (Strauss y col., 2003) y las que se predicen para VFA mediante el modelo bioinformático descrito en el apartado R3.

La proteína 3B o VPg se encuentra presente en el genoma de VFA de forma redundante existiendo tres copias de la misma, no idénticas, en tándem (Forss y col., 1982; King y

col., 1980). La proteína 3B se encuentra unida covalentemente al extremo 5' del RNA genómico de los picornavirus, dado que actúa como primer o cebador para la RNA polimerasa (Crawford y col., 1983; Grubman, 1980). Cada una de las copias de 3B es capaz de uridilarse *in vitro* por acción de la polimerasa 3D (Ferrer-Orta y col., 2006; Nayak y col., 2005) y es funcional en la replicación de VFA (Falk y col., 1992). La eliminación de copias de VPg afecta la replicación de los RNA mutagenizados de manera que los niveles de RNA viral sintetizado y partículas infecciosas formadas, correlacionan con el número de copias funcionales de VPg que se mantienen en los virus mutantes (Falk y col., 1992).

La proteína 3C pertenece a la familia de las “proteasas tipo tripsina”; se trata de una serín-proteasa que cataliza 10 de las 13 escisiones de la poliproteína de VFA, como se observa en la Fig. 3 (Grubman y col., 1981). Se han identificado los residuos que forman parte del sitio catalítico de 3C: C163, H46 y D84. Este dominio es similar a la secuencia S-H-D encontrada en la mayoría de las serin-proteasas, excepto por la S que se sustituye por una C. También se ha resuelto su estructura cristalográfica (Birtley y col., 2005; Grubman y col., 1995). Además de catalizar el procesamiento de la poliproteína viral, 3C proteoliza ciertas proteínas en células infectadas, como la histona H3 (Falk y col., 1990) y los factores de iniciación de la traducción eIF4A y eIF4GI (Belsham y col., 2000).

La proteína 3D es la RNA polimerasa dependiente de RNA que lleva a cabo la replicación del genoma viral (Newman y col., 1979). Tiene un 34% de homología de secuencia de aminoácidos con la 3D de PV, cuya estructura tridimensional se ha resuelto por cristalografía de rayos X (Hansen y col., 1997). Para el VFA se ha determinado la estructura tridimensional del complejo de la proteína 3D con una molécula molde iniciador de RNA (Ferrer-Orta y col., 2004). La enzima adquiere una conformación característica de “mano derecha” con subdominios de dedos, palma y pulgar, estando su sitio activo localizado en la palma, en el extremo N-terminal. 3D es capaz de interactuar con el extremo 5' UTR del RNA viral tanto de cadena positiva como negativa.

Las regiones no codificantes o UTRs se encuentran flanqueando la región codificante en sus extremos 5' y 3'. El extremo 5' UTR de VFA tiene aproximadamente 1300 nt de longitud, siendo el más largo de los picornavirus. Esta región incluye las secuencias necesarias tanto para iniciar la traducción de proteínas a partir del RNA viral, como para la replicación de éste. En el extremo 5' UTR se localizan las siguientes regiones (Fig.

2): i) fragmento S, que establece interacciones con factores celulares e interacciones RNA/RNA con el extremo 3' del RNA viral (Serrano y col., 2006), ii) el poli-C, tramo homopolimérico de longitud variable que parece estar implicado en virulencia (Rieder y col., 1993), iii) varios pseudonudos, presentes en número variable entre 2 y 4 (Escarmis y col., 1995), cuya función no está determinada, iv) un elemento *cre* (*cis-acting replication element*); esta estructura se localiza en un *stem loop* y contiene un motivo altamente conservado "AAACA" que actúa como molde para la uridilización de la proteína 3B (Nayak y col., 2005) y estimula la traducción del RNA viral dependiente de IRES (Lopez de Quinto y col., 2002), v) el elemento IRES (*internal ribosome entry site*), región de 462 nt altamente estructurada y conservada que media el inicio de la síntesis de proteínas virales de manera cap-independiente y se une a factores celulares de iniciación de la traducción como eIF4G, eIF3, PTB, PCBP-2 e ITAF45 (Martinez-Salas y col., 2008).

El extremo 3' UTR está formado por dos componentes: una región de aproximadamente 100 nt, dentro de la que se encuentran dos *stem loops*, SL1 y SL2, este último esencial para la infectividad del virus (Rodriguez Pulido y col., 2009), y un tramo poli-A de longitud variable, codificado por el virus, que contribuye a la circularización del genoma, mediante interacciones con la región 5' UTR (Serrano y col., 2006).

4. Ciclo infeccioso

4.1. Unión al receptor y entrada a la célula

El VFA es un virus citolítico en líneas celulares susceptibles. Su ciclo de infección es corto, dependiendo de la multiplicidad de infección y de la línea celular utilizada, siendo necesarias entre 4 y 6 h para formar nuevos viriones infectivos. Las células infectadas presentan alteraciones morfológicas, adquiriendo una forma redondeada hasta que se despegan de la placa y mueren (Rueckert, 1996). Este proceso va acompañado de cambios en la estructura celular interna, entre las que se incluyen alteraciones y redistribución de las membranas celulares (Martin-Acebes y col., 2008; Monaghan y col., 2004), así como alteraciones bioquímicas que incluyen la inhibición de la transcripción de RNAm y de la síntesis de proteínas del huésped (Moffat y col., 2005).

Como se ha comentado anteriormente, el virus entra a la célula mediante su interacción con receptores (Fig. 5). Se han identificado diferentes receptores con los cuales el virus

interacciona en líneas celulares establecidas, la mayoría pertenecientes a la familia de las integrinas α_v ($\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$) (Berinstein y col., 1995; Jackson y col., 2000a; Jackson y col., 2004; Jackson y col., 2002). En aislados propagados en cultivos celulares, el virus adquiere la capacidad de iniciar la infección uniéndose a heparan sulfato como receptor (Jackson y col., 1996). La información existente apoya que los virus que infectan hospedadores naturales utilizan las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_6$ para infectar células en cultivo (Jackson y col., 2000b; Neff y col., 1998). Se ha visto que ésta última integrina se expresa constitutivamente en las células epiteliales bovinas que son blanco de la infección por VFA, lo que sugiere que $\alpha_v\beta_6$ es el receptor preferentemente utilizado *in vivo* por este virus (Monaghan y col., 2005). La interacción de VFA con estas integrinas requiere del triplete RGD, comentado anteriormente, localizado en el bucle G-H de la proteína VP1 (Acharya y col., 1989).

Luego de la unión de VFA a la integrina, éste entra en la célula mediante un mecanismo de endocitosis dependiente de clatrina (Martin-Acebes y col., 2007; O'Donnell y col., 2005), pasando a los endosomas tempranos. La información existente indica que el VFA desencapsida en estos endosomas tempranos, al alcanzar éstos un pH ligeramente ácido (6,8-6,1) (Huotari y col., 2011) que provoca el desensamblaje de la cápsida viral, debido a fuerzas electrostáticas que generan la protonación de residuos de H en la proteína VP3 de la cápsida. De esta manera el RNA viral es liberado al citoplasma celular (Curry y col., 1995; O'Donnell y col., 2008).

4.2. Traducción de proteínas virales

Una característica importante de los RNAs de picornavirus es que son infecciosos, siendo capaces, en ausencia de proteínas virales, de iniciar su ciclo infectivo cuando se transfectan en células susceptibles (Belsham y col., 1988). Este proceso ocurre en el citoplasma celular. En la infección por PV, antes de comenzar la traducción, se escinde la proteína VPg que está covalentemente unida al genoma viral, mediante la intervención de enzimas celulares (Ambros y col., 1978), aunque la traducción también se puede iniciar con RNA que contengan la VPg (Golini y col., 1980). La síntesis de proteínas tiene lugar de forma independiente de cap, para lo que se emplea el elemento IRES localizado en el extremo 5' UTR (Belsham y col., 1990; Kuhn y col., 1990). Esto permite al virus sintetizar eficientemente sus proteínas ya que la traducción de mRNA cap-dependiente se inhibe rápidamente por la proteólisis del factor de iniciación de la traducción eIF4G, como se comentó anteriormente, por la proteasa viral L^{pro} (Saleh y

col., 2001). El IRES de VFA interacciona con varias proteínas celulares, incluyendo factores de iniciación como el extremo C-ter de eIF4G generado por el corte de la L^{pro}, el cual, a su vez, interacciona con los factores de traducción eIF4A y eIF3 unidos a la subunidad ribosomal 40S (Lamphear y col., 1995). También se ha identificado que la proteína celular PTBP (*polypyrimidine tract binding protein*) interacciona con dos regiones del IRES (Rodríguez Pulido y col., 2007), así como una proteína de 45kDa, ITAF₄₅ (*IRES-specific trans-acting factor*), que junto con PCBP es necesaria para la formación del complejo de iniciación de la traducción (Martinez-Salas y col., 2001; Pilipenko y col., 2000). Asimismo, el extremo 3' UTR del genoma viral también contribuye a la iniciación de la traducción así como a la replicación del genoma (Lopez de Quinto y col., 2002; Rodríguez Pulido y col., 2009). El resultado final de este proceso es la traducción de la poliproteína viral que será procesada por las proteasas virales antes mencionadas y generará los precursores y proteínas maduras.

4.3. Replicación del genoma

La replicación del RNA viral tiene lugar en un complejo de replicación que depende de la proteína 3D, la cual es el polipéptido más conservado dentro de los miembros de la familia *Picornaviridae*. La ausencia de actividad correctora de errores de las RNA polimerasas es uno de los factores determinantes de las altas tasas de mutación producidas durante la replicación del genoma de los virus RNA (Drake y col., 1999; Hansen y col., 1997). Para VFA se ha determinado experimentalmente su tasas de mutación, a partir de las secuencias de nucleótidos de la progenie de un genoma único, así como mediante la determinación de la frecuencia de mutantes resistentes a AcMo en clones aislados de VFA y de aislados naturales (Domingo, 2000; Escarmis y col., 2002; Nunez y col., 2001). La elevada tasa de mutación encontrada (entre 0,2 y 1 mutación introducida cada vez que se copia una cadena positiva o negativa de RNA) contribuye a que, como se ha comentado anteriormente, las poblaciones de VFA estén formadas por distribuciones de genomas no idénticos denominadas cuasiespecies (Domingo y col., 2002). La secuencia consenso (la determinada por los métodos de secuenciación convencionales) es un promedio de las diferentes secuencias que componen la cuasiespecie.

El primer paso en la replicación del genoma de VFA es la síntesis de RNA de polaridad negativa, para la que se requiere la uridilación de la proteína VPg, que en células infectadas se encuentra unida tanto a RNA de polaridad positiva como negativa. La

elongación de la cadena negativa va asociada a la formación de un intermediario replicativo de doble cadena (dsRNA), a partir del cual comenzará la síntesis de cadenas positivas. En células infectadas con PV la relación de cadenas positivas a negativas es de 50:1 (Novak y col., 1991). No se han detectado RNA con polaridad negativa libre *in vivo*.

El mecanismo por el cual cesa la traducción inicial de la cadena positiva de RNA y comienza la replicación de la cadena negativa de RNA se desconoce, pero ambos mecanismos no pueden coexistir ya que la traducción implica que los ribosomas se muevan sobre el RNA en dirección 5'-3' mientras que en la replicación la polimerasa viral se mueve desde el 3' hacia el 5' (Gamarnik y col., 1998). Para PV se ha propuesto que el precursor de la polimerasa 3CD tendría un papel relevante en este proceso, ya que tiene la capacidad de interactuar con el RNA, con lo cual al acumularse en el citoplasma se uniría al extremo 5' del RNA viral en la estructura de *cloverleaf* disminuyendo la afinidad de la proteína PCBP por el IRES. Como dicha interacción es esencial para la traducción, se cree que su disminución modularía el paso de traducción a transcripción. No está claro si este mecanismo puede operar en VFA, ya que se ha descrito que el precursor 3CD es rápidamente procesado a 3C y 3D (Grubman y col., 1984).

4.4. Encapsidación y maduración

Las cadenas positivas de RNA sintetizadas pueden volver traducirse para dar proteínas virales o incorporarse a las partículas del virus, para lo cual el RNA se debe encapsidar y comenzar la maduración de la partícula viral. Esta maduración se asocia con el procesamiento de VP0 para rendir VP2 y VP4 (Oh y col., 2009). Los mecanismos de encapsidación y maduración de VFA no son del todo conocidos. En otros picornavirus solo se incorporan a la cápsida RNA de polaridad positiva que están unidos covalentemente a VPg, encapsidándose únicamente las cadenas de nueva síntesis, lo que indica que hay una relación entre la replicación y la encapsidación (Harber y col., 1991; Nugent y col., 1999). Se ha postulado la existencia de una señal de encapsidación en el RNA de polaridad positiva que actuaría en *cis*, y estaría localizada fuera de la región P1 del RNA viral, siendo esta señal específica para cada picornavirus (Grubman y col., 2004).

Se han propuesto dos modelos para el ensamblaje de la partícula viral. En el primero de ellos, los pentámeros se ensamblarían en cápsidas vacías, introduciéndose

posteriormente el RNA. En el segundo, los pentámeros interaccionarían directamente con el RNA para formar el provirión. En ambos casos, es necesaria la miristoilación del extremo N-ter de VP0 para la formación de la cápsida (Ansardi y col., 1992; Moscufo y col., 1991).

El último paso del ensamblaje del virión, su maduración, se asocia con la proteólisis de VP0. Se ha propuesto que esta proteólisis tendría lugar de forma autocatalítica, como resultado de un residuo conservado de H de VP2, que activaría moléculas de agua de su entorno, generando un ataque nucleofílico sobre su enlace escindible. La maduración es un proceso necesario para generar virus infecciosos (Knipe y col., 1997; Lee y col., 1993).

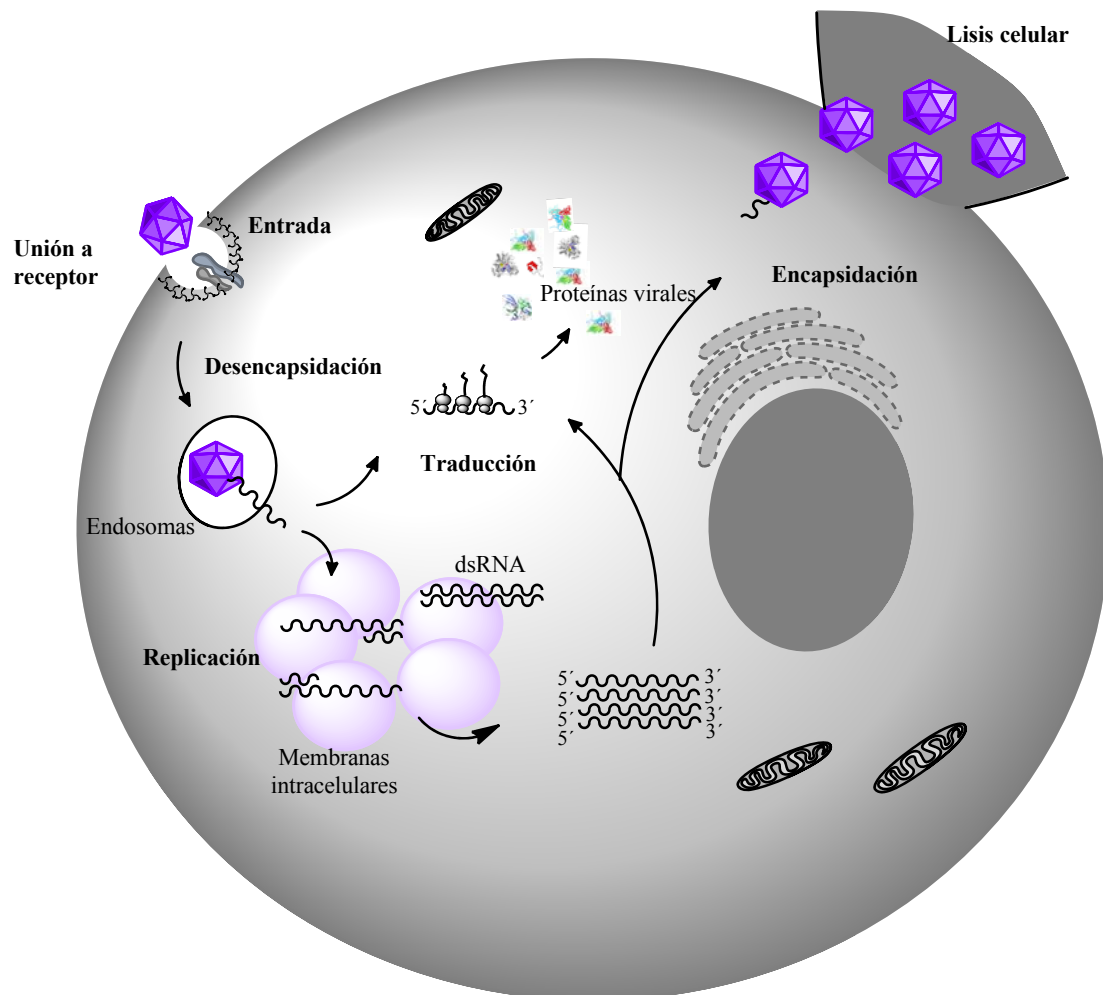


Figura 5. Ciclo infeccioso de VFA en una célula susceptible. Se representan, no a escala, los procesos más importantes del ciclo viral, comenzando por la unión a receptor, entrada a la célula vía vesículas revestidas de clatrina, desencapsidación en endosomas, traducción del RNA y procesamiento de proteínas

virales en el citoplasma celular, replicación del genoma viral en complejos de replicación asociados a membranas intracelulares, encapsidación y lisis celular. Modificado de (Whitton y col., 2005).

5. Reorganización de membranas celulares por virus

Las células infectadas por picornavirus sufren un reordenamiento de sus membranas intracelulares que lleva a la formación de estructuras vesiculares donde tendrá lugar la replicación del genoma viral. Esto confiere al virus ciertas ventajas, como disponer de una alta concentración local de proteínas virales disponibles para su replicación, proporcionar una organización espacial adecuada para la misma, así como constituir una protección frente a los mecanismos de defensa celulares y sensores de infección (Belov y col., 2012). Por otra parte, estas estructuras permiten disponer de ciertos lípidos requeridos en la síntesis de los genomas virales (Greninger y col., 2012; Sasaki y col., 2012). Los complejos de replicación de picornavirus están asociados a membranas celulares, derivadas tanto de RE como de Golgi, endosomas o lisosomas, por lo que las PNE y sus precursores se encuentran mayoritariamente localizados en estas estructuras (Bienz y col., 1983; Egger y col., 2002; Frankel y col., 1987; Garcia-Briones y col., 2006; Gosert y col., 2000). Dependiendo de la especie viral dentro de la familia *Picornaviridae* considerada, las vesículas membranosas inducidas por la infección difieren en sus características y origen. Para Poliovirus (PV) y otros enterovirus (EV) así como para el virus de la encefalomiocarditis (EMCV) estas estructuras tienen morfología similar, estando formadas en su mayoría por vesículas de doble membrana y tamaño heterogéneo, distribuidas en *clusters* compactos en el citoplasma celular (Gazina y col., 2002; Schlegel y col., 1996). Las vesículas membranosas inducidas por la infección con VFA tienen distintas características ya que se encuentran en menor cantidad y no se agregan en *clusters* densos; además, la proporción de vesículas con doble membrana es mucho menor y el origen de las mismas continúa siendo incierto (Knox y col., 2005; Martin-Acebes y col., 2008; Monaghan y col., 2004).

Otra diferencia importante en la replicación de picornavirus es la sensibilidad a la brefeldina A (BFA). Esta droga inhibe el transporte de membranas entre RE y Golgi, dado que bloquea la formación de vesículas dependientes de COP-I en la vía secretoria a través de la activación de los factores de intercambio de guanina (GEFs) de las Arf GTPasas, como GBF1, (Duden y col., 1994; Rothman, 1994). La replicación de VFA, así como la de EMCV no se ve afectada por la BFA, mientras que el rinovirus humano

y la mayoría de los enterovirus como PV, EV11 y EVB son altamente sensibles a éste compuesto (Garcia-Briones y col., 2006; Gazina y col., 2002; Martin-Acebes y col., 2008; Monaghan y col., 2004; O'Donnell y col., 2001). Esta falta de susceptibilidad a la BFA indica que el reclutamiento de membranas en aftovirus debe ocurrir por una vía diferente e implicar otros factores del hospedador que aún no se han identificado.

6. Proteína 3A

6.1. Poliovirus

La proteína 3A de PV es un polipéptido de 87 residuos que presenta un extremo N-terminal soluble y un dominio C-terminal hidrofóbico que ancla la proteína a la superficie de vesículas membranosas mediante una región de 22 aminoácidos, seguido de 7 residuos que conforman el extremo C-ter de la proteína. La estructura de los primeros 59 nt, correspondientes al fragmento N-ter soluble, se ha determinado por RMN (Strauss y col., 2003). Esta región forma un homodímero simétrico, en el que cada monómero está formado por una horquilla con dos estructuras de α -hélice anfipáticas (aa 23–29 y 32–41) separadas entre sí por un bucle que se dobla 180° para formar la horquilla. Las hélices α están flanqueadas por regiones desestructuradas (1-22 y 42-58) (Fig. 6). Cada horquilla posee una superficie hidrofóbica de residuos conservados (I22, L25, L26, V29, V34, Y37, C38 y W43) que forman la interfaz de dimerización, de tal manera que las horquillas se sitúan de forma paralela, rotadas 80° una respecto a la otra. El *loop* que separa las hélices α contiene tres residuos cargados (E38, K39 y K40) que podrían ser importantes en la replicación viral, ya que reemplazamientos a A en estos residuos producen virus no viables. Mediante el análisis del potencial electrostático de la superficie de la proteína, se determinó la presencia de un *patch* de cargas negativas localizadas en la superficie del dímero, correspondiente a los residuos D29 y E32 que podrían tener también un papel en la funcionalidad de la proteína, ya que la doble mutación a A de estos residuos en el precursor 3AB produce virus no viables (Xiang y col., 1998; Xiang y col., 1995). Por otra parte, mutaciones puntuales y deleciones en el extremo N-ter no estructurado, tienen implicaciones en la inhibición del tráfico de vesículas del RE al Golgi o en la estimulación de la actividad proteasa del precursor 3CD (Doedens y col., 1997; Xiang y col., 1995).

La proteína 3A así como su precursor 3AB tiene distintas funciones en el ciclo de replicación de PV, entre las que se incluyen la reorganización de membranas, el anclaje de la polimerasa viral a estas membranas, la inhibición de la secreción de proteínas de la célula huésped, así como el aportar la proteína 3B como cebador para la síntesis de RNA viral (Choe y col., 2004). Se ha descrito que la proteína 3AB es esencial para la replicación del RNA viral, y que se asocia a estructuras membranosas intracelulares producidas *de novo*, de manera que puede servir de anclaje al complejo de replicación (Towner y col., 1996).

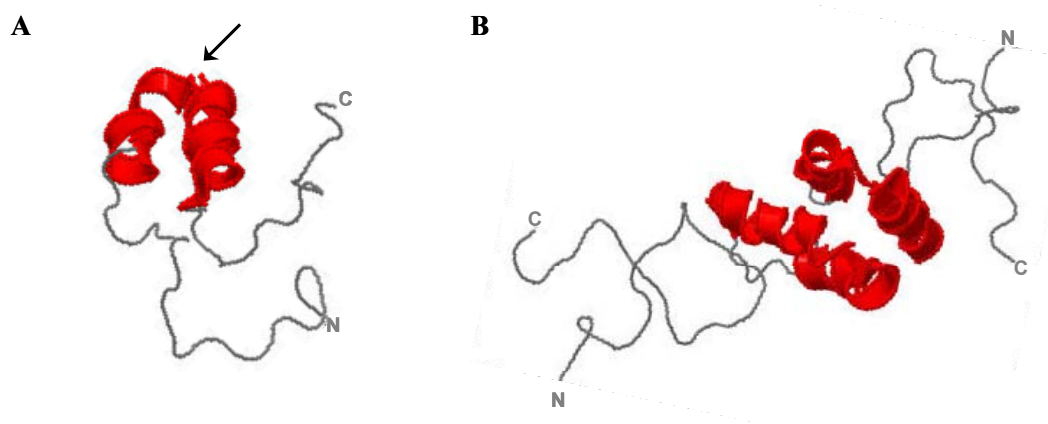


Figura 6. Representación de la estructura tridimensional de la proteína 3A de PV. A) Forma monomérica de la proteína, en rojo se representan las dos hélices α y en gris la región no estructurada resueltas por RMN. Se indica con una flecha el bucle que conecta las dos hélices α B) Homodímero estabilizado por la interacción de residuos hidrofóbicos de las dos hélices α de forma antiparalela. Obtenido de RCSB PDB (código de acceso 1NG7 extraído de (Strauss y col., 2003).

En experimentos de incubación con vesículas membranosas preformadas para formar proteoliposomas, se ha observado que 3A presenta dos topologías, una localización transmembrana y otra, no transmembrana, periférica, que parece asociarse con el precursor 3AB (Fig 7A). Mientras que la unión de 3AB a membranas estimula eficientemente la actividad *in vitro* de la 3D polimerasa, la proteína 3A sola, unida a membranas, no induce esta actividad (Fujita y col., 2007). Cuando se ha modelizado la interacción de las proteínas 3D y 3AB en membranas, se predice la formación una entramado de polimerasas que “tapiza” las membranas al que se anclaría el complejo de replicación, enmascarando de esta forma el extremo N-ter de 3A y provocando un efecto de “ocultamiento” de su señal en ensayos de IF (Choe y col., 2004) (Fig. 7B).

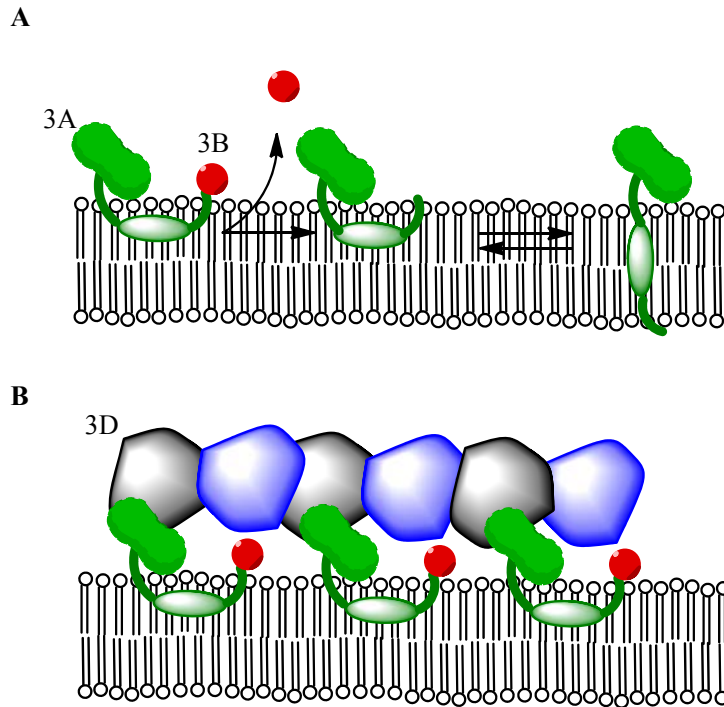


Figura 7. Modelización de la topología de proteína 3AB de PV en membranas del complejo de replicación. A) La proteína 3A cuando está en forma del precursor 3AB interaccionaría con la membrana a través de su dominio hidrofóbico como una proteína periférica; mientras que cuando se escinde la proteína 3B, 3A adquiriría una conformación transmembrana. Extraído y adaptado de (Fujita y col., 2007). **B)** Modelo propuesto para la oligomerización de la polimerasa 3D con la proteína 3AB unida a membranas en células infectadas con PV. Este modelo justifica el efecto de “ocultamiento de epítipo” correspondiente al extremo N-ter de 3A, observado para la proteína 3AB durante la infección. Extraído y modificado de (Choe y col., 2004).

Durante la infección por PV se inhibe el tráfico retrógrado entre el RE y Golgi por la acción de 3A. Esta inhibición no es imprescindible para el crecimiento viral, aunque se ha visto que provoca la disminución de la secreción de INF- β , IL-6 e IL-8, así como de la expresión de moléculas del MHC clase I y receptor de TNF en la membrana plasmática de células infectadas, lo cual facilita el crecimiento viral en las células hospedadoras. Esta inhibición del tráfico RE-Golgi también se ha observado con la 3A de CVB3, no así para otros picornavirus estudiados (rinovirus humano 14, VFA, EV71, virus de la hepatitis A o virus de Theiler) (Choe y col., 2005). Durante la infección con PV y CVB3 la proteína 3A recluta el factor GBF1 (factor 1 de resistencia a la brefeldina específico de Golgi) y Arf1 GTPasa, que tienen un papel importante en la regulación del tráfico de membranas en la vía de secreción celular (Belov y col., 2007), habiéndose sugerido que la unión de 3A de enterovirus con el factor GBF1 es necesaria para la

replicación viral (Belov y col., 2008; Lanke y col., 2009). Se ha demostrado, recientemente, que la expresión de 3A por éstos virus induce el reclutamiento selectivo de la enzima fosfatidilinositol-4-kinasa III β (PI4PKB) a las membranas, lo que cataliza la producción de lípidos fosfatidilinositol-4-fosfato (PI4P), que son necesarios para la replicación del RNA viral. Esto se debería a que las membranas ricas en PI4P parecen captar la polimerasa 3D a través de su sitio de unión a PI4P (Hsu y col., 2010). Este requerimiento de PI4PKB también se ha descrito para EV71 (Arita y col., 2011). Asimismo, se ha identificado otra proteína de Golgi, la ACBD3 (proteína que contiene 3 dominios de unión a acil-Coenzima A) que está involucrada en reclutar la PI4PKB en otros picornavirus no enterovirus, como el virus Aichi (AiV). En este virus, que pertenece al género *Koboviridae*, la presencia de esta kinasa es esencial para la replicación de su genoma (Sasaki y col., 2012). Además de AiV, también se ha observado la copurificación de las proteínas 3A y ACDB3 en células infectadas con los virus kobuvirus bovino, rinovirus humano 14, PV y CVB2, B3 y B5 (Greninger y col., 2012).

Por otra parte, la proteína 3A de PV tiene actividad anti-apoptótica (Belov y col., 2003; Dodd y col., 2001; Neznanov y col., 2001), pudiendo unirse a la proteína LIS1 e inactivarla. Esta proteína es un componente del motor dinaína/dinactina que determina el movimiento de organelos asociados a microtúbulos y el mantenimiento de la integridad del aparato de Golgi. La inactivación de LIS1 desorganiza el transporte vesicular RE-Golgi, dando como resultado la desaparición rápida de receptores de vida corta de la membrana plasmática y la pérdida de sensibilidad al TNF e INF por la célula infectada (Kondratova y col., 2005).

6.2. Coxsackievirus

La proteína 3A del CVB3 tiene un papel fundamental en la replicación del RNA viral así como en la inhibición del transporte de proteínas intracelular, como ya se ha comentado. Basándose en la estructura del extremo N-ter de PV, Wessels y col.(2006) generaron un modelo molecular de los 60 aa del extremo N-ter de la proteína 3A con el objetivo de hacer un estudio de la relación estructura-función mediante mutagénesis y estudiar su capacidad de dimerizar, inhibir transporte de proteínas y la replicación del RNAv. El modelo muestra que la proteína contiene dos hélices α (aa 20-27 y 31-42) que forman una horquilla helicoidal, con los extremos N- y C-ter desestructurados. Estas

hélices α son capaces de formar homodímeros semejantes a los de PV (Fig. 6). En este trabajo se identificaron dos determinantes principales requeridos para la dimerización: las interacciones hidrofóbicas entre las horquillas helicoidales de los monómeros, y un puente salino intermolecular entre D24 y K41. También se identificó un dominio en la región no estructurada de N-ter, conservado entre varios enterovirus, entre las posiciones 6-10 (formado por una carga +, carga -, residuo hidrofóbico, carga + e isoleucina). Este dominio no está implicado en la formación de dímeros, pero sí tiene un papel importante en la inhibición de secreción de proteínas .

6.3. Virus de la fiebre aftosa

La proteína 3A de VFA tiene propiedades y características que la hacen diferente de las 3A de otros picornavirus. No se dispone hasta el momento de una estructura para la misma, y muchas de las funciones que se le atribuyen se han generalizado a partir de la información disponible para otros picornavirus. Esta proteína posee un dominio hidrofóbico en la posición 59-76 (Gonzalez-Magaldi y col., 2012) que para otros picornavirus se ha descrito que localiza la proteína en membranas intracelulares (Choe y col., 2004; Liu y col., 2004), anclando así el complejo de replicación en un contexto membranoso (Datta y col., 1994; Doedens y col., 1997; Fujita y col., 2007; Towner y col., 1996). Como se comentó anteriormente, su secuencia es la única que posee un C-terminal de mayor longitud, presentando 77 aa entre el dominio hidrofóbico y su extremo C-ter, en vez de los 7 aa de PV (Fig. 4). 3A es una de las proteínas mas variables entre las codificada por el VFA, con un 37 % de sus aminoácidos conservados entre aislados de diferentes serotipos (Carrillo y col., 2005). Mediante microscopía de fluorescencia convencional, se ha descrito que 3A colocaliza con calreticulina, una proteína localizada en RE, en queratinocitos bovinos y porcinos infectados *ex vivo* con un virus del serotipo O (O'Donnell y col., 2001). En nuestro laboratorio se ha confirmado la colocalización con calreticulina mediante microscopía confocal en células BHK-21 infectadas con VFA C-S8c1, así como su colocalización parcial con la proteína p58, marcadora de trans-Golgi, no habiéndose observado colocalización con calnexina ni con un marcador de cis-Golgi, la proteína gp74 (Garcia-Briones y col., 2006). También se ha descrito que las células infectadas, así como las transfectadas con la proteína 3A, desorganizan o fragmentan el aparato de Golgi (Monaghan y col., 2004; O'Donnell y col., 2001) .

Como se comentó en el apartado anterior, en enterovirus la proteína 3A está implicada en la inhibición de la secreción de proteínas de la célula huésped, para lo que parece necesario una región rica en prolinas y lisina en el extremo N-ter (Choe y col., 2005; Wessels y col., 2005). Estos residuos no están presentes en la proteína 3A de VFA que tampoco está implicada en la inhibición de la secreción de proteínas (Moffat y col., 2005).

La proteína 3A se ha asociado con el rango de huésped, la patogenia y la virulencia de VFAs (Beard y col., 2000; Nunez y col., 2001; Nunez y col., 2007). Los aislados naturales de VFA pueden adaptarse experimentalmente a cobayas mediante inyecciones seriadas en la pata (Aramburu, 1949; Bittle y col., 1982; Cowan y col., 1965; Knudsen y col., 1979). El análisis de las mutaciones seleccionadas durante la adaptación del VFA C-S8c1 a cobaya mostró que la mutación Q44R en 3A, tanto sola como en combinación con la mutación I248C en la proteína 2C, es suficiente para conferir al virus la capacidad de producir lesiones en cobayas (Nunez y col., 2001). Por otra parte, deleciones en la proteína 3A se han asociado con la atenuación del virus en ganado vacuno (Giraud y col., 1990), así como con una alta virulencia en cerdos del aislado de serotipo O O/TAW/97, responsable de la epidemia de 1997 en Taiwan. La deleción de 10 aa en la región C-ter de 3A (residuos 93-102) que se asocia con este fenotipo (Beard y col., 2000; Knowles y col., 2001), coincide con la encontrada anteriormente por Giraud et al. en virus atenuados tras pases en huevos embrionados. También se han identificado deleciones en la proteína 3A asociadas a adaptación en cultivos en otros picornavirus como VHA o PV (Graff y col., 1994; Lama y col., 1998; Morace y col., 1993).

OBJETIVOS

Objetivos

Esta Tesis Doctoral plantea el estudio de distintos aspectos estructurales y funcionales de una proteína no estructural del virus de la Fiebre Aftosa: la proteína 3A.

Los objetivos concretos planteados son:

- Caracterización de la cinética de expresión de las proteínas no estructurales en células infectadas por VFA.
- Optimización de la expresión en *E.coli* y purificación de los fragmentos N-terminal y C-terminal de la proteína 3A y de su precursor 3ABBB.
- Caracterización de los efectos producidos por las proteínas derivadas de 3ABBB expresadas en células bacterianas.
- Estudio de la capacidad de dimerización de la proteína 3A de VFA y elaboración de un modelo molecular. Identificación de residuos de su extremo N-terminal que puedan estar implicados en este proceso.
- Análisis bioquímico de la interacción de la proteína 3Awt y versiones mutadas con membranas de células eucarióticas.
- Análisis de la dinámica *in vivo* de proteínas de fusión de 3Awt y mutantes con GFP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material es y Métodos

1. Líneas celulares eucarióticas

-BHK-21: fibroblastos de riñón de hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) (Stoker y col., 1964) procedentes de la *American Type Cultura Collection* (ATCC).

-IBRS-2: células de riñón de cerdo (*Sus scrofa*) (De Castro, 1964), amablemente cedidas por E. Blanco (CISA-INIA).

-VERO: células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (Yasumura Y, 1964), amablemente cedidas por MJ. Bustos (CBMSO).

Todas las líneas celulares se crecieron a 37°C en una atmósfera con 7% de CO₂ y 98% de humedad, empleando medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco), preparado con o sin rojo fenol (empleado en los ensayos in vivo de microscopía), suplementado con 100 U/ml de penicilina (Sigma), 100 µg/ml de estreptomycin (Sigma), 2 mM L-glutamina (Gibco) y 5% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco).

2. Virus

Se utilizó un preparado de VFA, el aislado C-S8c1, crecido a partir de un clon biológico del virus aislado de cerdo C-Santa Pau Sp/70 (Santa Pau, Girona 1970). Éste aislado es representativo del subtipo europeo (C1) del serotipo C de VFA (Sobrino y col., 1983).

Los virus se amplificaron por infección de monocapas celulares. Para ello se emplearon monocapas con un grado de confluencia entre el 70-80%, a las que se lavó dos veces con DMEM. Las monocapas fueron posteriormente inoculadas con una multiplicidad de infección (m.d.i.), definida como unidades formadoras de placa por ml (UFP/ml), indicada en cada experimento. Tras la aplicación del inóculo viral, las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera con 7% de CO₂ durante 1 h agitándose cada 15 min. Posteriormente se retiró el inóculo y, tras dos lavados con DMEM, se añadió medio DMEM suplementado con SFB al 5%. Las monocapas celulares se incubaron hasta la aparición de efecto citopático (ECP). En ese momento, se sometieron a tres ciclos de congelación/descongelación para obtener tanto el virus extracelular como el intracelular.

Las infecciones virales, tanto de células BHK-21 como IBRS-2, se realizaron en medio líquido o semisólido en presencia de 0,5% de agar, como se ha descrito previamente (Baranowski y col., 1998; Sobrino y col., 1983).

Para el estudio de la cinética de expresión de las proteínas virales, se emplearon células BHK-21 crecidas en placas de 35 mm Ø hasta una confluencia del 70-80%. Las monocapas se infectaron con una m.d.i. de 10 UFP/ml a 37°C durante 1h, agitando cada 15 min, luego se retiró el inóculo y se agregaron 2 ml de DMEM suplementado con el 5% de SFB. A diferentes tiempos post infección (p.i.) las monocapas se lavaron y se incubaron en tampón de lisis (EGTA 10 mM, MgCl₂ 2,5 mM, NP-40 1%, HEPES 20 mM pH 7,4) suplementado con PMSF 1 mM y con un coctel inhibidor de proteasas (Roche) en la dilución recomendada por el fabricante (1:25). Tras ello, las muestras se sonicaron, se les agregó tampón de carga Laemmli (Laemmli, 1970) (SDS 2%, glicerol 10%, DTT 10 mM, azul de bromofenol 0,1 %, Tris-HCl 50 mM pH 6,8) y se hirvieron durante 4 min.

3. Clones infecciosos

- pMT28: plásmido derivado del pGEM-1 que porta la secuencia nucleotídica completa del aislado de VFA C-S8c1 (Nº Genbank AJ133357); contiene 35 residuos de citidina en la secuencia del poliC de la región 5' no codificante y 25 adenosinas en la secuencia del poliA de la región 3' no codificante (García-Arriaza y col., 2004). Éste plásmido fue amablemente cedido por la Dra. Cristina Escarmís (CBMSO). El ADN de pMT28 se transcribió a partir del promotor de la polimerasa SP6. La numeración de los nucleótidos del genoma de VFA utilizada a lo largo de ésta Tesis Doctoral corresponde a la descrita para C-S8c1 (Toja y col., 1999).
- pMT28-3AL38E. Construcción derivada de pMT28 en la que el codón CTC, que codifica leucina (L) en la posición 38 de la proteína 3A, se sustituyó por el codón GAG, que codifica un ácido glutámico (E).
- pMT28-3AL41E. Construcción derivada de pMT28 en la que el codón CTC, que codifica leucina (L) en la posición 41 de la proteína 3A, se sustituyó por el codón GAG, que codifica un ácido glutámico (E).
- pMT28-C65S. Construcción derivada de pMT28 en la que el codón TGC, que codifica cisteína (C) en la posición 65 de la proteína 3A, se sustituyó por el codón TCC, que codifica una serina (S).

Estas tres construcciones derivadas de pMT28 fueron generadas en el laboratorio durante la realización de la Tesis Doctoral de Raúl Postigo Fernández y han sido utilizadas en la presente Tesis Doctoral para la construcción de mutantes puntuales de sustitución en la proteína 3A en distintos plásmidos de expresión en eucariotas.

4. Plásmidos

- pRSET-C (Clontech): vector derivado de pUC diseñado para expresar en *E.coli* altos niveles de proteínas de genes clonados. En éste plásmido, la transcripción de los genes de interés está bajo el control del promotor fuerte del bacteriófago T7. Para inducir la expresión de la T7 RNA polimerasa se utilizó isopropil β -D-tiogalactosido (IPTG) 1mM. Este plásmido porta el gen de resistencia a la ampicilina. Los productos de expresión incluyen en el extremo N-ter una cola de 6 H que permitieron la purificación de la proteína expresada mediante columnas de afinidad.

- pEGFP-C2 (Clontech): plásmido optimizado para la expresión en células eucariotas de la proteína verde fluorescente “mejorada” (Enhanced GFP); codifica para la variante GFPmut1 que contiene una doble sustitución en los aminoácidos F64 y S65 por W (λ_{max} de excitación=488nm, λ_{max} de emisión=507nm) (Cormack y col., 1996). Este plásmido, que porta el gen de resistencia a la kanamicina, se utilizó para el clonaje de genes en fase con el extremo C-terminal de EGFP y su expresión como proteínas de fusión para su uso en técnicas de microscopía *in vivo*.

- pRSV/L: plásmido de expresión en células eucariotas que posee la secuencia del gen de la luciferasa bajo el control del promotor fuerte LTR del virus del sarcoma de Rous (de Wet y col., 1987). Porta el gen de resistencia a ampicilina.

En la presente Tesis Doctoral se utilizaron los plásmidos pRSV3A, pRSV3AL38E, pRSV3AL41E, generados por el Dr. Postigo en el laboratorio, donde el gen de la luciferasa había sido reemplazado por la proteína 3Awt y versiones de ésta proteína con mutaciones puntuales en las posiciones 38 y 41 de esta proteína.

- plgLdR1KDEL-RFP: plásmido que codifica para una versión de la proteína roja fluorescente monomérica (mRFP1) que contiene una secuencia líder IgH de ratón de

localización a RE así como la secuencia KDEL de retención en el RE. Fué amablemente cedido por Benno Wolk (The Rockefeller University, Nueva York) (Wolk y col., 2008).

Los siguientes vectores del sistema de doble híbrido para detectar interacción entre proteínas en células de mamífero, fueron amablemente cedidos por el laboratorio de A. Nieto y J. Ortín (CNB).

- pM: plásmido descrito en (Gonzalez y col., 1996) y diseñado para generar proteínas de fusión con el dominio de unión al DNA GAL4 y la proteína de interés.
- pVP16: plásmido utilizado para generar proteínas de fusión con el dominio de activación transcripcional derivado de la proteína VP16 del virus herpes simplex.
- pGL-Gs: plásmido que posee el sitio de unión a GAL4 y el gen de la luciferasa como gen reportero para el sistema de doble híbrido.

5. Cepas bacterianas de *E.coli*

Las cepas bacterianas empleadas se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas de *E.coli* utilizadas.

Cepa	Genotipo	Uso
XL1 Blue	F ['] ::Tn10 proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96(Nal ^r) thi hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺) glnV44 relA1 lac	Clonaje
BL21(DE3)	F ⁻ ompT gal [dcm] [lon] hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻ ; una cepa de <i>E. coli</i> B) con DE3, un profago λ que posee el gen de la RNA polimerasa T7	Expresión
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ , mB ⁻) gal dcm (DE3) pLysS (CamR), plásmido que reduce la expresión basal de la RNA polimerasa T7	Expresión
DH5α	F ['] /endA1 hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nal ^r) relA1 Δ(lacIZYAargF) U169 deoR (φ80dlacΔ(lacZ)M15)	Clonaje
JM110	F ['] traD36 lacI ^q Δ(lacZ)M15 proA ⁺ B ⁺ /rpsL (Str ^r) thr leu thi lacY galK galT ara fhuA dam dcm glnV44 Δ(lac-proAB). Cepa deficiente en dos metilasas presentes en la mayoría de las cepas de <i>E.coli</i> .	Clonaje

6. Anticuerpos

Anticuerpos primarios

En la Tabla 2 se indican los anticuerpos primarios utilizados en esta Tesis Doctoral.

Tabla 2. Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Antígeno	Especie	Tipo ^a	Referencia/Origen
SD6	Sitio A VFA	Ratón	AcMo	(Mateu y col., 1990)
1C8	2C VFA	Ratón	AcMo	(Garcia-Briones y col., 2006) ^b
2C2	3A VFA	Ratón	AcMo	(De Diego y col., 1997) ^b
1F8	3B VFA	Ratón	AcMo	(Garcia-Briones y col., 2006) ^b
2D2	3C VFA	Ratón	AcMo	(Garcia-Briones y col., 2006) ^b
E56	3D VFA	Conejo	AcPo	(Strebel y col., 1986b)
AC-15	Actina β	Ratón	AcMo	Sigma
443	N-ter 3 ^a	Conejo	AcPo	Manuscrito enviado ^c
479	N-ter 3 ^a	Conejo	AcPo	Manuscrito enviado ^c
346	C-ter 3 ^a	Conejo	AcPo	Manuscrito enviado ^c
350	VFA ^d	Cerdo	AcPo	E.Blanco, sin publicar
Anti-Calnexina	Calnexina	Conejo	AcPo	Stressgen
Anti-GFP	GFP	Ratón	AcMo	Roche
Anti-Histidinas	Tag de 6 H	Conejo	AcPo	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Caveolina	Caveolina-1	Conejo	AcPo	BD Transduction Laboratories
196	Tubulina β II	Conejo	AcPo	(Armas-Portela y col., 1999)

a- AcMo-anticuerpo monoclonal, AcPo-anticuerpo policlonal.

b- E.Brocchi (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia, Italia).

c- Ac generado en la presente Tesis Doctoral.

d- Suero hiperinmune de cerdo que reconoce proteínas del VFA.

Anticuerpos secundarios

En los ensayos de *Western blot* se emplearon sueros anti Ig de ratón y de conejo, según el origen del Ac primario utilizado, acoplados a peroxidasa (GE Healthcare).

En los ensayos de inmunofluorescencia se utilizaron los siguientes Ac:

- Anti-conejo Alexa 488 (Molecular Porbes): Ac de burro anti IgG de conejo conjugado al fluoróforo Alexa 488 (Verde).
- Anti-ratón Alexa 555 (Molecular Porbes): Ac de burro anti IgG de ratón conjugado al fluoróforo Alexa 555 (rojo).

7. Clonaje, expresión en *E.coli* y purificación de las proteínas 3A, N-ter 3A, C-ter 3A, C-ter 3AB1 y C-ter 3AB3

7.1. Metodología de clonaje

La proteína 3A del aislado de VFA C-S8c1 había sido clonada previamente en el laboratorio, por G.León y J.I.Nuñez, en el plásmido pRSET-C para su expresión y purificación. Para realizar este clonaje, se amplificó DNA a partir del clon infeccioso pMT28, utilizando los oligonucleótidos 3A-1 y 3A-2 (Tabla 3). Los productos de PCR así como el vector pRSET-C fueron digeridos con NheI y BgIII, ligados y transformados en *E.coli* XL1 blue y BL21(DE) para su expresión y purificación por cromatografía de afinidad en columnas de Ni-NTA (Probond, Invitrogen). La proteína se eluyó de la columna con imidazol 400 mM, en fracciones de 2 ml. Al intentarlo se constató que la proteína 3A completa era muy difícil de purificar ya que formaba agregados insolubles que lo dificultaba, por lo que en ésta Tesis Doctoral se decidió realizar la clonación de distintos fragmentos de ésta proteína, que excluían la región hidrofóbica transmembrana (Pacheco y col., 2003). La estrategia de clonaje fue la misma que la empleada anteriormente, digiriéndose el plásmido pRSET-C (Fig. 8) con las enzimas de restricción NheI y BgIII. Los fragmentos clonados se esquematizan en la Fig. 9.

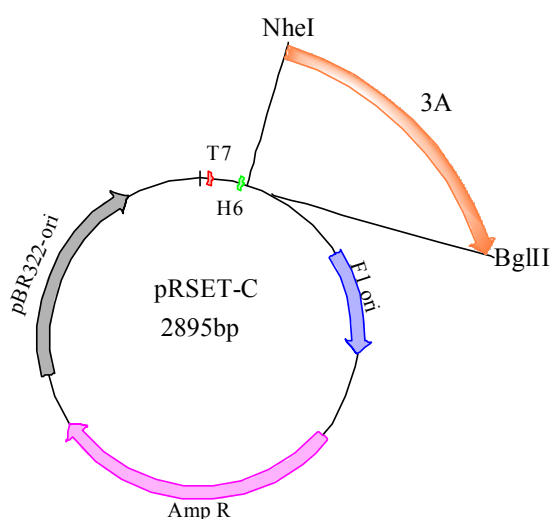


Figura 8. Representación del plásmido pRSET-C utilizado para el clonaje y expresión de la proteína 3A. Se indican el promotor de T7, la secuencia del péptido de 6 Histidinas, el origen de replicación y el gen de resistencia a Ampicilina.

Para la amplificación de las secuencias correspondientes a los distintos fragmentos de 3A clonados se empleó como molde DNA de pMT28 y las siguientes parejas de oligonucleótidos: 3A-1/3A-5 para G1, 3A-6/3A-2 para G2, 3A-6/3A-3B para G3 y 3A-6/3A-3BBB para G4 (ver Tabla 3).

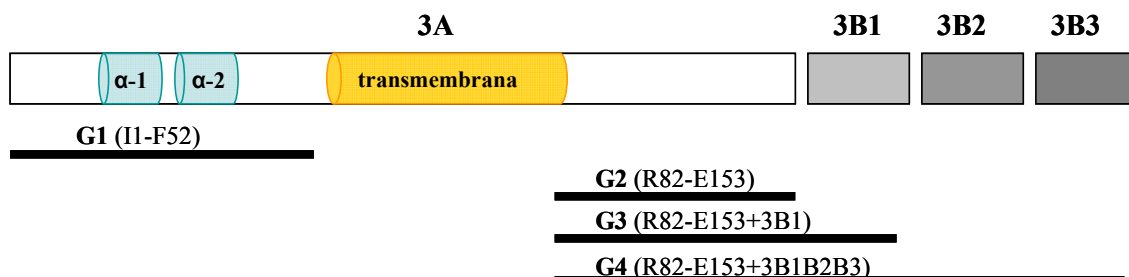


Figura 9. Esquema de la proteína 3A y de los fragmentos clonados en pRSET-C. En azul se representan las regiones de hélices α (α -1 y α -2) y en amarillo la región transmembrana hidrofóbica que se predice para esta proteína (ver Introducción). En grises se representan las tres copias de la proteína 3B o VPg. En la parte inferior se indica la longitud de las secuencias clonadas con su respectiva nomenclatura: G1 (residuos 11-F52 de 3A), G2 (residuos 82-E153 de 3A), G3 (residuos 82-E153 de 3A+3B1) y G4 (residuos 82-E153 de 3A+3B1B2B3).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para el clonaje de los fragmentos proteicos G1, G2, G3 y G4.

Fragmento clonado	Cebador	Secuencia de nucleótidos ^a	Orientación ^b	Enzima de restricción ^c
G1	3A-1	TAGGCGCTAGCATCTCAATACCTTCC	S	NheI
	3A-5	GCAGATCTTTAAAAAGCACGTTTCAC	A	BglII
G2	3A-6	TAGGCGCTAGCAGACAGAAGATGGTG	S	NheI
	3A-2	GCAGATCTTTATTCAGCTTGCGGTTG	A	BglII
G3	3A-3B	GCAGATCTTTACTCTTGTCGCGGGAG	A	BglII
G4	3A-3BBB	GCAGATCTTTACTCAGTGACAATCAA	A	BglII

a- Se indica el sitio de corte de la enzima de restricción incluido en la secuencia (subrayado) de cada oligonucleótido.

b- Se indica la orientación de cada oligonucleótido S: "sentido" (orientación genómica), A: "antisentido".

c- Sitio de restricción incluido en el oligonucleótido cebador.

7.2. Expresión de proteínas

Se partió de un preinoculo de bacterias *E.coli* BL21 transformadas con los plásmidos correspondientes (2,5 ml en LB suplementados con ampicilina 50 µg/ml y glucosa 40 mM) que había sido crecido durante la noche. Este preinóculo se llevó a un volumen de 100 ml en LB con 50 µg/ml de ampicilina y se dejó crecer hasta una DO₅₉₅ de 0,7 (fase exponencial). La inducción de la expresión de la proteína de interés se llevó a cabo añadiendo isopropil-tiogalactosidasa (IPTG) 1 mM e incubando las células durante 2h 30 min a 37°C con agitación. El medio de cultivo se centrifugó 15 min a 4°C y el precipitado se resuspendió en 4 ml de tampón de purificación (NaPO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8,0), se añadió lisozima 1 mg/ml y se incubó en hielo por 30 min. Tras añadir Tritón X-100 1%, DNAsa 5 µg/ml y PMSF 1 mM, las muestras se congelaron a -20°C. Tras 24 h de congelación, las bacterias se centrifugaron 30 min a 4°C y 4.924 x g, analizándose tanto el sobrenadante como el precipitado por *Western blot* con un AcMo frente a la proteína 3A (2C2) o frente a histidinas (anti-histidinas), para evaluar si la proteína expresada se encontraba en la fracción soluble o insoluble. Dado que la señal de la proteína 3A se repartía mayoritariamente en la fracción soluble, el sobrenadante de la centrifugación fue utilizado para la purificación de las proteínas expresadas.

7.3. Purificación

La purificación de las proteínas expresadas en *E.coli* se realizó en columnas de Ni-NTA (Probond, Invitrogen). Se incubaron 8 ml de lisado bacteriano entre 30-60 min con la resina, con agitación suave a 4 °C. Posteriormente, las columnas se empaquetaron en posición vertical, tomándose una muestra del sobrenadante como control y descartándose el resto. Las proteínas que no se unieron a la columna fueron eluidas con 15 ml de tampón de lavado (NaPO₄ 50 mM, NaCl 500 mM pH 6,5). Dado que la elución de las proteínas retenidas utilizando imidazol podía interferir en posteriores análisis estructurales de las proteínas de interés, se eligió la disminución de pH del tampón de lavado para su recuperación de la columna, determinándose que un pH de 4,5 era óptimo para la elución. Así pues, primero se realizó un lavado a pH 5,9 para eliminar proteínas contaminantes y un lavado posterior a pH 4,5. La proteína eluida fue recogida en diferentes fracciones de 3 ml cada una, denominadas F1- F9.

Las fracciones eluidas de las columnas de Ni-NTA se sometieron a distintas técnicas de análisis y detección de proteínas

8. Técnicas de análisis y detección de proteínas

8.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

El análisis de los lisados tanto celulares (en el tampón de lisis descrito en M2) como bacterianos en tampón de purificación (M7), de fracciones eluidas de columnas, así como de soluciones de péptidos sintéticos, fue llevado a cabo por SDS-PAGE. Se emplearon los porcentajes de 12% de poliacrilamida/bisacrilamida (30:1) para el gel separador y 5% de poliacrilamida/bisacrilamida (30:1) para el concentrador. Al lisado a analizar se le agregó tampón de carga Lameli (M2), calentándose a 100°C durante 4 min (salvo que se indique otra cosa). Se utilizó el sistema de geles Mini Protean 3 (BioRad) a voltaje constante de 200 V, 1 h. Una vez finalizada la separación, las proteínas se visualizaron por tinción con Coomassie Brilliant Blue R250 (Bio-rad) o se analizaron por *Western-blot*.

8.2. *Western-Blot*

Luego de la separación de las proteínas en geles de poliacrilamida, éstas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Protran, Whatman) mediante transferencia húmeda con amperaje constante de 300 mA durante 1 h. La reactividad inespecífica se bloqueó incubando las membranas con leche en polvo desnatada al 3% (Nestlé) en PBS durante 1h a temperatura ambiente (TA). Las membranas se incubaron con los Ac primarios correspondientes, en PBS con albúmina derivada de suero Bovino (BSA) (Sigma) 1%, durante 1 h a TA, o toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween-20 0,05% (Merck), se incubaron con las diluciones correspondientes de Ac secundarios acoplados a peroxidasa (GE Healthcare) en PBS-BSA 1% y se volvieron a lavar tres veces con PBS con Tween-20 0,05%. La detección de la actividad peroxidasa se realizó por quimioluminiscencia (*ECL Western Blotting Analysis system*).

8.3. Dot-Blot

Se realizó empleando un dispositivo *Bio-Dot* (Bio-Rad) acoplado a vacío. Para ello, la membrana de nitrocelulosa utilizada se prehidrató con PBS y se ensambló en el aparato (Bio-Dot). El antígeno a analizar (indicado en cada experimento) se inmovilizó directamente sobre la membrana de nitrocelulosa prehidratada. Tras lavar con PBS los pocillos, se retiró la membrana del dispositivo y se determinó la presencia de proteínas en ella mediante la tinción con Rojo Ponceau (Sigma). Posteriormente, la membrana se bloqueó con leche desnatada 3% en PBS, y se incubó con los Ac primarios y secundarios, tal y como se ha descrito para el ensayo de *Western-Blot*.

8.4. Cuantificación de proteínas

Las fracciones obtenidas de tres purificaciones independientes de la proteína G4 se juntaron (20 ml) y liofilizaron. Tras su resuspensión en un volumen de 4 ml de H₂O destilada se cuantificó la cantidad de proteína total empleando las siguientes técnicas colorimétricas de cuantificación de proteínas: BCA (*Bicinchoninic Acid assay*) o ensayo de Smith (Smith y col., 1985) y ensayo de Bradford (Bradford, 1976).

8.5. Inmunoprecipitación

Para caracterizar los Ac generados en animales inmunizados con diferentes proteínas y péptidos virales, se puso a punto un ensayo de inmunoprecipitación de la proteína 3A obtenida a partir de lisados de células infectadas. Las células fueron resuspendidas en tampón de lisis (EDTA 1mM, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, Tritón X-100 1%, Tris-HCl 50 mM pH 7,4) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (Roche) y PMSF 1 mM. Éste ensayo se empleó también para el análisis de lisados bacterianos de los fragmentos N-ter y C-ter (M7.2). Para ello, primeramente se realizó un preclareado de los lisados en el que se incubaron 100 µl de los mismos con 20 µl de proteína A (PA) sefarosa 1mg/ml (Sigma) bloqueada con BSA 1% durante 1h a 4°C con agitación, tras lo cual la mezcla se centrifugó a 15.000 x g, descartándose el sedimento. Para la inmunoprecipitación se incubaron 1 µl del Ac a analizar, con 20 µl de PA, durante 1h a 4°C con agitación. La muestra se lavó 3 veces con PBS, se centrifugó a 183 x g durante 5 min a 4°C, y el lavado final se llevó al volumen inicial con PBS BSA 1%. La mezcla

resultante (PA-Ac) se incubó con el sobrenadante del lisado preclareado antes, durante toda la noche a 4°C con agitación. Luego se realizaron tres lavados sucesivos, con tampón de lisis al 50% en Tris-HCl 50 mM pH 7,4, al 25% y finalmente con Tris-HCl 50 mM pH 7,4, mediante centrifugaciones de 5 min a 1.305 x g. El precipitado final se resuspendió en tampón Laemmli (M2) para su análisis por SDS-PAGE.

8.6. Filtración por centrifugación en membranas de celulosa (Centricón)

La proteína 3A purificada fue filtrada por centrifugación en membranas de celulosa (Centricón, Millipore) para intentar separar la fracción monomérica de la multimérica. Para ello se utilizaron dos tipos de membranas: Ultracel YM-30 y Ultracel YM-100. El dispositivo se ensambló como muestra la Fig. 10, colocándose la solución de proteína purificada en el recipiente de la muestra y sedimentándose utilizando el rotor SS-34 (Sorvall).

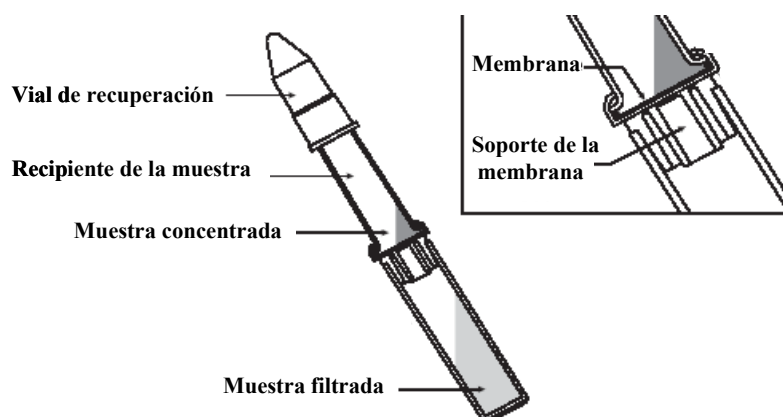


Figura 10. Esquema de un dispositivo Centricón. Se indican las distintas partes que lo componen así como donde se coloca la muestra a concentrar, donde se recupera la misma y donde se recupera la muestra filtrada. Extraído y modificado de “*Centricon User guide, Millipore*”.

Para las membranas YM-30 la centrifugación fue de 30 min a 2.990 x g a 4°C para volúmenes iniciales de 500 µl y 15 min para volúmenes de 200 µl. Las membranas YM-100 se centrifugaron durante 10 min a 4.306 x g. En ambos casos luego de éste paso de centrifugación se invirtió la mitad superior del dispositivo, de manera que el vial de recuperación quedara tapando el vial de la muestra filtrada y hacia abajo; en ésta posición se centrifugó durante 2 min a 478 x g para recuperar el concentrado. El procedimiento se llevó, también, a cabo en presencia de los agentes desnaturizantes urea 8M o SDS 0,1 M, así como preincubando la membrana durante 15 min con BSA

1% en PBS. El análisis de las muestras concentradas (C), filtradas (F) y de un lavado de la membrana (M) con 200 μ l de tampón Tris-HCl 200 mM pH 6,8, se realizó por *Western blot*.

8.7. Análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF)

El análisis proteómico por espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) se realizó en el Servicio de Proteómica del CBMSO. Para el mismo se utilizaron geles de SDS-PAGE 15% como se describe en M8.2, que fueron teñidos con Sypro ruby (Molecular Probes, Invitrogen). Las bandas seleccionadas se visualizaron con un transiluminador UV, recortaron del gel manualmente, deshidrataron con acetonitrilo y secaron con vacío. Luego de secarlas, las bandas se rehidrataron y digirieron *in situ* con tripsina (Promega) siguiendo el protocolo descrito por (Shevchenko y col., 1996). Brevemente, las bandas del gel se incubaron en NH_4HCO_3 50 mM con tripsina 5 ng/ μ l durante 1h en un baño de hielo. Tras retirar el tampón de digestión y cubrir los trozos de gel con NH_4HCO_3 50 mM, éstos se incubaron durante 12 h a 37°C. La digestión se detuvo mediante el agregado de ácido trifluoroacético 1%. Los sobrenadantes fueron secados y dializados antes de ser analizados.

El mapeo peptídico se realizó como está descrito (Naranjo y col., 2007), utilizando un espectrómetro de masas Autoflex™ (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) en el modo reflector ion positivo empleando como matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico y como superficie un Anchor-Chip™ (Bruker Daltonics). La identificación de los picos y asignación de masas peptídicas se realizó automáticamente utilizando el software Flex Analysis™, versión 2.2 (Bruker Daltonics). La búsqueda en la base de datos se realizó utilizando MASCOT <http://matrixscience.com> (Perkins y col., 1999) frente a la base de datos de proteínas no redundantes de NCBI <http://www.ncbi.nih.gov>. Los parámetros seleccionados fueron los siguientes: tolerancia de dos *missed clivages*, carbamidometilación (Cys) y oxidación (Met) como modificaciones fijas y variables respectivamente, y fijando la tolerancia peptídica a 100 ppm luego de la calibración externa. Se consideró una buena identificación de proteínas cuando el valor MASCOT de probabilidad fue significativo ($p < 0.05$). Los valores de las masas identificadas como correspondientes a fragmentos de digestión teórica de la proteína 3A con tripsina se obtuvieron mediante la aplicación informática MS-Digest de Protein Prospector 5.10.0 (Universidad de California).

9. Análisis microscópico de células bacterianas que expresan la proteína 3A y derivados

9.1. Inmunomicroscopía de bacterias

Los portaobjetos empleados para ésta técnica se trataron con poli-L-lisina (Sigma). Para ello, primero se lavaron con H₂O miliQ caliente (50°C) y jabón, se enjuagaron con 5 lavados de H₂O miliQ, seguido de un lavado con etanol al 75% durante 30 min. Posteriormente se aplicó poli-L-lisina (0,1% w/v) sobre ellos, dejándose secar a TA. Las bacterias en fase exponencial, inducidas con IPTG o sin inducir, se fijaron en el mismo medio que habían sido crecidas, LB, suplementado con paraformaldehído (PFA) 2,6%, glutaraldehído 0,04% y PBS 25%. Posteriormente, se incubaron 10 min a TA y luego 30 min en hielo. Tras 3 lavados en PBS por centrifugación a 1.538 x g 5 min, se resuspendieron en tampón GTE (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris 20 mM pH 7,5) y se permeabilizaron con lisozima 0,7 mg/ml, colocándose inmediatamente en los portaobjetos tratados con la poli-L-lisina. Tras 2 lavados con PBS, los portaobjetos se bloquearon con PBS-BSA 1% durante 15 min a TA y se incubaron en cámara húmeda con la dilución del Ac primario correspondiente durante 1 h, tras lo que se lavaron 10 veces con PBS y se incubaron con el Ac secundario acoplado a un fluorocromo durante 1 h a TA en cámara húmeda y oscuridad. Finalmente, las muestras se lavaron 10 veces con PBS y se montaron con medio de montaje Fluoromount G (Southern Biotech).

9.2. Microscopía electrónica de bacterias

Los clones bacterianos que expresaban los distintos fragmentos de 3A (G1, G2, G3 y G4) se crecieron en medio líquido por duplicado, hasta una DO₅₉₅ de 0,7. En cada caso, un cultivo se procesó directamente sin inducir (control no inducido) y otro se indujo con IPTG 1mM durante 2,5 h, para luego ser procesado para microscopía electrónica utilizando un protocolo de inclusión convencional en resina epoxi (Renau y col., 1998). Para ello, las células fueron lavadas tres veces con PBS y fijadas durante 30 min a 37° C en PFA 4% y glutaraldehído 2% en tampón cacodilato sódico 0,1 M pH 7,4 suplementado con CaCl₂ 5 mM. Tras tres lavados con el mismo tampón mediante centrifugación, las células fueron resuspendidas y postfijadas con tetróxido de osmio 1% y ferrocianuro potásico 1% a 4° C durante 1 h. Las muestras se lavaron tres veces

con H₂O bidestilada y se trataron 1 min con ácido tánico 0,15% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4. Tras un lavado con el mismo tampón y dos con H₂O destilada, las células fueron teñidas con acetato de uranilo 2% durante 1 h a TA. A continuación, se lavaron tres veces con H₂O bidestilada y se deshidrataron en una serie decreciente de disoluciones de etanol (50%, 75%, 90%, 95% y tres veces en etanol al 100%), incubándose durante 5-10 min en cada una de ellas. Las bacterias fueron seguidamente incluidas en la resina epoxi TAAB 812 (TAAB Laboratories), para lo que primero se infiltraron en una mezcla de resina: etanol 1:2 (1 h a TA), después 1:1 (1 h a TA), y a continuación en resina 100% (toda la noche a 4° C), seguido de un nuevo cambio de resina 100% (2 h). Las muestras fueron encapsuladas y polimerizadas durante 48 h a 60°C. Los cortes transparentes a los electrones (70-80 nm de grosor) fueron realizados con un ultramicrotomo Ultracut E (Leica) y montados sobre rejillas perforadas de cobre recubiertas de colodión y sombreadas con carbono (G200, Gilder). Para la observación de las muestras se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1010 (Jeol) operado a un voltaje de aceleración de 80 kV y equipado con una cámara digital Bioscan 792 (Gatan). La adquisición de las imágenes se realizó empleando el programa DigitalMicrograph (Gatan).

10. Producción de anticuerpos policlonales frente a los extremos N-ter y C-ter de la proteína 3A

El fragmento G4 de la proteína 3A, purificado como se explica en M7.3.1, se utilizó para inmunizar dos conejos y obtener anticuerpos específicos del extremo C-ter de 3A, así como de la región correspondiente a las 3 copias de la proteína 3B. Para ello se inocularon dos conejos blancos New Zeland por vía intradérmica con 200 µg de la proteína purificada emulsionada con adyuvante de Freund (Sigma) completo en la primera inoculación e incompleto las siguientes tres inmunizaciones, una cada 4 semanas. A las 4 semanas de la última inmunización, los animales fueron desangrados por punción cardiaca, separándose por centrifugación el suero que se guardó a -20 °C para su posterior caracterización. Se dispuso para ambos conejos de muestras de suero previas a la inmunización, como controles preinmunes.

Para disponer de un anticuerpo que reconociera el extremo N-ter de la proteína 3A, se diseñaron tres péptidos (ISI-KLH, KLH-CKG y KLH-CFE) con la colaboración de Leonor Kremer (Protein Tools, CNB), los cuales fueron sintetizados en el laboratorio de

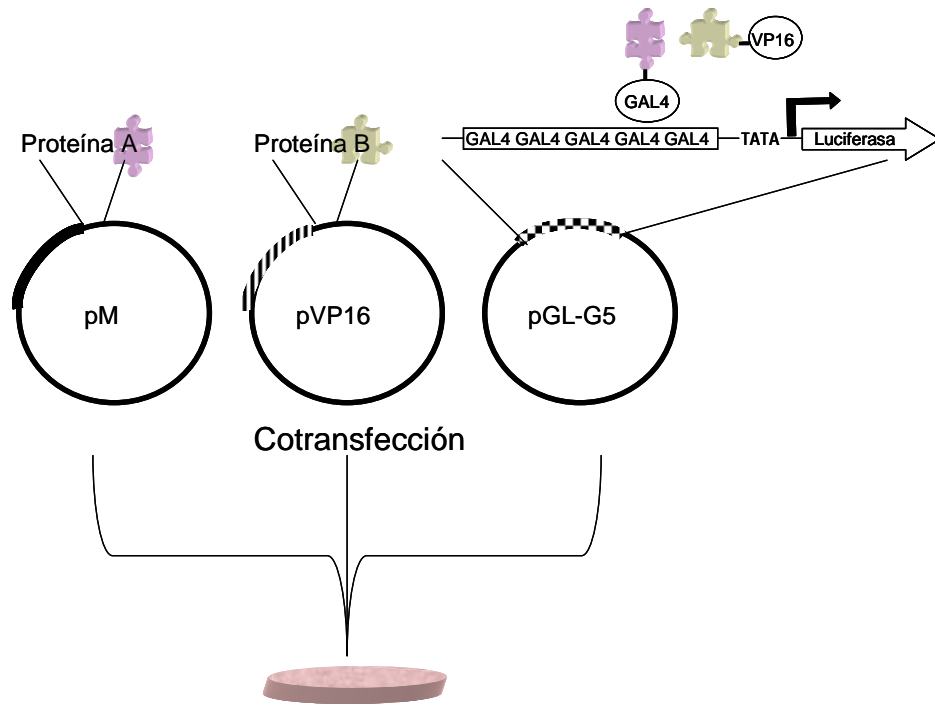


Figura 12. Diagrama del sistema de doble híbrido utilizado y su vector reportero. Se esquematizan los plásmidos pM con su dominio GAL 4, pVP16 con su dominio de activación de transcripción VP16 y el plásmido pGL-G5 que porta el gen de la luciferasa como gen reportero.

Para detectar interacciones de la proteína 3A consigo misma (3A-3A), con distintos mutantes (3A-3AL38E o -3AL41E o -3AC65S), o con el extremo N-ter (3A-G1), se clonaron en pM y pVP16 las siguientes proteínas: 3Awt, G1(N-ter), 3AL38E, 3AL41E, 3AC65S. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos y enzimas de restricción detallados en las Tablas 4 y 5. Para todas las construcciones el oligonucleótido con orientación sentido (orientación genómica) utilizado fue 3AiBam. Como oligonucleótidos antisentido se emplearon: 3A-2 para 3A, 3A-5 para G1, 3AfHind para 3A, 3AL38E, 3AL41E y 3AC65S. Las parejas de oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones, así como las enzimas de restricción empleadas en cada caso, están detalladas en la Tabla 4. En el caso de BclII y BamHI, que generan extremos compatibles entre sí, se realizó un tratamiento con fosfatasa alcalina antes de la ligación.

Tabla 4. Cebadores y enzimas de restricción utilizados para los clonajes en los vectores pM y pVP16 del sistema de doble híbrido.

Proteína clonada	Cebador	Sitio de restricción incluido en el inserto	Sitio de clonaje en pM y/o pVP16
3A	3AiBam	BamHI	BamHI
	3A-2	BglII	BclI
G1	3AiBam	BamHI	BamHI
	3A-5	BglII	BclI
3A,3AL38E,3AL41E, 3AC65S	3AiBam	BamHI	BamHI
	3AfHind	HindIII	HindIII

En el ensayo de detección de interacciones entre las proteínas clonadas en los vectores pM y pVP16 se emplearon células BHK-21 crecidas en placas de 35 mm Ø que fueron cotransfectadas con distintas relaciones molares de los plásmidos (pM:pVP16:pGL-G5; determinadas empíricamente), utilizando liposomas catiónicos (lipofectamina plus, Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. A las 24 h postransfección (p.t.) las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron 20 min con tampón de lisis (Passive Lysis Buffer, Promega), todo ello en hielo. Posteriormente, las monocapas se despegaron con un raspador y se centrifugaron a 20.000 x g durante 2 min a 4°C. La actividad luciferasa en el sobrenadante se determinó como está descrito (Brasier y col., 1989); para ello se agregó tampón de luciferina (glicilglicina 25 mM, MgSO₄ 15 mM, ATP 5 mM, BSA 0,1 mg/ml, DTT 1 mM) a los sobrenadantes en una relación 20:1 (tampón: sobrenadante) y luciferina 1 mM (Promega) en una relación 2:1 (tampón:enzima), ésta última agregada en el momento de realizar la cuantificación de la luciferasa expresada. Ésta cuantificación se llevó a cabo utilizando un luminómetro Sirius, Berthold.

Como controles del sistema de doble híbrido se utilizaron los plásmidos pSGPB1 y pVP16PA que expresan subunidades de la polimerasa del virus de la gripe que se sabe dimerizan (Zurcher y col., 1996), así como el plásmido pSGVPΔ490 donde GAL4-VP16 se expresan fusionados (Sadowski y col., 1989).

Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el clonaje de proteínas en el sistema de doble híbrido en células de mamífero.

Oligonucleótido	Secuencia de nucleótidos	Orientación ^a
3AiBam	TAGGGGATCCGTATCTCAATACCTTCC	S
3AfHind	GCAAGCTTTTATTCAGCTTGCGGTTG	A
pMsec ^b	TCATCGGAAGAGAGTAGT	S
pVP16sec ^b	GCCGACTTCGAGTTTGAG	S

a- S: “sentido” (orientación genómica). A: “antisentido”.

b- Oligonucleótidos utilizados para secuenciar los productos clonados

12. Clonaje en el plásmido de expresión eucariota pEGFP-C2

Para su posterior análisis mediante técnicas *in vivo*, la proteína 3A completa así como sus versiones mutadas, indicadas en la Fig. 13, fueron clonadas como proteínas de fusión con el extremo C-terminal de la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP).

wt	3A	ISIPSQKSVLYFLIEKGQHE AAIEFFEGMVHDSIKEELRPLIQQTSFVKR AFKRLKENFEIVALCLTLLA NIVIMIRETH KRQKMVDDAVNEYIEKANITDDQTLDEAE KNPLETSGASTVGFRRERLPGQKARDDVNSEPAQPTEEQPQAE
Sustituciones	3AL38E	ISIPSQKSVLYFLIEKGQHE AAIEFFEGMVHDSIKEEERPLIQQTSFVKR AFKRLKENFEIVALCLTLLA NIVIMIRETH KRQKMVDDAVNEYIEKANITDDQTLDEAE KNPLETSGASTVGFRRERLPGQKARDDVNSEPAQPTEEQPQAE
	3AL41E	ISIPSQKSVLYFLIEKGQHE AAIEFFEGMVHDSIKEELRPEIQQTSFVKR AFKRLKENFEIVALCLTLLA NIVIMIRETH KRQKMVDDAVNEYIEKANITDDQTLDEAE KNPLETSGASTVGFRRERLPGQKARDDVNSEPAQPTEEQPQAE
	3AC65S	ISIPSQKSVLYFLIEKGQHE AAIEFFEGMVHDSIKEELRPLIQQTSFVKR AFKRLKENFEIVALSLTLLA NIVIMIRETH KRQKMVDDAVNEYIEKANITDDQTLDEAE KNPLETSGASTVGFRRERLPGQKARDDVNSEPAQPTEEQPQAE
Delecciones	G1 (ΔK53-E153)	ISIPSQKSVLYFLIEKGQHEAAIEFFEGMVHDSIKEELRPLIQQTSFVKR*****
	G1t (Δ R82-E153)	ISIPSQKSVLYFLIEKGQHE AAIEFFEGMVHDSIKEELRPLIQQTSFVKR AFKRLKENFEIVALCLTLLA NIVIMIRETH KR*****
	NTT (ΔI1-L41)	*****LIQQTSFVKR AFKRLKENFEIVALCLTLLA NIVIMIRETH KRQKMVDDAVNEYIEKANITDDQTLDEAE KNPLETSGASTVGFRRERLPGQKARDDVNSEPAQPTEEQPQAE

Figura 13. Secuencias de la proteína 3A wt y los distintos mutantes clonados en pEGFP-C2. Los residuos deleccionados en cada una de las proteínas se indican entre paréntesis.

Para llevar a cabo estos clonajes se empleó el plásmido pEGFP-C2 (Clontech), descrito en el apartado M4 y mostrado esquemáticamente en la Fig. 14. Este plásmido codifica para una variante de la proteína GFP, la EGFP (*enhanced GFP*) que ha sido optimizada

para tener un mayor brillo de fluorescencia y ser expresada en altos niveles en células de mamíferos (Heim y col., 1995). La proteína verde fluorescente proviene de la medusa *Aequorea victoria* (Shimomura y col., 1962) y su gen fue el primero en ser clonado (Prasher y col., 1992) y expresado en sistemas heterólogos (Chalfie y col., 1994; Inouye y col., 1994) entre las proteínas verdes fluorescentes de diferentes organismos que se conocen.

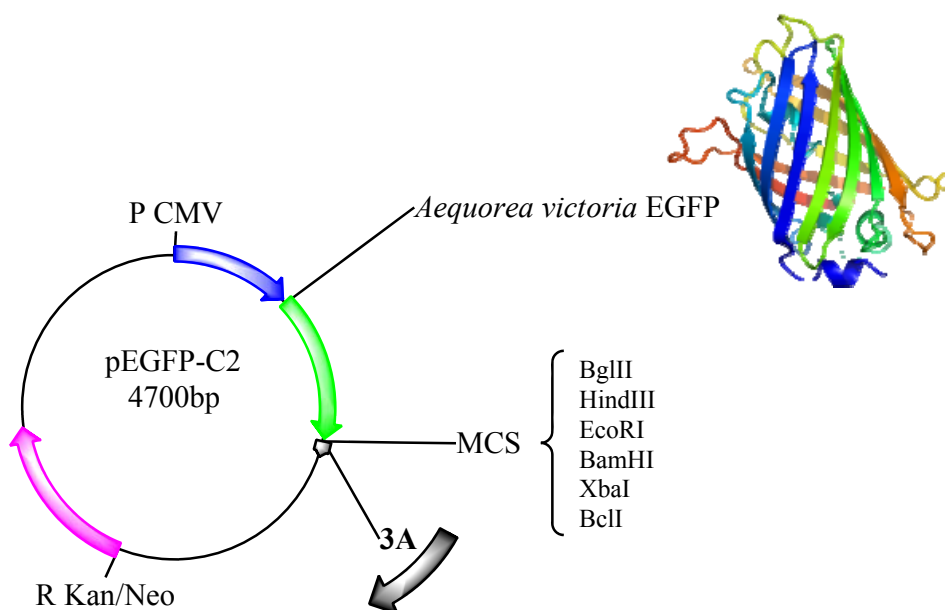


Figura 14. Esquema del plásmido pEGFP-C2 donde se representa dentro del MCS (*multiple cloning site*) las enzimas utilizadas en los clonajes de la proteína 3A y los distintos mutantes. A la derecha se ha incluido una representación de la estructura tridimensional de la EGFP que está constituida por 238 aminoácidos que forman un barril de 11 láminas β rodeando una α -hélice central donde se encuentra el cromóforo que se mantiene enterrado en el centro del cilindro (Ormo y col., 1996; Yang y col., 1996).

Para obtener la construcción pEGFP3Awt se amplificó el cDNA de VFA que contenía la secuencia completa de la proteína 3Awt empleando los oligonucleótidos 3ABamHI / 3A-2. La construcción pEGFPG1 se realizó de manera análoga, empleando los oligonucleótidos 3ABamHI / 3A-5. Para las construcciones que contenían además de la 3A las tres copias de la proteína 3B se utilizaron los oligonucleótidos 3ABamHI / 3A3BBB. El vector pEGFP fue digerido con BamHI y con BclI que genera extremos compatibles con BglII pero es sensible a *dam* metilasas por lo que se tuvo que extraer el DNA plasmídico (pEGFP-C2) de una cepa bacteriana que no las produjera, la *E.coli* JM110.

El mutante NTT se generó utilizando los oligonucleótidos NTT/3AfHind y las enzimas de restricción utilizadas para digerir los insertos fueron BglII y HindIII. El mutante G1t se generó con la pareja de oligonucleótidos t3AHind/rG1t, los fragmentos amplificados se digirieron con HindIII y BamHI. En ambos casos, el clonaje en el vector se realizó con las mismas enzimas de restricción. Las secuencias de los oligonucleótidos se indican en la Tabla 6.

Para los mutantes 3AL38E, 3AL41E y 3AC65S se partió de los clones correspondientes en el plásmido pM (apartado M10) cuyos insertos específicos, mediante digestión con EcoRI y XbaI, se reclonaron en pEGFP-C2.

Las construcciones obtenidas fueron secuenciadas para confirmar que las proteínas del VFA estuvieran en fase con GFP, para lo que se utilizaron los oligonucleótidos detallados en la Tabla 6.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para el clonaje en el vector pEGFP-C2.

Oligonucleótido	Secuencia de nucleótidos	Orientación ^b
NTT	CGGAGATCTGGATCCAACAACTTCA	S
rG1t	GCCGGATCCTTACTTGTGAGTCTCGC	A
f3AHind	GCGAAGCTTGATCTCAATACCTTCC	S
pEGFP ^a	ATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGA	S
pEGFP ^a	ACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTC	A

a – Oligonucleótidos utilizados para secuenciar los productos clonados.

b- S: “sentido” (orientación genómica). A: “antisentido”.

13. Clonaje del doble mutante 3AL38EL41E en pRSV

Partiendo del plásmido pRSV3AL41E (Fig. 15), se utilizó la técnica de *overlap extension* (Sambrook y col., 2001) para generar el doble mutante pRSV3AL38EL41E. Para ello se diseñaron dos oligonucleótidos que amplificaban la región de 3A y que incluían la sustitución L38E, cuya secuencia se detalla en la Tabla 7. Se realizaron 3 amplificaciones que se esquematizan en la Fig. 15. Primeramente y utilizando como molde el pRSV3AL41E y un oligonucleótido “sentido” con secuencia wt (3A1) y otro “antisentido” con secuencia mutada (3AL41EL38E-1) (flechas rojas en el esquema), se obtuvo el producto amplificado denominado PCR 1. En una segunda amplificación en la que se empleó el oligonucleótido “sentido” con la secuencia mutada (3AL41EL38E-2) y

el “antisentido” de secuencia wt (3A2) (flechas azules en el esquema), se obtuvo el producto de amplificación PCR 2. Finalmente, mezclando cantidades equimolares de los productos PCR1 y PCR2 como molde, se realizó una tercera amplificación con los oligonucleótidos wt (3A1/3A2) externos a la región mutada.

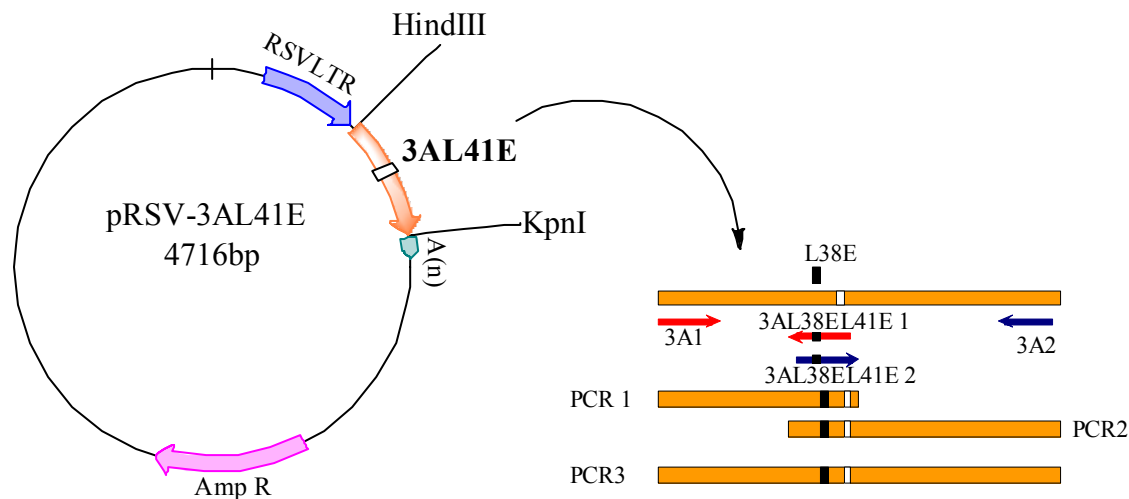


Figura 15. Esquema del plásmido pRSV3AL41E y de la estrategia de mutagénesis por *overlap extension* seguida para obtenerle doble mutante pRSV3AL38EL41E. Se indican las enzimas de restricción utilizadas en el clonaje, HindIII y KpnI. En el plásmido se representa el gen de resistencia a la ampicilina, en azul claro la señal de poliadenilación A(n) derivada del virus SV40 y el promotor LTR. A la derecha se representan los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones y los productos de PCR en cada reacción.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la introducción de la mutación puntual L38E en la proteína 3AL41E.

Oligonucleótido	Secuencia ^a	Orientación ^b
3A1 HindIII	GCGAAGCTTTCTAGAATGATCTCAATACCTTCC	S
3A2 KpnI	TATAGTTCTGGTACCTTATTCAGCTTGCGGTTG	A
L41EL38E-1	TTGGATCTCGGGCCGCTCTTCCTCCTTA	A
L41EL38E-2	TAAGGAGGAAGAGCGGCCCGAGATCCAA	S

a- Se indica el triplete mutagenizado subrayado

b- S: “sentido” (orientación genómica). A: “antisentido”.

14. Secuenciación

Los diferentes plásmidos desarrollados a lo largo de ésta Tesis Doctoral fueron secuenciados para confirmar su correcta construcción. Las secuencias fueron

determinadas en la Unidad de Genómica de Parque Científico de Madrid, utilizando un secuenciador multicapilar ABI Prism 3100, 3700, o 3730 (Applied Biosystems). Para ello se emplearon los cebadores indicados en cada clonaje.

15. Tratamientos bioquímicos para caracterizar interacciones de la proteína 3A con membranas celulares

15.1. Transfección y preparación de lisados de monocapas celulares

Se emplearon células Vero que fueron crecidas en placas de 60 mm Ø y transfectadas con 1,5-2 µg del plásmido correspondiente y Lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. A las 24 h p.t. las monocapas fueron lavadas tres veces con PBS en hielo y lisadas en PBS suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas, a la dilución que recomienda el fabricante (1:25) (Roche), mediante cinco ciclos de congelación en N₂ líquido y descongelación en baño a 37°C.

15.2. Centrifugación y tratamientos bioquímicos

Los lisados celulares fueron centrifugados a 300 x g durante 10 min para descartar restos celulares y luego a 30.000 x g y 20 min para separar fracciones membranosas o insolubles de fracciones solubles o citoplasmáticas; ésta última centrifugación se repitió dos veces. El precipitado obtenido fue resuspendido en distintas condiciones: Na₂CO₃ 0,1 M, urea 4 M, KCl 1M o Tritón X-100 0,5 %. Las muestras se centrifugaron a 30.000 x g durante 20 min y se separó el sobrenadante del precipitado (Liu y col., 2004; Tershak, 1984). Tras agregar Tampón Laemmli (M2) las muestras fueron hervidas 4 min antes de ser analizadas por SDS-PAGE y *Western Blot*.

15.3. Fraccionamiento de membranas en gradientes de densidad por centrifugación de equilibrio

El aislamiento de fracciones de membranas insolubles en detergentes no iónicos por centrifugación de equilibrio en gradientes de densidad de sacarosa se realizó como está descrito (Brown y col., 1992). Para ello, las células se crecieron en placas de 100 mm Ø que se transfectaron con los plásmidos correspondientes. A 24 h p.t. las células se

lavarón 3 veces con PBS y se despegaron con un raspador tras su incubación en tampón TNE (Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5mM a pH 7,4) con 0,5% de Tritón X-100 en hielo durante 30 min. El lisado obtenido se pasó 10 veces por una aguja de calibre 22 G, y se mezcló con sacarosa al 70% en tampón TNE suplementado con PMSF 1 mM y coctel de inhibidores de proteasas. La solución obtenida, con una concentración de sacarosa del 35% en un volumen de 4 ml, se colocó en un tubo de ultracentrífuga y por encima se añadieron 8 ml de un gradiente continuo (5-30%) de sacarosa. Los gradientes fueron centrifugados a 180.000 x g durante 18 h a 4°C. Tras la centrifugación, se recogieron 12 fracciones de 1 ml comenzando por el borde superior del tubo que se analizaron inmediatamente por *Western blot*, o se almacenaron a -20°C.

16. Péptidos sintéticos

Los péptidos utilizados correspondientes a la región N-ter de la proteína 3A comprendida entre los residuos Il y F52, así como aquellas variantes de éste péptido que contenían las sustituciones L38E, L41E, L38E-L41E, M29R y Q44D, fueron sintetizados en colaboración con David Andreu (Universidad Pompeu Fabra, Barcelona), como se mencionó anteriormente (ver Tabla 8). Brevemente, la síntesis se realizó en fase sólida en forma de péptidos C-terminal carboxamida en una resina amida Rink ChemMatrix®, utilizando un sintetizador Prelude (Protein Technologies, Tucson, AZ) por medio de la estrategia del 9-fluorenil-metoxicarbonilo (Fmoc). La identidad de cada péptido fue confirmada por espectrometría de masas MALDI-TOF en un Voyager DE-STR (Applied Biosystems), usando una matriz de ácido α -cyano-4-hydroxycinnamico y un modo de adquisición lineal.

Los péptidos liofilizados fueron resuspendidos en H₂O miliQ a una concentración de 5 mg/ml. Inmediatamente después a 1,87 μ g y 0,187 μ g de cada péptido se le agregó tampón de carga Laemmli con 2% SDS y 100 mM DTT, incubándose 25 min a TA. Las muestras se analizaron en SDS-PAGE al 12%. Los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie y transferidos a membranas de nitrocelulosa sobre las que se realizó un *Western blot* con anticuerpos policlonales (443 y 479) contra el extremo N-terminal de la proteína 3A generados como se describe en el apartado M10.

Tabla 8. Péptidos sintéticos de la región N-ter (I1-F52) de la proteína 3AwT y de los mutantes L38E, L41E, L38EL41E, M29R y Q44D.

	Secuencia de aminoácidos^a	PM^b_(promedio) calc/enc
wt	ISIPSQKSVLYFLIEKGQHEAAIEFFEGMVHDSIKEELRPLIQQTSFVKRAF	6036/6035
L38E	ISIPSQKSVLYFLIEKGQHEAAIEFFEGMVHDSIKEE <u>ER</u> PLIQQTSFVKRAF	6051/6052
L41E	ISIPSQKSVLYFLIEKGQHEAAIEFFEGMVHDSIKEELR <u>PE</u> IQQTSFVKRAF	6051/6052
L38L41E	ISIPSQKSVLYFLIEKGQHEAAIEFFEGMVHDSIKEE <u>ERPE</u> IQQTSFVKRAF	6068/6069
M29R	ISIPSQKSVLYFLIEKGQHEAAIEFFEG <u>R</u> VHDSIKEELRPLIQQTSFVKRAF	6061/6063
Q44D	ISIPSQKSVLYFLIEKGQHEAAIEFFEGMVHDSIKEELRPLIQ <u>D</u> TSFVKRAF	6023

^a Secuencias correspondientes a los residuos 1-52 de la proteína 3A. En negrita y subrayado se indican las sustituciones de aminoácido incluidas en cada uno de los péptidos mutados, respecto a la secuencia del aislado C-S8c1.

^b Peso molecular promedio calculado/encontrado

17. Inmunofluorescencia indirecta.

Las células se crecieron en cubreobjetos de vidrio, a las 24 h p.t. se lavaron con PBS dos veces y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min a TA. Después de tres lavados con PBS se bloquearon y permeabilizaron durante 15 min a TA con PBTG (PBS con 0,1% Tritón X-100, 1% BSA y 1 M glicina). Luego de tres lavados con PBS los cubreobjetos se incubaron con la dilución óptima del Ac primario correspondiente en PBS con 1% de BSA durante 60 min a TA en cámara húmeda. Tras tres lavados con PBS los cubreobjetos se incubaron con la dilución correspondiente del Ac secundario en las mismas condiciones que anteriormente. Para visualizar los núcleos, los cubreobjetos se sometieron a tres nuevos lavados con PBS, tras lo que se tiñeron con 1 µg/ml de DAPI (Molecular Probes, Invitrogen) durante 5 min. Tras repetir los lavados los cubreobjetos fueron montados con medio de montaje Fluoromount G (Southern Biotech) sobre portaobjetos de vidrio para su posterior observación al microscopio confocal Microradiance (Biorad/Zeiss).

El tratamiento de las imágenes y los análisis de colocación se realizaron con el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>), utilizando la aplicación (*plugin*) de colocación “*intensity correlation analysis*” (ICA)(Li y col., 2004).

18. Técnicas de microscopía *in vivo*

18.1. Microscopía *Time lapse*

Se crecieron células Vero en placas de 35 mm Ø con fondo de cristal (MatTek), que se mantuvieron en medio DMEM sin rojo fenol y se transfectaron con 1 µg de DNA del plásmido pEGFP3A. A partir de las 4,5 h p.t. comenzó a visualizarse por microscopía la fluorescencia verde, momento en el cual las células se monitorizaron en un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) provisto de un sistema *in vivo* (Cell Observer-Zeiss) acoplado a una cámara CCD monocroma y una rueda de filtros rápida para emisiones dobles LAMBDA 10 con controlador doble. Para la adquisición y procesamiento de imágenes se empleó el programa Metamorph 6.3 (Universal Imaging). A partir de las 6 h p.t. las células fueron “escaneadas” cada 5 min durante 3 h con un objetivo de agua (63x/1.2 Water C-Apochromat Corr) para mejorar la definición. El *tracking* manual y los cálculos cinéticos de la proteína fluorescente se realizaron utilizando el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

18.2. Recuperación de la fluorescencia luego del *photobleaching*

Para ésta técnica de recuperación de la fluorescencia luego del *photobleaching* o “apagamiento” (alteración del fluoroforo inducida por la iluminación que extingue su fluorescencia) (FRAP, *Fluorescence recovery after photobleaching*), las células se crecieron en las mismas condiciones y superficie que para la técnica de *time lapse* y se transfectaron derivados de pEGFP que expresaban las distintas versiones fluorescentes de la proteína 3A. Las células se observaron a distintos tiempos p.t. utilizando el sistema *in vivo* del microscopio invertido Axio Observer (Zeiss). Los experimentos se realizaron por triplicado con una $n > 10$, definiéndose tres regiones de interés (ROI) circulares con un Ø de 10 µm en cada campo elegido. La primera ROI se seleccionó en una región del citoplasma con un patrón de fluorescencia punteado sobre la que se iba a realizar el *photobleaching*. Como controles se emplearon: i) una segunda ROI en una célula vecina dentro del mismo campo o en la misma célula, pero en otra región del citoplasma, para determinar si durante el experimento existía *photobleaching* adicional y poder corregirlo; y ii) una tercera ROI localizada fuera de las células para medir el fondo o ruido. Las células fueron escaneadas seis veces antes de comenzar el *photobleaching*,

para determinar la máxima intensidad de fluorescencia inicial. Para realizar el *photobleaching* se utilizó un láser de Argón de $\lambda=488$ nm a su máxima potencia (100% potencia del láser y 100 interacciones) que se hizo incidir sobre la ROI-1 de manera que bajase su intensidad de fluorescencia aproximadamente un 80% respecto a la inicial. En ésta misma ROI-1 se monitorizó la recuperación de la fluorescencia escaneando continuamente ésta región y obteniendo una intensidad de fluorescencia en cada tiempo. Esta operación se realizó a una intensidad de láser del 1%. De ésta manera, si las proteínas fluorescentes son móviles, en la ROI-1 se va recuperando fluorescencia hasta alcanzar una máximo, que en la gráfica de intensidades en función del tiempo se representa como una meseta. Las imágenes fueron obtenidas con el programa Zenon (Zeis). Para analizar los datos y calcular la fracción móvil, ajustando la curva a una exponencial, se utilizó el programa Fcalc _Turku Centre for Biotechnology, University of Turku, Finland (Virtanen y col., 2010)_ que utiliza mínimos cuadrados mediante la siguiente ecuación:

$$A_1 (1-e^{-k_1 t}) + A_2 (1-e^{-k_2 t})$$

En ella, A_1 y A_2 representan las fracciones móviles/inmóviles y k es la constante cinética. Se utilizó la ecuación con dos componentes móviles ya que empíricamente es la que se ajustó a los valores obtenidos.

18.3. Pérdida de fluorescencia durante el *photobleaching*

En éste ensayo, donde se mide la pérdida de fluorescencia en una célula que es repetidamente “apagada” mediante *photobleaching* (FLIP, *Fluorescence loss in photobleaching*), las células se crecieron en placas de 35 mm Ø con fondo de cristal y se transfectaron con los plásmidos pEGFP3A ó plgLdR1KDEL-RFP (Wolk y col., 2008), éste último como control. Las células se observaron a 24 h p.t. en el mismo sistema *in vivo* que el empleado para la técnica de FRAP. En éste caso se seleccionó una ROI sobre la cual se realizaron 150 repeticiones de 15 interacciones de láser al 100% de potencia para la proteína RFP y al 60% para GFP, cada seis escaneos (7 s). Se seleccionó también una ROI-2 en el citoplasma de la misma célula era repetidamente “apagada” (*photobleached*) para monitorizar la pérdida de fluorescencia. También se seleccionó una ROI-3 en una célula diferente dentro del mismo campo para estimar el *photobleaching* global que podía ocurrir en ese campo. Las imágenes fueron adquiridas con el programa Zenon (Zeiss).

19. Ensayo de ligación por proximidad *in situ*

Esta técnica de ligación por proximidad (PLA, *Proximity ligation assay*) *in situ* es un ensayo de detección de interacción entre proteínas (Weibrecht y col., 2010) y se utilizó para estudiar la homodimerización de la proteína 3A. Para ello, las muestras fueron procesadas como recomienda el fabricante (PLA Duolink II, Olink). Brevemente, las células fueron crecidas en cubreobjetos de cristal de 10 mm², transfectadas con 1 µg de los plásmidos correspondientes y Lipofectamina, o infectadas con el aislado de VFA C-S8c1 a una m.d.i de 5 ufp/ml. A 24 h p.t. o 3 h p.i. las células se lavaron tres veces con PBS y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 15 min a TA, tras lo que se boquearon y permeabilizaron con PBTG durante 15 min a TA en cámara húmeda. Los cubreobjetos fueron pegados con laca de uñas sobre portaobjetos de cristal y bordeados con un lápiz graso (Vector) para mantener posteriormente los volúmenes de reacción sobre las células de interés.

Dado que nuestro interés era detectar la homodimerización de la proteína 3A, se empleó un único AcMo (2C2) al que se conjugaron cada una de las dos sondas empleadas en la técnica de PLA (sonda PLA + ó -) mediante el kit comercial Probemaker (Duolink). En esta técnica los requisitos del anticuerpo a ser conjugado son, que esté purificado a una concentración de 1 mg/ml y que esté en tampón PBS. Para ello el anticuerpo monoclonal 2C2 se purificó mediante columna de afinidad de proteína G (Sigma), se dializó frente a PBS toda la noche a 4°C y se cuantificó mediante espectrofotometría a $\lambda=280$ nm.

Las células fueron incubadas con ambos Ac primarios 2C2 conjugados, diluidos en 1% BSA en PBS, por 1 h a TA en cámara húmeda y posteriormente lavadas dos veces con tampón A (Tris 0,01 M, NaCl 0,15 M y Tween 20 0,05%) durante 5 min. Para la detección de la interacción proteína-proteína se agregó la solución de ligación (ligasa, tampón correspondiente y oligonucleótidos) que se incubó 30 min a 37°C. Durante éste paso los oligonucleótidos hibridan con las sondas conjugadas a 2C2 únicamente si éstas están lo suficientemente cerca entre sí (menos de 40 nm) y forman un círculo cerrado de DNA. Luego de lavar las muestras con Tampón A por 2 min dos veces, se agregó la solución de amplificación (polimerasa, nucleótidos y oligonucleótidos fluorescentes) incubándose a 37°C durante 100 min en cámara húmeda. La amplificación por círculo rodante genera un DNA concatámero sobre el que hibridan las sondas. Las muestras se lavaron finalmente dos veces con tampón B (Tris 0,2 M, NaCl 0,1 M) 10 min y una vez

con una dilución 1:10 del mismo por 1 min. Se utilizó una mínima cantidad de medio de montaje con DAPI para el montaje con cubreobjetos de cristal que fueron sellados con laca de uñas a TA. Las muestras fueron mantenidas a 4 °C en oscuridad hasta ser observadas al microscopio de fluorescencia Confocal LSM710 Vertical (Biorad/Zeiss).

20. Métodos bioinformáticos para predicción de la estructura de la región N-ter de la proteína 3A de VFA

En colaboración con Paulino Gómez Puertas (Servicio de Bioinformática del CBMSO), y basándose en la estructura determinada por RMN del fragmento soluble N-ter de la proteína 3A de PV, se obtuvo un modelo molecular para los 94 residuos del extremo N-ter de la proteína 3A de VFA (González-Magaldi et al, 2012). Para ello se empleó un alineamiento múltiple del dominio soluble (N-ter) y secuencias aledañas de distintas proteínas 3A de varios enterovirus y VFA. Las secuencias incluidas en este alineamiento (cuyo número de identificación ID Uniprot se indica entre paréntesis) fueron: 1NG7, Poliovirus tipo 1 cepa Mahoney (P03300), secuencia utilizada como molde para los procedimientos de modelado por homología (Strauss y col., 2003); PV tipo 1, aislado CHN-Guangdong/92-2 (Q9E912); CVB3 (P03313); CVA11 (Q7T7P4); CVA20 (Q7T7N8); VFA tipo C, aislado C-S8c1, (Q9E2G4); VFA tipo O (P03305); VFA tipo A (P49303); VFA tipo Asia 1 (Q7TDB3), utilizando el servidor SWISS-MODEL (Guex y col., 1999; Peitsch, 1996; Schwede y col., 2003) disponible en <http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>. La calidad estructural del modelo se confirmó utilizando programas de análisis del mismo servidor (Anolea/Gromos). Las figuras del mismo se generaron utilizando el sistema gráfico Pymol Molecular Graphics System (Schrödinger, LLC).

21. Métodos estadísticos y análisis de los datos

Los valores representados en las gráficas corresponden a la media de los valores de las determinaciones \pm el valor de su desviación estándar o desviación típica (indicándose en cada caso). Los datos fueron sometidos a un análisis de la varianza (ANOVA) usando la distribución *F* de Fisher-Snedecor y aplicando la corrección de Bonferroni al test de la *t* de Student en el caso de las comparaciones múltiples. Para ello se empleó el programa informático SPSS versión 19. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente

significativas cuando el valor de p estimado fue menor de 0,05, lo que se indica en las gráficas mediante un asterisco (*) o menor de 0,01, lo que se indica con dos asteriscos (**).

RESULTADOS

Resultados

1. Cinética de expresión de PNE durante la infección con VFA

Durante el ciclo de multiplicación del VFA se producen en las células infectadas tanto proteínas virales maduras como sus precursores. Para estudiar la cinética de detección de estas proteínas se infectaron células BHK-21 que, a distintos tiempos p.i., se lisaron y se analizaron por *Western blot*, como se describe en (García-Briones y col., 2006). Los tiempos p.i. incluyeron la hora de adsorción del virus a 37°C. Para el ensayo se utilizaron Ac frente a las PNE 2C, 3A, 3B, 3C, 3D así como frente a la proteína de la cápsida VP1, detallados en el apartado M6. La detección de la proteína 2B no fue posible ya que el suero que el laboratorio tenía disponible frente a ella, que se había utilizado en técnicas de inmunofluorescencia, no funcionó en *Western blot* (Fig. 16).

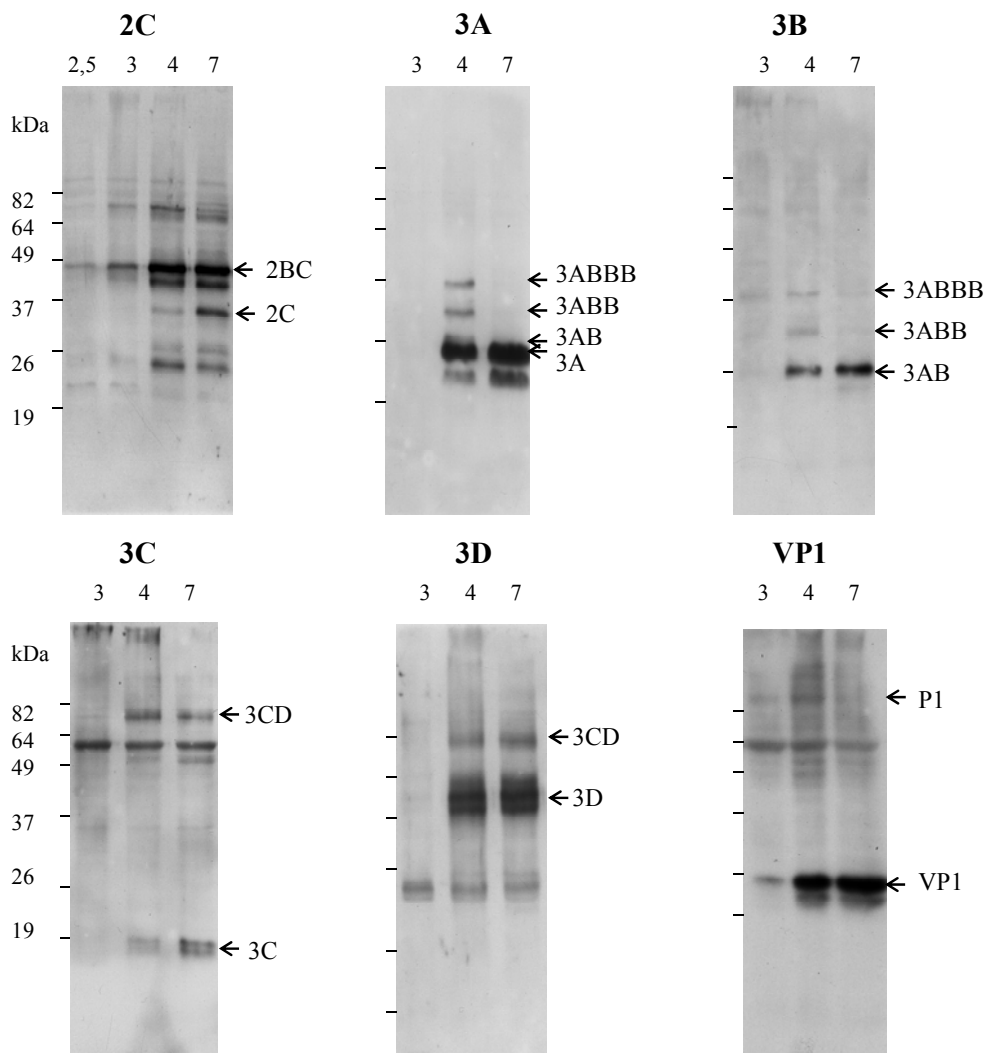


Figura 16. Cinética de detección de proteínas virales en células infectadas con VFA. Ensayo de *Western blot* de monocapas de células BHK-21 infectadas y analizadas a distintos tiempos p.i., en el que se emplearon Ac frente a cada una de las proteínas indicadas. Las flechas indican las proteínas virales y

sus precursores a los que se corresponden las bandas mayoritarias, de acuerdo con (Belsham y col., 2004; Toja y col., 1999). Los tamaños predichos en kDa para las mismas son los siguientes: 52,7 (2BC), 35,8 (2C), 17,4 (3A), 20,1 (3AB), 22,7 (3ABB), 25,3 (3ABBB), 47,4 (3ABC), 22,1 (3C), 75,7 (3CDpol), 52,7 (3Dpol), 81 (P1) y 22,9 (VP1). Se indica, también, la migración de los marcadores de peso molecular empleados y sus tamaños en kDa.

La primer proteína detectada (2,5 h p.i.) fue 2C, seguida de los precursores P1, 2BC y 3ABBB a las 3 h p.i. Todas las proteínas maduras analizadas se visualizaron claramente a las 4 h p.i., lo que también ocurrió con los precursores 2BC, 3ABBB, 3ABB, 3AB y P1. A las 7h p.i. se detectaron todas las proteínas maduras así como los precursores 2BC, 3AB, 3ABC y 3CD. Los anticuerpos anti-2C y anti-3A también revelaron la presencia de bandas de tamaño menor al teórico para los tiempos p.i. de 4 y 7 h.

En el laboratorio se había analizado previamente la distribución de las PNE mediante microscopía de fluorescencia, determinándose los patrones celulares de las distintas PNE, así como los cambios morfológicos en la monocapa infectada, observados por microscopía óptica de contraste de fase. De ésta manera, como se comenta en Discusión, se pudieron correlacionar los resultados del análisis de proteínas con las observaciones microscópicas de distribución de las PNE (Garcia-Briones y col., 2006).

2. Estudio de la proteína 3A del VFA: caracterización de su capacidad de dimerización

Como se comenta en la Introducción, la proteína 3A de VFA presenta una serie de características únicas entre los Picornavirus, disponiéndose de limitada información sobre su papel en el ciclo de multiplicación del virus. Por todo ello, el estudio de ésta proteína ha constituido la parte central de ésta Tesis Doctoral. Asimismo, la descripción de la capacidad de la proteína 3A de PV para formar dímeros intermoleculares (Strauss y col., 2003) hizo interesante profundizar en la caracterización de la posible dimerización de la proteína 3A de VFA, de la que ya existían evidencias previas en el laboratorio que se comentan en el siguiente apartado.

2.1. Expresión de la proteína 3A completa en *E.coli*

Como aproximación inicial al estudio de la proteína 3A, su secuencia completa fusionada a 6 residuos de H en su extremo N-ter se había clonado en el plásmido de

expresión bacteriano pRSET-C, con el objetivo de poder disponer de proteína purificada que hiciese posible, entre otros estudios, los encaminados a obtener información sobre su estructura. En la Fig. 17 se muestra el resultado de un experimento de detección por *Western blot* de la proteína 3A expresada a partir de pRSET-C-3A. En este experimento se incluyó tanto la proteína presente en un extracto de bacterias lisadas 2,5 h post inducción con IPTG 1 mM, como la recuperada tras su purificación en una columna de Ni-NTA, empleando imidazol 400 mM (ver detalles en M7.1), así como dos diluciones 1:2 y 1:10 de esta proteína purificada. En todos los casos, la proteína 3A, detectada empleando el Ac Mo 2C2, mostró un patrón de bandas con movilidades compatibles con la presencia de dímeros y de formas de mayor tamaño (multímeros). Durante el proceso de purificación y manejo de la proteína expresada a partir de pRSET-C-3A, se observó, también, la dificultad para conseguir su recuperación eficiente en la fracción soluble, lo que no permitió obtener resultados satisfactorios en los intentos posteriores de emplear esta proteína en análisis estructurales por RMN, realizados en colaboración con Ernest Giralt (Parque Científico de Barcelona).

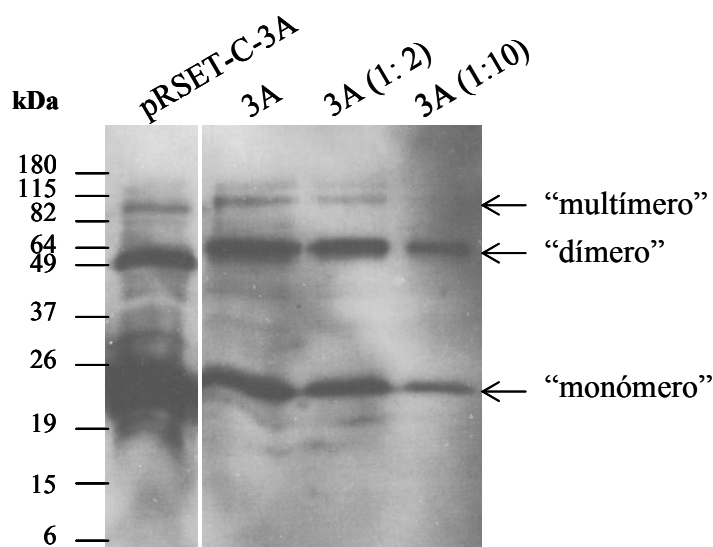


Figura 17. Análisis de la proteína 3A expresada en *E.coli* y purificada. *Western blot* con un Ac Mo frente a 3A (2C2) de un extracto de *E.coli* que expresaba la proteína 3A, 2,5 h post inducción con IPTG 1 mM, así como de una alícuota de la proteína purificada de la columna de Ni-NTA con imidazol 400 mM y dos diluciones de la misma, 1:2 y 1:10. A la izquierda se indica la movilidad de los marcadores de tamaño y su peso molecular en kDa.

2.1.1. Filtración de la proteína 3A por centrifugación en membranas de celulosa

Como parte de los intentos de caracterizar las propiedades bioquímicas de la proteína 3A del VFA expresada en *E.coli* a partir de pRSET-C-3A, se utilizó un dispositivo de filtración por centrifugación en membranas de celulosa (Centricón, Millipore), con el objetivo de concentrar la fracción monomérica de la proteína 3A eluída de la columna de purificación. Una de las aplicaciones de estos dispositivos de centrifugación es la filtración de moléculas con tamaño molecular menor que el tamaño mínimo retenido por la membrana elegida. Dado que el peso molecular de la proteína 3A con la cola de H era de 18,2 kDa, se utilizaron tipos de filtros distintos, tal y como se explicó en el apartado M8.6. Cuando se empleó el filtro YM-30, con el que se esperaba que la proteína monomérica se recuperara en la fracción filtrada (F) mientras que los elementos diméricos o multiméricos (con un tamaño mínimo de 36 kDa) quedarán retenidos en la fracción concentrada (C), la proteína se comportó como si su tamaño fuera mayor de 30 kDa, ya que el análisis por *Western blots* de las fracciones obtenidas reveló la ausencia de bandas tanto en la fracción filtrada, como en la unida a la membrana (Fig. 18A), detectándose la proteína 3A solamente en la fracción concentrada. Cuando se utilizó un filtro YM-100, cuyo tamaño mínimo retenido es de 100 kDa, el comportamiento observado fue similar al anterior (Fig. 18B). Cuando la membrana de los centricones YM30 e YM100 se bloqueó con 0,01% BSA para minimizar la posibilidad de que la proteína se estuviera reteniendo en ella, tampoco se recuperó proteína 3A en la fracción filtrada, lo que también se observó cuando la muestra fue tratada con agentes desnaturizantes como SDS 0,1 M ó urea 8M (Fig. 18A y B). Por tanto, los resultados sugieren que la proteína 3A completa expresada en *E.coli* a partir de pRSETC-3A forma agregados que no atraviesan el filtro del centricón, ya sea por su tamaño o por problemas de insolubilidad.

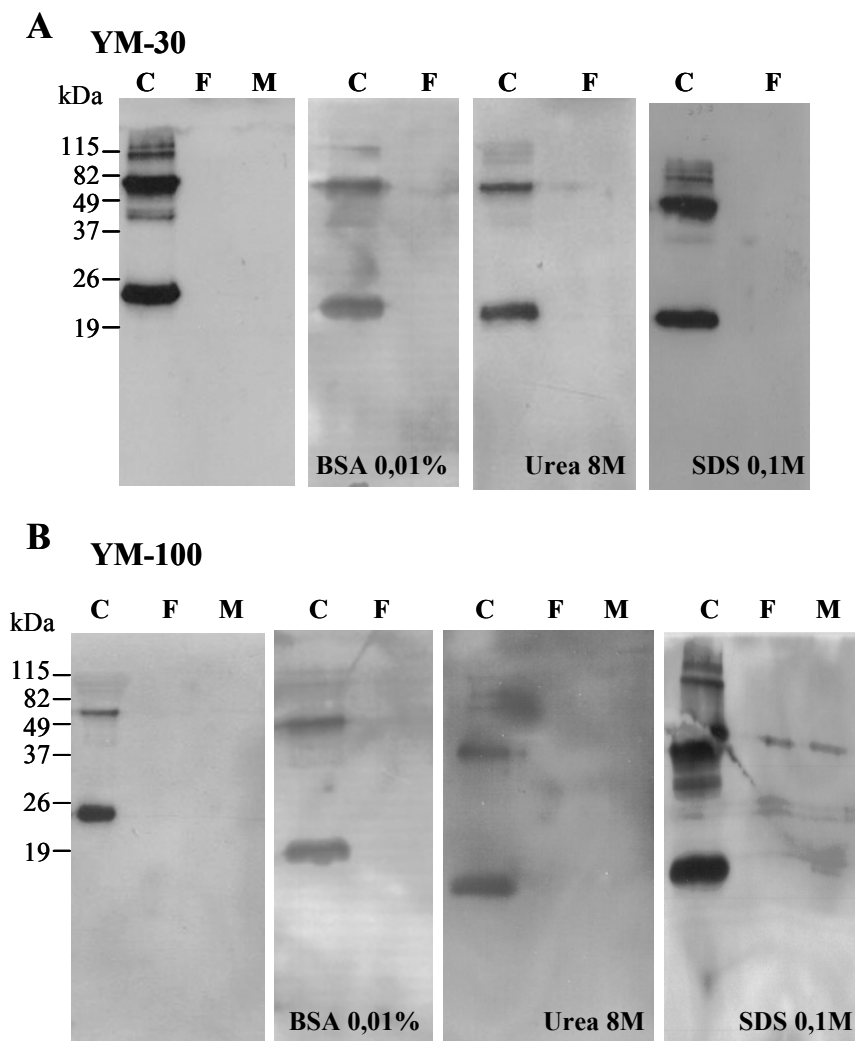


Figura 18. Análisis por centrifugación en dispositivos de filtración (Centricón). Se analizó la movilidad electroforética de las fracciones concentradas (C), filtradas (F) y lo que pudiera quedar unido a la membrana (M) obtenidas a partir de la filtración de soluciones de la proteína 3A purificada, como se describe en R2.1, sin ningún tratamiento, y en presencia de SDS 0,1M o de urea 8M. Se emplearon centricones con membranas YM-30 (A) o YM-100 (B). Se incluye un control en el que la membrana de cada dispositivo fue bloqueada con BSA 0,01%.

2.1.2. Análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF)

Como parte del estudio de la capacidad de la proteína 3A expresada en *Ecoli* para dimerizar/multimerizar, se llevó a cabo un análisis proteómico por espectrometría de masas MALDI-TOF. Para ello se emplearon las bandas de la proteína recuperadas tras la separación electroforética en un gel de SDS-PAGE de la fracción purificada obtenida a partir de pRSETC-3A. Estos experimentos se llevaron a cabo en colaboración con el

Servicio de Proteómica del CBMSO. Como se muestra en la Fig. 19A, la tinción del gel con Sypro reveló la presencia de dos bandas denominadas muestra 1 y 2, que fueron cortadas y digeridas con tripsina para su análisis como se explica en M8.7. Como control interno se utilizaron las masas correspondientes a los péptidos resultantes de la digestión de BSA. También se utilizó un estándar interno, con cuyos valores de espectrometría se realizó la identificación de los péptidos problema por PMS (*probability based Mowse score*). La Fig. 19B muestra los picos de la espectrometría de masas correspondientes a las muestras 1 y 2, indicándose en rojo los valores de las masas identificadas como correspondientes a fragmentos de digestión con tripsina de la proteína 3A, obtenidas mediante la aplicación informática MS-Digest de Protein Prospector 5.10.0 (Universidad de California).

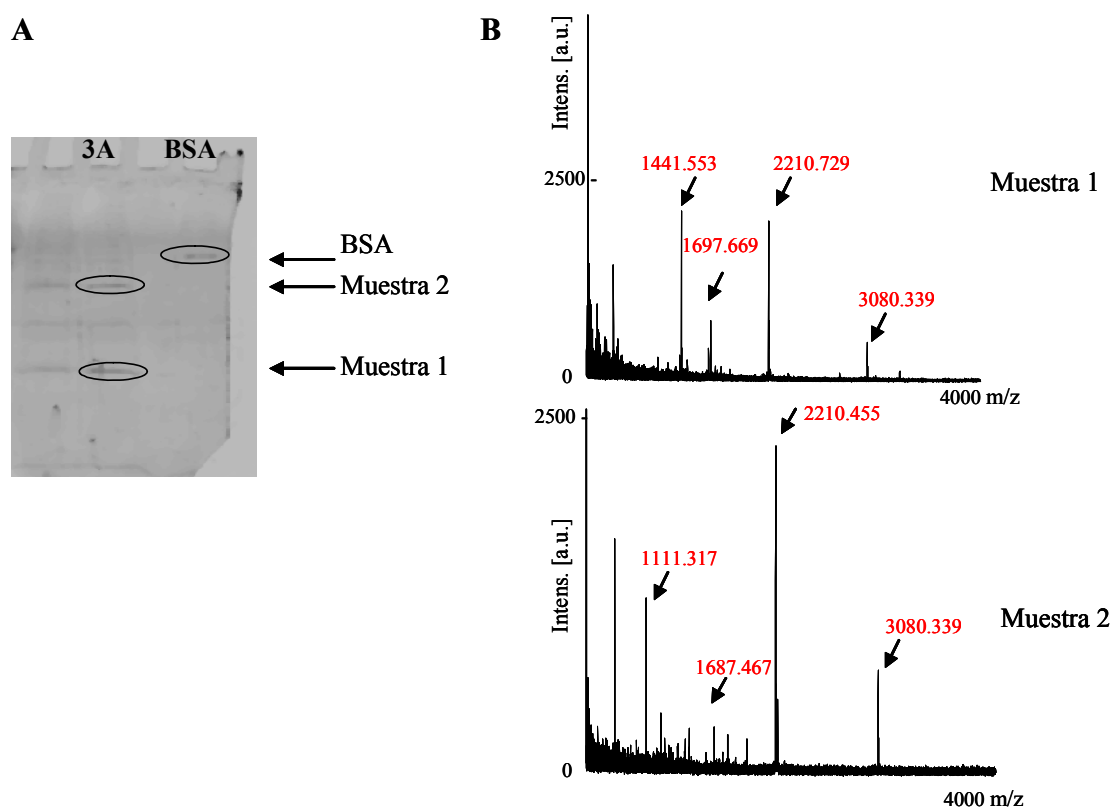


Figura 19. Análisis de la proteína 3A por espectrometría de masas MALDI-TOF. A) Gel de poliacrilamida teñido con Sypro donde se señalan las muestras analizadas. Las muestras 1 y 2 corresponden a las dos bandas mayoritarias de la proteína 3A producida en *E.coli* a partir de pRSET-C-3A y purificada como se describe en el apartado M7. La proteína BSA se utilizó como control. B) Espectros de masas UV-MALDI de las muestras 1 y 2, para las que se indican las masas de los picos (números en rojo) que corresponden a péptidos de 3A.

Los resultados indicaron que ambas muestras (1 y 2) poseían péptidos trípticos de la proteína 3A, lo que es compatible con que la proteína presente en la muestra 2 corresponda a un dímero de la contenida en la muestra 1.

2.2. Expresión y purificación de distintos fragmentos de la proteína 3A

Como se describe en el apartado R2.1, los niveles de expresión de la proteína 3A en *E.coli* no habían hecho posible obtener información directa sobre su estructura. Una observación similar se había hecho con la proteína 3A de PV. En éste caso, la expresión del fragmento N-ter de la proteína, excluyendo el dominio transmembrana y los restantes residuos del extremo C-ter, incrementó el rendimiento de la expresión bacteriana y la solubilidad de ésta proteína, permitiendo la determinación de la estructura molecular en solución de éste fragmento de 3A (Strauss y col., 2003). Por todo ello, se planteó el clonaje y expresión de los fragmentos N-ter (G1) y C-ter (G2) de 3A (prescindiendo en ambos del dominio transmembrana), así como los correspondientes al extremo C-ter seguido de una copia (G3) o las tres copias (G4) de la proteína 3B (ver Tabla 9 y Fig. 20A). Así mismo, los fragmentos expresados fueron empleados para la producción de sueros específicos de conejo.

2.2.1. Expresión de G1, G2, G3 y G4

Los distintos fragmentos de la proteína 3A fueron clonados en el vector pRSET-C (-G1, -G2, -G3 y -G4) que permite la expresión de las proteínas de interés con una cola de 6 H que facilita su posterior purificación (Fig. 20A). En la Tabla 9 se detallan la longitud en aminoácidos (aa), el tamaño en kDa y el punto isoeléctrico (pI) de cada fragmento. El plásmido pRSET-C, descrito en el apartado M7.1, posee el promotor del bacteriófago T7, lo que permite expresar de forma inducible proteínas que pudieran ser tóxicas, ya que las bacterias no tienen RNAPol T7 lo que minimiza la expresión basal de los genes clonados. La cepa bacteriana empleada, *E.coli* BL21(DE3)pLys fue elegida ya que contiene el gen de la RNAPol T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, el cual es inducible por IPTG (Cantrell y col., 2003). Las condiciones de crecimiento, inducción y lisis bacterianas elegidas para éstos experimentos se describen en el apartado M7. Como parte de ellas se añadió glucosa 40 mM al inóculo nocturno para reprimir la inducción del promotor *lac* por la lactosa presente en el medio LB (Mierendorf y col., 2000).

Tabla 9. Proteínas del VFA clonadas en pRSET-C

Proteína	aa	kDa*	pI
3A	153	18,22	4,69
3ABBB	224	25,95	9,28
G1	52	6,86	6,52
G2	72	8,79	4,00
G3	95	11,35	4,49
G4	143	16,52	9,36

*El tamaño indicado corresponde al teórico del fragmento clonado, más las 6 H añadidas en su extremo N-ter.

La expresión de los distintos fragmentos se analizó mediante *Western blot* con el AcMo anti 3A (2C2) y con un AcPo anti histidinas, ya que se constató que el AcMo 2C2 no reconocía la región N-terminal de la proteína 3A y, por tanto, el fragmento G1 (Fig. 20B).

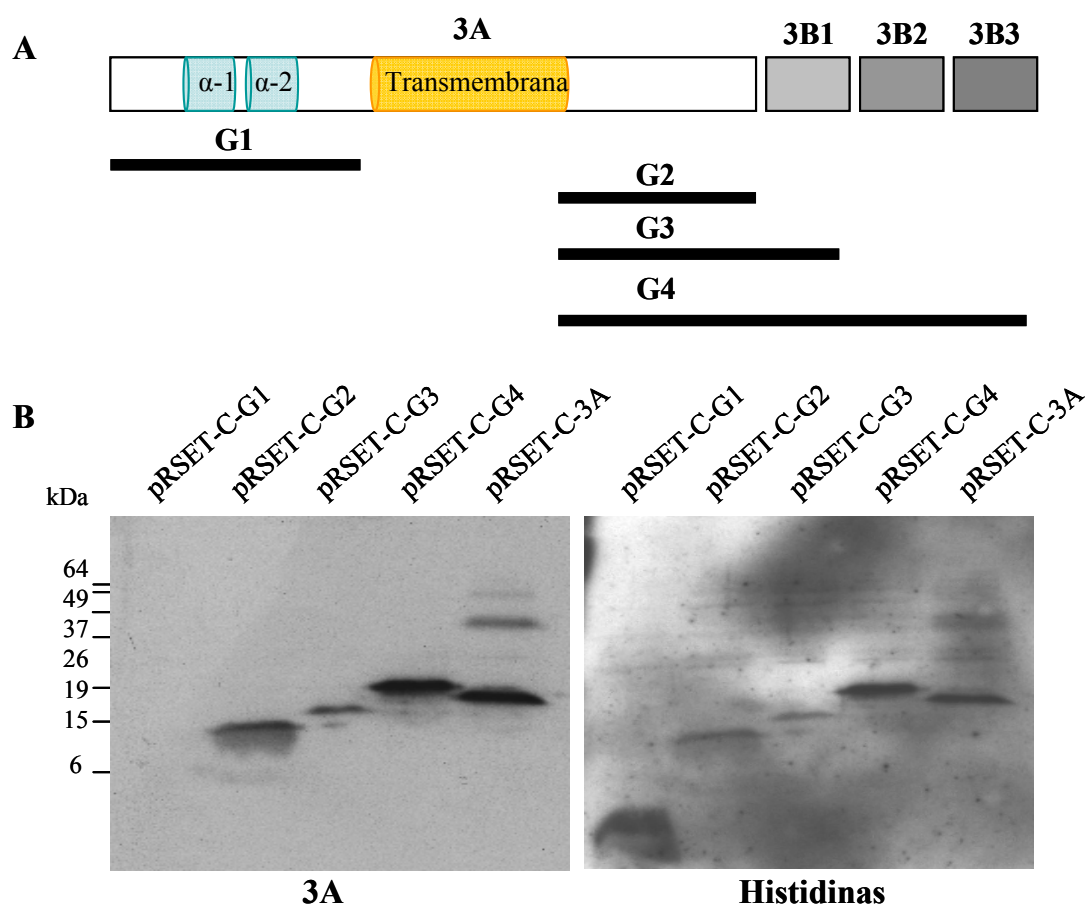


Figura 20. Expresión de fragmentos de las proteínas de la región 3ABBB en *E.coli*. A) Esquema de los fragmentos de la proteína 3ABBB expresados en pRSET-C. Se representan en azul las regiones de hélices α que como posteriormente se describirán (apartado R3), participan en la dimerización de la proteína 3A y, en amarillo, la región transmembrana. B) *Western blot* de geles de poliacrilamida al 12% transferidos a membranas de nitrocelulosa e incubados con el AcMo 2C2 y el AcPo anti-histidinas de

lisados de células que expresaban G1, G2, G3 y G4. Como control se incluyó la proteína 3A completa expresada como se indica en el apartado R2.1. A la izquierda se indica la migración de los marcadores de tamaño y su peso molecular en kDa.

2.2.2. Purificación de distintos fragmentos de la proteína 3A

Para la purificación de los distintos fragmentos de 3A se emplearon columnas de Ni-NTA que permiten la retención por afinidad de proteínas que contienen tramos de residuos de H. Dado que los intentos previos de eluir la proteína 3A completa expresada a partir de pRSET-3A empleando imidazol habían dado como resultado bajos niveles de elución y pureza, y considerando que para su posterior análisis estructural por técnicas de RMN era ventajoso eluir la proteína en un tampón sin imidazol, se exploraron condiciones de pH que permitiesen la purificación de éstas proteínas. Este análisis previo de los diferentes fragmentos a purificar, como se describe en el apartado M7.3, permitió determinar condiciones favorables de lavado/elución para los fragmentos G4 y G2, por lo que para el fragmento G4 se utilizó un pH de 5,9 en el lavado, realizándose la elución a pH 4,5, mientras que para el fragmento G2, los pHs fueron de 6,9 y 5,5 para el lavado y elución, respectivamente. Empleando estas condiciones, el nivel de expresión y los rendimientos de la purificación fueron diferentes para cada fragmento. Como se muestra en la Fig. 21, el análisis preliminar del fraccionamiento de la columna de Ni-NTA para el fragmento G4 por *Dot blot* con el AcMo 2C2, indicó que la proteína eluía únicamente a pH 4,5, mientras que en los lavados preliminares a pH de 6,5 (L1-5) y pH 5,9 (fracciones 1-7) se eluían otras proteínas contaminantes. El fraccionamiento de G4 se confirmó en un ensayo de *Western blot* (Fig. 22).

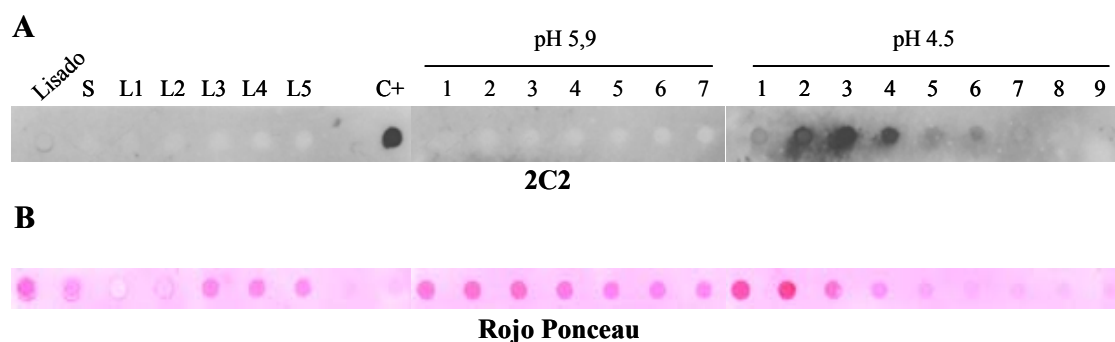


Figura 21. Purificación de fragmento G4. Análisis de la distribución de las proteínas en las diferentes fracciones. A) *Dot blot* incubado con el AcMo anti 3A (2C2) de: lisado de bacterias transformadas con pRSET-C-G4 e inducidas con IPTG; S: sobrenadante de la resina; L1-L5: lavados de

la columna (pH 6,5); C+: control positivo de 3A purificada; 1 al 7: fracciones eluidas a pH 5,9; 1 al 9: fracciones eluidas a pH 4,5. **B)** La misma membrana de nitrocelulosa teñida con Rojo Ponceau.

Las fracciones de G4 eluidas a pH 4,5 en tres ensayos independientes se liofilizaron para su empleo en la inmunización de conejos, lo que se realizó con el objetivo de obtener AcPo específicos frente a éste fragmento de la proteína 3A (ver apartado M10, Ac 346 y 347). Así mismo, como se describe en el apartado R2.2.3, se exploró la posibilidad de utilizar el fragmento G4 purificado para obtener información estructural.

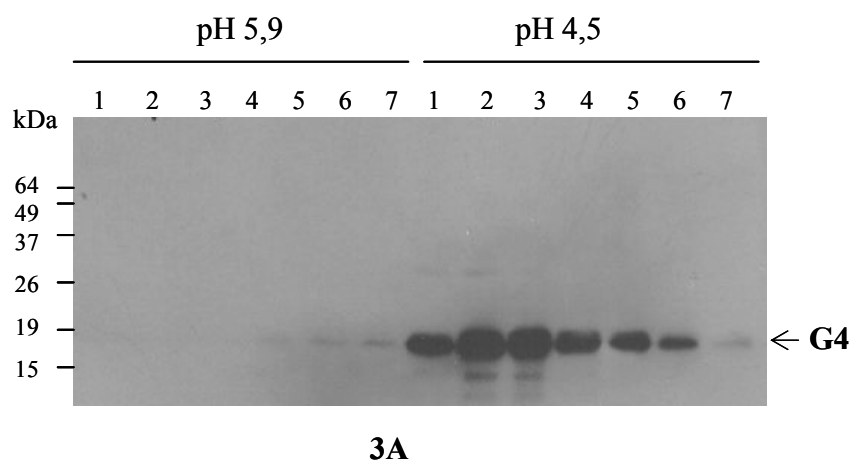


Figura 22. Análisis de fracciones eluidas de la columna de purificación del fragmento G4. *Western blot* con el AcMo anti 3A (2C2) de diferentes fracciones obtenidas a los pHs indicados. La flecha muestra la migración esperada para el fragmento G4. Se indica la migración de los marcadores de tamaño y su peso molecular en kDa.

El perfil de recuperación del fragmento G2 durante los lavados y la elución, analizado por *Western blot*, se muestra en la Fig. 23A. En éste caso no fue posible encontrar condiciones de elución en las que la relación pureza:concentración fuese favorable, ya que la proteína eluyó a pH 5,5 junto con otras proteínas contaminantes, como se observa en la Fig. 23B que muestra la tinción por masa de las proteínas eluidas a este pH.

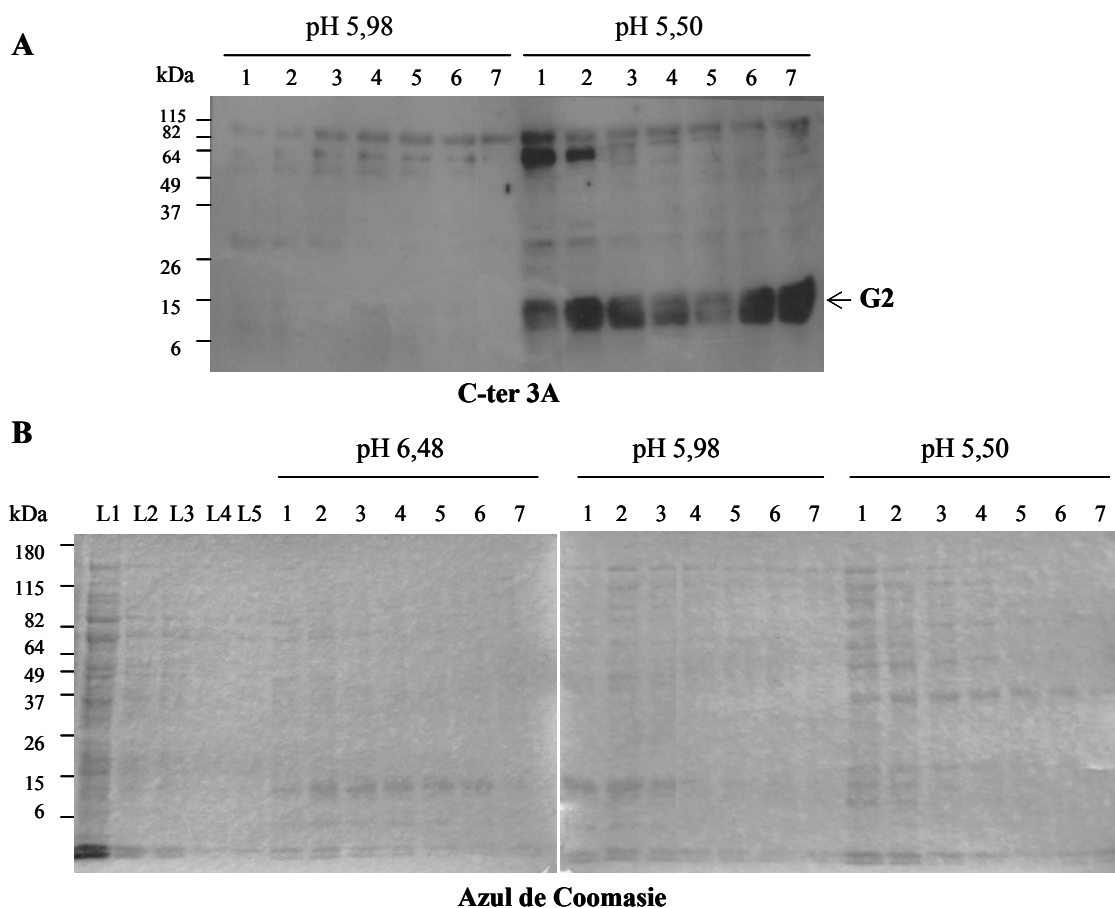


Figura 23. Análisis de fracciones eluidas de la columna de purificación del fragmento G2. A) *Western blot* de la membrana incubada con el AcPo anti-C-ter 3A (347) de diferentes fracciones eluidas a los pHs indicados. La flecha indica la migración del fragmento G2. **B)** Gel de poliacrilamida teñido con Azul de Coomassie de: L1 a 5, lavados a pH 6,9; 1-7 fracciones eluidas a los pHs indicados. Se indican en kDa los tamaños de los marcadores de peso molecular.

Para el fragmento G1, como se observa en la Fig. 24, la mayor cantidad de proteína se perdió en los lavados, por lo que tampoco fue posible encontrar las condiciones adecuadas para su purificación por ésta técnica.

De manera independiente a los intentos de purificación descritos anteriormente, la expresión en *E.coli* de todos los fragmentos de la región 3ABBB clonados fue caracterizada mediante microscopía de fluorescencia y su efecto en la célula bacteriana mediante microscopía electrónica como se describe en el apartado M9.

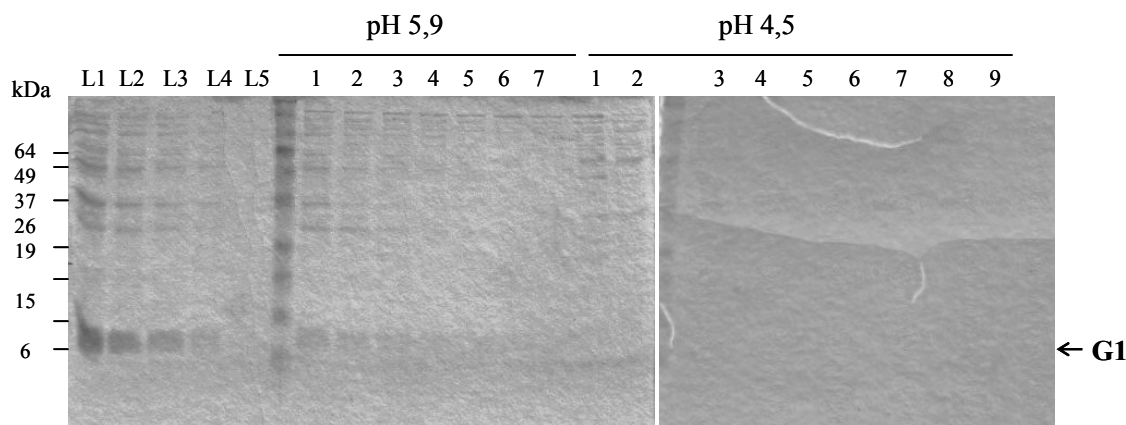


Figura 24. Análisis de diferentes fracciones obtenidas en la purificación por columna del fragmento G1. Gel teñido con Azul de Coomasie de lavados L1-5 realizados durante la purificación, y las distintas fracciones 1-7 a pH 5,9 y 4,5. Se indica la migración esperada para el fragmento G1, así como de los marcadores de tamaño y su peso molecular en kDa.

2.2.3. Cuantificación de proteína G4 purificada

El análisis estructural por RMN requiere poder disponer de la proteína problema con una pureza $\geq 90\%$ y un rango de concentración entre 3 y 30 $\mu\text{g/ml}$. Para determinar la concentración del fragmento G4 recuperado de la columna de Ni-NTA, se utilizaron dos técnicas colorimétricas diferentes. Como se muestra en la Tabla 10, la concentración estimada por los dos métodos, para 3 purificaciones independientes, era inicialmente suficiente para poder llevar a cabo el análisis por RMN. No obstante, cuando se determinó la pureza de dos de éstos preparados, la banda proteica de tamaño correspondiente al fragmento G4 apareció en una proporción $<90\%$ respecto a otras bandas que contaminaban la purificación. Por todo ello, se decidió no continuar con su análisis estructural.

Tabla 10. Cuantificación de proteína G4 purificada

Muestra ^a	Bradford ^b	BCA ^c
1	36 $\mu\text{g/ml}$	22 $\mu\text{g/ml}$
2	24 $\mu\text{g/ml}$	15 $\mu\text{g/ml}$
3	25 $\mu\text{g/ml}$	36 $\mu\text{g/ml}$

a- Se analizó la proteína recuperada de tres experimentos independientes de purificación.

b- Técnica de cuantificación de proteínas basada en la capacidad de las mismas de unir el colorante Azul de Coomassie G-250. El complejo proteína-colorante presenta una A_{\max} a $\lambda=595$ nm (Bradford, 1976).

c-Ensayo del ácido Bicinonínico o de Smith que combina la reacción de Biuret, la reducción del ión Cúprico (Cu^{2+}) a ión cuproso (Cu^{+}) en un medio alcalino y la detección de éste catión en medio alcalino utilizando un reactivo que contiene el ácido bicinonínico. El complejo coloreado tiene una A_{\max} a $\lambda=560$ nm (Smith y col., 1985).

2.3. Análisis por microscopía de células bacterianas que expresan los fragmentos G1, G2, G3 y G4.

2.3.1. Microscopía óptica

Como se comenta en la Discusión, durante los últimos años se ha empezado a conocer el considerable nivel de compartimentalización existente en la célula bacteriana (Nevo-Dinur y col., 2012; Shapiro y col., 2009). Como un primer paso en el análisis de las interacciones celulares de 3A, se caracterizó la distribución celular de las proteínas G1, G2, G3 y G4 expresadas en *E.coli*, así como los efectos que inducían en la célula bacteriana.

Las bacterias se inmovilizaron en portaobjetos con poli-L-lisina, se permeabilizaron con lisozima y se analizaron por inmunofluorescencia con el AcMo 2C2 (Fig. 25). Tanto en las bacterias transformadas con pRSET-C como en las que expresaban G1 no se observaron células fluorescentes, ya que como se comentó en el apartado R2.2.1 el Ac Mo 2C2 no reconoce el extremo N-ter de 3A. Las células que expresaban la proteína G2 presentaron un patrón de fluorescencia en la periferia celular. Esta distribución periférica de la fluorescencia no fue tan marcada para la proteína G3, aunque se mantuvo su localización mayoritaria en la periferia bacteriana. Finalmente, la proteína G4 mostró un patrón de fluorescencia más heterogéneo, encontrándose células con fluorescencia citoplasmática y otras con señal más periférica.

Con las células que expresaban el fragmento G1 se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia empleando un Ac hiperinmune de cerdo (350) (Fig. 26), detectándose una señal de fluorescencia con una relación señal: ruido baja. La ausencia de un buen anticuerpo que reconociese la región N-ter de la proteína 3A motivó al diseño de péptidos sintéticos para generar un AcPo específico frente a ésta región, como se ha comentado en el apartado M10.

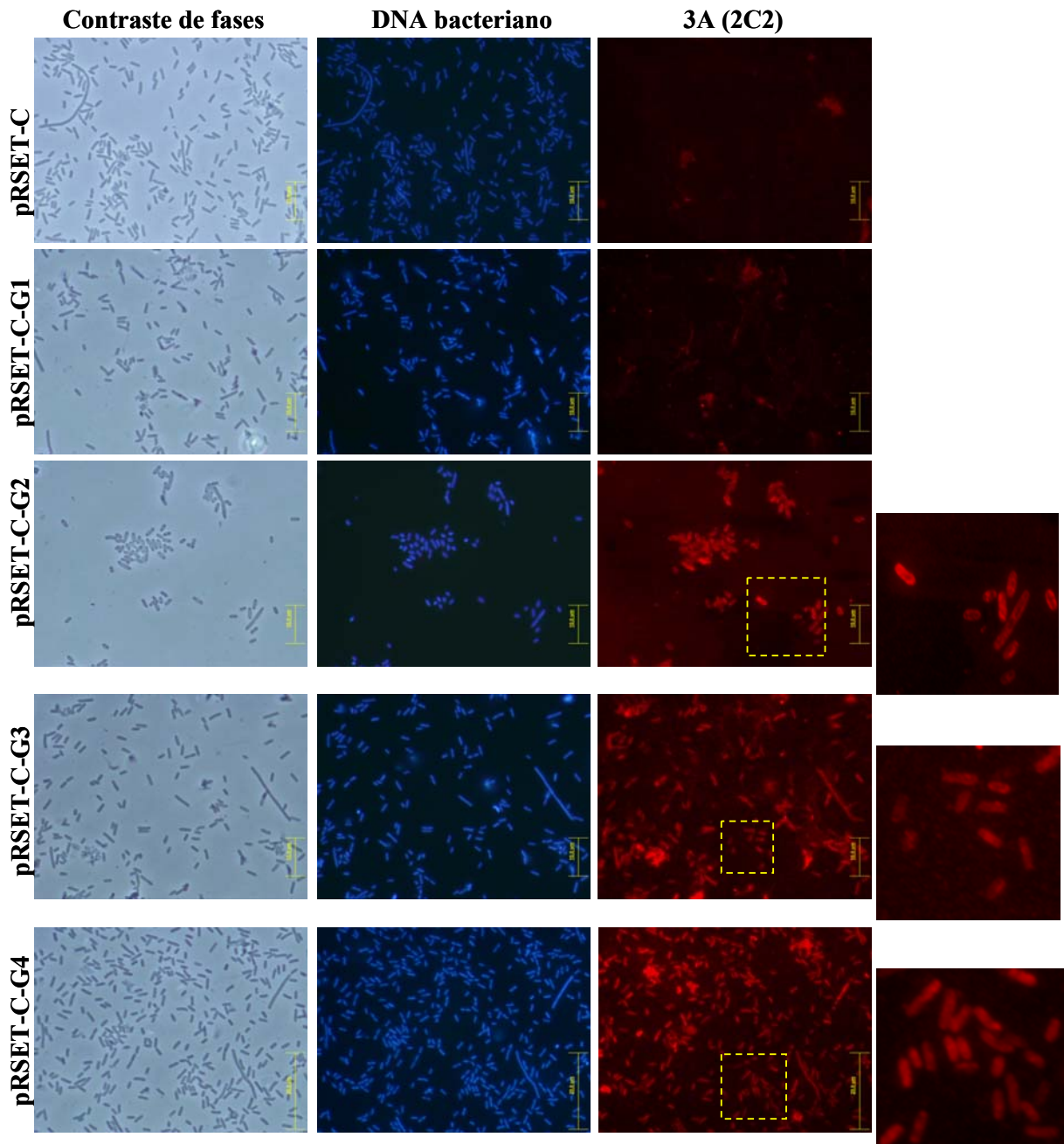


Figura 25. Expresión de proteínas de la región 3ABBB en *E.coli*. Inmunomicroscopía de bacterias tras 24h de su transformación con 10 ng de los plásmidos indicados y 2,5 h de inducción con IPTG 1mM. Las imágenes corresponden a microscopía de contraste de fases (izquierda), la fluorescencia debida al DAPI para la detección del DNA bacteriano (centro), y la inmunofluorescencia observada con el AcMo 2C2 detectado con el secundario anti IgG de ratón Alexa Fluor 555 (derecha). Se incluye la amplificación de las regiones indicadas en el cuadrado punteado. Las barras corresponden a 10 μ m.

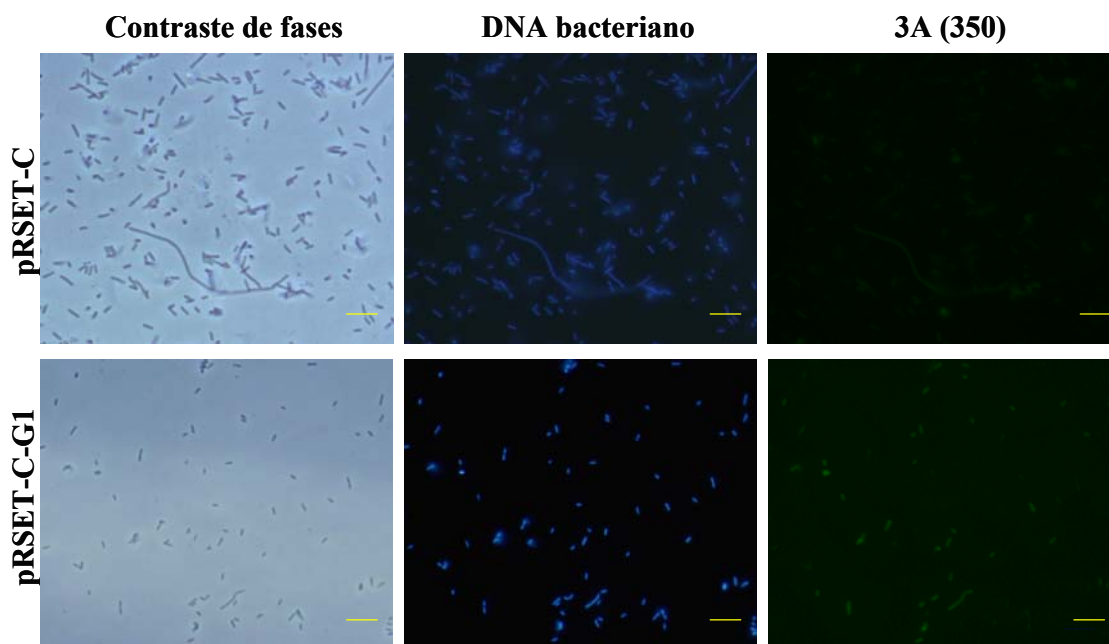


Figura 26. Expresión del fragmento N-ter (G1) en *E.coli*. Inmunomicroscopía de bacterias transformadas con 10 ng de plásmido pRSET-C o pRSET-C-G1 tras 2,5h post inducción con IPTG 1mM. Las imágenes corresponden a microscopía de contraste de fases (izquierda), la fluorescencia debida al DAPI para la detección del DNA bacteriano (centro), y la inmunofluorescencia observada con el suero hiperinmune de cerdo (350) detectado con un secundario anti Ig porcina acoplado a FITC (derecha). La barra corresponde a 10 μ m.

2.4 Análisis ultraestructural por microscopía electrónica

Se ha descrito la inducción de cierta proliferación intracelular de membranas de bacterias *E.coli* que expresaban la proteína 3A del VFA (Weber y col., 1996). Para analizar como podía afectar la expresión de los distintos fragmentos de la proteína 3A a la ultraestructura de células de *E.coli*, se analizaron por microscopía electrónica bacterias transformadas con las diferentes construcciones estudiadas. Como se puede observar en la Fig. 27, la expresión de cualquiera de estas proteínas (G1, G2, G3 y G4) produjo una alteración en la membrana externa, cuando se compararon con las bacterias control transformadas con el plásmido sin inserto pRSET-C. Esta modificación consistió en la adquisición de un aspecto mas rizado. Esta observación indica que, en ausencia del dominio transmembrana presente en la proteína 3A completa, los fragmentos expresados parecen mantener cierta capacidad de alterar estructuras membranosas bacterianas.

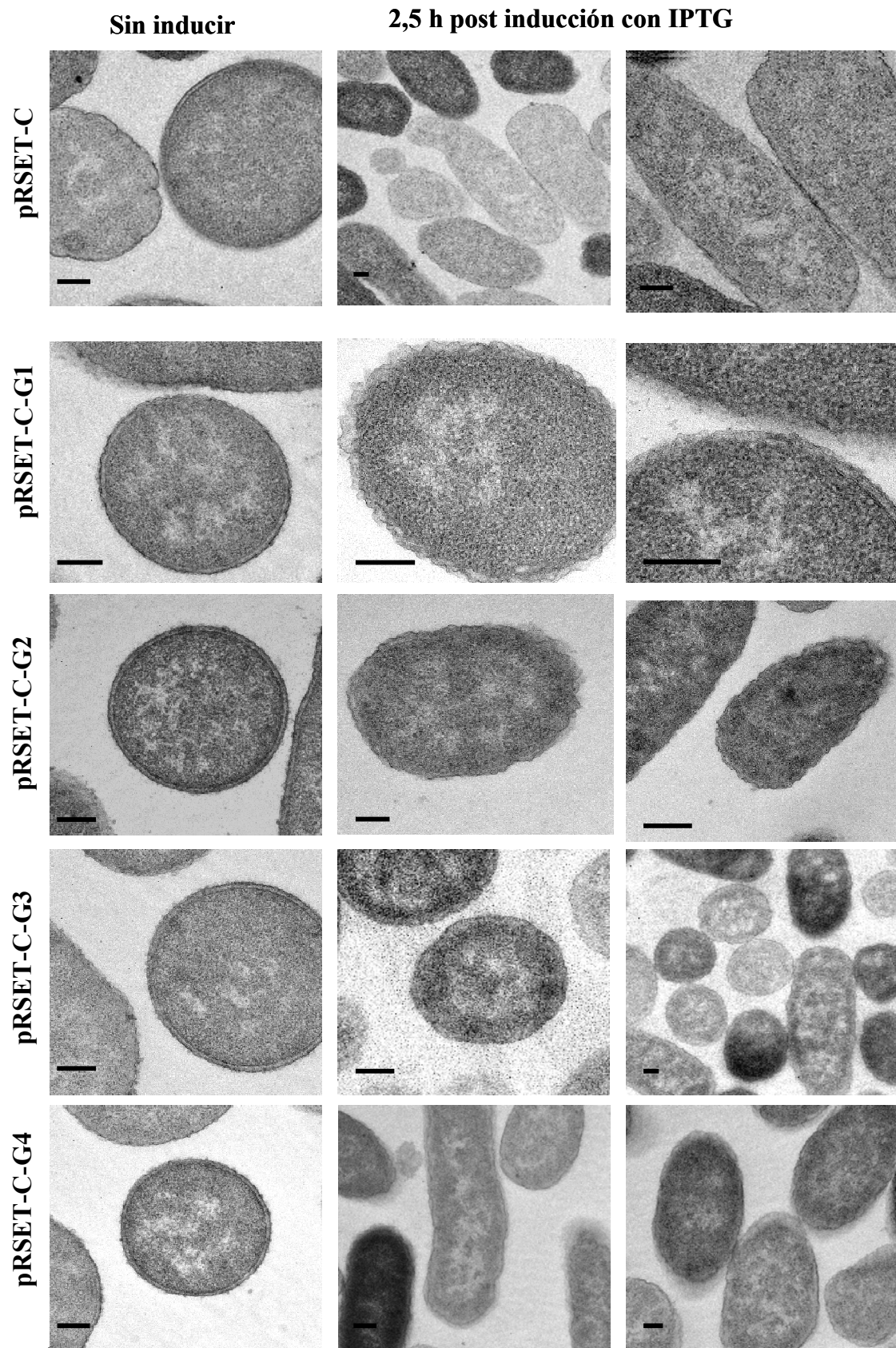


Figura 27. Microscopía electrónica de transmisión de bacterias *E.coli* que expresan distintas proteínas de la región 3ABBB. Las bacterias, transformadas con 10 ng de cada uno de los plásmidos

indicados, se crecieron en medio líquido hasta alcanzar una DO_{595} de 0,7, siendo posteriormente inducidas, o no, con IPTG 1mM durante 2,5 h. Las muestras fueron procesadas para su observación al microscopio electrónico empleando un protocolo de inclusión convencional en resina epoxi (ver M9.2). Barra 200 μ m.

El fragmento que indujo un efecto mas acusado en la proliferación de membranas fue G1, el único de los cuatro que posee el extremo amino terminal (N-ter). En la Fig. 28 se muestra una imagen a mayor aumento representativa de las estructuras encontradas en las células que expresaban el fragmento G1 de la proteína 3A. Ésta estructuras son semejantes a las descritas en bacterias que expresaban la proteína 3A completa (Weber y col., 1996).

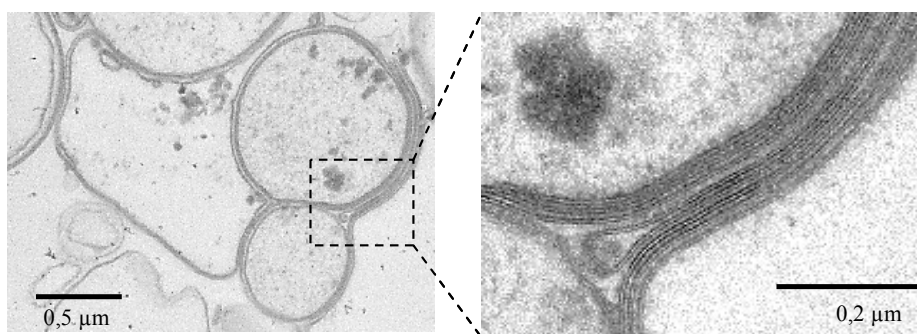


Figura 28. Proliferación de membranas de células de *E.coli* transformadas con pRSET-C-G1. Microscopía electrónica de transmisión de bacterias transformadas con 10 ng de pRSET-C-G1 e inducidas con IPTG 1mM durante 2,5 h. Las muestras fueron procesadas empleando un protocolo de inclusión convencional en resina epoxi (TABB 812).

2.5. Obtención y caracterización de anticuerpos frente al extremo N-ter y C-ter de la proteína 3A

Como se ha comentado anteriormente, los anticuerpos disponibles en el laboratorio al inicio de ésta Tesis Doctoral, no reconocían la región correspondiente al fragmento N-ter de 3A, lo que limitaba la caracterización de esta proteína, así como de los fragmentos expresados que contenían el fragmento N-ter. Con el objetivo de obtener anticuerpos dirigidos frente a este extremo de la proteína 3A, como se detalla en el apartado M10, se inmunizaron 15 ratones y 6 conejos con tres péptidos del extremo N-ter (ver Tabla 11 y M10). Estos experimentos se llevaron a cabo por el personal de animalario del CBMSO y del CNB. Asimismo, se inmunizaron dos conejos (346 y 347)

con la proteína G4 purificada de *E.coli* (ver M10), con el objetivo de intentar disponer también de Ac específicos frente al extremo C-ter de la proteína 3A.

Tabla 11. Péptidos del extremo N-ter de 3A utilizados para inmunizar ratones y conejos.

Péptido ^a	Ratón ^b	Conejo
ISI (I1-E15)	# 50	442, 478
	1 al 5	
CKG (K16-G28)	#49	481, 480
	1 al 5	
CFE (F26-Q43)	# 48	443, 479
	1 al 5	

a-Los residuos correspondientes a cada péptido se indica entre paréntesis, ver detalles de los péptidos en M10.

b-En cada caso se indica el número correspondiente a la pauta de inmunización utilizada (i.e. # 50) y los animales empleados (1-5).

La capacidad de los distintos sueros obtenidos a partir de los animales inmunizados para detectar los extremo N-ter ó C-ter de 3A empleando diferentes técnicas como *Dot blot*, *Western blot*, inmunofluorescencia y ELISA se resume en la Tabla 12. Los sueros policlonales obtenidos frente a la proteína G4 purificada dieron buenos resultados, sobre todo el 346, cuando se emplearon tanto en inmunofluorescencia como en *Western blot*. Los resultados obtenidos con los péptidos del extremo N-ter de 3A variaron dependiendo del péptido utilizado. Los animales inmunizados con el péptido ISI (I1-E15) no generaron ningún suero que reconociese el fragmento N-ter, cuando éstos se testaron frente al propio péptido, acoplado a KLH y sin acoplar, a la proteína 3A purificada o frente a lisados de *E.coli* que expresaban G1 así como a células infectadas. Sin embargo, la inmunización con los péptidos CKG (K16-G28) y CFE (F26-Q43) permitió obtener sueros positivos, tanto de conejos como de ratones. Entre ellos, los que mostraron una buena relación señal:ruido fueron los de los conejos 443 y 479, así como los de los ratones 48/4 y 48/5, todos ellos inmunizados con el péptido CFE (F26-Q43). Este péptido contiene la secuencia de la región donde se localizan los residuos que se predice están implicados en dimerización de la proteína 3A, como se comenta en el apartado R3, por lo que resultaron de particular interés para el desarrollo de ésta Tesis Doctoral.

Tabla 12. Caracterización de los distintos sueros de animales inmunizados

Animal	Número	Inmunógeno	Dot Blot ^a	Western Blot ^b	IF ^c	IP ^b	ELISA ^e	
Conejo	346	Proteína G4 purificada	+	+	dilución 1:500	-	/	
Conejo	347	Proteína G4 purificada	+	+f	dilución 1:500	-	/	
Conejo	478	Péptido N-ter ISI (I1-E15)	-	-	-	-	-	
	442		-	-	-	-	-	
Ratón	50/1		-	-	-	/	-	
	50/2		-	-	-	/	-	
	50/3		-	-	-	/	-	
	50/4		-	-	-	/	-	
	50/5		-	-	-	/	>1:200	
Conejo	480		Péptido N-ter CKG (K16-G28)	+	+f	1/500	+	>1:10000
	481			+	-	1/500	-	>1:10000
Ratón	49/1			+	-	-	/	-
	49/2	+		-	-	/	>1:800	
	49/3	+		/	1/100f	/	>1:3200	
	49/4	+		/	1/100f	/	>1:3200	
	49/5	+		-	1/100f	/	>1:3200	
Conejo	443	Péptido N-ter CFE (F26-Q43)		+	+	1/500	-	>1/800
	479			+	+	1/500	-	>1/800
Ratón	48/1			+	-	1/100	/	>1:800
	48/2		+	-	-	/	>1:800	
	48/3		+	-	-	/	>1:800	
	48/4		+	+	1/100	/	>1:3200	
	48/5		+	+	1/100	/	>1:3200	

a- Se utilizaron como antígenos 5 y 10 µg de péptido sin acoplar a KLH.

b- Se utilizaron lisados de bacterias que expresaban G4, G1 y 3A, así como lisados de células infectadas con FMDV C-S8c1 m.d.i.=10 ufp/ml lisadas 3h p.i.

c- Las IF se realizaron sobre monocapas de células infectadas con FMDV C-S8c1 m.d.i.=0,5 ufp/ml, fijadas con PFA 3,5 h p.i. y células mock como control negativo. Se indica la mayor dilución de los sueros que dió resultado positivo.

e- Los experimentos de ELISA se realizaron en el laboratorio de Leonor Kremer. Las placas se tapizaron con 100µl por pocillo de péptidos lineales 1 µg/ml. Se consideraron resultados negativos aquellos cuya dilución 1/200 dió una DO inferior a dos veces la del control negativo. El título se define como la dilución que dió una DO correspondiente a la mital del *plateau* obtenido en el ensayo.

f- Se observó fondo en muestras correspondientes al control negativo o *mock*.

/- No realizado.

La inmunización de ratones se realizó con el objetivo de generar AcPo murinos para hacer dobles marcajes, así como para intentar generar AcMo. Para esto último, se extrajeron, en el laboratorio de L.Kremer (CNB) y siguiendo el protocolo descrito (Kremer y col., 2004), los bazos y nódulos linfáticos de los ratones 48/4 y 48/5, dos de los animales que dieron mejores resultados (Tabla 12). El análisis de los sobrenadantes de hibridomas obtenidos tras fusionar los linfocitos con células de mieloma, mostró que ninguno de ellos era capaz de reconocer el péptido empleado en la inmunización. Los hibridomas restantes se mantienen congelados para su eventual caracterización.

3. Modelo de la estructura de la región N-ter de la proteína 3A de VFA

Una vez obtenidas las evidencias de la dimerización/multimerización de la proteína 3A expresada en *E.coli*, y dada la dificultad de los análisis estructurales de la proteína completa y de sus distintos fragmentos, se decidió emplear un abordaje bioinformático que permitiese obtener información sobre la estructura de esta proteína. Para ello, basándonos en la estructura determinada por RMN del fragmento soluble N-ter de la proteína 3A de PV (Strauss y col., 2003), en colaboración con Paulino Gómez Puertas (Servicio de Bioinformática del CBMSO), se obtuvo un modelo molecular para los 94 residuos del extremo N-ter de la proteína 3A del VFA (González-Magaldi et al, 2012), como se explica en el apartado M20. En la Fig. 29A se muestra el alineamiento de la secuencia de 3A de VFA analizada con las correspondientes a otros serotipos de VFA y a otros picornavirus. En el modelo elaborado (Fig. 29B), se observa la estructura terciaria de proteína 3A, que presenta dos hélices α (α_1 , residuos 25-33, y α_2 , residuos 37-44) conectadas por un bucle de tres residuos I34, K35 y E36. El consenso entre distintos métodos de predicción de dominios transmembrana (Bagos y col., 2006; Kall y col., 2007; Tusnady y col., 2001) indicó, también, que la región comprendida entre los residuos 59-76 sería la responsable del anclaje a membranas de la proteína 3A (Fig. 29A). Como ocurre en la estructura de 3A de PV, las hélices α_1 y α_2 de cada

monómero interaccionarían de manera antiparalela mediante contactos hidrofóbicos, proporcionando estabilidad física al dímero. La interfaz de dimerización predicha por el modelo incluye todos los residuos comprendidos entre las posiciones 25-44 de los dos monómeros antiparalelos, estando implicados en las interacciones hidrofóbicas los residuos: F25, F26, M29, V30, L38, L41 e I42 de ambos monómeros.

Del modelo obtenido se predice que mutaciones que introduzcan cargas electrostáticas dentro del *core* hidrofóbico, podrían desestabilizar el dímero y afectar la funcionalidad de la proteína. Teniendo esto en cuenta, se construyeron mutantes puntuales en los residuos hidrofóbicos L38 y L41 altamente conservados entre VFA de distintos serotipos (Carrillo y col., 2005), en los que el aminoácido hidrofóbico fue sustituido por otro con carga negativa (E), como se muestra en la Fig. 29C. La mutación L38E además de desestabilizar las interacciones hidrofóbicas del *core*, podría generar repulsiones electrostáticas dado que estos residuos aparecen enfrentados en el modelo.

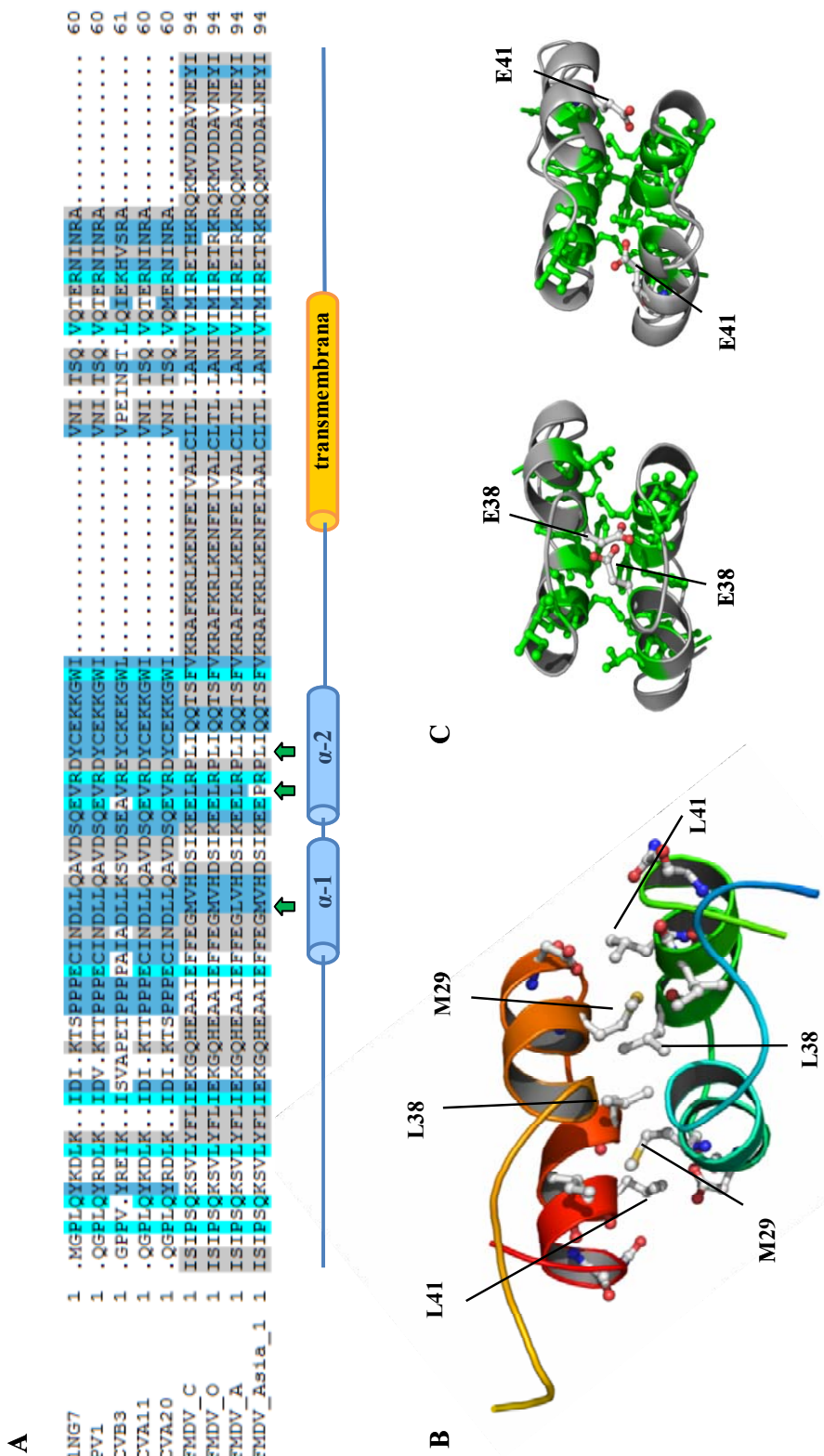


Figura 29. Modelo en 3D del dímero de la proteína 3A del VFA. A) Estructura derivada del alineamiento múltiple del dominio soluble y alrededores de distintas proteínas 3A de varios enterovirus y VFAs (IDs Uniprot entre paréntesis): ING7, Poliovirus tipo 1 cepa Mahoney (P03300)– secuencia utilizada como molde para los procedimientos de modelado por homología (Strauss y col., 2003) –; PV tipo 1, aislado CHN-Guangdong/92-2 (Q9E912); CVB3 (P03313); CVA11 (Q7T7P4); CVA20 (Q7T7N8); VFA tipo C, aislado C-S8c1, (Q9E2G4); VFA tipo O (P03305); VFA tipo A (P49303); VFA tipo Asia 1 (Q7TDB3). Las posiciones en el alineamiento están coloreadas atendiendo a la conservación de la secuencia, para lo que se empleó la matriz de BLOSUM 62 y el estándar de colores Belvu (donde los residuos más conservados se colorean en cian, seguidos del azul claro, gris y los menos conservados en blanco) [<http://sonnhammer.sbc.su.se/Belvu.html> (Sonnhammer y col., 2005)]. Se indican con flechas verdes las posiciones de los residuos hidrofóbicos M29, L38 y L41. B) Vista general del modelo en 3D donde se indican los residuos involucrados en la interfaz de interacción que serán objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral. C) Modelos en 3D de los mutantes que podrían desestabilizar el dímero, E38 y E41. Extraído y adaptado de (Gonzalez-Magaldi y col., 2012)

4. Expresión transitoria en células eucariotas de la proteína 3A y de mutantes que se predice interfieren en su dimerización

En el contexto de la infección, y mediante análisis por *Western blot* (Fig. 16), no era posible discriminar si la proteína 3A estaba presente en forma de dímeros o multímeros, ya que ésta se encontraba también en forma de precursores de tamaño y movilidad similares al dímero (3AB, 3ABB, 3ABBB), así como en forma de precursores de mayor tamaño (P3) (García-Briones y col., 2006; O'Donnell y col., 2001). Para estudiar la capacidad de formar dímeros cuando se expresaba en células eucariotas, la proteína 3A se clonó en el vector pRSV, tal y como se describe en el apartado M4 (pRSV3Awt). Se construyeron también los plásmidos pRSV3AL38E, -3AL41E y -3AL38EL41E, con reemplazamientos de aminoácidos apolares por residuos ácidos, los cuales se esperaba que desestabilizasen la formación del dímero intermolecular de 3A (Fig. 29C).

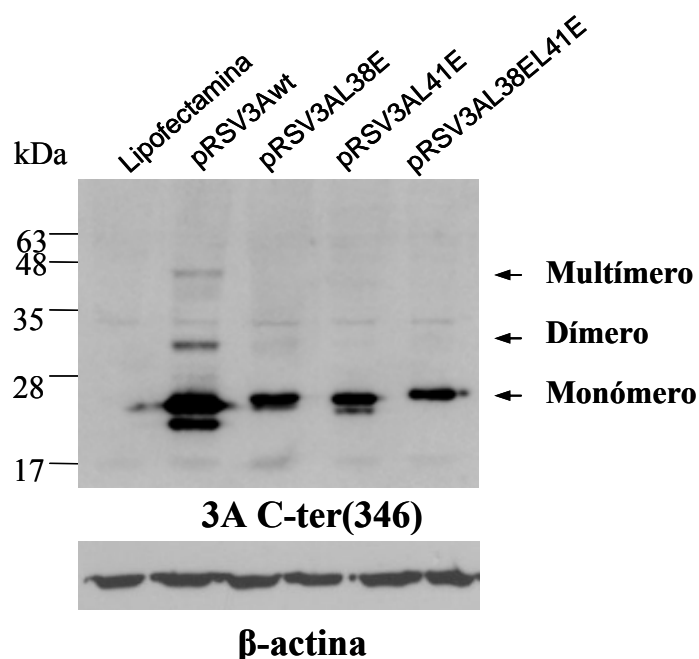


Figura 30. Expresión transitoria de la proteína 3A y de mutantes en el dominio de dimerización. Análisis de lisados de células Vero transfectadas con 1 μ g de los plásmidos indicados. *Western blot* de las membranas incubadas con el AcPo frente a C-ter de 3A (346). A la izquierda se indica la migración de los marcadores de tamaño y su peso molecular en KDa. A la derecha se indican las migraciones correspondientes al monómero, dímero y multímero de 3A. Como control de carga se incubó la membrana con un Ac frente a β -actina.

Los lisados obtenidos 24 h p.t. con cada una de éstos plásmidos, se analizaron en ensayos de *Western blot* en los que se utilizaron Ac dirigidos frente al extremo C-ter de

3A (346), incluyéndose un Ac frente a β -actina como control de carga. Como se muestra en la Fig. 30, se observó la presencia de bandas correspondientes a monómero, dímero y multímero para la proteína 3Awt. Contrariamente, el análisis de las proteínas con las sustituciones L38E y L41E reveló la presencia de una única banda correspondiente al monómero de 3A. Por tanto, los reemplazamientos L38E y L41E parecen eliminar la capacidad de detectar dímeros/multímeros de 3A cuando ésta proteína se expresa transitoriamente en células eucarióticas.

5. Análisis de la capacidad de dimerización de la proteína 3A empleando un sistema de doble híbrido en células BHK-21

El sistema de doble híbrido para detectar la interacción de proteínas o dimerización de las mismas, es una técnica frecuentemente utilizada. Inicialmente se desarrolló en levaduras (Chien y col., 1991; Fields y col., 1989), siendo posteriormente adaptado para su aplicación en células de mamífero (Dang y col., 1991; Fearon y col., 1992). En la presente Tesis Doctoral se ha utilizado un sistema en células de mamífero que permite el análisis de la interacción entre proteínas virales en condiciones más cercanas a las que tienen lugar durante la infección viral. Primeramente, se llevó a cabo la puesta a punto de esta técnica, descrita en M10, que consiste en cotransfectar un primer plásmido (1) que posee un dominio de unión al ADN fusionado con una de las proteínas de interés, un segundo plásmido (2) que tiene un dominio de activación de la transcripción fusionado con la segunda proteína de interés, y un tercer plásmido (3) que tiene el gen de la luciferasa como gen reportero, el cual activará su transcripción solamente si hay interacción entre las dos proteínas fusionadas en los plásmidos 1 y 2. La relación molar de los plásmidos a transfectar se determinó empíricamente, ya que está descrito que ciertos insertos pueden tener “direccionalidad” o preferencia por uno u otro vector; en éstos casos la interacción entre las dos proteínas depende del vector (Finkel y col., 1993). De esta manera, una interacción puede ser más fuerte dependiendo del contexto de los vectores que expresan los insertos. La relación molar utilizada en las cotransfecciones de los plásmidos control pSGPB1 (plásmido 1, conteniendo el gen de la subunidad PB1 de la polimerasa del virus de la gripe), pVP16PA (plásmido 2, conteniendo el gen de la subunidad PA de la polimerasa del virus de la gripe) y pGL-G5 (plásmido 3, conteniendo el gen de la luciferasa) fue de 0,1:1:0,5, respectivamente. Para los clones derivados de la proteína 3A, la relación molar con la que se obtuvo mejor

relación señal:fondo fue de 0,1:0,1:0,5. La Tabla 13 resume los plásmidos empleados en las distintas transfecciones realizadas. En todos los casos, se transfectaron primero los plásmidos pM, pVP16 y pGL-G5 para determinar la actividad luciferasa (Act Luc) basal del plásmido pGL-G5 en el sistema (transfección 1). En la Fig. 31A se muestra la Act Luc de los lisados de células transfectadas con el control positivo pSGVPA490, donde los dominios de GAL4 y VP16 están fusionados (transfección 2) (Sadowski y col., 1989), el cual indujo los mayores niveles enzimáticos detectados. En ésta Fig. 31A se incluye el control de las dos subunidades de la polimerasa del virus de la gripe (PA y PB1) que dimerizan, para lo cual se transfectaron las subunidades por separado (transfecciones 3 y 4 en Tabla 13), cuya actividad fue considerada fondo, y las dos subunidades conjuntamente (transfección 5) (Zurcher y col., 1996), cuya transfección indujo una Act Luc significativamente mayor que los controles.

Tabla 13. Transfecciones de plásmidos control realizadas con el sistema de doble híbrido.

Transfección ^a	Plásmido 1	Plásmido 2
1	pM	pVP16
2	pSGVPA490	
3	pM-PA	pVP16
4	pM	pVP16-PB1
5	pM-PA	pVP16-PB1

a-Todas las transfecciones incluyeron el mismo plásmido 3: pGL-G5

Una vez verificada la eficiencia del sistema de doble híbrido utilizado para detectar dimerización, y tal y como se indica en M10 y se detalla en la Tabla 2 de Materiales y métodos, se clonó en los plásmidos pM y pVP16: la proteína 3A, el fragmento N-ter de la misma (G1), así como los mutantes 3AL38E, 3AL41E y 3AC65S. Estos plásmidos fueron empleados para realizar las cotransfecciones indicadas en la Tabla 14. Las transfecciones del 6 al 15 corresponden a los controles con solo uno de los plásmidos portando una de las proteínas clonadas y el otro vector vacío, incluyendo siempre el plásmido pGL-G5, para detectar las señales de fondo. Asimismo, se analizaron la homodimerización de la proteína 3A completa (transfección 16), la interacción entre sí del extremo N-ter (G1-G1) (transfección 19), así como las interacciones G1-3A (transfección 17) y 3A-G1 (transfección 18).

Los resultados de éstas transfecciones se muestran en la Figura 31B, donde se aprecia que la única pareja de proteínas de VFA que dio una diferencia significativa ($p < 0,05$)

fue pMG1-pVP163A (transfección 17), respecto a las transfecciones tanto con los plásmidos control (transfecciones 7 y 8), como con los plásmidos pM3A-pVP16G1 (transfección 18), aunque los valores obtenidos para pMG1-pVP163A mostraron una considerable desviación estándar. Por tanto, para ésta pareja de insertos se puso de manifiesto la “direccionalidad” de los vectores, ya que con G1-3A se observó un aumento significativo de la Act Luc, que no se detectó con 3A-G1.

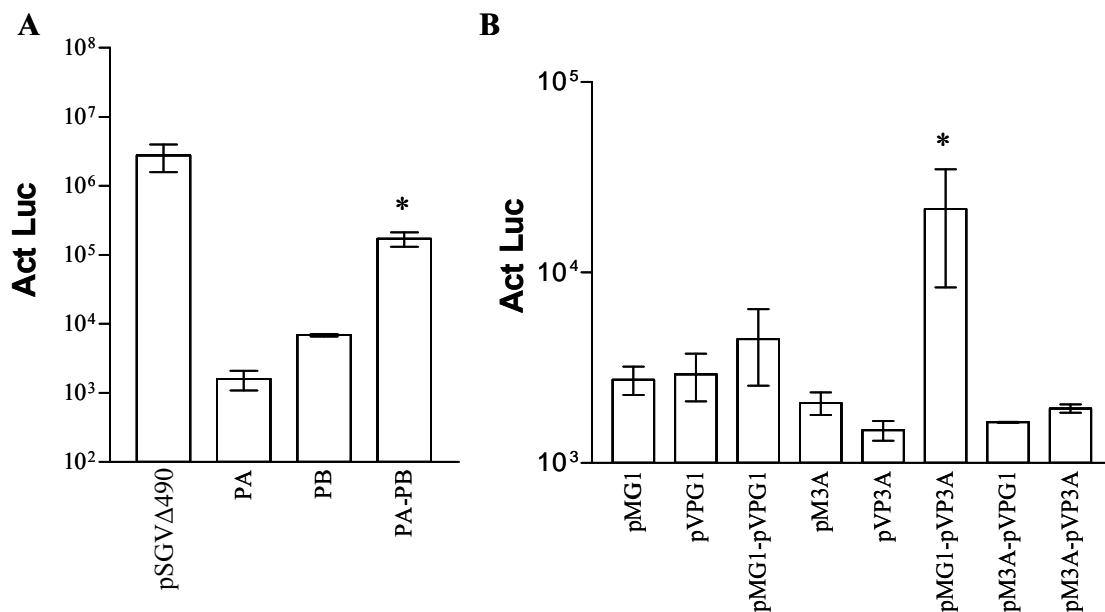


Figura 31. Actividad Luciferasa (Act Luc) en el sistema de doble híbrido en células de mamífero. A) Act Luc de células transfectadas con plásmidos control indicados en la figura (transfecciones 2 al 5 de Tabla 5). **B)** Act Luc de células transfectadas con los plásmidos indicados y detallados en la Tabla 6 (transfecciones 6-9 y 16-19). Se realizaron tres medidas de actividad enzimática para cada muestra, en tres experimentos independientes (* $p \leq 0,05$).

Teniendo en cuenta los resultados comentados anteriormente se decidió llevar un análisis del efecto de las sustituciones L38E y L41E que se predice desestabilizan la formación del dímero de 3A (ver apartado R3), así como de la sustitución por S del único residuo de C presente en la proteína 3A, C65S, que elimina la posibilidad de establecer puentes disulfuro intermoleculares. Los resultados de las transfecciones de las parejas G1-3AL38E (transfección 20), G1-3AL41E (transfección 21) y G1-3AC65S (transfección 22) se muestran en la Fig. 32. En todas éstas transfecciones se repitió el efecto de “direccionalidad” de los vectores por lo que los resultados de las transfecciones de las parejas 3AL38-G1 (transfección 23), 3AL41-G1 (transfección 24)

y 3AC65S-G1 (transfección 25) no se incluyeron en ésta figura. En la misma, se aprecia una bajada en la Act Luc de las parejas con la proteína 3A mutada. Aunque esta disminución no es estadísticamente significativa, sí indica la tendencia a una menor interacción.

Tabla 14. Transfecciones de plásmidos clonados en el sistema de doble híbrido.

Transfección^a	Interacción	Plásmido 1	Plásmido 2
6		pM-3A	pVP16
7		pM	pVP16-3A
8		pM-G1	pVP16
9		pM	pVP16-G1
10		pM-3AL38E	pVP16
11		pM	pVP16-3AL38E
12		pM-3AL41E	pVP16
13		pM	pVP16-3AL41E
14		pM-3AC65S	pVP16
15		pM	pVP16-3AC65S
16	3A-3A	pM-3A	pVP16-3A
17	G1-3A	pM-G1	pVP16-3A
18	3A-G1	pM-3A	pVP16-G1
19	G1-G1	pM-G1	pVP16-G1
20	G1-3AL38E	pM-G1	pVP16-3AL38E
21	G1-3AL41E	pM-G1	pVP16-3AL41E
22	G1-3AC65S	pM-G1	pVP16-3AC65S
23	3AL38E-G1	pM-3AL38E	pVP16-G1
24	3AL41E-G1	pM-3AL41E	pVP16-G1
25	3AC65S-G1	pM-3AC65S	pVP16-G1

a-Todas las transfecciones incluyeron el mismo plásmido 3: pGL-GS

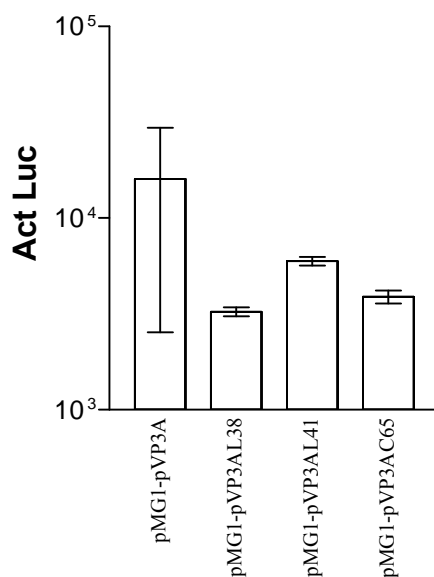


Figura 32. Interacción del extremo N-ter de la proteína 3A con la proteína 3A completa en el sistema de doble híbrido en células de mamífero: efecto de mutaciones en 3A. Act Luc de lisados de monocapas transfectadas con las parejas de plásmidos indicados en la figura, detallados en la Tabla 3 (transfecciones 17, 20, 21 y 22). Las medidas se realizaron por triplicado en dos experimentos independientes.

6. Ligación *in situ* por proximidad para detectar homodimerización de la proteína 3A

Para confirmar los bajos niveles de dimerización detectados en el ensayo de doble híbrido se observaban con la proteína 3A entera en el contexto de su expresión en células transfectadas, se utilizó la técnica de ligación *in situ* por proximidad (PLA, *proximity ligation assay*) con la que se puede visualizar por microscopía de fluorescencia la formación de homodímeros (Antonio y col., 2011; Gajadhar y col., 2009; Nilsson y col., 2010). El fundamento de ésta técnica se explica en el apartado M19 y la misma se esquematiza en la Fig. 33. El AcMo 2C2 (anti-3A) se conjuga con dos oligonucleótidos (sondas PLA + y -) (Fig. 33A). Los Ac conjugados se unen a las proteínas 3A de las células transfectadas o infectadas. Si las proteínas reconocidas se encuentran en forma de dímeros, serán detectadas por ésta técnica (Fig. 33B). La detección diferencial se basa en que la distancia entre las proteínas problema sea menor de 40 nm. De ésta manera los oligonucleótidos se ligan formando un DNA circular (Fig. 33C), éste se amplifica en forma de círculo rodante y, finalmente, el DNA amplificado se hibrida con un oligonucleótido acoplado a un fluorocromo el cual se visualiza y cuantifica por microscopía de fluorescencia (Fig. 33D). De esta manera, la reacción de

PLA solo ocurrirá como resultado de la proximidad entre el anticuerpo acoplado a una sonda + y otro acoplado a una sonda -, mientras que las parejas sonda +/sonda + y sonda -/sonda - no darán señal PLA.

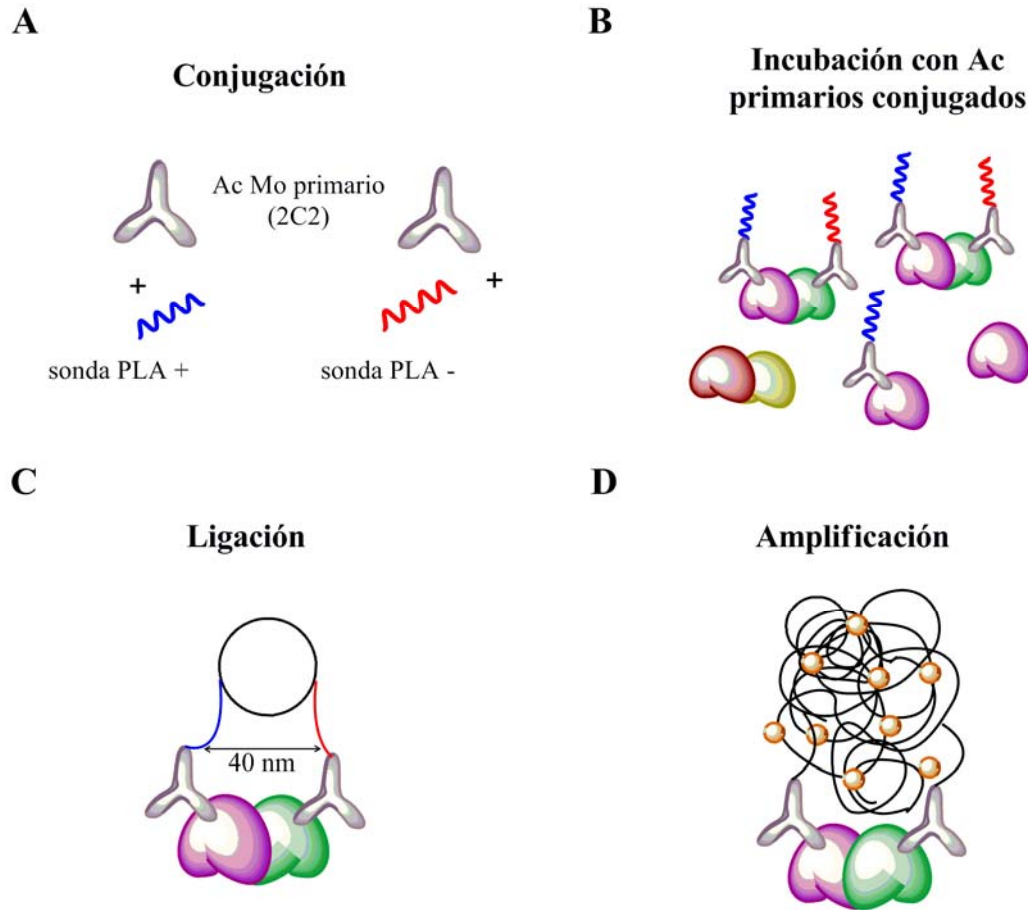


Figura 33. Ligación *in situ* por proximidad para detectar homodímeros. **A)** Conjugación del Ac Mo empleado, 2C2. **B)** Incubación de los Ac conjugados con la muestra donde se encuentra la proteína que puede dimerizar (células que expresan transitoriamente proteína 3A o células infectadas). **C)** Ligación de sondas si están en proximidad (hasta 40nm) y formación de DNA circular. **D)** Amplificación del DNA e hibridación con sonda fluorescente (naranja, $\lambda_{exc}= 554 \text{ nm}$, $\lambda_{emisión}=576 \text{ nm}$) del producto amplificado. La proteína 3A se representa en distintos colores (rosa, verde, amarillo y granate), el AcMo 2C2 en gris, las sondas PLA + en azul y PLA - en rojo, y las sondas fluorescentes en naranja.

El ensayo de ligación por proximidad se llevó a cabo sobre monocapas de células IBRS-2 infectadas con VFA con una m.d.i. de 5 ufp/ml, las cuales se fijaron a las 3 h p.i. Como control biológico se utilizaron células IBRS-2 sin infectar (*mock*) y como controles técnicos se incluyeron monocapas de células infectadas que se incubaron solo

con cada una de las sondas PLA (+ o -). Asimismo, para asegurarnos de que la fluorescencia obtenida no correspondía únicamente a una doble detección de la proteína 3A (en la misma molécula), sino que respondía a la formación de homodímeros, se empleó un Ac Mo frente a 3A purificado, lo que aseguraba que su interacción con la proteína fuese siempre en el mismo determinante antigénico. Como puede observarse en la Fig. 34, todos los controles dieron niveles de fluorescencia indetectables, mientras que las células infectadas mostraron una clara señal de fluorescencia correspondiente a la dimerización de la proteína 3A.

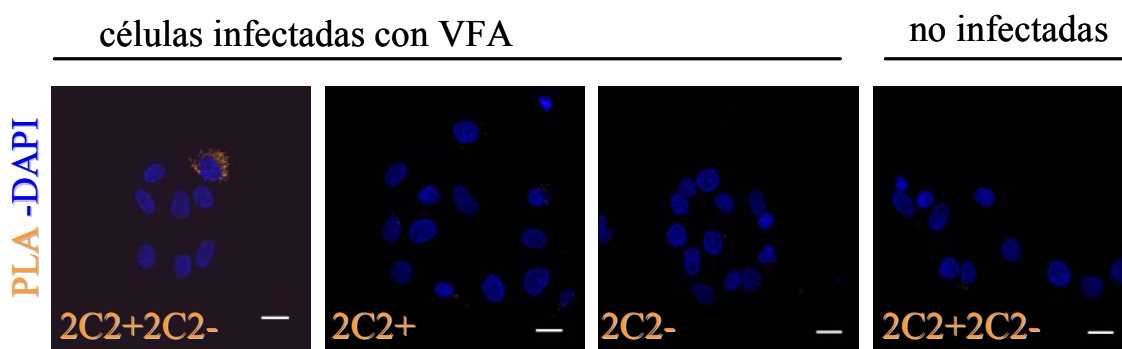


Figura 34. Ensayo de ligación *in situ* por proximidad en células IBRS-2 infectadas con VFA. Las imágenes incluyen ensayos de PLA en los que se emplearon las parejas de sondas 2C2+/2C2-, así como 2C2+/2C2+ y 2C2-/2C2-, y células infectadas con una m.d.i.= 5 ufp/ml (3h p.i.). Se incluye, también, un control de células sin infectar (*mock*). Los núcleos se tiñeron con DAPI. La barra corresponde a 20 μ m.

A continuación se determinó si esta señal de dimerización era detectable en células transfectadas con pRSV3Awt que expresaban transitoriamente la proteína 3A así como el efecto de las sustituciones L38E y L41E sobre la dimerización. La eficiencia de transfección obtenida en células IBRS-2 es habitualmente baja (<20%), por lo que tras el ensayo de ligación por proximidad, se realizó una inmunofluorescencia utilizando el AcPo primario 346 generado frente al fragmento C-terminal de 3A y un Ac secundario anti-conejo acoplado a Alexa 647 para detectar aquellas células que habían sido transfectadas y expresaban la proteína 3A. De ésta manera, se pudo visualizar en las células positivas al AcPo 346, una clara señal de fluorescencia, correspondiente a la homodimerización de 3A (Fig. 35A).

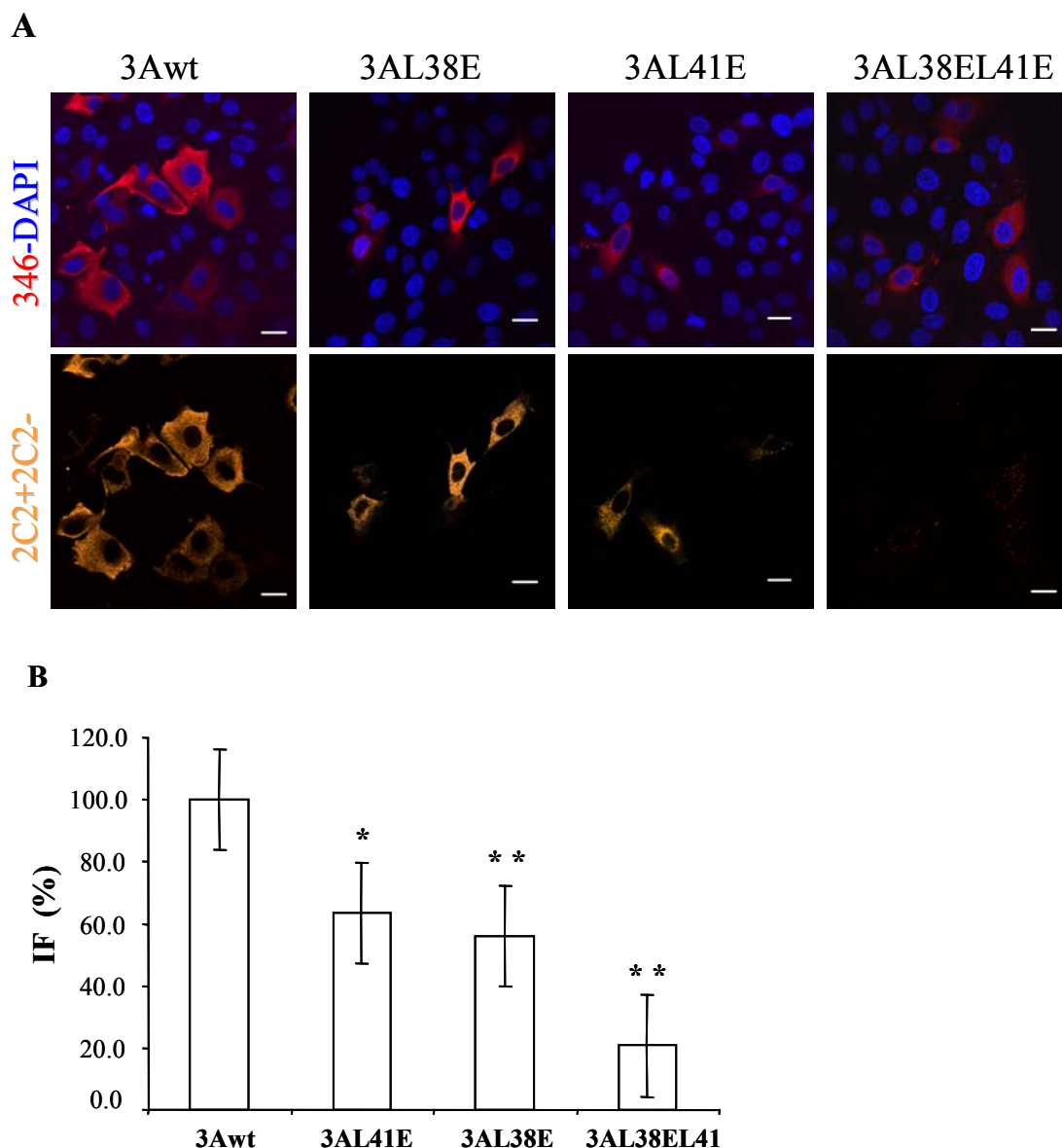


Figura 35. Análisis por PLA *in situ* de células IBRS-2 transfectadas con los plásmidos pRSV3Awt, pRSV3AL38E, pRSV3AL41E y pRSV3AL38EL41E. A) Imágenes de células fluorescentes tras la amplificación por PLA *in situ* con las sondas 2C2+/2C2- (naranja) y la inmunofluorescencia con el Ac primario anti-C-terminal 3A (346) y secundario anti-conejo Alexa Fluor 555 (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). La barra corresponde a 20 µm. **B)** Porcentaje de la Intensidad de fluorescencia naranja media (IF) de las células transfectadas \pm desviación típica, cuantificadas utilizando el programa Image-J, normalizado frente a la 3Awt, $n \geq 40$. Se indica la significación estadística (* $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,005$).

La técnica de PLA permite cuantificar la señal de dimerización mediante la detección de puntos fluorescentes, correspondiendo cada punto a una interacción. En nuestro caso, al tratarse de un sistema de expresión transitoria bajo un promotor fuerte, no fue posible obtener condiciones en las que se observasen puntos discretos, por lo que se cuantificó

la intensidad de fluorescencia de células enteras comparándose la media de esta intensidad entre células transfectadas con 3Awt y con los distintos mutantes. Estrategias similares de cuantificación han sido utilizadas en ensayos de ligación por proximidad con otras proteínas (Gajadhar y col., 2009; Nilsson y col., 2010). Como se muestra en la Fig. 35B, las intensidades medias de fluorescencia naranja en células transfectadas con las proteína mutantes en los residuos L38, L41 así como la del doble mutante L38EL41E, fueron significativamente menores que la correspondiente a las células transfectadas con la proteína 3Awt. Como era de esperar, con el doble mutante la diferencia fue más apreciable. Este resultado confirma la implicación de los residuos L38 y L41 en la dimerización de la proteína 3A de VFA.

7. Estudio de la dimerización de la proteína 3A empleando péptidos sintéticos de su región N-terminal

Una vez confirmada la capacidad de la proteína 3A de VFA para dimerizar tanto en el contexto de la infección viral como de su expresión transitoria, se decidió emplear una aproximación basada en el uso de péptidos sintéticos para estudiar la implicación de su extremo N-ter en la dimerización. Para ello se diseñó un péptido sintético, como se explica en el apartado M16, denominado N-ter, que contenía los primeros 52 aa (I1-F52) de 3A.

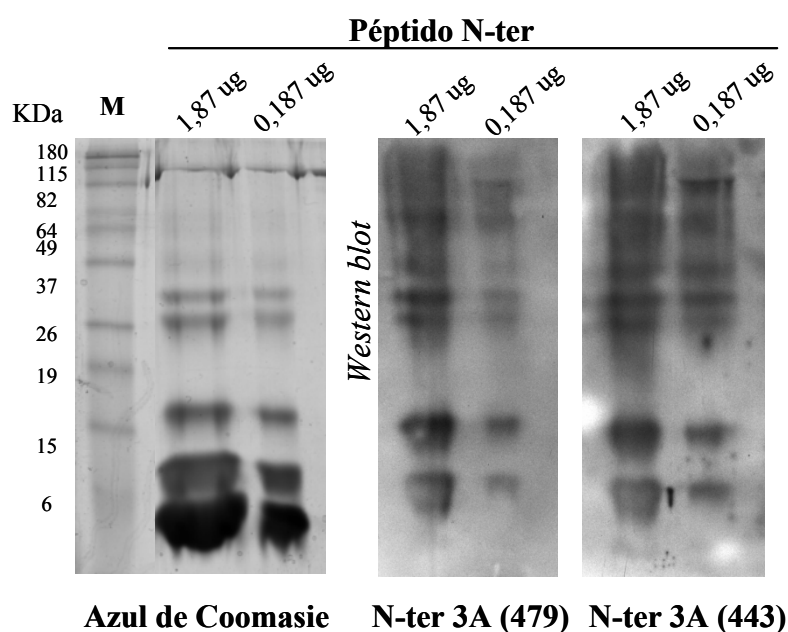


Figura 36. Análisis electroforético del péptido correspondiente al extremo N-ter de la proteína 3A. Los geles de SDS-PAGE se tiñeron con Azul de Coomassie o se transfirieron a membranas de

nitrocelulosa y se revelaron con los AcPo 479 y 443 que reconocen el extremo N-ter de la proteína 3A. Se indica los μg de péptido cargados en cada caso y el tamaño en kDa de los marcadores (M) de peso molecular utilizados.

La movilidad electroforética de este péptido N-ter fue determinada en geles de SDS-PAGE, mediante tinción con Azul de Coomasie y por *Western blot* utilizando los Ac frente a N-ter de 3A generados previamente (apartado R2.5) (Fig. 36), donde se observa la presencia de múltiples bandas. En este experimento la forma monomérica del péptido, visualizada por la tinción por masa, no fue reconocida por los AcPo empleados. Como se muestra en la Fig. 36, el péptido N-ter mostró capacidad de dimerizar/multimerizar, siendo ésta independiente de la formación de puentes disulfuro, ya que no existen cisteínas en su secuencia.

Una vez que se comprobó la capacidad del péptido N-ter para formar dímeros/multímeros detectables en las condiciones empleadas, se sintetizaron versiones de éste péptido que incluían sustituciones puntuales: L38E, L41E y L38EL41E. Además se sintetizó un péptido con la sustitución M29R, para la que, como en los casos anteriores, el modelo bioinformático elaborado (apartado R3) predecía su implicación en las interacciones hidrofóbicas que median la dimerización de 3A. El análisis de la migración electroforética de estos péptidos (Fig. 37) mostró la ausencia de bandas correspondientes a formas diméricas/multiméricas para los cuatro péptidos mutantes. En este experimento el AcPo 479 reconoció la forma monomérica del péptido wt.

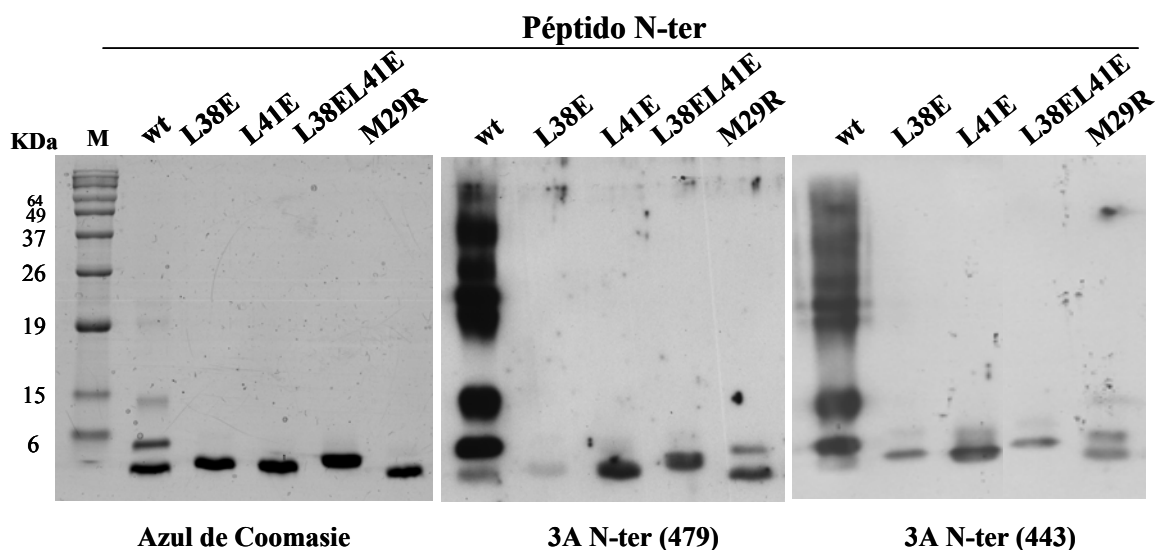


Figura 37. Análisis electroforético del péptido N-ter y de versiones de este péptido conteniendo las sustituciones: L38E, L41E, L38EL41E y M29R. Se emplearon 0,187 μg de cada péptido. Los geles SDS-PAGE al 12% se tiñeron con Azul de Coomasie o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se

revelaron con los AcPo primarios 479 y 443 generados frente al fragmento N-ter de la proteína 3A. Se indican los tamaños (en kDa) de los marcadores utilizados (M).

Por tanto, la sustitución de residuos apolares o no cargados localizados en la interfase de dimerización que el modelo predice, elimina la capacidad del péptido N-ter para migrar como un dímero/multímero en SDS-PAGE.

8. Estudio *in vivo* de la dinámica de la proteína 3A en células eucariotas

El análisis *in vivo* de la dinámica de las proteínas requiere sondas fluorescentes cuyas propiedades biofísicas puedan ser monitorizadas y así permitir la observación de cambios en la bioquímica celular (Lippincott-Schwartz y col., 2001; Wouters y col., 2001).

En la presente Tesis Doctoral se ha utilizado la proteína verde fluorescente como herramienta para generar proteínas virales de fusión utilizando el plásmido pEGFP-C2 descrito en M11.

La proteína GFP mantiene su fluorescencia sin la necesidad de enzimas ni cofactores específicos de la medusa, ya que su gen contiene toda la información necesaria para la correcta formación del cromóforo. Diferentes propiedades de ésta proteína fluorescente la hacen idónea para las aplicaciones perseguidas en ésta Tesis Doctoral, como el ser resistente al *photobleaching* o “apagamiento” a bajas intensidades de iluminación (Patterson y col., 1997). Esto permite que las células que expresan proteínas de fusión con GFP puedan ser iluminadas para su observación durante muchas horas, por ejemplo en microscopía a tiempo real (*time lapse*), sin perder su intensidad. GFP puede también ser rápida e irreversiblemente “apagada” a altas intensidades de iluminación (Tsien, 1998), característica que ha permitido analizar la recuperación de la fluorescencia luego del “apagamiento” (FRAP), así como la pérdida de fluorescencia por “apagamiento” (FLIP). Ésta proteína puede, incluso, ser parcialmente “apagada” de manera reversible en muy cortos períodos de tiempo (milisegundos) (Swaminathan y col., 1997).

Para abordar estudios de proteínas de fusión con proteínas fluorescentes, es fundamental que se lleven los controles necesarios para que las propiedades de la proteína estudiada se alteren lo menos posible al fusionarla con la proteína fluorescente. Es importante, por tanto, asegurarse de que la fusión no bloquea la localización subcelular y la funcionalidad de la proteína de interés. Para ello, se debe llevar a cabo un estudio de la secuencia de la proteína de interés en búsqueda de señales de localización celular, de

manera que, en lo posible, no se vean alteraciones por la fusión, así como, si se trata de una proteína de unión a membranas, predecir la topología de la misma e intentar preservarla (Snapp, 2009).

8.1. Caracterización de las proteínas de fusión con GFP

Como paso previo para el diseño de proteínas de fusión entre GFP y la proteína 3A y diferentes variantes de ésta estudiadas en la presente Tesis Doctoral, se determinó el extremo de 3A que debía fusionarse a GFP. Para ello, se realizó un análisis bioinformático de predicción de localización de proteínas transmembrana (Krogh y col., 2001) (Fig. 38).

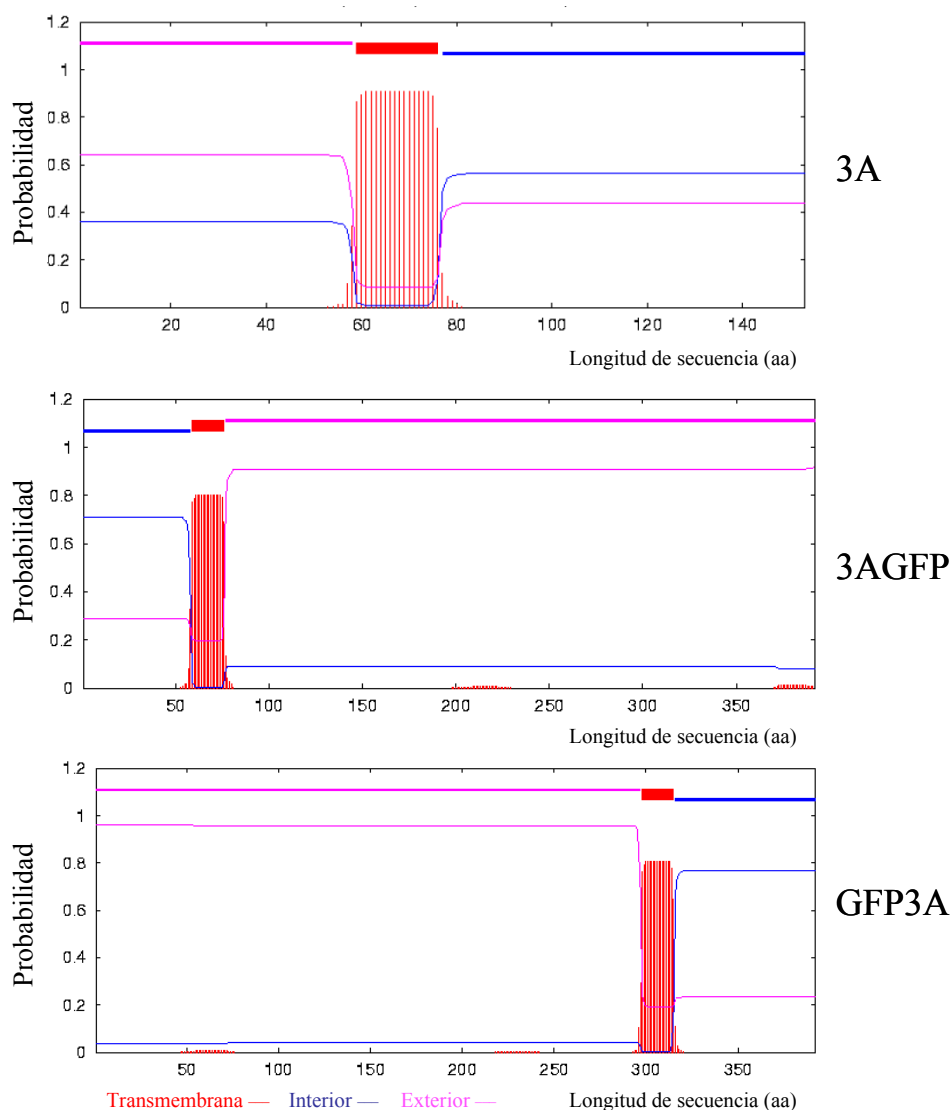


Figura 38. Diagramas de probabilidad de topología de 3A, GFP3A y 3AGFP en membranas. Se muestra la probabilidad de que las regiones indicadas se encuentren en el interior (azul) o el exterior (rosa) de un compartimento, o constituyan un dominio transmembrana (rojo), utilizando el software

TMHMM v 2.0, basado en el modelo de Markov (TMHMM). En la parte superior de cada gráfico, la línea más gruesa representa la topología predicha para cada secuencia proteica.

Los resultados obtenidos indicaron que la estrategia de clonaje que mantenía la teórica topología de membrana de 3A era la fusión de su extremo N-ter con el extremo C-ter de GFP.

De acuerdo con esta estrategia, se clonó la secuencia completa de 3A en el plásmido pEGFP en la configuración GFP-3A. El plásmido obtenido se secuenció para confirmar que contuviera la secuencia correcta de 3A y que ésta estuviese en fase con la secuencia de la proteína GFP. La construcción resultante se transfectó en células Vero, crecidas en cubreobjetos de cristal, para observar por inmunofluorescencia la colocación de la fluorescencia de GFP y la correspondiente a 3A, ésta última determinada mediante el uso de un Ac primario anti-3A. Mediante el programa ImageJ (M17), se calcularon los siguientes coeficientes, utilizados frecuentemente en estudios de colocación: i) coeficiente de correlación de Pearson (R_r) (cuyo valor oscila entre 1 y -1, cuanto mas cerca de 1 indica mejor colocación); ii) coeficiente de solapamiento de Mander (R) (cuyo valor oscila entre 0 y 1, correspondiendo 1 a una buena colocación y 0 a una mala). La Fig. 39 muestra los resultados obtenidos con células Vero transfectadas con pEGFP3A. En este estudio, para que la estimación del coeficiente de solapamiento de Mander sea válida, el número de objetos en ambos canales tiene que ser similar. En ese sentido, el valor de Ch1:Ch2 que indica la relación de píxeles de los canales verde:rojo, tiene que ser aproximadamente 1 para que el coeficiente de Mander pueda ser utilizado; M1 y M2 son los coeficientes de Mander separados por canales M1 (canal 1) y M2 (canal 2) normalizados frente a la intensidad total de los píxeles. Los resultados obtenidos con células transfectadas con pEGFP3A (Fig. 39) confirmaron la colocación de la proteína 3A y GFP. Los valores de colocación entre GFP y 3A obtenidos en células transfectadas con los derivados de pEGFP que expresaban los diferentes mutantes de 3A construidos (ver M12), fueron similares a los mostrados en la Fig. 39 y confirman la colocación de las distintas versiones de la proteína 3A con la proteína GFP.

A continuación, se realizó un análisis por inmunofluorescencia en células fijadas a las 24 h p.t. con los siguientes plásmidos: GFP3Awt, GFP3ABBB, GFP3G1, GFP3G1t, GFP3NTT, GFP3AL38E, GFP3AL41E y GFP3AC65S (Fig. 40).

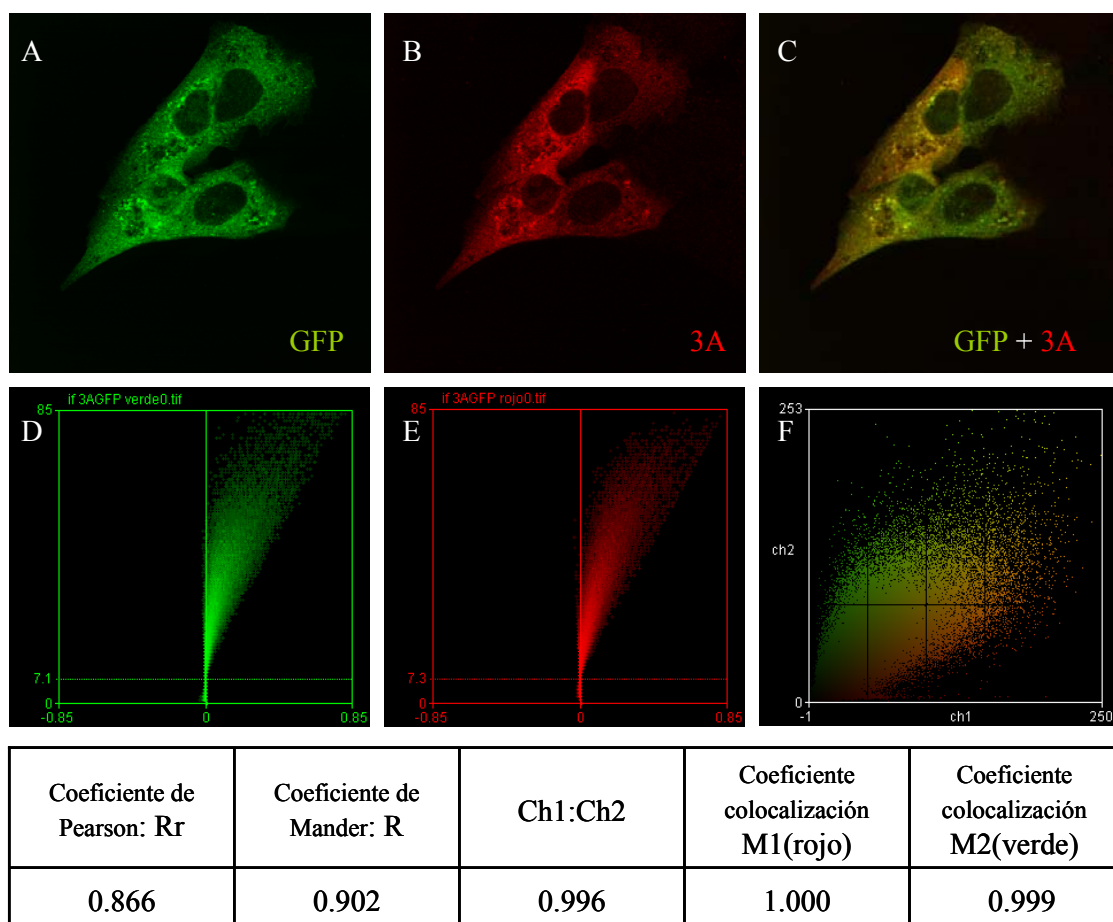


Figura 39. Inmunofluorescencia de células Vero a 24 h postransfección con pEGFP-3A. A) Fluorescencia de GFP. **B)** Fluorescencia de la proteína 3A, para cuya detección se utilizó el AcPo 346 obtenido frente al extremo C-ter de 3A y como Ac secundario un anti-conejo acoplado a Alexa-555. **C)** Superposición de ambos canales. **D)** y **E)** Gráficas ICA (*intensity correlation assay*) para cada canal donde en absisas se representan los valores PDM (producto de la diferencia de las medias) = $(I \text{ roja} - I \text{ roja media}) \times (I \text{ verde} - I \text{ verde media})$ y en ordenadas la intensidad verde o roja. **F)** Gráfica de dispersión de colores en la que se representan las intensidades roja vs verde. Tanto las gráficas como los coeficientes se obtuvieron utilizando la aplicación ICA del programa Image-J (Li y col., 2004).

En la Fig. 40 se observa que la proteína 3Awt mostró un patrón citoplasmático relativamente homogéneo con pocas zonas punteadas y con zonas de mayor intensidad de fluorescencia en la región perinuclear. La proteína 3ABBB, como se había descrito anteriormente en el laboratorio para la proteína sin fusionar a GFP (García-Briones y col., 2006), presentaba un patrón fibroso perinuclear. Las proteínas que contenían sustituciones puntuales presentaron alteraciones en su distribución citoplasmática; tanto 3AL38E, 3AL41E como 3AC65S mostraron un aumento de la fluorescencia punteada. Por otra parte, con el fragmento N-ter de 3A (G1) se observó un acúmulo fluorescente único en el citoplasma, que aumentó en tamaño e intensidad con el tiempo post

transfección. Estas células que expresaban G1 presentaban una morfología alterada, redondeadas y con núcleos picnóticos, por lo que esta proteína no fue incluida en posteriores análisis de microscopía *in vivo*. En las células transfectadas con la delección G1t ($\Delta R82-E153$) fusionada a GFP se apreció una distribución con acúmulos, más pequeños en éste caso, repartidos en el citoplasma. En el caso de la delección NTT ($\Delta I1-L41$, que interrumpe la posible región implicada en dimerización), se obtuvo una distribución que se asemejaba a la de la 3A wt, aunque menos homogénea.

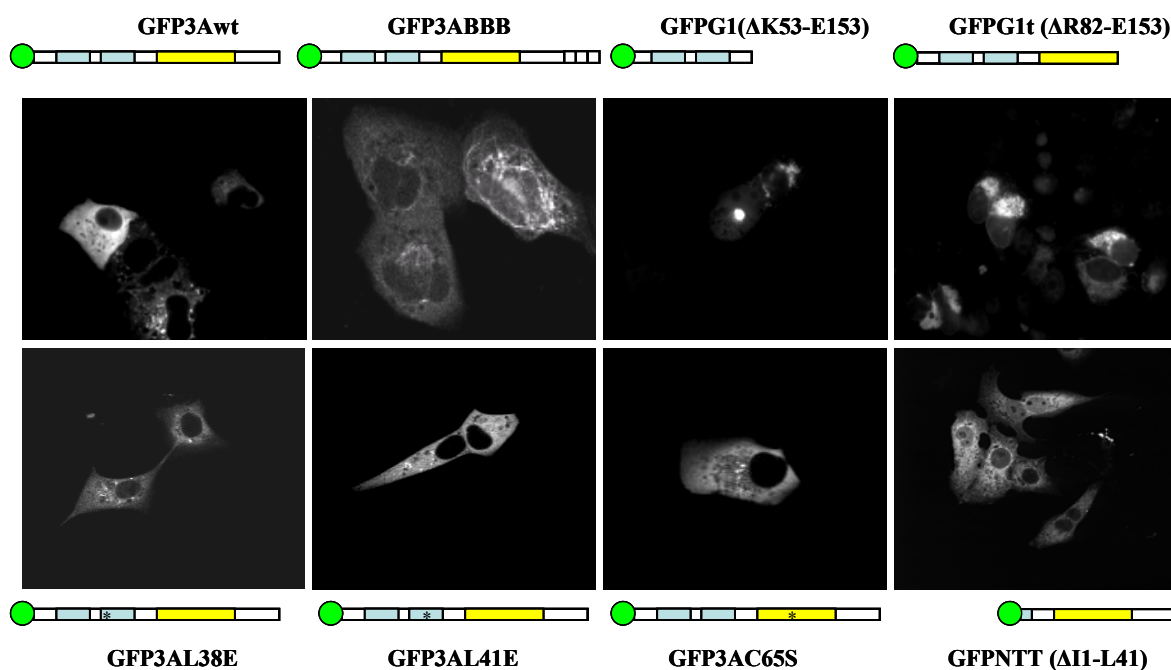


Figura 40. Distribución subcelular de la fluorescencia de proteínas de fusión con GFP. Microscopía de fluorescencia de células Vero tras 24 h de su transfección con 1 μ g de los plásmidos que expresan las proteínas indicadas en cada caso. Las imágenes fueron adquiridas en microscopio invertido Axioscope (Zeiss) acoplado a una cámara ccd. Se incluye el esquema de los diferentes mutantes de la proteína 3A fusionados a GFP estudiados. La proteína GFP se representa como un círculo verde, las hélices α 1 y 2 de 3A implicadas en su dimerización, se indican en azul, y en amarillo el dominio transmembrana.

La expresión de éstas proteínas de fusión también fue analizada por *Western Blot*. Para ello, se emplearon células Vero que fueron lisadas 24 h p.t., y sus proteínas separadas por SDS-PAGE. Como se muestra en la Fig. 41, el *Western blot* con el Ac anti-GFP indicó que todas las proteínas fusionadas a GFP expresadas tenían una movilidad electroforética correspondiente al tamaño esperado, cuando se comparaban con la proteína GFP sin fusionar. La señal obtenida con los Ac frente a los fragmentos C-ter y

N-ter permitió corroborar que cada proteína fusionada contenía la región clonada de la proteína 3A. Con el Ac frente al extremo N-ter se observaron algunas bandas muy tenues para G1t, 3AL38E y 3ABBB que podrían deberse a un problema de reactividad del Ac debido a cambios conformacionales de estas proteínas o en el caso de L38E, a la falta de reactividad debida a la sustitución introducida en esta proteína mutante, ya que el péptido utilizado para generar el Ac N-ter utilizado solapa con el residuo mutagenizado.

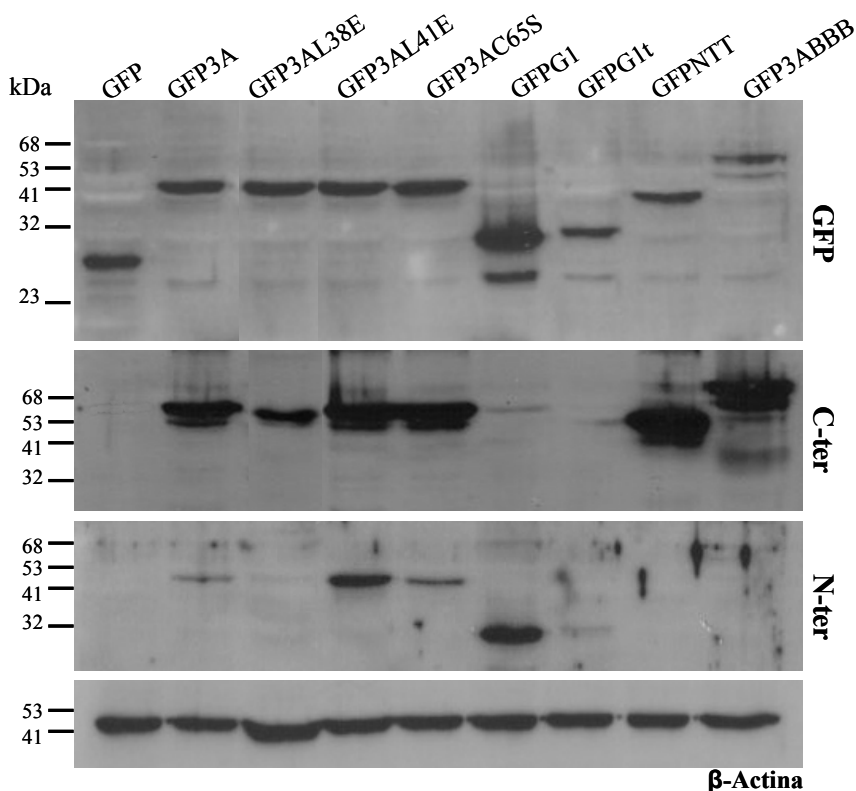


Figura 41. Detección de las diferentes proteínas de fusión con GFP en extractos celulares. *Western blot* de lisados de células Vero a 24 h postransfección con los plásmidos que expresaban las proteínas de fusión indicadas en cada pocillo. Los anticuerpos utilizados fueron: AcMo anti GFP, AcPo 443 anti N-ter de 3A, AcPo 346 anti C-ter de 3A y AcMo anti β -Actina (control de carga). A la izquierda se indica la migración de los marcadores de tamaño y su peso molecular en KDa.

8.2. Caracterización *in vivo* de células transfectadas con pEGFP3Awt

Por medio de microscopía *time lapse* o a tiempo real se llevó a cabo la monitorización de la proteína 3A fusionada a GFP dentro del citoplasma de células transfectadas con el plásmido pEGFP3A. Como primer paso se realizó una cinética de la fluorescencia de GFP a distintas h p.t. para determinar el tiempo al cual ésta comenzaba ser detectada, que para las células Vero fue entre las 5 y 6 h. Basándonos en este resultado, se llevó a

cabo un experimento en el que, a partir de las 6 h p.t., se tomaron imágenes de fluorescencia seriadas cada 5 min, durante 3 h, como se muestra en la Fig. 42.

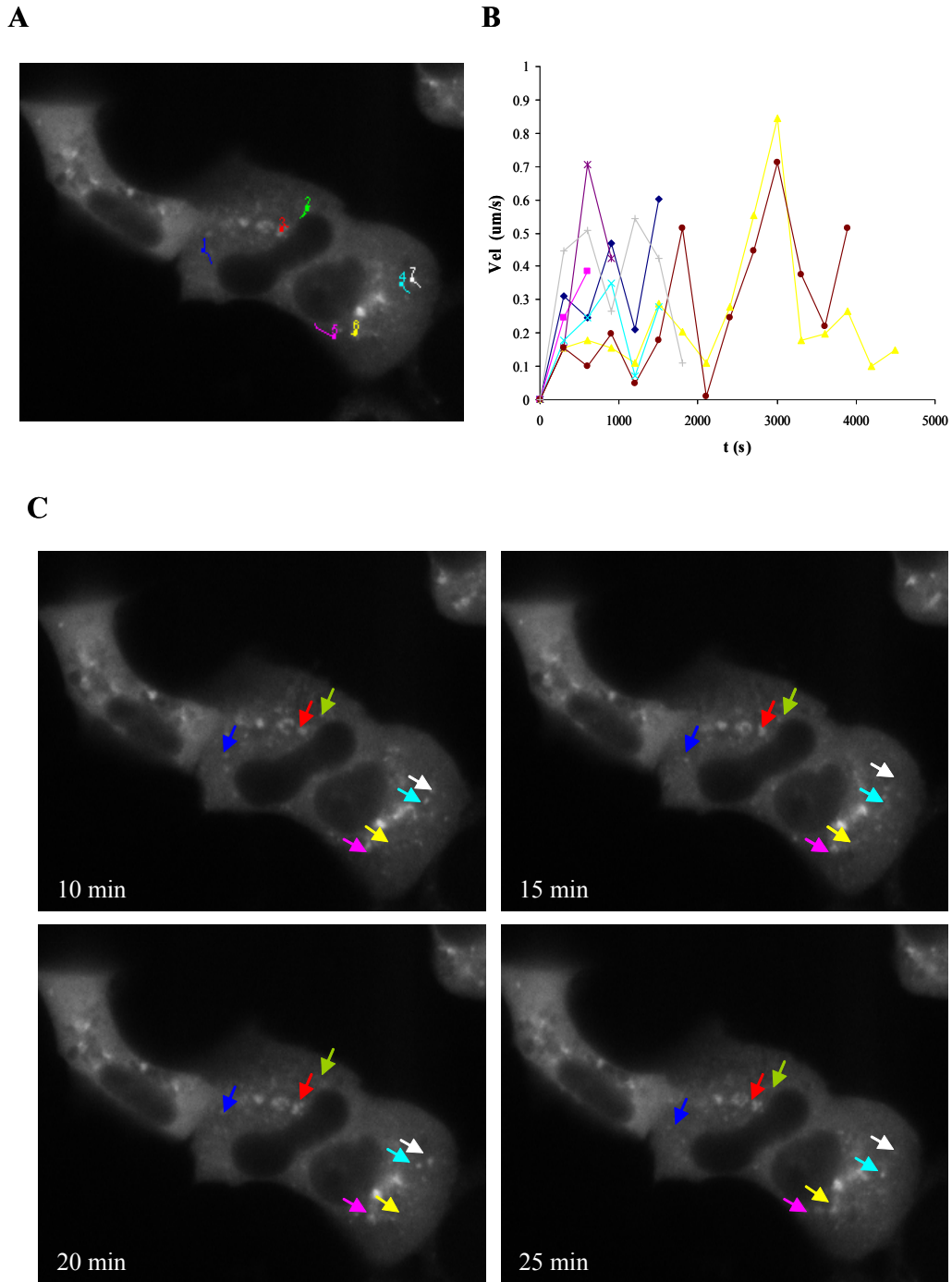


Figura 42. Microscopía a tiempo real de la proteína GFP3A. Se muestran imágenes de células Vero transfectadas con 1 μg de GFP3A y monitorizadas en un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara CCD monocroma con disco de filtros ultrarrápido y a un sistema de monitorización de placas con control de temperatura y CO_2 . A las 6 h p.t. las células fueron monitorizadas cada 5 min durante 3 h con un láser de 488 nm y con un objetivo 63x/1.2 Water C-Apochromat Corr. **A)** Superposición de todas las imágenes de los distintos tiempos (*stack*) donde se dibujan en distintos colores

las trayectorias de algunos de los puntos fluorescentes en ese campo. **B)** Representación gráfica de la velocidad en función tiempo de los puntos mostrados en A. **C)** Imágenes individuales obtenidas a distintos tiempos.

A partir de estas imágenes, se analizó el movimiento del patrón de puntos fluorescentes que mayoritariamente se localizaron en la región perinuclear y que, en muchos casos, se extendieron a todo el citoplasma con una fluorescencia más homogénea. Mediante el uso de la aplicación de “*tracking dots*” del programa ImageJ, se realizó el seguimiento de la trayectoria o “*tracking*” de los puntos. Con la trayectoria recorrida y el tiempo se calculó la velocidad en $\mu\text{m/s}$ y su variación en función del tiempo (Fig. 42B). El movimiento observado para la proteína 3A presentó un patrón confinado, como se puede observar en las trayectorias dibujadas en la imagen de la Fig. 42A, donde se utilizan colores diferentes para cada punto. Este patrón difiere del descrito para otros complejos proteicos virales dependientes de microtúbulos (Wolk y col., 2008).

8.3. Análisis biofísicos de la dinámica de la proteína 3A

8.3.1. Análisis por microscopía FRAP

Con el objetivo de caracterizar la movilidad de 3A dentro del citoplasma de células transfectadas, se determinó la recuperación de la fluorescencia luego del “*photobleaching*” (FRAP) de la proteína GFP3A y de los mutantes descritos en R8.1. Como se detalla en M18.2, en esta técnica se selecciona una región de interés (ROI) en el citoplasma fluorescente, sobre la cual se hace incidir un haz de luz (láser) a su máxima intensidad (100%), monitorizándose posteriormente la recuperación de la fluorescencia en esa zona (Snapp y col., 2003), tal y como se esquematiza en la Fig. 43A. La optimización de la técnica se llevó a cabo empleando células transfectadas con GFP3A. En la Fig. 43B se muestra un ejemplo de una célula analizada con esta técnica, indicándose la región elegida como ROI 1 (círculo rojo). Como control del *photobleaching* global del campo se seleccionó una ROI 2 (círculo azul), con intensidad de fluorescencia similar y, en lo posible, en una célula vecina a la que es “apagada”. Por último, se incluyó una ROI 3 fuera de las células para medir fondo o ruido. En la Fig. 43B se muestran imágenes de células transfectadas 6h p.t. con pEGFP3Awt con sus respectivas ROIs 1 (en rojo) y 2 (en azul), antes, durante y después del *photobleaching*.

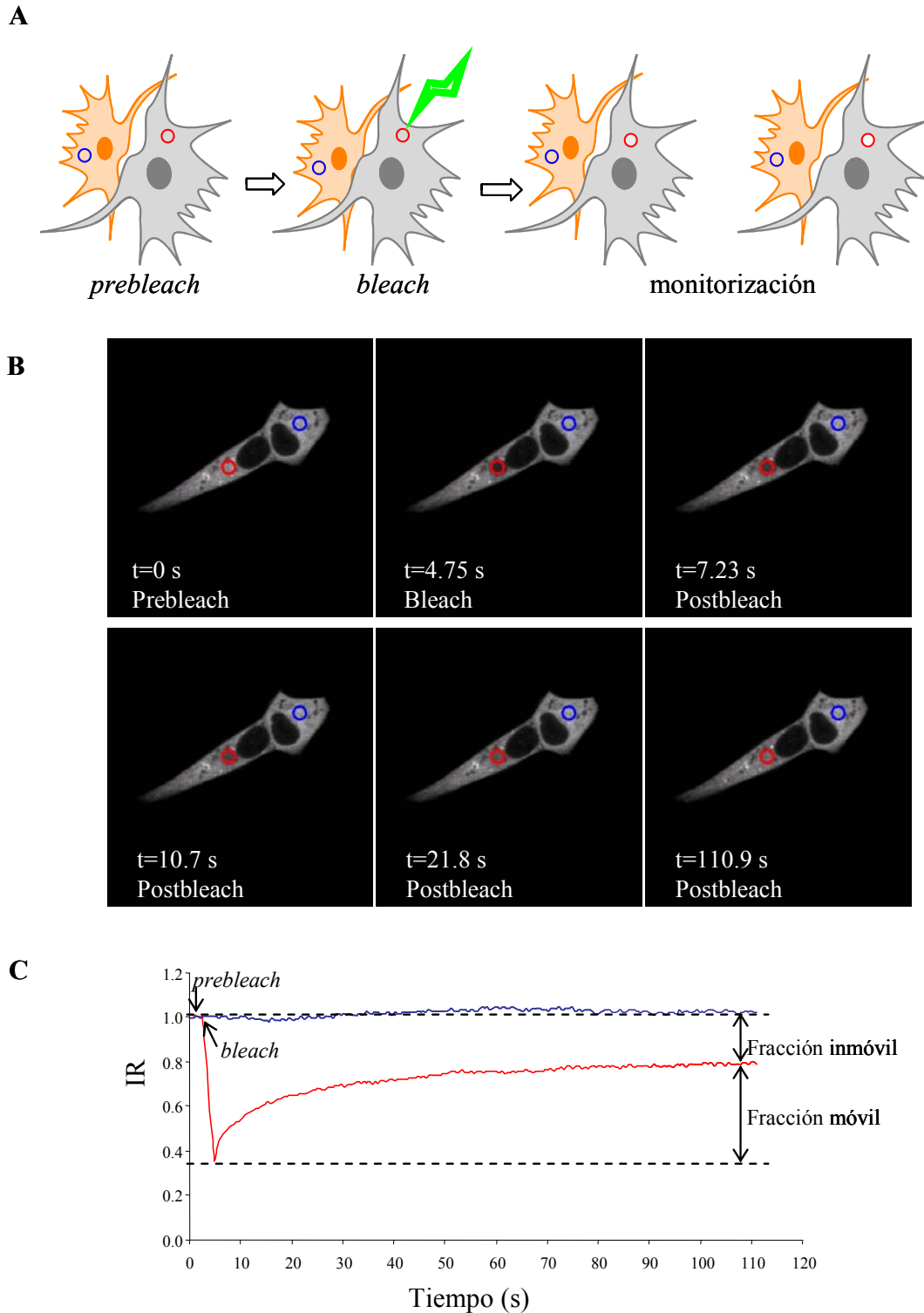


Figura 43. Microscopía FRAP de células que expresan GFP3A. A) Esquema del proceso de *bleaching* de una ROI determinada en el citoplasma de una célula fluorescente y de su análisis. **B)** Imágenes de células Vero transfectadas con 1 μg de pEGFP3A antes del “apagamiento” (*prebleach*), durante el mismo (*bleach*) y en la posterior recuperación de la fluorescencia (*postbleach*). Las imágenes se monitorizaron en un microscopio invertido Axio Observer (Zeiss) y el experimento se realizó por triplicado con una $n>10$. El “apagamiento” se realizó en la ROI 1 (círculo rojo) mediante 100 interacciones al 100% de

potencia del láser de $\lambda=488$ nm. La recuperación de la fluorescencia se monitorizó continuamente en todo el campo a baja intensidad de potencia del láser (1%) hasta que la recuperación alcanzó un *plateau*. Las células se monitorizaron 6 veces antes del “apagamiento” para determinar la intensidad de máxima fluorescencia inicial media. No se observó *photobleaching* adicional en la ROI 2 (círculo azul). **C)** Gráfica de intensidad de fluorescencia relativa (IR) vs tiempo. Se indican en la gráfica parámetros de interés obtenidos a partir de la misma como la Fracción móvil y la inmóvil.

En la Fig. 43C se representa la intensidad relativa (IR) de fluorescencia en función del tiempo, para la ROI 1 y para la ROI 2, indicándose mediante flechas las intensidades que corresponden al *prebleach* y al *bleach*, así como lo que se define como Fracción móvil (área bajo la curva indicada) y la Fracción inmóvil (diferencia entre la IR inicial e IR final). Estas fracciones se refieren al porcentaje de proteína fluorescente que es móvil dentro del citoplasma celular en función de su capacidad de moverse al sitio donde se realiza el *photobleaching* y así recuperar fluorescencia en esa región. En la célula analizada en el ejemplo, la GFP3A, presentó un porcentaje de Fracción móvil del 68%. Para determinar cómo el tiempo postransfección podía afectar a la recuperación de la fluorescencia, se realizó una cinética de FRAP a distintos tiempos tras la transfección de células Vero con pEGFP3A.

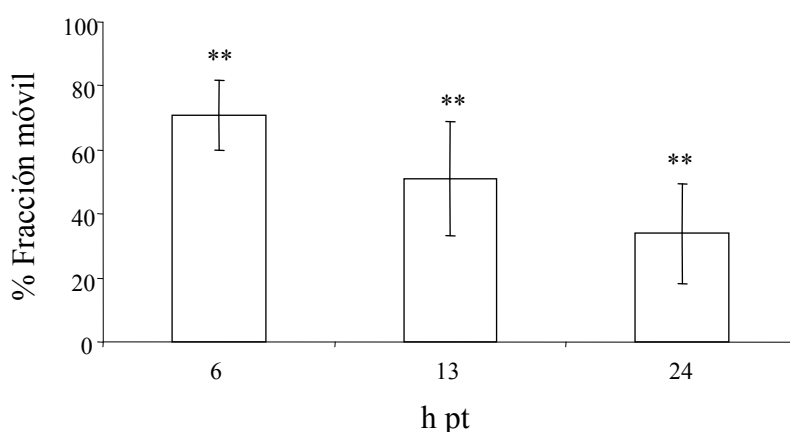


Figura 44. Cinética de recuperación de fluorescencia con pEGFP3A en células Vero a distintos tiempos postransfección con pEGFP3Awt. Las células se transfectaron con 1 μ g de plásmido. Se representa la fracción móvil obtenida en cada caso, calculada como se explicó en M18.2, ajustando la curva de la IR vs t a una curva exponencial, para lo que se utilizó el programa informático Fcalc. (** $p \leq 0,01$).

Como se puede observar en la Fig. 44 la movilidad fue mayor a tiempos cercanos a la transfección (6 h) y disminuyó con el tiempo. Estas diferencias fueron, en todos los

casos, significativas. Para comparar la recuperación de la fluorescencia de GFP3Awt con la de los distintos fragmentos y mutantes de la proteína 3A expresados en pEGFP, se eligió el tiempo que se usa habitualmente en ensayos de FRAP, que es 24 h p.t. A éste tiempo, la proteína wt mostró un porcentaje de fracción móvil entre 20-50%. Este análisis se llevó a cabo con células Vero transfectadas con pEGFP3Awt, pEGFP3AL38E, pEGFP3AL41E, pEGFP3AC65S, pEGFPNTT ó pEGFPG1t (Fig. 45). La proteína de fusión GFPG1 no se incluyó en éste análisis porque, como se comentó anteriormente y se observa en la Fig. 40, formaba acúmulos en el citoplasma a modo de agregados que no hicieron posible su análisis por FRAP.

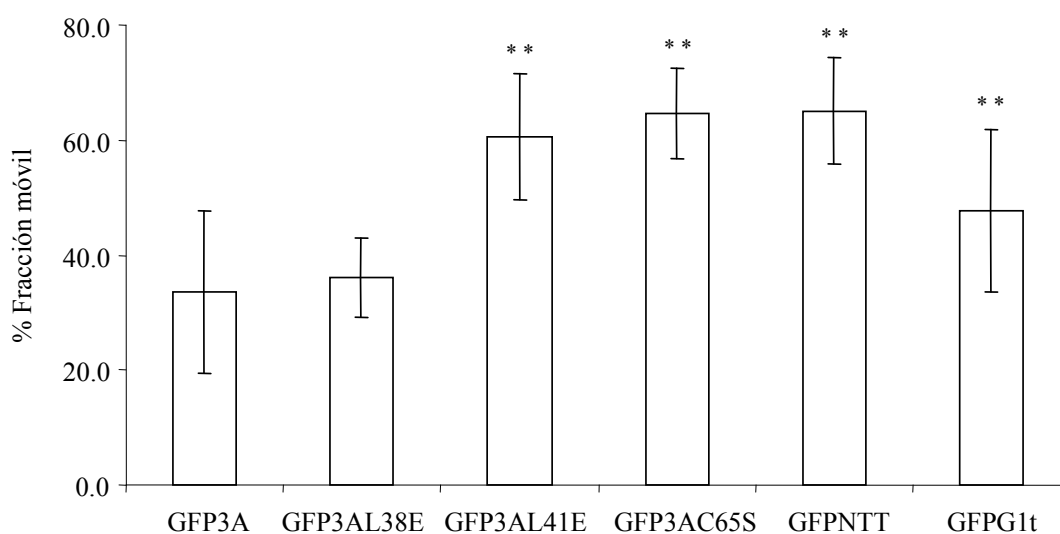


Figura 45. Fracciones móviles determinadas en el análisis por microscopía FRAP de 3Awt y distintos mutantes. Se representan las medias \pm la desviación estándar de experimentos realizados por triplicado con una $n > 10$. (** $p \leq 0,01$, referidos a GFP3A).

Como se muestra en la Fig. 45, todas las proteínas analizadas, excepto 3AL38E, aumentaron significativamente el porcentaje de su fracción móvil respecto a la 3Awt.

8.3.2 Análisis por microscopía FLIP

La movilidad de una proteína dentro de la célula puede estar confinada a un orgánulo o puede extenderse por todo el citoplasma. El retículo endoplásmico (RE) es el mayor compartimento intracelular con una extensa y compleja red de túbulos y cisternas intercomunicadas que se extienden a través de la célula incluyendo la envuelta nuclear (Lippincott-Schwartz y col., 2000). La continuidad del RE en el citoplasma ha sido

extensamente estudiada (Cole y col., 1996; Nehls y col., 2000; Verkman, 2002) mediante la técnica de FLIP (Dundr y col., 2003; Snapp y col., 2006).

La proteína 3A del VFA colocaliza parcialmente con marcadores de RE (García-Briones y col., 2006; O'Donnell y col., 2001), por lo que se decidió analizar la pérdida de fluorescencia por “apagamiento” de la proteína GFP3Awt expresada transitoriamente en células Vero mediante FLIP. En ésta técnica, como se explica en M18.3, se realiza el “apagamiento” repetitivo de un área seleccionada del citoplasma de la célula fluorescente, midiéndose la pérdida de intensidad de fluorescencia del resto del citoplasma. Con esto se determina si las proteínas fluorescentes que se mueven en el citoplasma lo hacen en un compartimento confinado o si, por el contrario, lo hacen en un compartimento que tenga continuidad dentro de la célula. Si esto último se cumpliera, la fluorescencia de toda la célula se iría apagando gradualmente hasta extinguirse. La técnica se esquematiza en la Fig. 46.

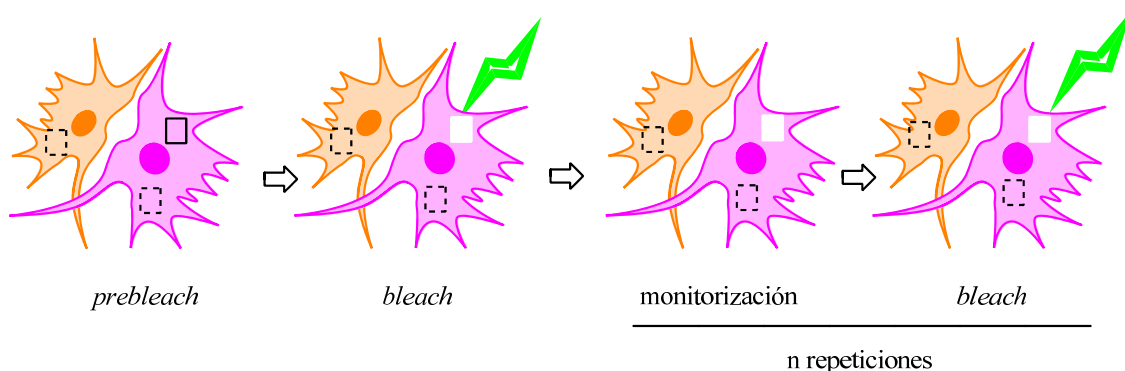
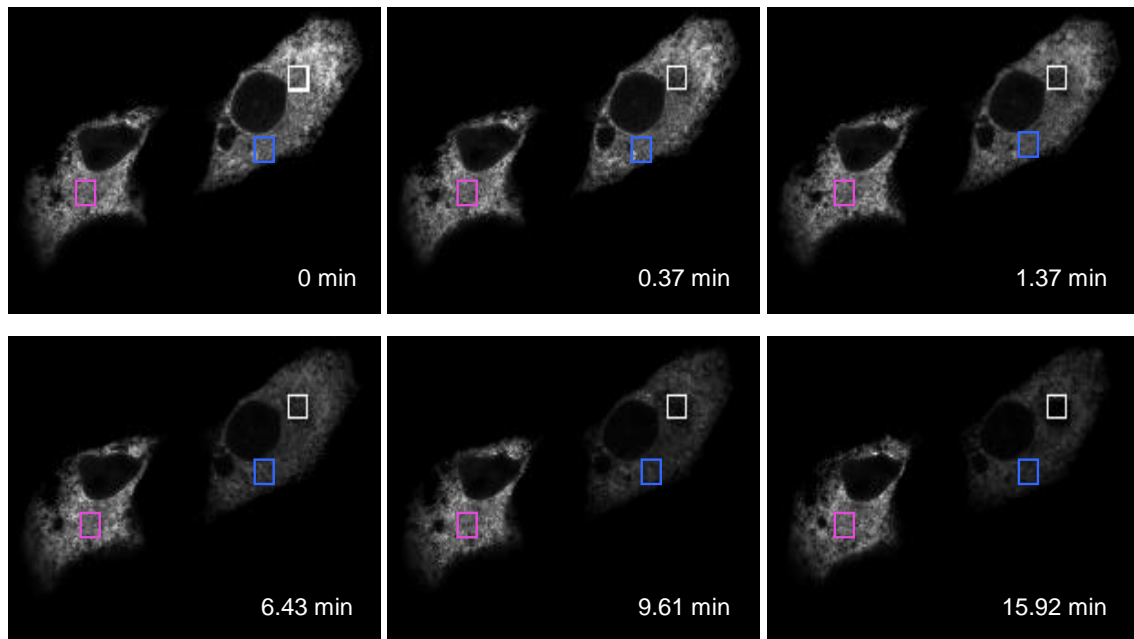


Figura 46. Esquema de la técnica de FLIP. Se representan dos células fluorescentes en un mismo campo. Se selecciona una ROI 1 que va a ser repetidamente apagada (cuadrado de línea continua), y luego se selecciona una ROI 2 en la misma célula (cuadrado punteado), donde se monitoriza la pérdida de fluorescencia a medida que se repiten los apagamientos en la ROI 1. Se selecciona una ROI 3 (cuadrado punteado) de una célula vecina para determinar el *photobleaching* en todo el campo.

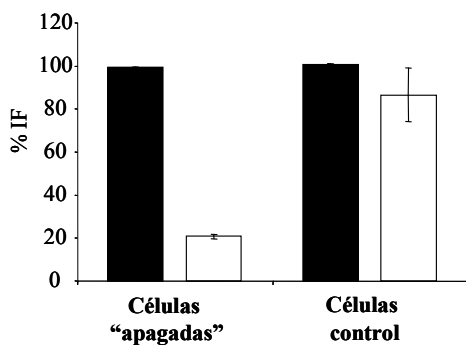
Como control de la técnica, se utilizó el plásmido plgLdR1KDEL-RFP (Wolk y col., 2008) (amablemente cedido por Benno Wölk) descrito en el apartado M4, que expresa la proteína fluorescente monomérica roja (mRFP1) fusionada al péptido señal de localización en RE (KDEL). Al realizar el “apagamiento” repetido de la fluorescencia de la proteína roja en una región del citoplasma, como ésta se localizaba en el RE, se observó la extinción de la fluorescencia en casi la totalidad de la célula (Fig. 47), como

está descrito que pase para una proteína de retículo con ésta técnica (Lippincott-Schwartz y col., 2001).

A



B



C

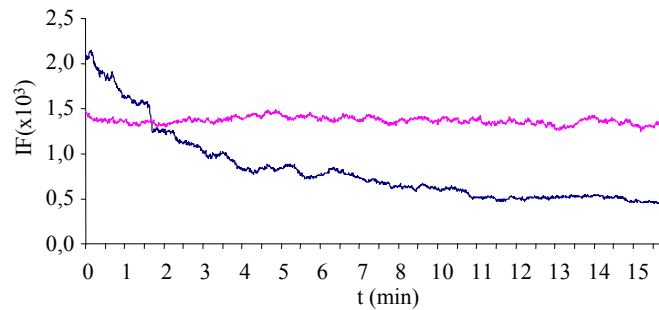
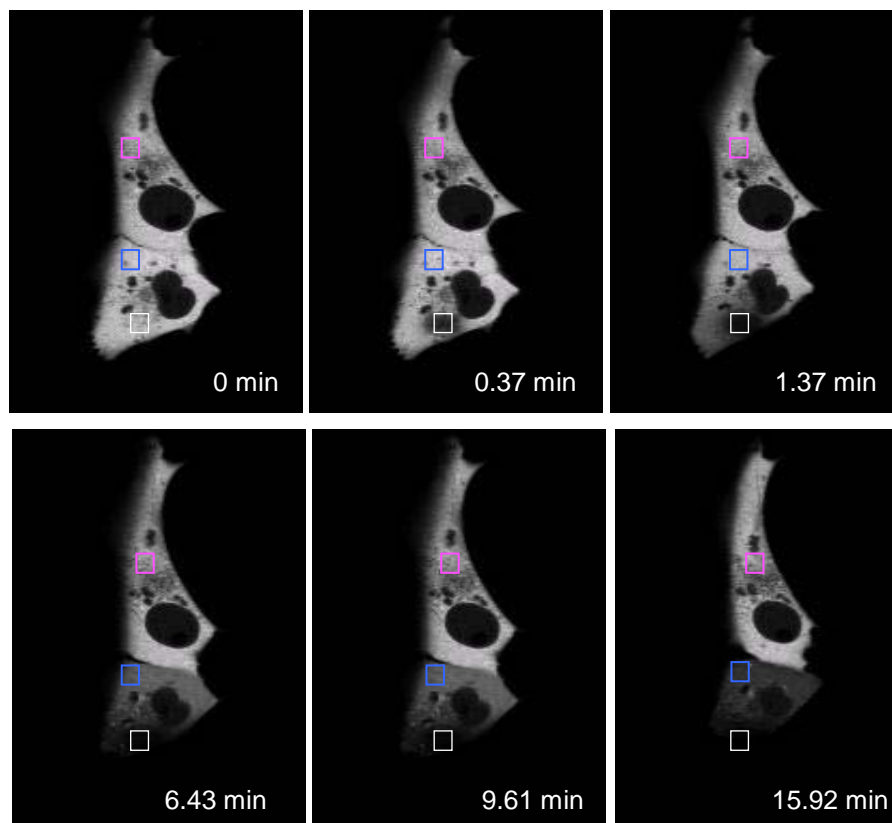


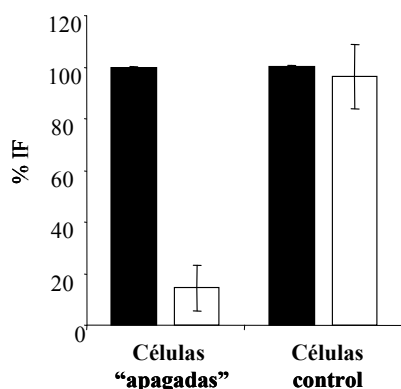
Figura 47. Análisis por microscopía FLIP de células transfectada con el plásmido control IgLdR1KDEL-RFP. A) Imágenes de las células transfectadas con 1 μ g de pIgLdR1KDEL-RFP a las que se realizó el “apagamiento” repetido en una ROI fluorescente del citoplasma (cuadrado blanco) y se monitorizó la pérdida de intensidad de fluorescencia en el citoplasma de la misma célula (cuadrado azul) y de una célula vecina (cuadrado rosa), a distintos tiempos. Se considera $t=0$ al prebleach. **B)** se representa el porcentaje de la intensidad de fluorescencia (IF) de las células “apagadas” y de las células control dentro de un mismo campo. Las barras negras representan la IF antes del “apagamiento” y las blancas la IF final luego de todas repeticiones del “apagamiento” (15 min). **C)** Representación de la IF vs tiempo de la célula del panel A, donde la línea azul representa la IF de la célula “apagada” y la rosa la IF de la célula control.

El análisis de la pérdida de la fluorescencia por repetición del “apagamiento” de una región fluorescente del citoplasma en células transfectadas con la proteína GFP3Awt mostró un resultado similar al de la proteína control dirigida al RE (Fig. 48), observándose que la fluorescencia de la célula tendió a extinguirse. Por tanto, estos resultados son compatibles con la localización de la proteína 3A en un compartimento continuo como el RE.

A



B



C

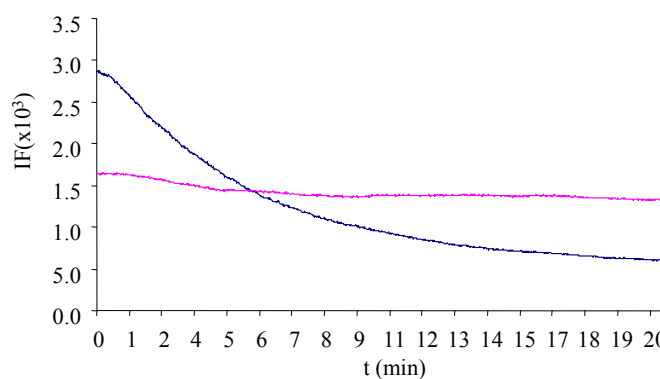


Figura 48. Análisis por microscopía FLIP de las células transfectadas con GFP3Awt. A) Imágenes de células Vero transfectadas con 1 μ g de pEGFP3Awt a las que se realizó el “apagamiento” repetido en una ROI fluorescente del citoplasma (cuadrado blanco) y se monitorizó la pérdida de intensidad de

fluorescencia a distintos tiempos en el citoplasma de la misma célula (cuadrado azul) y de una célula vecina (cuadrado rosa). Se considera $t=0$ al prebleach. **B)** Representación del porcentaje de la intensidad de fluorescencia (IF) de las células “apagadas” y de las células control dentro de un mismo campo. Las barras negras representan la IF antes del “apagamiento” y las blancas la IF final luego de las 150 repeticiones del “apagamiento”. **C)** Representación de la IF vs tiempo donde la línea azul representa la IF de la célula “apagada” y en rosa la IF de la célula control.

9. Caracterización bioquímica de la unión de la proteína 3A a membranas celulares

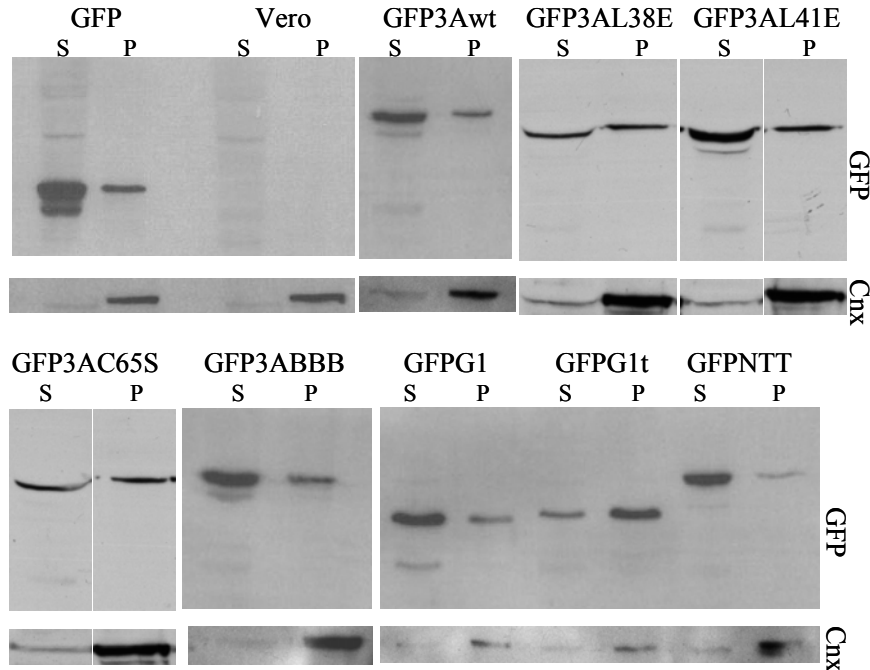
Se ha descrito que las PNE de picornavirus 2B, 2C y 3A, así como sus precursores 2BC y 3AB, están asociados a membranas (Knox y col., 2005; Krogerus y col., 2007; Teterina y col., 1997; Towner y col., 1996). La proteína 3A de VFA, como se comentó en el apartado R3, se predice que tiene una región hidrofóbica entre los residuos 59-96 que sería responsable de su anclaje a membranas, habiéndose descrito su capacidad para interactuar con membranas celulares (Moffat y col., 2005; O'Donnell y col., 2001). No obstante, el tipo de interacción que 3A puede establecer con las mismas no se ha caracterizado hasta el momento.

Las proteínas integrales de membrana se pueden distinguir de las proteínas periféricas mediante tratamientos bioquímicos. Altas concentraciones de sales, pH muy básicos (i.e. $\text{pH}>11$), así como la presencia de agentes caotrópicos, como guanidina o urea, pueden disociar las proteínas periféricas de una bicapa lipídica (Fujiki y col., 1982; Gilmore y col., 1985). Por el contrario, la interacción de una proteína integral de membrana con una bicapa lipídica es mucho más fuerte y, generalmente, no se disocia con estos tratamientos, siendo necesario el uso de detergentes para su extracción de las membranas (Towner y col., 1996).

Para una primera caracterización de las distintas proteínas expresadas transitoriamente en células Vero, en solubles o insolubles, éstas se separaron por centrifugación ($30.000 \times g$), como se explica en el apartado M15. Para ello se lisaron monocapas de células transfectadas con pEGFP3Awt, pEGFP3ABBB, pEGFPG1, pEGFPG1t, pEGFPNTT, pEGFP3AL41E, pEGFP3AL38E o pEGFP3AC65S. Las proteínas presentes en los precipitados y sobrenadantes, se analizaron por *Western blot* con Ac primarios anti-GFP y anti-Calnexina, éste último como control del fraccionamiento ya que la calnexina es una proteína integral del RE de tipo I y posee un dominio luminal, una región transmembrana, y un dominio C-terminal citoplasmático con una secuencia de retención en RE (Bergeron y col., 1994). Como controles se incluyeron, también, lisados de

células sin transfectar y de células transfectadas con el plásmido pEGFP vacío (Fig.49A).

A



B

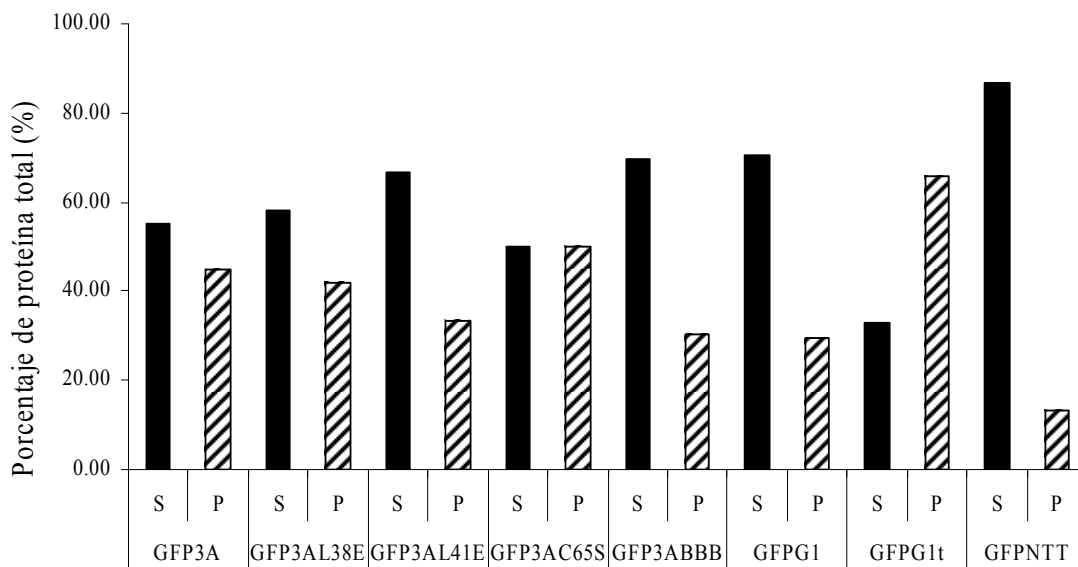


Figura 49. Análisis por Western blot de lisados de células Vero transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas de fusión indicadas. A) Los lisados celulares, obtenidos a 24 h p.t. con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas, se centrifugaron a 30.000 x g, recuperándose las fracciones correspondientes al sobrenadante o fracción soluble (S) y al precipitado o fracción insoluble (P). Los Ac utilizados fueron anti-GFP y anti-Calnexina. **B)** Se representa la densidad relativa de las

distintas bandas, obtenida mediante densitometría y cuantificada empleando el programa Image J. Las barras negras corresponden a las fracciones solubles y las rayadas a las fracciones insolubles.

La determinación del porcentaje relativo de cada fracción se llevó a cabo densitometrando las bandas obtenidas, para lo que se utilizó una aplicación (*plug-in*) del programa Image J, y calculando el porcentaje de densidad relativa de cada fracción, para lo que consideró como 100 % la suma de las fracciones soluble e insoluble. Los porcentajes relativos determinados para las diferentes proteínas analizadas se muestran en la Fig. 49B.

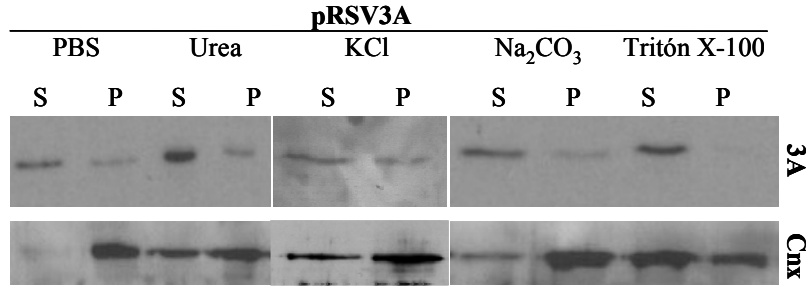
El resultado obtenido en éste fraccionamiento con la proteína 3Awt coincidió con lo publicado previamente (Moffat y col., 2005), ya que el 54% de su marca se encontró en la fracción insoluble (precipitado), sugiriendo su asociación parcial con algún tipo de membrana celular. Porcentajes similares de proteína en la fracción soluble se encontraron para el mutante de sustitución en la posición C65 (50%). La presencia de 3A en la fracción soluble o citoplasmática, aumentó ligeramente en los mutantes de sustitución L38E (58%) y L41E (66%), así como en el precursor 3ABBB (69%). Para los mutantes de delección las distribuciones variaron. El fragmento G1 que presenta deleccionada toda la región transmembrana además del extremo C-terminal, mostró un mayor porcentaje de fracción soluble (71%), lo que se observó también, con el mutante NTT (86%) que tiene deleccionado el extremo N-terminal, lo que trunca la región F26-Q44 que contribuye a la dimerización de la proteína 3A (ver apartado R3). Por último, el mutante G1t, que tiene deleccionado el extremo C-terminal pero que mantiene la región transmembrana, fue el que se recuperó en menor proporción en la fracción soluble (32%) entre las construcciones comparadas.

Una vez determinada la distribución de la proteína 3A entre las fracciones soluble e insoluble, se realizaron los tratamientos bioquímicos anteriormente mencionados, para caracterizar la interacción de las distintas versiones de esta proteína con membranas celulares. Para ello, se utilizó la proteína de fusión GFP3A así como la proteína 3A sin modificar clonada en el plásmido pRSV. El análisis, como está descrito en M15.2, se realizó partiendo del precipitado obtenido de centrifugar los extractos celulares a 30.000 x g durante 20 min, que se resuspendió en cada una de las siguientes condiciones: urea 4 M, Na₂CO₃ 0,1 M pH 11,6 ó KCl 1 M. También se incluyó un tratamiento con un detergente no iónico (Triton X-100 0.5 %). Luego del tratamiento las muestras se centrifugaron nuevamente, separándose las fracciones solubles (sobrenadante) e

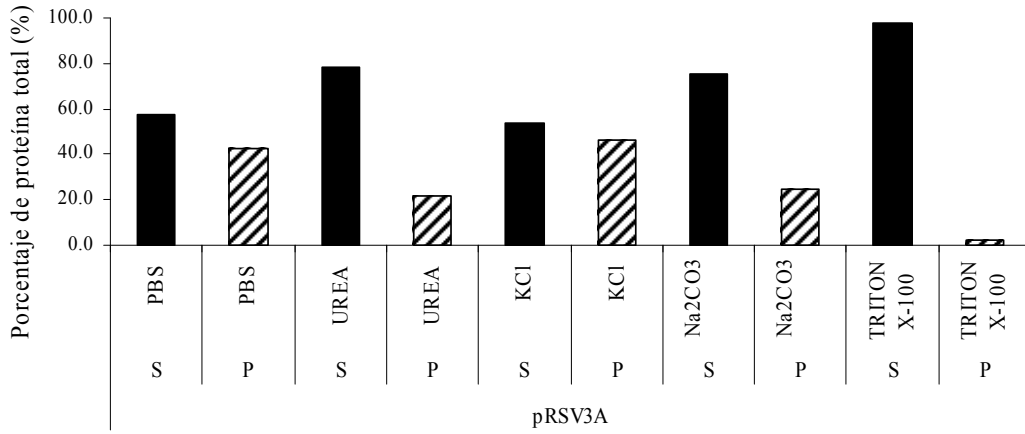
insolubles (precipitado), como se muestra en la Fig. 50. Como control del fraccionamiento, se utilizó la proteína calnexina.

Como se observa en la Fig. 50A y C, la calnexina se solubilizó en presencia de Tritón X-100 y, parcialmente, en la de urea. Para la proteína 3A de VFA, se observó que altas concentraciones de sal (KCl) o pH elevados (Na_2CO_3) alteraban claramente su solubilidad (tanto utilizando para su expresión el plásmido pRSV3A como pEGFP3A), si bien los tratamientos que produjeron un aumento más marcado de su solubilidad fueron Tritón X-100 y, en menor medida, urea. Así pues, la proteína 3A, obtenida del precipitado, presenta una fracción soluble en tratamientos más suaves, lo cual correlaciona con una proteína periférica, y otra soluble en tratamientos más drásticos, compatible con las propiedades de una proteína transmembrana. Como se comentó en la Introducción, estas propiedades son similares a las descritas de la proteína 3AB de PV.

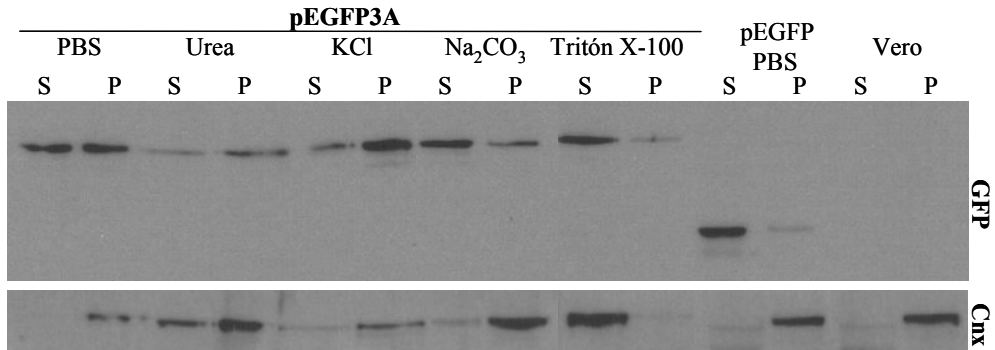
A



B



C



D

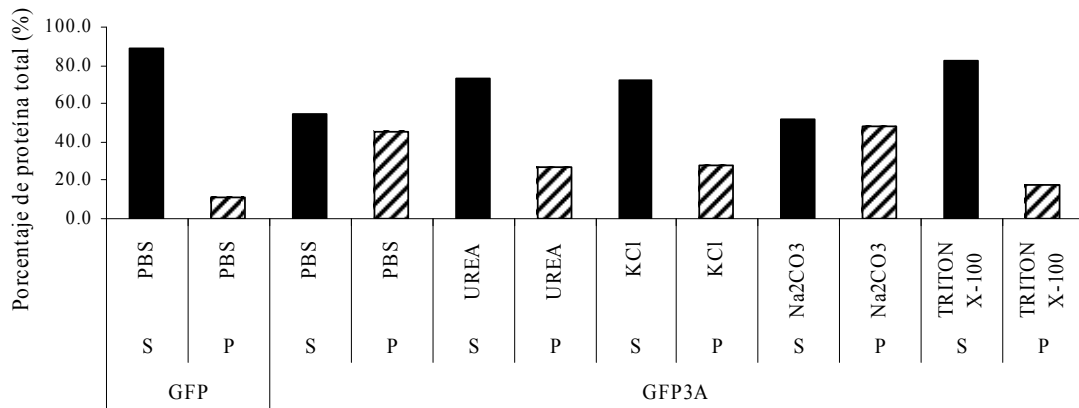


Figura 50. Distribución de la proteína 3A en fracciones de membrana sometidas a diferentes tratamientos bioquímicos. Se muestran los resultados obtenidos con células Vero, transfectadas con los plásmidos pRSV3A y pEGFP3A. **A)** y **C)** *Western Blot* de las fracciones solubles (S) e insolubles (P) separadas tras resuspender los precipitados, obtenidos por centrifugación de lisados de células transfectadas, en presencia de los compuestos indicados en cada caso. Los Ac primarios utilizados fueron anti-GFP, anti-3A (2C2) y anti-Calnexina (Cnx). **B)** y **D)** Para cada experimento se representa el porcentaje de la proteína total que corresponde a cada fracción, considerando el 100% como la suma de la fracción S y P. Estos valores fueron obtenidos por densitometría de cada banda cuantificada empleando el programa ImageJ.

10. Análisis de la asociación de 3A con membranas ricas en *lipid rafts*

Distintas proteínas virales pueden asociarse con membranas ricas en lípidos resistentes a detergentes no iónicos (*lipid rafts*) (Bhattacharya y col., 2010; Hogue y col., 2011; Lu y col., 2008; Matto y col., 2004; Rossman y col., 2011). Como se ha descrito en el apartado anterior, el tratamiento con Tritón-X100 permitía solubilizar la fracción insoluble de la proteína 3A de VFA recuperada tras la centrifugación (Fig. 50), lo que sugería que esta proteína no estaba asociada a *lipid rafts*. Para confirmarlo, se realizó el aislamiento de *lipid rafts* mediante fraccionamiento de membranas insolubles en detergentes no iónicos por centrifugación de equilibrio en gradientes de densidad de sacarosa. Para ello, como se explica en el apartado M15.3, se transfectaron células Vero y BHK-21 con el plásmido pEGFP3Awt, que 24 h p.t. se procesaron para separar por centrifugación de equilibrio las distintas fracciones de membranas en presencia de Tritón X-100 0,5%. Las fracciones se analizaron por *Western blot* utilizando los Ac primarios anti-GFP y anti-caveolina-1, éste último incluido como control ya que la caveolina-1 se encuentra en membranas ricas en *lipid rafts* (Millan y col., 1997). Los resultados confirmaron que GFP3A no se asociaba a membranas insolubles en detergentes no iónicos, ya que, como se observa en la Fig. 51, la proteína GFP3A se encontró en las fracciones de mayor densidad, correspondientes a las proteínas solubles en Tritón X-100, mientras que la caveolina-1 se recuperó de las fracciones de menor densidad, correspondientes a las proteínas asociadas a membranas ricas en lípidos resistentes a detergentes no iónicos.

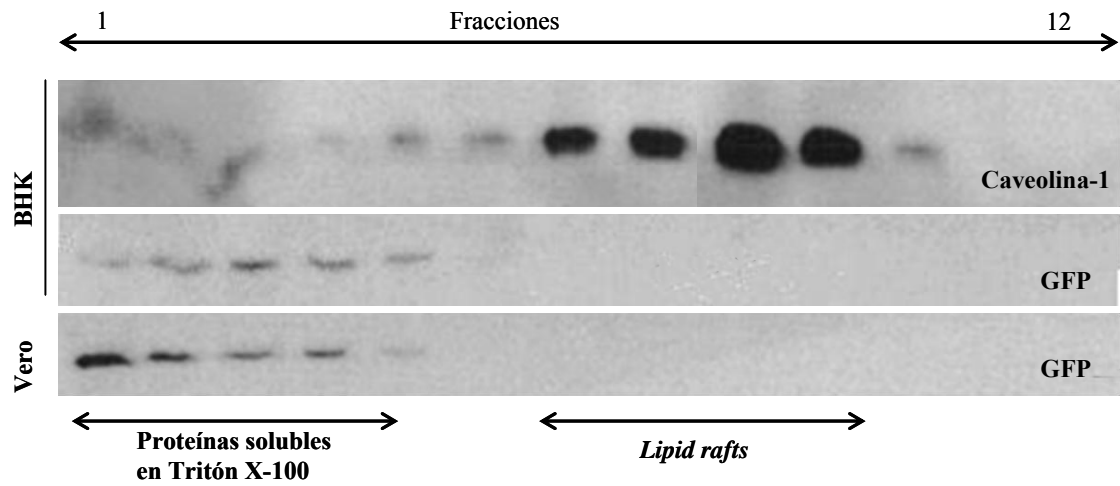


Figura 51. Asociación de 3A con membranas ricas en lípidos solubles en detergentes no iónicos. Análisis por *Western blot* de fracciones 1 (fondo del tubo) al 12 (parte superior del tubo), de un gradiente de densidad de sacarosa de lisados de células Vero o BHK-21, obtenidas a las 24 h p.t. con pEGFP3A. Las células fueron resuspendidas en tampón de lisis con Tritón X-100 0,5% a 4°C. Los Ac utilizados fueron el AcMo frente a GFP y como control un AcPo frente a Caveolina-1. Se indican las fracciones correspondientes a proteínas solubles en Tritón X-100 y las correspondientes a proteínas asociadas a membranas insolubles o “resistentes” a detergentes no iónicos (*Lipid rafts*).

DISCUSIÓN

Discusión

Expresión de proteínas de VFA en células infectadas

El ciclo infeccioso del VFA en cultivos celulares es un ciclo rápido que, dependiendo de la línea celular, puede durar entre 4 y 6 horas. Se trata de un ciclo citolítico en el que las células infectadas presentan un ECP característico. En otros picornavirus como PV, cada una de las PNE y la mayoría de sus precursores se sabe que tienen diferentes funciones que son necesarias para la replicación de su RNA, la formación de la partícula del virus así como la patogénesis que produce (Andino y col., 1999; Choe y col., 2005; Porter, 1993; Whitton y col., 2005). En la célula infectada por PV se observan reorganizaciones de membranas en el citoplasma, que generan nuevas estructuras vesiculares. En este contexto membranoso se ancla el complejo de replicación viral (Bienz y col., 1987; Gazina y col., 2002; Gosert y col., 2000) proceso al que contribuyen las PNE 2B, 2BC, 2C y 3A a través de sus regiones hidrofóbicas (Aldabe y col., 1995; Cho y col., 1994; Towner y col., 1996).

Para VFA se habían descrito diferencias con otros picornavirus en este proceso de reorganización de membranas y el origen de las mismas, no disponiéndose al inicio de esta Tesis Doctoral de información detallada sobre la distribución intracelular de las PNE y sus precursores, y su relación con la replicación y patogénesis de VFA.

Como primer paso para caracterizar el papel funcional de las PNE de VFA se ha analizado la cinética de detección y localización intracelular de las proteínas virales 2B, 2C, 3A, 3B, 3C y 3D, así como sus precursores en células BHK-21. Esta línea celular se usa frecuentemente en investigación básica de VFA, así como para ensayos de diagnóstico y producción de antígenos vacunares (Barteling y col., 1991; Brown, 1998). En el análisis por *Western blot* de extractos de células infectadas, recolectados a distintos tiempos post infección, utilizando Ac específicos para las PNE 2C, 3A, 3B, 3C y 3D así como para la proteína de la cápsida VP1 (Fig. 16), la primera proteína detectada fue 2C a 2,5 h p.i., seguida de VP1, P1, 2BC y 3ABBB a 3 h p.i. A las 4 h p.i. se detectaron claramente todas las proteínas maduras analizadas así como los precursores 2BC, 3ABBB, 3ABB, 3AB y P1. Al comparar estos resultados con los correspondientes al análisis de las células infectadas por técnicas de IF (García-Briones y col., 2006), se observaron diferencias en la detección por ambas técnicas de las proteínas a los distintos tiempos tras la infección, mayoritariamente a tiempos cortos. De esta manera, a 3 h p.i. se detectaron por IF todas las proteínas analizadas,

presentando una distribución perinuclear y polarizada, como la descrita para virus de serotipo O (Knox y col., 2005; Monaghan y col., 2004; O'Donnell y col., 2001). Como se ha comentado anteriormente, los tiempos a los que las PNE se detectaron por *Western blot* fueron en general más tardíos, necesitándose 4 h tras la infección para observarlas en su totalidad. Esta diferencia podría deberse a la asincronía en el progreso de la infección, por la que una parte pequeña de las células infectadas expresasen las PNE virales en cantidades suficientes para su detección por IF, en condiciones en las que el análisis por *Western blot* no detectase su presencia en la totalidad de las células. Alternativamente, este efecto podría deberse a una sensibilidad menor para ésta técnica con los Ac utilizados.

En el mencionado estudio (García-Briones y col., 2006) se puso también de manifiesto diferencias en los patrones de IF en células infectadas para distintas PNE, siendo relevante destacar la falta de colocalización entre 2C y 3A observada a las 3,5 h p.i., lo cual sugiere que estas proteínas pueden interactuar con diferentes componentes celulares en estadios avanzados de la infección.

Expresión de la proteína 3A en *E.coli* y su purificación

Durante la presente Tesis Doctoral se ha profundizado en la caracterización y análisis de la proteína 3A, que, como se ha comentado en la Introducción, posee diferencias con otros picornavirus en su tamaño y en aspectos funcionales como el no contribuir a la inhibición de la secreción de proteínas del huésped. Para ello, primeramente se llevó a cabo su clonaje y expresión en *E.coli* para explorar si existían condiciones de purificación compatibles con su posterior análisis bioquímico y estructural. Como se observa en la Fig. 17, el análisis de la movilidad electroforética de la proteína purificada proporcionó los primeros indicios de su posible dimerización/multimerización, ya que aún en condiciones desnaturalizantes, 3A presentó un patrón de múltiples bandas en SDS-PAGE.

Con el objetivo de concentrar la fracción monomérica de la proteína 3A, eluída de la columna de purificación, y así poder llevar a cabo posteriores análisis como el de su multimerización mediante el uso de agentes entrecruzantes (*crosslinkers*) (Xiang y col., 1998), se utilizó un dispositivo de filtración por centrifugación que contenía dos tipos de membranas de celulosa, YM-30 (tamaño mínimo retenido en la membrana ~36 kDa) e YM-100 (tamaño mínimo retenido en la membrana ~100 kDa). En estos experimentos se emplearon distintas condiciones de preparación de la muestra. Como puede verse en

la Fig.18, en ninguna de las condiciones examinadas y con ninguna de las membranas utilizadas se consiguió filtrar la fracción monomérica y así separarla de las fracciones multiméricas. Estos resultados sugieren que la proteína 3A completa, expresada en *E.coli* a partir de pRSETC-3A, forma agregados multimoleculares que no atraviesan el filtro del centrifugón por poseer un tamaño mayor al del tamaño mínimo retenido en la membrana, y que en las condiciones desnaturalizantes testeadas no se disocian; o bien que la proteína expresada en bacterias presenta una baja solubilidad que evita que pueda ser filtrada, mas aún al disminuir su volumen. Estos resultados obtenidos de la filtración hicieron que no pudiera realizarse la adición de agentes entrecruzantes para reproducir la multimerización de la proteína a partir de monómeros.

El análisis por espectroscopia de masas, permitió identificar péptidos con masas correspondientes a la proteína 3A en las dos bandas mayoritarias, una de tamaño correspondiente a la forma monomérica y la segunda con un tamaño mayor, recuperadas a partir de SDS-PAGE (Fig. 19), lo que confirmó que estas bandas correspondían a dímeros/multímeros de 3A.

Por otra parte, el rendimiento y pureza obtenidos con la proteína 3A expresada en *E.coli* no fueron suficientes para abordar su análisis estructural. La baja solubilidad de la proteína 3A de VFA expresada en bacterias ha sido descrita por otros autores (Fu y col., 2008; Lubroth y col., 1996; Priyadharshini y col., 2007). Este problema de solubilidad también se ha encontrado para la proteína 3A de PV expresada en *E.coli*, que solo pudo ser purificada a partir de cuerpos de inclusión cuando se expresó como una forma truncada que contenía solo su extremo N-ter, excluyendo la región correspondiente a los residuos hidrofóbicos del extremo C-ter. En el caso de VFA, dada la mayor longitud del extremo C-ter, la región hidrofóbica está localizada en el centro de la molécula, dividiéndola prácticamente en dos mitades. En un intento de llevar a cabo una aproximación similar a la empleada por PV, se optó por una estrategia de clonaje de una serie de fragmentos de la proteína en el plásmido pRSET-C, ninguno de los cuales contenía la región de aminoácidos hidrofóbicos (residuos 59 al 76). Las construcciones clonadas y expresadas incluyeron el fragmento G1 que contiene únicamente el extremo N-ter (residuos I1-F52), el fragmento G2 que abarca el extremo C-ter (residuos R82-E153) y dos versiones del extremo C-ter con 1 o las 3 copias de 3B respectivamente, G3, (G2+3B1) y G4 (G2+3B1B2B3). De los cuatro fragmentos expresados, solo se pudieron encontrar condiciones de purificación que permitían buenos rendimientos para el fragmento G4. No obstante, al analizar las muestras obtenidas para su estudio por

RMN los niveles pureza obtenidos no fueron suficientes para su empleo en estudios estructurales, ya que la banda proteica de tamaño correspondiente al fragmento G4 apareció en una proporción < 90% respecto a otras bandas que contaminaban la purificación.

Análisis de la expresión de la proteína 3A en *E.coli*

Las bacterias transformadas con los diferentes plásmidos construidos fueron utilizadas para caracterizar el efecto de la expresión de distintos fragmentos de 3ABBB en la célula bacteriana. En la última década, la biología celular bacteriana ha vivido una revolución gracias a los avances en las técnicas de imagen, fundamentalmente técnicas de *tracking in vivo* de macromoléculas dentro de las células. Esto ha cambiado la antigua concepción no compartimentalizada de la célula bacteriana, basada en la ausencia de orgánulos envueltos de membrana, a la de una célula con un alto grado de organización, cuya existencia es vital para los distintos procesos celulares (Shapiro y col., 2009). Actualmente se conoce que muchas proteínas bacterianas se localizan en dominios subcelulares específicos y regulan el desarrollo espacial de otras proteínas, DNA y lípidos. Las moléculas de RNA también se localizan específicamente, de manera que los patrones de distribución de las proteínas y sus correspondientes mRNAs presentan una correlación en su localización (Nevo-Dinur y col., 2012). Se han descrito diferentes patrones de localización de proteínas bacterianas y de proteínas exógenas expresadas en bacterias, habiéndose observado dentro de estas últimas, la localización en la membrana bacteriana de proteínas transmembrana expresadas en *E.coli* (Nevo-Dinur y col., 2011).

La localización de las proteínas bacterianas, fundamentalmente en lo que se refiere a la señal o *zip code* que determina la localización precisa tanto de los mRNAs como de las proteínas maduras, es un campo que está actualmente en desarrollo, existiendo aún muchas preguntas por responder (Nevo-Dinur y col., 2012). Los resultados de IF obtenidos al expresar las proteínas G2, G3 y, en menor medida, G4 en *E.coli* (Fig. 25) son compatibles con la localización de estas proteínas en la membrana plasmática. Esto sugiere que, a pesar de que estas proteínas carecen de la región hidrofóbica de la proteína 3A, aún mantienen un tropismo por membranas, lo que deja abierta la pregunta de cómo mantienen dicho tropismo.

La inducción de la formación de membranas intracelulares en *E.coli* se ha observado ocasionalmente para algunas proteínas, exógenas o endógenas de la bacteria, estando relacionada con la sobreexpresión de las mismas (Eriksson y col., 2009). Algunas de

estas proteínas sobreexpresadas son proteínas endógenas integrales de membrana (Arechaga y col., 2000; Herskovits y col., 2002; van Weeghel y col., 1990; von Meyenburg y col., 1984; Weiner y col., 1984; Wilkison y col., 1986), que inducen la formación de pilas de membranas o túbulos en el citoplasma, cerca y de manera continua, con la membrana interna (citoplasmática). También se han observado efectos similares con la sobreexpresión de proteínas de membrana exógenas, algunas de ellas virales, incluyendo la proteína 3A de VFA (Weber y col., 1996), como se comentó en R2.4, o la proteína sp6.6 del bacteriófago PM2 que induce la morfogénesis de membranas; estos últimos resultados fueron los primeros en sugerir que una proteína con dominios hidrofóbicos de unión a membranas, puede inducir el desarrollo de nuevas estructuras membranosas (Armour y col., 1990). Además, *E.coli* como muchas otras bacterias Gram-negativas, puede formar y desprender al entorno vesículas de su propia membrana externa (Kim y col., 2008; Mashburn-Warren y col., 2008).

Mediante análisis por microscopía electrónica de las bacterias que expresaban los distintos fragmentos de la proteína 3A, se pudieron observar ciertas alteraciones en la membrana externa (Fig. 27) así como la proliferación de estructuras membranosas, fundamentalmente en las células que expresaban el fragmento G1 (N-ter) (Fig. 28).

Se han sugerido distintos mecanismos, que se solapan entre ellos, para explicar cómo proteínas endógenas o exógenas pueden “expandir” o “curvar” las membranas de *E.coli*, formando eventualmente compartimentos membranosos. La capacidad de dimerizar de algunas de éstas proteínas, podría modificar la curvatura de las membranas, como se ha descrito para algunas proteínas en eucariotas (Lingwood y col., 2009; Vonck y col., 2009). Este efecto puede potenciarse si la proteína que dimeriza interacciona con la bicapa lipídica de manera monotópica como se ha visto en sistemas no bacterianos (Reinbothe y col., 1999). De esta manera, el extremo N-ter de la proteína 3A de VFA, donde se encuentra localizado el dominio de dimerización de la proteína (ver mas adelante), podría estar implicado en la alteración y proliferación de membranas en *E.coli* observada.

También se ha determinado que la presencia de cargas positivas en los residuos de la proteína próximos a la interfaz con la membrana, pueden tener importancia en su interacción con esta. Se ha observado que, tanto en proteínas periféricas como transmembrana, sus residuos cargados positivamente interaccionan con fosfolípidos aniónicos como el fosfatidilglicerol y la cardiolipina, especialmente cuando se distribuyen en pares (Epanand y col., 2007; Marius y col., 2012). Los residuos de K y R se

encuentran frecuentemente en las interfaces de proteínas de membrana monotópicas, así como residuos de H. También los residuos hidrofóbicos L, Y y W tendrían un papel fundamental en el anclaje de las proteínas monotópicas a membranas (Granseth y col., 2005). Al analizar la secuencia de la proteína 3A se observa la presencia de residuos K, R y H (indicados en la Fig. 52 en rojo, amarillo y verde, respectivamente) flanqueando la región transmembrana, por lo que es posible que en la interacción de la proteína 3A con membranas participen también éstas interacciones.

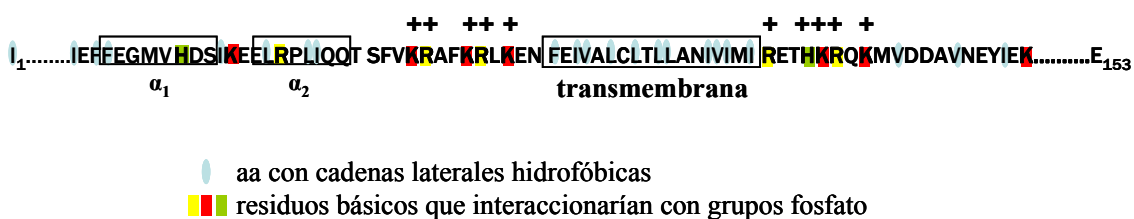


Figura. 52. Secuencia de la proteína 3A resaltando en colores los residuos básicos y los hidrofóbicos. En cajas rectangulares se indican la región hidrofóbica y las dos hélices- α predichas según el modelo molecular (R3). Se puede visualizar la acumulación de cargas positivas flanqueando la región hidrofóbica, indicadas con un signo + en la parte superior de la secuencia.

Interacción de la proteína 3A con membranas de células eucarióticas

La replicación de los virus RNA de polaridad positiva está íntimamente asociada a membranas. Como se comentó en la Introducción, se postula que esto le confiere al virus ventajas tanto para su replicación como para su protección frente a los mecanismos celulares de la inmunidad innata (Belov y col., 2012). Para la proteína 3A de VFA se había descrito su interacción con membranas celulares, pero dicha interacción no estaba caracterizada. Como era de esperar de su capacidad para establecer estas interacciones, el modelo molecular desarrollado (Fig. 29), indica que 3A posee un dominio hidrofóbico de anclaje a membranas en la región comprendida entre los residuos 59-76.

Como un primer paso al análisis de su interacción con membranas de células eucariotas, se realizó una separación de fracciones solubles e insolubles por centrifugación, en células transfectadas con la proteína 3Awt, donde se observó que un 54% de la proteína se recuperaba en la fracción insoluble, lo que está en concordancia con estudios similares previos (Moffat y col., 2005). También se analizó la solubilidad de los mutantes generados para desestabilizar la región de dimerización (L38E y L41E),

encontrándose que éstas mutaciones puntuales no alteraban en gran medida la solubilidad de la proteína completa. Sin embargo, cuando se deletó la región N-ter (mutante NTT) se observó un pronunciado aumento de la proteína en la fracción soluble, lo cual indica que podría haber una asociación entre el extremo N-ter de la proteína y su interacción con membranas que repercuta en la solubilidad de la proteína dentro de la célula. Al analizar los mutantes de delección G1 y G1t, el comportamiento fue el esperado, ya que G1 tiene deletado todo el C-ter incluyendo la región hidrofóbica, mientras que en G1t solo carece del extremo C-ter. Como se observa en la Fig. 49, la fracción soluble de G1 aumentó y la de G1t disminuyó en relación a la proteína 3A wt. Por tanto, mantener la región de anclaje a membranas hace a la proteína menos soluble. Otro factor a tener en cuenta en la solubilidad son las diferencias en el pI; como se observa en la Tabla 9 la proteína 3A tiene un pI de 4,6 mientras que 3ABBB lo tiene de 9,28 con lo que este cambio en la carga neta de la proteína podría explicar la diferencia de solubilidad observada entre ambas proteínas.

El empleo de tratamientos bioquímicos para caracterizar la interacción de la proteína 3Awt expresada transitoriamente con las membranas celulares mostró que la solubilidad de la proteína se ve alterada en condiciones de mayor fuerza iónica y de pH básico, si bien las condiciones más exigentes son las que tienen mayor efecto, como el agente caotrópico (urea) y más aún el detergente (Tritón X-100) (Fig. 50). Este comportamiento parece indicar que, como está descrito para la proteína 3AB de PV en la modelización de su topología dentro del complejo de replicación (ver Introducción), podrían haber determinados “momentos” o estadios en los que la proteína adquiera cierta disposición en relación a su interacción con membranas que podría ser tipo periférica y “otros” en los que podría adquirir una topología transmembrana.

El ensayo de expresión transitoria utilizado no reproduce el contexto de la infección viral, en el que la proteína 3A puede interactuar con otras PNE virales. Asumiendo esta limitación, los resultados obtenidos indican que 3A parece poder comportarse de manera polivalente en su capacidad para interactuar con las membranas de la célula hospedadora, ya que una parte de la misma no se asocia con dichas membranas (fracción soluble), mientras que parte de la que sí lo hace (fracción insoluble) se comporta como una proteína periférica y otra parte como una proteína transmembrana.

Para completar el análisis de la interacción de la proteína 3Awt con membranas celulares se descartó que la misma estuviera asociada a *lipid rafts* (Fig. 51).

Dimerización de la proteína 3A

La dimerización y multimerización de proteínas es un proceso biológico común. Estudios biofísicos y estructurales recientes muestran que este mecanismo es un factor clave en la regulación de distintas funciones de las proteínas (Marianayagam y col., 2004), incluyendo proteínas relevantes para la replicación viral (Li y col., 2009). Dentro de los picornavirus, se ha descrito recientemente la implicación y relevancia de la dimerización/multimerización de proteínas no estructurales en su ciclo biológico (Cameron y col., 2010; Cuconati y col., 1998; Samuilova y col., 2004; Zell y col., 2005), incluyendo la proteína 2C de VFA (Sweeney y col., 2010).

Durante el análisis de la proteína 3A expresada en *E.coli* se obtuvieron resultados compatibles con la dimerización /multimerización de la misma. Debido a los problemas experimentales encontrados para obtener información estructural directa a partir de la proteína 3A, comentados anteriormente, se hizo evidente la necesidad de disponer de un modelo estructural para la misma. El modelo desarrollado predice la existencia de una región estructurada en el extremo N-ter de 3A, formada por dos hélices α y conectadas por un bucle con los residuos cargados K35, E36 y la I34 (Fig. 29). En PV (Strauss y col., 2003) y CVB3 (Wessels y col., 2007) éste bucle está formado únicamente por residuos con cargas negativas. A continuación se encuentra una región hidrofóbica de interacción con membranas (residuos 59-76) y finalmente una región C-ter no estructurada para la que, al no disponer de información estructural de proteínas análogas de otros picornavirus (en los que este extremo C-ter se reduce a pocos residuos, 7 en PV), no se pudo predecir su estructura. Según este modelo 3A forma homodímeros, cuya estabilidad física se debe, fundamentalmente, a interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales de los residuos localizados en las hélices α , que interaccionan de manera antiparalela, de forma similar a lo descrito para PV y CVB3. La interfaz de dimerización incluye residuos encontrados entre las posiciones 25-44 de ambos monómeros, siendo los que contribuyen fundamentalmente a la misma: F25, F26, M29, V30, L38, L41 e I42. A partir de este modelo se puede predecir que sustituciones que introduzcan interacciones electrostáticas en el *core* hidrofóbico pueden ser capaces de desestabilizar el dímero. Basándonos en esta predicción, se diseñaron mutantes en los residuos L38 y L41 que introducían cargas electrostáticas negativas en el *core* hidrofóbico mediante la sustitución de L por E.

Al analizar la expresión transitoria de la proteína 3Awt y la de los mutantes 3AL38E y 3AL41E en células Vero, se obtuvieron resultados compatibles con la

dimerización/multimerización de la proteína wt así como la implicación en la dimerización de los residuos sustituidos. De esta manera, el ensayo de *Western blot* utilizando un Ac frente al extremo C-ter de la proteína, reveló que 3Awt migraba como una banda mayoritaria de tamaño correspondiente a su forma monomérica, observándose también otras bandas de menor movilidad electroforética, una intermedia que podría corresponder a dímeros, así como otras de mayor tamaño compatibles con multímeros (Fig. 30). En las proteínas mutantes L38E y L41E, las bandas de menor migración correspondientes a dímeros y multímeros disminuyeron apreciablemente, lo que apoya la relevancia del mantenimiento de las interacciones hidrofóbicas para la estabilidad del dímero. El doblete observado para la banda mayoritaria monomérica, ha sido descrito con anterioridad (García-Briones y col., 2006); aunque el origen de esta doble migración no se ha determinado, podría deberse a la proteólisis específica de 3A, a formas con diferentes modificaciones postraduccionales o a diferentes conformaciones de la proteína, resistentes a las condiciones desnaturizantes del ensayo. Este doblete no se observó en la proteína mutante 3AL38E.

Aunque el análisis de la migración de proteínas en SDS-PAGE ha sido empleado para el estudio de la dimerización de la proteína 3A de otros picornavirus, como PV (Xiang y col., 1998), se trata de una técnica en la que las proteínas se analizan en condiciones desnaturizantes lejanas a las existentes en el ambiente celular. Una alternativa para el estudio de este tipo de interacciones es el uso de sistemas de doble híbrido (Chien y col., 1991), que han sido empleados para detectar interacciones entre PNE de diferentes picornavirus (de Jong y col., 2002; Ishikawa y col., 2010; Liu y col., 2010; Teterina y col., 2006; Xiang y col., 1998; Yin y col., 2007).

Para continuar la caracterización de la capacidad de dimerización de la proteína 3A de VFA se decidió emplear una adaptación del sistema de doble híbrido a células de mamífero (Dang y col., 1991; Fearon y col., 1992). Con los plásmidos control (descritos en M11), se obtuvieron valores de actividad del gen reportero (Act Luc) altos, tal y como estaba descrito (Zurcher y col., 1996) (Fig. 31A). Sin embargo, los incrementos de la Act Luc encontrados para la proteína 3A fueron bajos, lo que limitó la significación de los resultados obtenidos con las proteínas mutantes analizadas. Como se muestra en la Fig. 31B, no se detectó interacción para la proteína completa (pareja 3A-3A), pero sí entre el extremo N-ter de 3A y la proteína entera (pareja G1-3A). Uno de los factores que posiblemente redujo la obtención de señal en este sistema es la capacidad de la proteína 3A de interactuar con membranas celulares, ya que una de

las limitaciones de este sistema de doble híbrido es que las proteínas en estudio son dirigidas al núcleo (Usui y col., 2005), por lo que esta estrategia está principalmente indicada para proteínas solubles (Stagljar y col., 1998). Teniendo esto en cuenta, es posible que dado que el fragmento G1 carece de la región hidrofóbica de unión a membranas, su solubilidad sea mayor que la de los restantes fragmentos analizados, por lo que solamente se observe un aumento en la Act Luc cuando G1 sea uno de los miembros de la pareja de proteínas analizada. Considerando entonces como la única interacción detectada por ésta técnica la de la pareja pMG1-pVP163A, se decidió incluir los mutantes de 3A L38E, L41E y C65S en el ensayo. De esta manera se mantuvo el plásmido pMG1 en su versión wt y las mutaciones se introdujeron en el plásmido pVP163A. Como observa en la Fig. 32, la bajada de Act Luc encontrada para los mutantes L38E, L41E y C65S, sugiere que estas mutaciones desfavorecen la interacción, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Como alternativa al estudio de la dimerización de 3A a nivel intracelular se puso a punto la técnica de PLA *in situ* para determinar la presencia de homodímeros de esta proteína tanto en células infectadas como en células que expresaban transitoriamente la proteína wt. Con esta técnica se analizaron, también, las proteínas mutantes 3AL38E y 3AL41E, así como el doble mutante 3AL38EL41E, ya que los mutantes individuales podían dar lugar a situaciones intermedias, más difíciles de cuantificar. De hecho la demostración de la implicación de diferentes residuos en la dimerización de proteínas 3A de otros picornavirus se ha realizado empleando dobles mutantes de esta proteína (Wessels y col., 2006). Como se observa en la Fig. 34, en células infectadas con VFA se pudo detectar, mediante la técnica de PLA *in situ*, una clara señal de fluorescencia correspondiente a homodímeros de 3A, lo que confirma la capacidad de esta proteína para dimerizar en la célula infectada. El análisis del efecto de las sustituciones L38E y L41E no se pudo llevar a cabo empleando virus que contuviesen estas mutaciones, ya que, como se comentará posteriormente, estos virus mutantes tienen un importante defecto en su capacidad para multiplicarse y solo es posible recuperar virus en los que la mutación había sido revertida. Por todo ello, se decidió estudiar el efecto de estas mutaciones sobre la capacidad de dimerizar de la proteína 3A expresada transitoriamente. Dado que el porcentaje de células transfectadas con el plásmido pRSV3A es bajo (< 20%), tras la amplificación por PLA se llevó a cabo una IF con un Ac frente al extremo C-ter de 3A para poder identificar las células transfectadas, lo que permitió cuantificar la fluorescencia correspondiente a la señal de PLA en aquellas

células que expresaban la proteína wt y las proteínas mutantes estudiadas. En este ensayo, la expresión de la proteína 3A en las células transfectadas no está sincronizada, por lo que existen células con niveles saturantes de expresión que no fueron incluidas en el análisis. Por otra parte, todas las células que presentaban niveles de fluorescencia no saturados fueron incluidas en el análisis, para no inducir sesgo en el muestreo. Estos factores hacen que las desviaciones estándar sean considerables, por lo que fue necesario trabajar con tamaños muestrales altos ($n > 40$) para poder obtener resultados estadísticamente significativos. Los resultados obtenidos de esta manera muestran una diferencia significativa en el porcentaje de intensidad de fluorescencia de las células que expresan proteínas 3A mutantes con respecto a las que expresan la 3Awt, indicando que las posiciones mutagenizadas tienen una implicación en la dimerización, y que el efecto de las mutaciones es aditivo, ya que la diferencia es mayor para el doble mutante que para los mutantes individuales (Fig. 35B).

Como continuación del estudio de la dimerización se emplearon péptidos sintéticos de la región N-ter de la proteína 3A, caracterizándose, primeramente, la movilidad electroforética del péptido de 52 aa correspondientes a esta región (residuos I1 a F52) de la proteína 3A wt. La tinción de los geles con Azul de Coomasie mostró la presencia de una banda correspondiente al monómero y de bandas compatibles con formas diméricas y multiméricas (Fig. 36). Cuando el mismo gel se reveló por *Western blot* empleando los Ac 443 y 479 –generados en esta Tesis Doctoral (ver apartado R2.5), dado que los disponibles en el laboratorio no reconocían el péptido N-ter– se detectaron las mismas bandas que tras la tinción por masa, aunque en este caso la intensidad de la tinción de la forma monomérica fue menor. Por tanto, los Ac utilizados reconocen preferentemente las formas multiméricas del péptido N-ter, lo que podría deberse a la multimerización del epítipo reconocido por el Ac y/o a cambios en la conformación de las formas multiméricas del péptido, respecto al monómero. Una vez comprobado que el péptido N-ter reproducía la formación de dímeros y multímeros observada con la proteína 3Awt completa, se sintetizaron versiones de este péptido con los reemplazamientos L38E, L41E y L38EL41E, que introducen una carga electrostática en el *core* hidrofóbico de 3A, así como el reemplazamiento M29R, para el que se predecía un efecto similar (Fig. 29B). La tinción de los geles obtenidos con Azul de Coomasie reveló, para todos ellos, la presencia de una única banda correspondiente a su forma monomérica (Fig. 37). Este resultado se repitió en los análisis por *Western blot*, siendo el péptido Nter-M29R el único para el que se observó una leve banda correspondiente al dímero que, dado que no

se aprecia en la tinción por masa, debe corresponder a una fracción minoritaria. Por otra parte, las pequeñas diferencia de movilidad observada entre las formas monoméricas de los distintos péptidos comparados, podrían corresponder a las sustituciones incorporadas que agregan aminoácidos cargados en los péptidos mutantes. De hecho, se han descrito diferencias de movilidad electroforética similares utilizando péptidos de 48 residuos con cambios en un aminoácido (Rath y col., 2009). En este experimento de *Western blot* (Fig. 37), el péptido Nter-L38E fue poco reconocido por el Ac 479. Dado que estos Ac (443 y 479) fueron obtenidos inmunizando conejos con el péptido CFE de secuencia wt (apartado M10 y R2.5), el reemplazamiento L38E podría afectar el reconocimiento del péptido por estos Ac. Alternativamente, la adquisición de la carga negativa que representa la sustitución L38E podría primar un cambio conformacional que limitase el reconocimiento por el Ac. En conjunto, estos resultados apoyan la implicación del *core* hidrofóbico, que predice el modelo molecular utilizado, en la estabilidad de los dímeros que la proteína 3A es capaz de formar; en particular la contribución de los residuos L38, L41 y M29.

Como se comentó anteriormente, la relevancia potencial en la biología del VFA de las sustituciones en el *core* hidrofóbico estudiadas había llevado a introducirlas en el clon infeccioso pMT28, para analizar de su efecto sobre la infectividad del RNA viral (Postigo, 2009). Los resultados obtenidos indicaron que las sustituciones L38E y L41E afectan severamente la multiplicación viral, recuperándose virus con pseudoreversiones (E38V y E41A) que restauran el carácter hidrofóbico de los residuos. Asimismo, los RNA mutantes perdieron la capacidad de producir letalidad en ratones lactantes (Gonzalez-Magaldi y col., 2012). Estos resultados confirman la relevancia de la región hidrofóbica localizada entre los residuos 25 y 44 de 3A para la multiplicación de VFA, lo que apoya que la dimerización de 3A sea necesaria para la infectividad del virus.

La posibilidad de interferir funciones importantes de proteínas, como puede ser su dimerización, empleando péptidos u otras moléculas mediante tecnología de transducción de péptidos (CPP, *cell penetrating peptides*), es un área de reciente interés (Gupta y col., 2005; Loiarro y col., 2005; Orange y col., 2008; Wender y col., 2012).

En esta línea, será interesante explorar si la inhibición de la dimerización de 3A es factible y si puede llegar a constituir una alternativa terapéutica frente a la infección por VFA y, eventualmente, por otros picornavirus.

Dinámica de la proteína 3A *in vivo*

Una de las herramientas más importantes para el estudio de procesos dinámicos en células *in vivo* sigue siendo la microscopía óptica. Además de los avances sustanciales en “equipamiento óptico” (*optic hardware*) y en el desarrollo de detectores de imagen electrónicos cada vez mas sensibles, un factor clave en éste campo ha sido el descubrimiento, clonaje y expresión de la proteína GFP de medusa (Stephens y col., 2003), cuya fusión con la proteína de interés permite su localización a tiempo real. Para realizar el estudio detallado del tipo de movimiento de subpoblaciones de componentes intracelulares, es necesario realizar el *tracking* o seguimiento de partículas individuales mediante microscopía *time lapse* (Saxton y col., 1997).

La construcción en la que el extremo N-ter de 3A se fusionó con el extremo C-ter de GFP, mostró una distribución celular similar a la descrita para la proteína 3Awt en células infectadas (Fig. 40) (Garcia-Briones y col., 2006). Las imágenes correspondientes al movimiento de esta proteína GFP3A, obtenidas por microscopía *time lapse*, mostraron que los puntos fluorescentes se localizaban, preferentemente en la región perinuclear y presentaban un movimiento confinado, como se muestra en la Fig. 42A y en el video suplementario (ver CD que se adjunta). Una de las mayores limitaciones técnicas para cuantificar este proceso es la de aplicar criterios de “vinculación de las partículas mas cercanas” en el momento del *tracking*, que, como se explicó en M18.1, se realizó manualmente. En el *tracking* de partículas fluorescentes, que generalmente tienen un aspecto similar, la información entre una serie de imágenes consecutivas deja una ambigüedad potencial, donde los puntos entre una imagen y la siguiente pueden desaparecer, reaparecer, separarse o unirse (Meijering y col., 2012; Smal y col., 2010). Por lo tanto, las conclusiones de este apartado son cualitativas y haría falta analizar un número considerablemente mayor de puntos (y de células), e idealmente, un sistema automatizado de *tracking* para poder cuantificar la velocidad de los puntos fluorescentes correspondientes a 3A. Esta limitación es particularmente evidente a la hora de intentar evaluar el efecto de diferentes mutaciones en 3A sobre su dinámica.

En combinación con las técnicas de microscopía *time lapse*, se ha analizado la fracción móvil de la proteína de fusión en el citoplasma de células transfectadas mediante la técnica de FRAP. Una de las ventajas de este ensayo es que no tiene las limitaciones técnicas mencionadas anteriormente, ya que no es necesario utilizar criterios subjetivos en su cuantificación. En este análisis se incluyeron los distintos mutantes de la proteína

3A fusionada a GFP. En los ensayos de FRAP que utilizan expresiones transitorias de proteínas se recomienda trabajar entre las 16 y 36 h p.t., determinando empíricamente las condiciones óptimas de expresión para cada sistema (Snapp y col., 2003). Al realizar una cinética a distintos tiempos p.t. con la proteína GFP3Awt (Fig. 44), se observó que su movilidad disminuía con el tiempo, encontrándose el mayor valor de movilidad a las 6 h p.t. Asumiendo que la menor movilidad de la proteína 3A a tiempos posteriores (24 h) era debida a su interacción con membranas, y dado que nos interesaba estudiar el efecto de diferentes mutaciones sobre esta interacción, los ensayos posteriores se llevaron a cabo a 24 h p.t. Los resultados de la comparación de la movilidad de la proteína wt con los mutantes analizados (Fig. 45) sugieren que algunos de los cambios que afectan su capacidad de formar dímeros o multímeros, como los que presentan las construcciones GFP3AL41E y GFPNTT, modifican su movilidad en el citoplasma, aumentándola. Sin embargo, la proteína GFP3AL38E no presentó diferencias de movilidad con la versión wt. Así mismo, el mutante en la C65 así como el mutante de delección G1t también presentaron una mayor movilidad. Estos resultados indican que la movilidad de la proteína es una característica que puede verse afectada al alterar la estructura o composición de la proteína de múltiples maneras y no depende de un único factor y aparentemente no está directamente relacionada con la dimerización. También se ha visto que en células transfectadas aproximadamente el 50% de la proteína 3A se une a membranas a 24 h p.t., resultado que es consistente con la movilidad observada a las 24 h p.t. y refleja que en tiempos anteriores se podría encontrar mayor cantidad de proteína soluble.

Finalmente se ha analizado mediante la técnica de FLIP el comportamiento de la proteína de fusión GFP3A. En esta técnica, si las moléculas fluorescentes son completamente móviles y tienen acceso a la región que es repetidamente “apagada” por *photobleaching*, la célula puede reducir totalmente su fluorescencia, como sucede con el plásmido control pIgLdR1KDEL-RFP (Fig. 47). Con la proteína GFP3A, el comportamiento observado fue similar (Fig. 48). Considerando que estos resultados brindan información sobre la conectividad de las estructuras que contienen la quimera GFP3A (Snapp y col., 2003), se puede inferir que su localización en el citoplasma tiene cierta continuidad o conectividad. Aunque queda por determinar el origen de esta continuidad, podría tratarse del RE, para el que existen evidencias de su colocalización parcial con la proteína 3A (García-Briones y col., 2006; O'Donnell y col., 2001). De confirmarse este resultado, indicaría que, en los tiempos tempranos tras la infección con

VFA, anteriores a la reorganización de endomembranas asociada con la replicación generalizada del virus, la proteína 3A interactuaría con membranas de éste orgánulo celular.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Durante la infección con VFA de células BHK-21, la primer PNE detectada por *Western blot* a las 2,5 h post-infección es 2C, seguida de P1, 2BC y 3ABBB que lo son a las 3 h post-infección. A las 4 h post-infección se detectan todas las PNE, con excepción de 2B cuya expresión no pudo ser analizada.
2. La expresión en *E.coli* de la proteína 3A, principalmente la de su fragmento N-ter (G1), induce modificaciones en las membranas bacterianas; la localización observada para los fragmentos C-ter (G2) y C-ter-3B (G3) es compatible con la esperada para una proteína de membrana.
3. La proteína 3A de VFA forma dímeros y multímeros detectables electroforéticamente tanto cuando se expresa en *E.coli* como en células eucarióticas. Esta capacidad de formar dímeros se detecta también *in situ*, tanto en células infectadas como en células que expresan la proteína de forma transitoria.
4. El modelo molecular obtenido muestra que el extremo N-ter de 3A se estructura como un dímero, donde cada monómero presenta dos hélices α (α_1 , residuos 25-33 y α_2 , residuos 37-44) conectadas por un bucle de tres residuos I34, K35 y E36. A continuación se encuentra una región hidrofóbica responsable de su interacción con membranas. Conforme con este modelo, los contactos hidrofóbicos que se establecen entre las hélices α de los monómeros proporciona estabilidad física al dímero, siendo los principales residuos implicados: F25, F26, M29, V30, L38, L41 e I42.
5. Las mutaciones L38E, L41E y el doble mutante L38EL41E, que introducen aminoácidos cargados en el entorno hidrofóbico de la hélice α_2 , desestabilizan la dimerización de la proteína; lo que confirma el modelo molecular y la relevancia de las interacciones hidrofóbicas para la estabilidad del dímero.
6. El extremo N-ter de 3A reproduce la capacidad de formar dímeros y multímeros, ya que un péptido sintético que contiene los residuos I1-F52 muestra bandas correspondientes a dímeros y multímeros del mismo en SDS-PAGE. Estas bandas

no se observan con versiones del péptido que contienen las sustituciones L38E, L41E y M29R.

7. La proteína 3A muestra un comportamiento “polivalente” en su interacción con membranas celulares, similar al descrito para la proteína 3A de PV. De esta manera, una fracción de 3A (46%) se recupera como proteína soluble. Dentro de la fracción que se asocia a membranas, una parte lo hace siguiendo el patrón de solubilización de proteínas periféricas de membrana y la otra el de proteínas integrales de membrana.
8. La proteína de fusión GFP3A expresada transitoriamente en células Vero presenta una movilidad citoplasmática confinada, habiéndose determinado mediante la técnica de FRAP que posee una fracción móvil de 20-50 % a las 24 h p.t. Esta movilidad en el citoplasma aumenta cuando se introducen las mutaciones L41E, C65S y en los mutantes de delección NTT y G1t.
9. La movilidad de la proteína en el citoplasma, estimada mediante la técnica de FLIP, es compatible con su localización en un compartimento continuo o que posea conectividad dentro de la célula.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D. y Brown, F. (1989).** The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* **337**, 709-716.
- Aldabe, R. y Carrasco, L. (1995).** Induction of membrane proliferation by poliovirus proteins 2C and 2BC. *Biochemical and biophysical research communications* **206**, 64-76.
- Alexandersen, S. y Mowat, N. (2005).** Foot-and-mouth disease: host range and pathogenesis. *Current topics in microbiology and immunology* **288**, 9-42.
- Ambros, V., Pettersson, R. F. y Baltimore, D. (1978).** An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirus RNA and the 5' terminal protein. *Cell* **15**, 1439-1446.
- Andino, R., Boddeker, N., Silvera, D. y Gamarnik, A. V. (1999).** Intracellular determinants of picornavirus replication. *Trends in microbiology* **7**, 76-82.
- Ansardi, D. C., Porter, D. C. y Morrow, C. D. (1992).** Myristylation of poliovirus capsid precursor P1 is required for assembly of subviral particles. *Journal of virology* **66**, 4556-4563.
- Antonio, L. S., Stewart, A. P., Xu, X. J., Varanda, W. A., Murrell-Lagnado, R. D. y Edwardson, J. M. (2011).** P2X4 receptors interact with both P2X2 and P2X7 receptors in the form of homotrimers. *British journal of pharmacology* **163**, 1069-1077.
- Aramburu, H. G. (1949).** A comparison of different methods of inoculating guinea-pigs with the virus of foot-and-mouth disease. *The Journal of comparative pathology and therapeutics* **59**, 42-47.
- Arechaga, I., Miroux, B., Karrasch, S., Huijbregts, R., de Kruijff, B., Runswick, M. J. y Walker, J. E. (2000).** Characterisation of new intracellular membranes in *Escherichia coli* accompanying large scale over-production of the b subunit of F(1)F(o) ATP synthase. *FEBS letters* **482**, 215-219.
- Arita, M., Kojima, H., Nagano, T., Okabe, T., Wakita, T. y Shimizu, H. (2011).** Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is a target of enviroxime-like compounds for antipoliovirus activity. *Journal of virology* **85**, 2364-2372.
- Armas-Portela, R., Parrales, M. A., Albar, J. P., Martinez, A. C. y Avila, J. (1999).** Distribution and characteristics of betaII tubulin-enriched microtubules in interphase cells. *0014-4827 (Print) Journal Article* **248**, 372-380.
- Armour, G. A. y Brewer, G. J. (1990).** Membrane morphogenesis from cloned fragments of bacteriophage PM2 DNA that contain the sp6.6 gene. *Faseb J* **4**, 1488-1493.
- Bagos, P. G., Liakopoulos, T. D. y Hamodrakas, S. J. (2006).** Algorithms for incorporating prior topological information in HMMs: application to transmembrane proteins. *BMC bioinformatics* **7**, 189.
- Baranowski, E., Molina, N., Nuñez, J. I., Sobrino, F. y Saiz, M. (2003).** Recovery of infectious foot-and-mouth disease virus from suckling mice after direct inoculation with in vitro-transcribed RNA. *Journal of virology* **77**, 11290-11295.
- Baranowski, E., Sevilla, N., Verdaguer, N., Ruiz-Jarabo, C. M., Beck, E. y Domingo, E. (1998).** Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Journal of virology* **72**, 6362-6372.
- Barteling, S. J. y Vreeswijk, J. (1991).** Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* **9**, 75-88.

- Baxt, B. y Becker, Y. (1990).** The effect of peptides containing the arginine-glycine-aspartic acid sequence on the adsorption of foot-and-mouth disease virus to tissue culture cells. *Virus genes* **4**, 73-83.
- Beard, C. W. y Mason, P. W. (2000).** Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *Journal of virology* **74**, 987-991.
- Belov, G. A., Altan-Bonnet, N., Kovtunovych, G., Jackson, C. L., Lippincott-Schwartz, J. y Ehrenfeld, E. (2007).** Hijacking components of the cellular secretory pathway for replication of poliovirus RNA. *Journal of virology* **81**, 558-567.
- Belov, G. A., Feng, Q., Nikovics, K., Jackson, C. L. y Ehrenfeld, E. (2008).** A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication. *PLoS Pathog* **4**, e1000216.
- Belov, G. A., Nair, V., Hansen, B. T., Hoyt, F. H., Fischer, E. R. y Ehrenfeld, E. (2012).** Complex dynamic development of poliovirus membranous replication complexes. *Journal of virology* **86**, 302-312.
- Belov, G. A., Romanova, L. I., Tolskaya, E. A., Kolesnikova, M. S., Lazebnik, Y. A. y Agol, V. I. (2003).** The major apoptotic pathway activated and suppressed by poliovirus. *Journal of virology* **77**, 45-56.
- Belsham, G. J. y Bostock, C. J. (1988).** Studies on the infectivity of foot-and-mouth disease virus RNA using microinjection. *The Journal of general virology* **69** (Pt 2), 265-274.
- Belsham, G. J. y Brangwyn, J. K. (1990).** A region of the 5' noncoding region of foot-and-mouth disease virus RNA directs efficient internal initiation of protein synthesis within cells: involvement with the role of L protease in translational control. *Journal of virology* **64**, 5389-5395.
- Belsham, G. J. y Martinez-Salas, E. (2004).** Genome Organization, Translation and Replication of Foot-and-Mouth Disease Virus RNA. In *Foot and Mouth disease Current Perspectives*.
- Belsham, G. J., McInerney, G. M. y Ross-Smith, N. (2000).** Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *Journal of virology* **74**, 272-280.
- Bergeron, J. J., Brenner, M. B., Thomas, D. Y. y Williams, D. B. (1994).** Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends in biochemical sciences* **19**, 124-128.
- Berinstein, A., Roivainen, M., Hovi, T., Mason, P. W. y Baxt, B. (1995).** Antibodies to the vitronectin receptor (integrin alpha V beta 3) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *Journal of virology* **69**, 2664-2666.
- Bhattacharya, B. y Roy, P. (2010).** Role of lipids on entry and exit of bluetongue virus, a complex non-enveloped virus. *Viruses* **2**, 1218-1235.
- Bhattacharya, S., Banerjee, R., Ghosh, R., Biswas, A. y Chatterjee, A. (2003).** Identification of foot-and-mouth disease from a captive kangaroo in a zoological garden in India. *The Veterinary record* **153**, 504-505.
- Bienz, K., Egger, D. y Pasamontes, L. (1987).** Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* **160**, 220-226.
- Bienz, K., Egger, D., Rasser, Y. y Bossart, W. (1983).** Intracellular distribution of poliovirus proteins and the induction of virus-specific cytoplasmic structures. *Virology* **131**, 39-48.

- Birtley, J. R., Knox, S. R., Jaulent, A. M., Brick, P., Leatherbarrow, R. J. y Curry, S. (2005).** Crystal structure of foot-and-mouth disease virus 3C protease. New insights into catalytic mechanism and cleavage specificity. *The Journal of biological chemistry* **280**, 11520-11527.
- Bittle, J. L., Houghten, R. A., Alexander, H., Shinnick, T. M., Sutcliffe, J. G., Lerner, R. A., Rowlands, D. J. y Brown, F. (1982).** Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* **298**, 30-33.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254.
- Brasier, A. R., Tate, J. E. y Habener, J. F. (1989).** Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. *BioTechniques* **7**, 1116-1122.
- Brown, D. A. y Rose, J. K. (1992).** Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533-544.
- Brown, F. (1998).** Problems with BHK 21 cells. *Developments in biological standardization* **93**, 85-88.
- Cameron, C. E., Oh, H. S. y Moustafa, I. M. (2010).** Expanding knowledge of P3 proteins in the poliovirus lifecycle. *Future microbiology* **5**, 867-881.
- Cantrell, S. A., Casali, N. y Preston, A. (2003).** Vectors for the Expression of Recombinant Proteins in E.coli. E.coli Plasmid Vectors. In *E coli plasmid vectors*, pp. 257-275. Edited by J. M. Walker: Humana Press.
- Cao, X., Bergmann, I. E., Fullkrug, R. y Beck, E. (1995).** Functional analysis of the two alternative translation initiation sites of foot-and-mouth disease virus. *Journal of virology* **69**, 560-563.
- Capella, G. L. (2001).** Foot and mouth disease in human beings. *Lancet* **358**, 1374.
- Carrillo, C., Tulman, E. R., Delhon, G., Lu, Z., Carreno, A., Vagnozzi, A., Kutish, G. F. y Rock, D. L. (2005).** Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *Journal of virology* **79**, 6487-6504.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. y Prasher, D. C. (1994).** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science (New York, NY)* **263**, 802-805.
- Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R. y Fields, S. (1991).** The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 9578-9582.
- Cho, M. W., Teterina, N., Egger, D., Bienz, K. y Ehrenfeld, E. (1994).** Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology* **202**, 129-145.
- Choe, S. S., Dodd, D. A. y Kirkegaard, K. (2005).** Inhibition of cellular protein secretion by picornaviral 3A proteins. *Virology* **337**, 18-29.
- Choe, S. S. y Kirkegaard, K. (2004).** Intracellular topology and epitope shielding of poliovirus 3A protein. *Journal of virology* **78**, 5973-5982.
- Clarke, B. E., Sangar, D. V., Burroughs, J. N., Newton, S. E., Carroll, A. R. y Rowlands, D. J. (1985).** Two initiation sites for foot-and-mouth disease virus polyprotein in vivo. *The Journal of general virology* **66 (Pt 12)**, 2615-2626.

- Cole, N. B., Smith, C. L., Sciaky, N., Terasaki, M., Edidin, M. y Lippincott-Schwartz, J. (1996).** Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science (New York, NY)* **273**, 797-801.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. y Falkow, S. (1996).** FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33-38.
- Cowan, K. M. y Trautman, R. (1965).** Antibodies Produced by Guinea Pigs Infected with Foot-and-Mouth Disease Virus. *J Immunol* **94**, 858-867.
- Crawford, N. M. y Baltimore, D. (1983).** Genome-linked protein VPg of poliovirus is present as free VPg and VPg-pUpU in poliovirus-infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 7452-7455.
- Cuconati, A., Xiang, W., Lahser, F., Pfister, T. y Wimmer, E. (1998).** A protein linkage map of the P2 nonstructural proteins of poliovirus. *Journal of virology* **72**, 1297-1307.
- Curry, S., Abrams, C. C., Fry, E., Crowther, J. C., Belsham, G. J., Stuart, D. I. y King, A. M. (1995).** Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *Journal of virology* **69**, 430-438.
- Dang, C. V., Barrett, J., Villa-Garcia, M., Resar, L. M., Kato, G. J. y Fearon, E. R. (1991).** Intracellular leucine zipper interactions suggest c-Myc hetero-oligomerization. *Molecular and cellular biology* **11**, 954-962.
- Datta, U. y Dasgupta, A. (1994).** Expression and subcellular localization of poliovirus VPg-precursor protein 3AB in eukaryotic cells: evidence for glycosylation in vitro. *Journal of virology* **68**, 4468-4477.
- David, W. y Brown, G. (2001).** Foot and mouth disease in human beings. *Lancet* **357**, 1463.
- De Castro, M. P. (1964).** Behaviour of the foot-and-mouth disease virus in cell cultures: susceptibility of the IB-RS-2 cell line. *Arq Inst Biol Sao Paulo* **31**, 63-78.
- De Diego, M., Brocchi, E., Mackay, D. y De Simone, F. (1997).** The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *0304-8608 (Print) Journal Article* **142**, 2021-2033.
- de Felipe, P., Hughes, L. E., Ryan, M. D. y Brown, J. D. (2003).** Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *The Journal of biological chemistry* **278**, 11441-11448.
- de Jong, A. S., Schrama, I. W., Willems, P. H., Galama, J. M., Melchers, W. J. y van Kuppeveld, F. J. (2002).** Multimerization reactions of coxsackievirus proteins 2B, 2C and 2BC: a mammalian two-hybrid analysis. *The Journal of general virology* **83**, 783-793.
- de los Santos, T., Segundo, F. D., Zhu, J., Koster, M., Dias, C. C. y Grubman, M. J. (2009).** A conserved domain in the leader proteinase of foot-and-mouth disease virus is required for proper subcellular localization and function. *Journal of virology* **83**, 1800-1810.
- de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R. y Subramani, S. (1987).** Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Molecular and cellular biology* **7**, 725-737.
- Devaney, M. A., Vakharia, V. N., Lloyd, R. E., Ehrenfeld, E. y Grubman, M. J. (1988).** Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *Journal of virology* **62**, 4407-4409.

- Dodd, D. A., Giddings, T. H., Jr. y Kirkegaard, K. (2001).** Poliovirus 3A protein limits interleukin-6 (IL-6), IL-8, and beta interferon secretion during viral infection. *Journal of virology* **75**, 8158-8165.
- Doedens, J. R., Giddings, T. H., Jr. y Kirkegaard, K. (1997).** Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *Journal of virology* **71**, 9054-9064.
- Doel, T. R. (2003).** FMD vaccines. *Virus research* **91**, 81-99.
- Domingo, E. (2000).** Viruses at the edge of adaptation. *Virology* **270**, 251-253.
- Domingo, E., Baranowski, E., Escarmis, C. y Sobrino, F. (2002).** Foot-and-mouth disease virus. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* **25**, 297-308.
- Domingo, E., Davila, M. y Ortin, J. (1980).** Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene* **11**, 333-346.
- Domingo, E., Martinez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J. C., Portela, A., Ortin, J., Lopez-Galindez, C., Perez-Brena, P., Villanueva, N., Najera, R. y et al. (1985).** The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review. *Gene* **40**, 1-8.
- Domingo, E., Menendez-Arias, L., Quiñones-Mateu, M. E., Holguin, A., Gutierrez-Rivas, M., Martinez, M. A., Quer, J., Novella, I. S. y Holland, J. J. (1997).** Viral quasispecies and the problem of vaccine-escape and drug-resistant mutants. *Progress in drug research Fortschritte der Arzneimittelforschung* **48**, 99-128.
- Donnelly, M. L., Hughes, L. E., Luke, G., Mendoza, H., ten Dam, E., Gani, D. y Ryan, M. D. (2001).** The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *The Journal of general virology* **82**, 1027-1041.
- Drake, J. W. y Holland, J. J. (1999).** Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 13910-13913.
- Duden, R., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Winey, M., Byers, B. y Schekman, R. (1994).** Yeast beta- and beta'-coat proteins (COP). Two coatomer subunits essential for endoplasmic reticulum-to-Golgi protein traffic. *The Journal of biological chemistry* **269**, 24486-24495.
- Dundr, M. y Misteli, T. (2003).** Measuring dynamics of nuclear proteins by photobleaching. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al Chapter 13*, Unit 13 15.
- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D. y Bienz, K. (2002).** Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of virology* **76**, 5974-5984.
- Epand, R. F., Tokarska-Schlattner, M., Schlattner, U., Wallimann, T. y Epand, R. M. (2007).** Cardiolipin clusters and membrane domain formation induced by mitochondrial proteins. *Journal of molecular biology* **365**, 968-980.
- Eriksson, H. M., Wessman, P., Ge, C., Edwards, K. y Wieslander, A. (2009).** Massive formation of intracellular membrane vesicles in *Escherichia coli* by a monotopic membrane-bound lipid glycosyltransferase. *The Journal of biological chemistry* **284**, 33904-33914.

- Escarmis, C., Dopazo, J., Davila, M., Palma, E. L. y Domingo, E. (1995). Large deletions in the 5'-untranslated region of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virus research* **35**, 155-167.
- Escarmis, C., Gomez-Mariano, G., Davila, M., Lazaro, E. y Domingo, E. (2002). Resistance to extinction of low fitness virus subjected to plaque-to-plaque transfers: diversification by mutation clustering. *Journal of molecular biology* **315**, 647-661.
- Falk, M. M., Grigera, P. R., Bergmann, I. E., Zibert, A., Multhaup, G. y Beck, E. (1990). Foot-and-mouth disease virus protease 3C induces specific proteolytic cleavage of host cell histone H3. *Journal of virology* **64**, 748-756.
- Falk, M. M., Sobrino, F. y Beck, E. (1992). VPg gene amplification correlates with infective particle formation in foot-and-mouth disease virus. *Journal of virology* **66**, 2251-2260.
- Fearon, E. R., Finkel, T., Gillison, M. L., Kennedy, S. P., Casella, J. F., Tomaselli, G. F., Morrow, J. S. y Van Dang, C. (1992). Karyoplasmic interaction selection strategy: a general strategy to detect protein-protein interactions in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 7958-7962.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Agudo, R., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E. y Verdaguer, N. (2006). The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *The EMBO journal* **25**, 880-888.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E. y Verdaguer, N. (2004). Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *The Journal of biological chemistry* **279**, 47212-47221.
- Fields, S. y Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Finkel, T., Duc, J., Fearon, E. R., Dang, C. V. y Tomaselli, G. F. (1993). Detection and modulation in vivo of helix-loop-helix protein-protein interactions. *The Journal of biological chemistry* **268**, 5-8.
- Forss, S. y Schaller, H. (1982). A tandem repeat gene in a picornavirus. *Nucleic acids research* **10**, 6441-6450.
- Forss, S., Strebel, K., Beck, E. y Schaller, H. (1984). Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic acids research* **12**, 6587-6601.
- Fox, G., Parry, N. R., Barnett, P. V., McGinn, B., Rowlands, D. J. y Brown, F. (1989). The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). *The Journal of general virology* **70** (Pt 3), 625-637.
- Fracastorius, H. (1546). *De sympathia et antipathia rerum. De contagione et contagiosis morbis et eorum curatione.* . Venice, Heirs of L. A. Junta. .
- Frankel, G., Lorch, Y., Karlik, P. y Friedmann, A. (1987). Fractionation of Theiler's virus-infected BHK21 cell homogenates: isolation of virus-induced membranes. *Virology* **158**, 452-455.
- Fu, Y., Lu, Z., Cao, Y., Guo, J., Zhang, X., Tian, M., Liu, Z. y Cai, X. (2008). [Purification and reactivity of foot-and-mouth disease virus non-structural protein 3A, 3B and 2C expressed in *E. coli*]. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica* **48**, 790-795.

- Fujiki, Y., Hubbard, A. L., Fowler, S. y Lazarow, P. B. (1982).** Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* **93**, 97-102.
- Fujita, K., Krishnakumar, S. S., Franco, D., Paul, A. V., London, E. y Wimmer, E. (2007).** Membrane topography of the hydrophobic anchor sequence of poliovirus 3A and 3AB proteins and the functional effect of 3A/3AB membrane association upon RNA replication. *Biochemistry* **46**, 5185-5199.
- Gajadhar, A. y Guha, A. (2009).** A proximity ligation assay using transiently transfected, epitope-tagged proteins: application for in situ detection of dimerized receptor tyrosine kinases. *BioTechniques* **48**, 145-152.
- Gamarnik, A. V. y Andino, R. (1998).** Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes & development* **12**, 2293-2304.
- Garcia-Arriaza, J., Manrubia, S. C., Toja, M., Domingo, E. y Escarmis, C. (2004).** Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation. *Journal of virology* **78**, 11678-11685.
- Garcia-Briones, M., Rosas, M. F., Gonzalez-Magaldi, M., Martin-Acebes, M. A., Sobrino, F. y Armas-Portela, R. (2006).** Differential distribution of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells. *Virology* **349**, 409-421.
- Gazina, E. V., Mackenzie, J. M., Gorrell, R. J. y Anderson, D. A. (2002).** Differential requirements for COPI coats in formation of replication complexes among three genera of Picornaviridae. *Journal of virology* **76**, 11113-11122.
- Gilmore, R. y Blobel, G. (1985).** Translocation of secretory proteins across the microsomal membrane occurs through an environment accessible to aqueous perturbants. *Cell* **42**, 497-505.
- Giraud, A. T., Beck, E., Strebel, K., de Mello, P. A., La Torre, J. L., Scodeller, E. A. y Bergmann, I. E. (1990).** Identification of a nucleotide deletion in parts of polypeptide 3A in two independent attenuated aphthovirus strains. *Virology* **177**, 780-783.
- Golde, W. T., Pacheco, J. M., Duque, H., Doel, T., Penfold, B., Ferman, G. S., Gregg, D. R. y Rodriguez, L. L. (2005).** Vaccination against foot-and-mouth disease virus confers complete clinical protection in 7 days and partial protection in 4 days: Use in emergency outbreak response. *Vaccine* **23**, 5775-5782.
- Golini, F., Semler, B. L., Dorner, A. J. y Wimmer, E. (1980).** Protein-linked RNA of poliovirus is competent to form an initiation complex of translation in vitro. *Nature* **287**, 600-603.
- Gonzalez-Magaldi, M., Postigo, R., de la Torre, B. G., Vieira, Y. A., Rodriguez-Pulido, M., Lopez-Viñas, E., Gomez-Puertas, P., Andreu, D., Kremer, L., Rosas, M. F. y Sobrino, F. (2012).** Mutations that hamper dimerization of foot-and-mouth disease virus 3A protein are detrimental for infectivity. *Journal of virology*.
- Gonzalez, S., Zurcher, T. y Ortin, J. (1996).** Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein involved in the interaction with the PB2 and PA subunits: a model for the viral RNA polymerase structure. *Nucleic acids research* **24**, 4456-4463.
- Gosert, R., Egger, D. y Bienz, K. (2000).** A cytopathic and a cell culture adapted hepatitis A virus strain differ in cell killing but not in intracellular membrane rearrangements. *Virology* **266**, 157-169.
- Gradi, A., Foeger, N., Strong, R., Svitkin, Y. V., Sonenberg, N., Skern, T. y Belsham, G. J. (2004).** Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4GII

- within foot-and-mouth disease virus-infected cells: identification of the L-protease cleavage site in vitro. *Journal of virology* **78**, 3271-3278.
- Graff, J., Kasang, C., Normann, A., Pfisterer-Hunt, M., Feinstone, S. M. y Flehmig, B. (1994).** Mutational events in consecutive passages of hepatitis A virus strain GBM during cell culture adaptation. *Virology* **204**, 60-68.
- Granseth, E., von Heijne, G. y Elofsson, A. (2005).** A study of the membrane-water interface region of membrane proteins. *Journal of molecular biology* **346**, 377-385.
- Greninger, A. L., Knudsen, G. M., Betegon, M., Burlingame, A. L. y Derisi, J. L. (2012).** The 3A protein from multiple picornaviruses utilizes the golgi adaptor protein ACBD3 to recruit PI4KIIIbeta. *Journal of virology* **86**, 3605-3616.
- Grubman, M. J. (1980).** The 5' end of foot-and-mouth disease virion RNA contains a protein covalently linked to the nucleotide pUp. *0304-8608 (Print) Journal Article* **63**, 311-315.
- Grubman, M. J. y Baxt, B. (2004).** Foot-and-mouth disease. *Clinical Microbiology Reviews* **17**, 465-493.
- Grubman, M. J., Baxt, B., La Torre, J. L. y Bachrach, H. L. (1981).** Identification of a protein kinase activity in purified foot- and-mouth disease virus. *Journal of virology* **39**, 455-462.
- Grubman, M. J., Robertson, B. H., Morgan, D. O., Moore, D. M. y Dowbenko, D. (1984).** Biochemical map of polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus. *Journal of virology* **50**, 579-586.
- Grubman, M. J., Zellner, M., Bablanian, G., Mason, P. W. y Piccone, M. E. (1995).** Identification of the active-site residues of the 3C proteinase of foot-and-mouth disease virus. *Virology* **213**, 581-589.
- Guex, N., Diemand, A. y Peitsch, M. C. (1999).** Protein modelling for all. *Trends in biochemical sciences* **24**, 364-367.
- Gupta, B., Levchenko, T. S. y Torchilin, V. P. (2005).** Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Advanced drug delivery reviews* **57**, 637-651.
- Hansen, J. L., Long, A. M. y Schultz, S. C. (1997).** Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* **5**, 1109-1122.
- Harber, J. J., Bradley, J., Anderson, C. W. y Wimmer, E. (1991).** Catalysis of poliovirus VP0 maturation cleavage is not mediated by serine 10 of VP2. *Journal of virology* **65**, 326-334.
- Heim, R., Cubitt, A. B. y Tsien, R. Y. (1995).** Improved green fluorescence. *Nature* **373**, 663-664.
- Herskovits, A. A., Shimoni, E., Minsky, A. y Bibi, E. (2002).** Accumulation of endoplasmic membranes and novel membrane-bound ribosome-signal recognition particle receptor complexes in Escherichia coli. *The Journal of cell biology* **159**, 403-410.
- Hogue, I. B., Grover, J. R., Soheilian, F., Nagashima, K. y Ono, A. (2011).** Gag induces the coalescence of clustered lipid rafts and tetraspanin-enriched microdomains at HIV-1 assembly sites on the plasma membrane. *Journal of virology* **85**, 9749-9766.
- Hollister, J. R., Vagnozzi, A., Knowles, N. J. y Rieder, E. (2008).** Molecular and phylogenetic analyses of bovine rhinovirus type 2 shows it is closely related to foot-and-mouth disease virus. *Virology* **373**, 411-425.
- Hsu, N. Y., Ilnytska, O., Belov, G., Santiana, M., Chen, Y. H., Takvorian, P. M., Pau, C., van der Schaar, H., Kaushik-Basu, N., Balla, T., Cameron, C. E.,**

- Ehrenfeld, E., van Kuppeveld, F. J. y Altan-Bonnet, N. (2010). Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* **141**, 799-811.
- Huotari, J. y Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *The EMBO journal* **30**, 3481-3500.
- Inouye, S. y Tsuji, F. I. (1994). Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS letters* **341**, 277-280.
- Ishikawa, K., Sasaki, J. y Taniguchi, K. (2010). Overall linkage map of the nonstructural proteins of Aichi virus. *Virus research* **147**, 77-84.
- Jackson, C. L. y Casanova, J. E. (2000a). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. 0962-8924 (Print) *Journal Article Research Support, Non-US Gov't Review* **10**, 60-67.
- Jackson, T., Blakemore, W., Newman, J. W., Knowles, N. J., Mould, A. P., Humphries, M. J. y King, A. M. (2000b). Foot-and-mouth disease virus is a ligand for the high-affinity binding conformation of integrin alpha5beta1: influence of the leucine residue within the RGD motif on selectivity of integrin binding. *The Journal of general virology* **81**, 1383-1391.
- Jackson, T., Clark, S., Berryman, S., Burman, A., Cambier, S., Mu, D., Nishimura, S. y King, A. M. (2004). Integrin alphavbeta8 functions as a receptor for foot-and-mouth disease virus: role of the beta-chain cytodomain in integrin-mediated infection. *Journal of virology* **78**, 4533-4540.
- Jackson, T., Ellard, F. M., Ghazaleh, R. A., Brookes, S. M., Blakemore, W. E., Corteyn, A. H., Stuart, D. I., Newman, J. W. y King, A. M. (1996). Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *Journal of virology* **70**, 5282-5287.
- Jackson, T., Mould, A. P., Sheppard, D. y King, A. M. (2002). Integrin alphavbeta1 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *Journal of virology* **76**, 935-941.
- Kahn C.M., L. S. E. (2005). *The Merck Veterinary Manual*. Whitehouse Station, NJ, USA: Merck Sharp, Dohme Corp.
- Kall, L., Krogh, A. y Sonnhammer, E. L. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server. *Nucleic acids research* **35**, W429-432.
- Kim, J. Y., Doody, A. M., Chen, D. J., Cremona, G. H., Shuler, M. L., Putnam, D. y DeLisa, M. P. (2008). Engineered bacterial outer membrane vesicles with enhanced functionality. *Journal of molecular biology* **380**, 51-66.
- King, A. M., Sangar, D. V., Harris, T. J. y Brown, F. (1980). Heterogeneity of the genome-linked protein of foot-and-mouth disease virus. *Journal of virology* **34**, 627-634.
- Klein, J. (2009). Understanding the molecular epidemiology of foot-and-mouth-disease virus. *Infect Genet Evol* **9**, 153-161.
- Knipe, T., Rieder, E., Baxt, B., Ward, G. y Mason, P. W. (1997). Characterization of synthetic foot-and-mouth disease virus provirions separates acid-mediated disassembly from infectivity. *Journal of virology* **71**, 2851-2856.
- Knowles, N. J., Davies, P. R., Henry, T., O'Donnell, V., Pacheco, J. M. y Mason, P. W. (2001). Emergence in Asia of foot-and-mouth disease viruses with altered host range: characterization of alterations in the 3A protein. *Journal of virology* **75**, 1551-1556.
- Knowles, N. J. y Samuel, A. R. (2003). Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus research* **91**, 65-80.

- Knox, C., Moffat, K., Ali, S., Ryan, M. y Wileman, T. (2005).** Foot-and-mouth disease virus replication sites form next to the nucleus and close to the Golgi apparatus, but exclude marker proteins associated with host membrane compartments. *The Journal of general virology* **86**, 687-696.
- Knudsen, R. C., Grocock, C. M. y Andersen, A. A. (1979).** Immunity to foot-and-mouth disease virus in guinea pigs: clinical and immune responses. *Infection and immunity* **24**, 787-792.
- Kondratova, A. A., Neznanov, N., Kondratov, R. V. y Gudkov, A. V. (2005).** Poliovirus protein 3A binds and inactivates LIS1, causing block of membrane protein trafficking and deregulation of cell division. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **4**, 1403-1410.
- Kremer, L. y Marquez, G. (2004).** Generation of monoclonal antibodies against chemokine receptors. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **239**, 243-260.
- Krogerus, C., Samuilova, O., Poyry, T., Jokitalo, E. y Hyypia, T. (2007).** Intracellular localization and effects of individually expressed human parechovirus 1 non-structural proteins. *The Journal of general virology* **88**, 831-841.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. y Sonnhammer, E. L. (2001).** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology* **305**, 567-580.
- Kuhn, R., Luz, N. y Beck, E. (1990).** Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *Journal of virology* **64**, 4625-4631.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lama, J., Sanz, M. A. y Carrasco, L. (1998).** Genetic analysis of poliovirus protein 3A: characterization of a non-cytopathic mutant virus defective in killing Vero cells. *The Journal of general virology* **79 (Pt 8)**, 1911-1921.
- Lamphear, B. J., Kirchweger, R., Skern, T. y Rhoads, R. E. (1995).** Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *The Journal of biological chemistry* **270**, 21975-21983.
- Lanke, K. H., van der Schaar, H. M., Belov, G. A., Feng, Q., Duijsings, D., Jackson, C. L., Ehrenfeld, E. y van Kuppeveld, F. J. (2009).** GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for Arf, is crucial for coxsackievirus B3 RNA replication. *Journal of virology* **83**, 11940-11949.
- Lawrence, P. y Rieder, E. (2009).** Identification of RNA helicase A as a new host factor in the replication cycle of foot-and-mouth disease virus. *Journal of virology* **83**, 11356-11366.
- Lea, S., Abu-Ghazaleh, R., Blakemore, W., Curry, S., Fry, E., Jackson, T., King, A., Logan, D., Newman, J. y Stuart, D. (1995).** Structural comparison of two strains of foot-and-mouth disease virus subtype O1 and a laboratory antigenic variant, G67. *Structure* **3**, 571-580.
- Lea, S., Hernandez, J., Blakemore, W., Brocchi, E., Curry, S., Domingo, E., Fry, E., Abu-Ghazaleh, R., King, A., Newman, J. y et al. (1994).** The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* **2**, 123-139.
- Lee, W. M., Monroe, S. S. y Rueckert, R. R. (1993).** Role of maturation cleavage in infectivity of picornaviruses: activation of an infectious particle. *Journal of virology* **67**, 2110-2122.

- Leforban, Y., Gerbier, G. y Rweyemamu, M. (2002).** Action of FAO in the control of foot and mouth disease. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* **25**, 373-382.
- Letshwenyo, M., Mapitse, N. y Hyera, J. M. (2006).** Foot-and-mouth disease in a kudu (*Tragelaphus strepsiceros*) in Botswana. *The Veterinary record* **159**, 252-253.
- Li, F., Browning, G. F., Studdert, M. J. y Crabb, B. S. (1996).** Equine rhinovirus 1 is more closely related to foot-and-mouth disease virus than to other picornaviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 990-995.
- Li, Q., Lau, A., Morris, T. J., Guo, L., Fordyce, C. B. y Stanley, E. F. (2004).** A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *J Neurosci* **24**, 4070-4081.
- Li, S., Tang, X., Seetharaman, J., Yang, C., Gu, Y., Zhang, J., Du, H., Shih, J. W., Hew, C. L., Sivaraman, J. y Xia, N. (2009).** Dimerization of hepatitis E virus capsid protein E2s domain is essential for virus-host interaction. *PLoS Pathog* **5**, e1000537.
- Lingwood, D., Schuck, S., Ferguson, C., Gerl, M. J. y Simons, K. (2009).** Generation of cubic membranes by controlled homotypic interaction of membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* **284**, 12041-12048.
- Lippincott-Schwartz, J., Roberts, T. H. y Hirschberg, K. (2000).** Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 557-589.
- Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E. y Kenworthy, A. (2001).** Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 444-456.
- Liu, J., Wei, T. y Kwang, J. (2004).** Membrane-association properties of avian encephalomyelitis virus protein 3A. *Virology* **321**, 297-306.
- Liu, Y., Wang, C., Mueller, S., Paul, A. V., Wimmer, E. y Jiang, P. (2010).** Direct interaction between two viral proteins, the nonstructural protein 2C and the capsid protein VP3, is required for enterovirus morphogenesis. *PLoS Pathog* **6**, e1001066.
- Loeffler F., F. P. (1897).** Summarischer bericht uber die ergebnisse der untersuchungen der kommission zur erforschung der maul-und-klamenseuche, Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. **22**, 257-259.
- Loiarro, M., Sette, C., Gallo, G., Ciacci, A., Fanto, N., Mastroianni, D., Carminati, P. y Ruggiero, V. (2005).** Peptide-mediated interference of TIR domain dimerization in MyD88 inhibits interleukin-1-dependent activation of NF- $\{\kappa\}$ B. *The Journal of biological chemistry* **280**, 15809-15814.
- Lopez de Quinto, S., Saiz, M., de la Morena, D., Sobrino, F. y Martinez-Salas, E. (2002).** IRES-driven translation is stimulated separately by the FMDV 3'-NCR and poly(A) sequences. *Nucleic acids research* **30**, 4398-4405.
- Lu, Y., Liu, D. X. y Tam, J. P. (2008).** Lipid rafts are involved in SARS-CoV entry into Vero E6 cells. *Biochemical and biophysical research communications* **369**, 344-349.
- Lubroth, J., Grubman, M. J., Burrage, T. G., Newman, J. F. y Brown, F. (1996).** Absence of protein 2C from clarified foot-and-mouth disease virus vaccines provides the basis for distinguishing convalescent from vaccinated animals. *Vaccine* **14**, 419-427.

- Marianayagam, N. J., Sunde, M. y Matthews, J. M. (2004).** The power of two: protein dimerization in biology. *Trends in biochemical sciences* **29**, 618-625.
- Marius, P., de Planque, M. R. y Williamson, P. T. (2012).** Probing the interaction of lipids with the non-annular binding sites of the potassium channel KcsA by magic-angle spinning NMR. *Biochimica et biophysica acta* **1818**, 90-96.
- Martin-Acebes, M. A., Gonzalez-Magaldi, M., Rosas, M. F., Borrego, B., Brocchi, E., Armas-Portela, R. y Sobrino, F. (2008).** Subcellular distribution of swine vesicular disease virus proteins and alterations induced in infected cells: a comparative study with foot-and-mouth disease virus and vesicular stomatitis virus. *Virology* **374**, 432-443.
- Martin-Acebes, M. A., Gonzalez-Magaldi, M., Sandvig, K., Sobrino, F. y Armas-Portela, R. (2007).** Productive entry of type C foot-and-mouth disease virus into susceptible cultured cells requires clathrin and is dependent on the presence of plasma membrane cholesterol. *Virology* **369**, 105-118.
- Martinez-Salas, E., Pacheco, A., Serrano, P. y Fernandez, N. (2008).** New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *The Journal of general virology* **89**, 611-626.
- Martinez-Salas, E., Ramos, R., Lafuente, E. y Lopez de Quinto, S. (2001).** Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *The Journal of general virology* **82**, 973-984.
- Mashburn-Warren, L., McLean, R. J. y Whiteley, M. (2008).** Gram-negative outer membrane vesicles: beyond the cell surface. *Geobiology* **6**, 214-219.
- Mateu, M. G. (1995).** Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus research* **38**, 1-24.
- Mateu, M. G., Martinez, M. A., Capucci, L., Andreu, D., Giralt, E., Sobrino, F., Brocchi, E. y Domingo, E. (1990).** A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *The Journal of general virology* **71 (Pt 3)**, 629-637.
- Matto, M., Rice, C. M., Aroeti, B. y Glenn, J. S. (2004).** Hepatitis C virus core protein associates with detergent-resistant membranes distinct from classical plasma membrane rafts. *Journal of virology* **78**, 12047-12053.
- Medina, M., Domingo, E., Brangwyn, J. K. y Belsham, G. J. (1993).** The two species of the foot-and-mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities. *Virology* **194**, 355-359.
- Meijering, E., Dzyubachyk, O. y Smal, I. (2012).** Methods for cell and particle tracking. *0076-6879 (Print) Journal Article* **504**, 183-200.
- Mierendorf, R. C., Morris, B. B., Hammer, B., Novy, R. E. y Rapley, R. (2000).** Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System. *The Nucleic Acid Protocols Handbook*, pp. 947-977: Humana Press.
- Millan, J., Puertollano, R., Fan, L. y Alonso, M. A. (1997).** Caveolin and MAL, two protein components of internal detergent-insoluble membranes, are in distinct lipid microenvironments in MDCK cells. *Biochemical and biophysical research communications* **233**, 707-712.
- Moffat, K., Howell, G., Knox, C., Belsham, G. J., Monaghan, P., Ryan, M. D. y Wileman, T. (2005).** Effects of foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins on the structure and function of the early secretory pathway: 2BC but not 3A blocks endoplasmic reticulum-to-Golgi transport. *Journal of virology* **79**, 4382-4395.
- Moffat, K., Knox, C., Howell, G., Clark, S. J., Yang, H., Belsham, G. J., Ryan, M. y Wileman, T. (2007).** Inhibition of the secretory pathway by foot-and-mouth

- disease virus 2BC protein is reproduced by coexpression of 2B with 2C, and the site of inhibition is determined by the subcellular location of 2C. *Journal of virology* **81**, 1129-1139.
- Monaghan, P., Cook, H., Jackson, T., Ryan, M. y Wileman, T. (2004).** The ultrastructure of the developing replication site in foot-and-mouth disease virus-infected BHK-38 cells. *J Gen Virol* **85**, 933-946.
- Monaghan, P., Gold, S., Simpson, J., Zhang, Z., Weinreb, P. H., Violette, S. M., Alexandersen, S. y Jackson, T. (2005).** The alpha(v)beta6 integrin receptor for Foot-and-mouth disease virus is expressed constitutively on the epithelial cells targeted in cattle. *The Journal of general virology* **86**, 2769-2780.
- Morace, G., Pisani, G., Beneduce, F., Divizia, M. y Pana, A. (1993).** Mutations in the 3A genomic region of two cytopathic strains of hepatitis A virus isolated in Italy. *Virus research* **28**, 187-194.
- Moscufo, N., Simons, J. y Chow, M. (1991).** Myristoylation is important at multiple stages in poliovirus assembly. *Journal of virology* **65**, 2372-2380.
- Naranjo, V., Villar, M., Martin-Hernando, M. P., Vidal, D., Hofle, U., Gortazar, C., Kocan, K. M., Vazquez, J. y de la Fuente, J. (2007).** Proteomic and transcriptomic analyses of differential stress/inflammatory responses in mandibular lymph nodes and oropharyngeal tonsils of European wild boars naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Proteomics* **7**, 220-231.
- Nayak, A., Goodfellow, I. G. y Belsham, G. J. (2005).** Factors required for the Uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) in vitro. *Journal of virology* **79**, 7698-7706.
- Neff, S., Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Mason, P. W., Blystone, S. D., Brown, E. J. y Baxt, B. (1998).** Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin alpha(v)beta3 as its receptor. *Journal of virology* **72**, 3587-3594.
- Nehls, S., Snapp, E. L., Cole, N. B., Zaal, K. J., Kenworthy, A. K., Roberts, T. H., Ellenberg, J., Presley, J. F., Siggia, E. y Lippincott-Schwartz, J. (2000).** Dynamics and retention of misfolded proteins in native ER membranes. *Nat Cell Biol* **2**, 288-295.
- Nevo-Dinur, K., Govindarajan, S. y Amster-Choder, O. (2012).** Subcellular localization of RNA and proteins in prokaryotes. *Trends Genet.*
- Nevo-Dinur, K., Nussbaum-Shochat, A., Ben-Yehuda, S. y Amster-Choder, O. (2011).** Translation-independent localization of mRNA in *E. coli*. *Science (New York, NY)* **331**, 1081-1084.
- Newman, J. F., Cartwright, B., Doel, T. R. y Brown, F. (1979).** Purification and identification of the RNA-dependent RNA polymerase of foot-and-mouth disease virus. *The Journal of general virology* **45**, 497-507.
- Neznanov, N., Kondratova, A., Chumakov, K. M., Angres, B., Zhumabayeva, B., Agol, V. I. y Gudkov, A. V. (2001).** Poliovirus protein 3A inhibits tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis by eliminating the TNF receptor from the cell surface. *Journal of virology* **75**, 10409-10420.
- Nilsson, I., Bahram, F., Li, X., Gualandi, L., Koch, S., Jarvius, M., Soderberg, O., Anisimov, A., Kholova, I., Pytowski, B., Baldwin, M., Yla-Herttuala, S., Alitalo, K., Kreuger, J. y Claesson-Welsh, L. (2010).** VEGF receptor 2/-3 heterodimers detected in situ by proximity ligation on angiogenic sprouts. *The EMBO journal* **29**, 1377-1388.
- Novak, J. E. y Kirkegaard, K. (1991).** Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation

- and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *Journal of virology* **65**, 3384-3387.
- Nugent, C. I., Johnson, K. L., Sarnow, P. y Kirkegaard, K. (1999).** Functional coupling between replication and packaging of poliovirus replicon RNA. *Journal of virology* **73**, 427-435.
- Núñez, J. I., Baranowski, E., Molina, N., Ruiz-Jarabo, C. M., Sanchez, C., Domingo, E. y Sobrino, F. (2001).** A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *Journal of virology* **75**, 3977-3983.
- Núñez, J. I., Molina, N., Baranowski, E., Domingo, E., Clark, S., Burman, A., Berryman, S., Jackson, T. y Sobrino, F. (2007).** Guinea pig-adapted foot-and-mouth disease virus with altered receptor recognition can productively infect a natural host. *Journal of virology* **81**, 8497-8506.
- O'Donnell, V., Larocco, M. y Baxt, B. (2008).** Heparan sulfate-binding foot-and-mouth disease virus enters cells via caveola-mediated endocytosis. *Journal of virology* **82**, 9075-9085.
- O'Donnell, V., LaRocco, M., Duque, H. y Baxt, B. (2005).** Analysis of foot-and-mouth disease virus internalization events in cultured cells. *Journal of virology* **79**, 8506-8518.
- O'Donnell, V., Pacheco, J. M., Henry, T. M. y Mason, P. W. (2001).** Subcellular distribution of the foot-and-mouth disease virus 3A protein in cells infected with viruses encoding wild-type and bovine-attenuated forms of 3A. *Virology* **287**, 151-162.
- O'Donnell, V., Pacheco, J. M., LaRocco, M., Burrage, T., Jackson, W., Rodriguez, L. L., Borca, M. V. y Baxt, B. (2011).** Foot-and-mouth disease virus utilizes an autophagic pathway during viral replication. *Virology* **410**, 142-150.
- Oh, H. S., Pathak, H. B., Goodfellow, I. G., Arnold, J. J. y Cameron, C. E. (2009).** Insight into poliovirus genome replication and encapsidation obtained from studies of 3B-3C cleavage site mutants. *Journal of virology* **83**, 9370-9387.
- Ojosnegros, S., Perales, C., Mas, A. y Domingo, E. (2011).** Quasispecies as a matter of fact: viruses and beyond. *Virus research* **162**, 203-215.
- Orange, J. S. y May, M. J. (2008).** Cell penetrating peptide inhibitors of nuclear factor-kappa B. *Cell Mol Life Sci* **65**, 3564-3591.
- Ormo, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. y Remington, S. J. (1996).** Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science (New York, NY)* **273**, 1392-1395.
- Pacheco, J. M., Henry, T. M., O'Donnell, V. K., Gregory, J. B. y Mason, P. W. (2003).** Role of nonstructural proteins 3A and 3B in host range and pathogenicity of foot-and-mouth disease virus. *Journal of virology* **77**, 13017-13027.
- Patterson, G. H., Knobel, S. M., Sharif, W. D., Kain, S. R. y Piston, D. W. (1997).** Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical journal* **73**, 2782-2790.
- Peitsch, M. C. (1996).** ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *0300-5127 (Print) Journal Article Research Support, Non-US Gov't Review* **24**, 274-279.
- Pereira, H. G. (1976).** Subtyping of foot-and-mouth disease virus. *Developments in biological standardization* **35**, 167-174.

- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. y Cottrell, J. S. (1999).** Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551-3567.
- Piccone, M. E., Rieder, E., Mason, P. W. y Grubman, M. J. (1995).** The foot-and-mouth disease virus leader proteinase gene is not required for viral replication. *Journal of virology* **69**, 5376-5382.
- Pilipenko, E. V., Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Khitrina, E. V., Poperechnaya, A. N., Agol, V. I. y Hellen, C. U. (2000).** A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor. *Genes & development* **14**, 2028-2045.
- Porter, A. G. (1993).** Picornavirus nonstructural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *Journal of virology* **67**, 6917-6921.
- Postigo, R. (2009).** Análisis funcional de la proteína 3A del virus de la Fiebre Aftosa. In *Departamento de Biología Molecular*. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid Facultad de Ciencias Departamento de Biología Molecular.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. y Cormier, M. J. (1992).** Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233.
- Priyadharshini, M. L., Balamurugan, V., Prabhudas, K., Suryanarayana, V. V. S. y Reddy, G. R. (2007).** Expression of 3AB protein of foot and mouth disease virus in *Pichia pastoris* *Indian Journal of Biotechnology* **6**, 329-335.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G. y Deber, C. M. (2009).** Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 1760-1765.
- Reinbothe, C., Lebedev, N. y Reinbothe, S. (1999).** A protochlorophyllide light-harvesting complex involved in de-etiolation of higher plants. *Nature* **397**, 80-84.
- Renau, J. y Mejías, L. (1998).** "Manual de técnicas de microscopía electrónica (MET).Apñicaciones Biológicas." *Universidad de Granada*.
- Rieder, E., Bunch, T., Brown, F. y Mason, P. W. (1993).** Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly(C) tracts of two nucleotides are virulent in mice. *Journal of virology* **67**, 5139-5145.
- Rodriguez Pulido, M., Serrano, P., Saiz, M. y Martinez-Salas, E. (2007).** Foot-and-mouth disease virus infection induces proteolytic cleavage of PTB, eIF3a,b, and PABP RNA-binding proteins. *Virology* **364**, 466-474.
- Rodriguez Pulido, M., Sobrino, F., Borrego, B. y Saiz, M. (2009).** Attenuated foot-and-mouth disease virus RNA carrying a deletion in the 3' noncoding region can elicit immunity in swine. *Journal of virology* **83**, 3475-3485.
- Rossman, J. S. y Lamb, R. A. (2011).** Influenza virus assembly and budding. *Virology* **411**, 229-236.
- Rothman, J. E. (1994).** Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**, 55-63.
- Rueckert, R. R. (1996).** Picornaviridae: The viruses and their replication In *Field's Virology*, pp. 609-654. Edited by B. N. Fields, Knipe, D. M. and Howley, P. H. New York.
- Rueckert, R. R. y Wimmer, E. (1984).** Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *Journal of virology* **50**, 957-959.

- Rweyemamu, M., Roeder, P., Mackay, D., Sumption, K., Brownlie, J., Leforban, Y., Valarcher, J. F., Knowles, N. J. y Saraiva, V. (2008).** Epidemiological patterns of foot-and-mouth disease worldwide. *Transboundary and emerging diseases* **55**, 57-72.
- Rweyemamu, M. M. y Leforban, Y. (1999).** Foot-and-mouth disease and international development. *Advances in virus research* **53**, 111-126.
- Sadowski, I. y Ptashne, M. (1989).** A vector for expressing GAL4(1-147) fusions in mammalian cells. *Nucleic acids research* **17**, 7539.
- Saleh, L., Rust, R. C., Fullkrug, R., Beck, E., Bassili, G., Ochs, K. y Niepmann, M. (2001).** Functional interaction of translation initiation factor eIF4G with the foot-and-mouth disease virus internal ribosome entry site. *The Journal of general virology* **82**, 757-763.
- Sambrook, J. y Russell, D. (2001).** *Molecular Cloning: A laboratory manual*. . N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuilova, O., Krogerus, C., Poyry, T. y Hyypia, T. (2004).** Specific interaction between human parechovirus nonstructural 2A protein and viral RNA. *The Journal of biological chemistry* **279**, 37822-37831.
- Sasaki, J., Ishikawa, K., Arita, M. y Taniguchi, K. (2012).** ACBD3-mediated recruitment of PI4KB to picornavirus RNA replication sites. *The EMBO journal* **31**, 754-766.
- Saxton, M. J. y Jacobson, K. (1997).** Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **26**, 373-399.
- Schlegel, A., Giddings, T. H., Jr., Ladinsky, M. S. y Kirkegaard, K. (1996).** Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *Journal of virology* **70**, 6576-6588.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. y Peitsch, M. C. (2003).** SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic acids research* **31**, 3381-3385.
- Serrano, P., Pulido, M. R., Saiz, M. y Martinez-Salas, E. (2006).** The 3' end of the foot-and-mouth disease virus genome establishes two distinct long-range RNA-RNA interactions with the 5' end region. *The Journal of general virology* **87**, 3013-3022.
- Shapiro, L., McAdams, H. H. y Losick, R. (2009).** Why and how bacteria localize proteins. *Science (New York, NY)* **326**, 1225-1228.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. y Mann, M. (1996).** Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry* **68**, 850-858.
- Shimomura, O., Johnson, F. H. y Saiga, Y. (1962).** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *Journal of cellular and comparative physiology* **59**, 223-239.
- Sierra, M., Airaksinen, A., Gonzalez-Lopez, C., Agudo, R., Arias, A. y Domingo, E. (2007).** Foot-and-mouth disease virus mutant with decreased sensitivity to ribavirin: implications for error catastrophe. *Journal of virology* **81**, 2012-2024.
- Smal, I., Loog, M., Niessen, W. y Meijering, E. (2010).** Quantitative comparison of spot detection methods in fluorescence microscopy. *IEEE transactions on medical imaging* **29**, 282-301.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. y Klenk, D.**

- C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* **150**, 76-85.
- Snapp, E. L. (2009). Fluorescent proteins: a cell biologist's user guide. 0962-8924 (Print) *Journal Article Research Support, Non-US Gov't Review* **19**, 649-655.
- Snapp, E. L., Altan, N. y Lippincott-Schwartz, J. (2003). Measuring protein mobility by photobleaching GFP chimeras in living cells. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al Chapter 21*, Unit 21 21.
- Snapp, E. L., Sharma, A., Lippincott-Schwartz, J. y Hegde, R. S. (2006). Monitoring chaperone engagement of substrates in the endoplasmic reticulum of live cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 6536-6541.
- Sobrino, F., Davila, M., Ortin, J. y Domingo, E. (1983). Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* **128**, 310-318.
- Sobrino, F. y Domingo, E. (2001a). Foot-and-mouth disease in Europe. FMD is economically the most important disease of farm animals. Its re-emergence in Europe is likely to have consequences that go beyond severe alterations of livestock production and trade. 1469-221X (Print) *Journal Article* **2**, 459-461.
- Sobrino, F. y Domingo, E. (2004). *Foot and Mouth disease Current Perspectives*. Madrid: Horizon Bioscience.
- Sobrino, F., Saiz, M., Jimenez-Clavero, M. A., Nunez, J. I., Rosas, M. F., Baranowski, E. y Ley, V. (2001b). Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. 0928-4249 (Print) *Journal Article Review* **32**, 1-30.
- Sonnhammer, E. L. y Hollich, V. (2005). Scoredist: a simple and robust protein sequence distance estimator. *BMC bioinformatics* **6**, 108.
- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. y te Heesen, S. (1998). A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 5187-5192.
- Stephens, D. J. y Allan, V. J. (2003). Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science (New York, NY)* **300**, 82-86.
- Stoker, M. y Macpherson, I. (1964). Syrian Hamster Fibroblast Cell Line BHK21 and Its Derivatives. *Nature* **203**, 1355-1357.
- Strauss, D. M., Glustrom, L. W. y Wuttke, D. S. (2003). Towards an understanding of the poliovirus replication complex: the solution structure of the soluble domain of the poliovirus 3A protein. *Journal of molecular biology* **330**, 225-234.
- Strebel, K. y Beck, E. (1986a). A second protease of foot-and-mouth disease virus. *Journal of virology* **58**, 893-899.
- Strebel, K., Beck, E., Strohmaier, K. y Schaller, H. (1986b). Characterization of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion proteins. *Journal of virology* **57**, 983-991.
- Sutmoller, P., Barteling, S. S., Olascoaga, R. C. y Sumption, K. J. (2003). Control and eradication of foot-and-mouth disease. *Virus research* **91**, 101-144.
- Swaminathan, R., Hoang, C. P. y Verkman, A. S. (1997). Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophysical journal* **72**, 1900-1907.

- Sweeney, T. R., Cisnetto, V., Bose, D., Bailey, M., Wilson, J. R., Zhang, X., Belsham, G. J. y Curry, S. (2010). Foot-and-mouth disease virus 2C is a hexameric AAA+ protein with a coordinated ATP hydrolysis mechanism. *The Journal of biological chemistry* **285**, 24347-24359.
- Takada, Y., Ye, X. y Simon, S. (2007). The integrins. *Genome biology* **8**, 215.
- Tershak, D. R. (1984). Association of poliovirus proteins with the endoplasmic reticulum. *Journal of virology* **52**, 777-783.
- Teterina, N. L., Bienz, K., Egger, D., Gorbalenya, A. E. y Ehrenfeld, E. (1997). Induction of intracellular membrane rearrangements by HAV proteins 2C and 2BC. *Virology* **237**, 66-77.
- Teterina, N. L., Levenson, E., Rinaudo, M. S., Egger, D., Bienz, K., Gorbalenya, A. E. y Ehrenfeld, E. (2006). Evidence for functional protein interactions required for poliovirus RNA replication. *Journal of virology* **80**, 5327-5337.
- Thomson, G. R., Vosloo, W. y Bastos, A. D. (2003). Foot and mouth disease in wildlife. *Virus research* **91**, 145-161.
- Toja, M., Escarmis, C. y Domingo, E. (1999). Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus research* **64**, 161-171.
- Towner, J. S., Ho, T. V. y Semler, B. L. (1996). Determinants of membrane association for poliovirus protein 3AB. *The Journal of biological chemistry* **271**, 26810-26818.
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry* **67**, 509-544.
- Tusnady, G. E. y Simon, I. (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics (Oxford, England)* **17**, 849-850.
- Usui, K., Katayama, S., Kanamori-Katayama, M., Ogawa, C., Kai, C., Okada, M., Kawai, J., Arakawa, T., Carninci, P., Itoh, M., Takio, K., Miyano, M., Kidoaki, S., Matsuda, T., Hayashizaki, Y. y Suzuki, H. (2005). Protein-protein interactions of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Genome biology* **6**, R98.
- van Weeghel, R. P., Keck, W. y Robillard, G. T. (1990). Regulated high-level expression of the mannitol permease of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 2613-2617.
- Verkman, A. S. (2002). Solute and macromolecule diffusion in cellular aqueous compartments. *Trends in biochemical sciences* **27**, 27-33.
- Virtanen, S. S., Sandholm, J., Yegutkin, G., Kalervo VÃ¤Ã¶nÃ¶nen, H. y HÃ¤rkÃ¶nen, P. L. (2010). *Inhibition of GGTase-I and FTase disrupts cytoskeletal organization of human PC-3 prostate cancer cells.*
- von Meyenburg, K., Jorgensen, B. B. y van Deurs, B. (1984). Physiological and morphological effects of overproduction of membrane-bound ATP synthase in *Escherichia coli* K-12. *The EMBO journal* **3**, 1791-1797.
- Vonck, J. y Schafer, E. (2009). Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochimica et biophysica acta* **1793**, 117-124.
- Weber, S., Granzow, H., Weiland, F. y Marquardt, O. (1996). Intracellular membrane proliferation in *E. coli* induced by foot-and-mouth disease virus 3A gene products. *Virus genes* **12**, 5-14.

- Weibrecht, I., Leuchowius, K. J., Clausson, C. M., Conze, T., Jarvius, M., Howell, W. M., Kamali-Moghaddam, M. y Soderberg, O. (2010). Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. *Expert review of proteomics* 7, 401-409.
- Weiner, J. H., Lemire, B. D., Elmes, M. L., Bradley, R. D. y Scraba, D. G. (1984). Overproduction of fumarate reductase in *Escherichia coli* induces a novel intracellular lipid-protein organelle. *Journal of bacteriology* 158, 590-596.
- Wender, P. A., Cooley, C. B. y Geihe, E. I. (2012). Beyond Cell Penetrating Peptides: Designed Molecular Transporters. *Drug discovery today* 9, e49-e55.
- Wessels, E., Duijsings, D., Lanke, K. H., Melchers, W. J., Jackson, C. L. y van Kuppeveld, F. J. (2007). Molecular determinants of the interaction between coxsackievirus protein 3A and guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Journal of virology* 81, 5238-5245.
- Wessels, E., Duijsings, D., Notebaart, R. A., Melchers, W. J. y van Kuppeveld, F. J. (2005). A proline-rich region in the coxsackievirus 3A protein is required for the protein to inhibit endoplasmic reticulum-to-golgi transport. *Journal of virology* 79, 5163-5173.
- Wessels, E., Notebaart, R. A., Duijsings, D., Lanke, K., Vergeer, B., Melchers, W. J. y van Kuppeveld, F. J. (2006). Structure-function analysis of the coxsackievirus protein 3A: identification of residues important for dimerization, viral rna replication, and transport inhibition. *The Journal of biological chemistry* 281, 28232-28243.
- Whitton, J. L., Cornell, C. T. y Feuer, R. (2005). Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nature Reviews Microbiology* 3, 765-776.
- Wilkison, W. O., Walsh, J. P., Corless, J. M. y Bell, R. M. (1986). Crystalline arrays of the *Escherichia coli* sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, an integral membrane protein. *The Journal of biological chemistry* 261, 9951-9958.
- Wolk, B., Buchele, B., Moradpour, D. y Rice, C. M. (2008). A dynamic view of hepatitis C virus replication complexes. *Journal of virology* 82, 10519-10531.
- Wouters, F. S., Verveer, P. J. y Bastiaens, P. I. H. (2001). Imaging biochemistry inside cells. *Trends in Cell Biology* 11, 203-211.
- Xiang, W., Cuconati, A., Hope, D., Kirkegaard, K. y Wimmer, E. (1998). Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3Dpol with VPg and with genetic variants of 3AB. *Journal of virology* 72, 6732-6741.
- Xiang, W., Cuconati, A., Paul, A. V., Cao, X. y Wimmer, E. (1995). Molecular dissection of the multifunctional poliovirus RNA-binding protein 3AB. *RNA (New York, NY)* 1, 892-904.
- Yang, F., Moss, L. G. y Phillips, G. N., Jr. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature biotechnology* 14, 1246-1251.
- Yasumura Y, K. M. (1964). The research for the SV40 by means of tissue culture technique. *Nippon Rinsho* 21, 1201-1219.
- Yin, J., Liu, Y., Wimmer, E. y Paul, A. V. (2007). Complete protein linkage map between the P2 and P3 non-structural proteins of poliovirus. *The Journal of general virology* 88, 2259-2267.
- Zell, R., Seitz, S., Henke, A., Munder, T. y Wutzler, P. (2005). Linkage map of protein-protein interactions of Porcine teschovirus. *The Journal of general virology* 86, 2763-2768.
- Zurcher, T., de la Luna, S., Sanz-Ezquerro, J. J., Nieto, A. y Ortin, J. (1996). Mutational analysis of the influenza virus A/Victoria/3/75 PA protein: studies of

interaction with PB1 protein and identification of a dominant negative mutant.
The Journal of general virology **77 (Pt 8)**, 1745-1749.

ANEXOS

Mutations That Hamper Dimerization of Foot-and-Mouth Disease Virus 3A Protein Are Detrimental for Infectivity

Mónica González-Magaldi,^a Raúl Postigo,^a Beatriz G. de la Torre,^b Yuri A. Vieira,^a Miguel Rodríguez-Pulido, Eduardo López-Viñas,^{a,c} Paulino Gómez-Puertas,^a David Andreu,^b Leonor Kremer,^d María F. Rosas,^a and Francisco Sobrino^{a,e}

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Cantoblanco, Madrid, Spain^a; Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain^b; Biomol-Informatics SL, Madrid, Spain^c; Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Cantoblanco, Madrid, Spain^d; and CISA-INIA, Valdeolmos, Madrid, Spain^e

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) nonstructural protein 3A plays important roles in virus replication, virulence, and host range. In other picornaviruses, homodimerization of 3A has been shown to be relevant for its biological activity. In this work, FMDV 3A homodimerization was evidenced by an *in situ* protein fluorescent ligation assay. A molecular model of the FMDV 3A protein, derived from the nuclear magnetic resonance (NMR) structure of the poliovirus 3A protein, predicted a hydrophobic interface spanning residues 25 to 44 as the main determinant for 3A dimerization. Replacements L38E and L41E, involving charge acquisition at residues predicted to contribute to the hydrophobic interface, reduced the dimerization signal in the protein ligation assay and prevented the detection of dimer/multimer species in both transiently expressed 3A proteins and in synthetic peptides reproducing the N terminus of 3A. These replacements also led to production of infective viruses that replaced the acidic residues introduced (E) by nonpolar amino acids, indicating that preservation of the hydrophobic interface is essential for virus replication. Replacements that favored (Q44R) or impaired (Q44D) the polar interactions predicted between residues Q44 and D32 did not abolish dimer formation of transiently expressed 3A, indicating that these interactions are not critical for 3A dimerization. Nevertheless, while Q44R led to recovery of viruses that maintained the mutation, Q44D resulted in selection of infective viruses with substitution D44E with acidic charge but with structural features similar to those of the parental virus, suggesting that Q44 is involved in functions other than 3A dimerization.

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) is the prototypic member of the aphthovirus genus within the family *Picornaviridae* (5, 24, 52) and the etiological agent of a devastating disease of livestock (34). The viral particle is composed of a protein capsid that contains a positive-sense RNA molecule of about 8,500 nucleotides that is infectious and encodes a single polypeptide, which is processed in infected cells by *cis*- and *trans*-acting viral proteases (55) to yield different polypeptide precursors and the mature viral proteins (9, 62). The viral genome encodes four structural capsid proteins (VP1 to VP4) and seven nonstructural (NS) proteins, the leader Lb/ab protease, and proteins encoded in the P2 (2B and 2C) and P3 (3A, 3B, 3C, and 3D) regions (9).

Replication of picornaviruses occurs associated to cell endomembranes that are recruited during viral infection (25). NS proteins are involved in crucial aspects of the viral cycle and pathogenesis, such as rearrangements of intracellular membranes required for endomembrane recruitment and the lysis of host cells (1, 12, 14, 18, 73). Protein 3A is an example of this multifunctional role; in poliovirus (PV), the interaction between the RNA replication complex and intracellular membranes appears to be accomplished by proteins 3A and 2C, which have membrane-binding properties (11, 60). When expressed as a recombinant protein in transfected cells, PV 3A cofractionates with endoplasmic reticulum markers (66), and its single transient expression can disrupt the secretory apparatus (23) and decrease major histocompatibility complex (MHC) class I expression (22). On the other hand, 3AB presumably anchors 3B in intracellular membranes originated *de novo* during the early steps of RNA replication, where uridylylated 3B primes the synthesis of nascent viral RNAs (2, 37, 68, 69). PV 3AB has a nonspecific RNA-binding activity and associates with the cloverleaf structure in the 5' end of viral RNA and

with the 3CD precursor to form a ribonucleoprotein complex required for PV RNA synthesis (32, 74, 76).

While FMDV shows considerable functional and structural analogies with PV and other picornaviruses, some differences have been reported, such as its resistance to the Golgi disruption exerted by brefeldin A, the different pattern of membrane reorganization induced in infected cells (39, 43), and the ability of 2B and 2BC, instead of 3A, to inhibit the secretory pathway in cultured cells (42), likely contributing to the evasion of innate and acquired immune responses (58). In addition, FMDV is the only picornavirus encoding 3 copies of 3B protein, required for both optimal replication in cell culture (26) and for virulence in natural hosts (50). All 3 copies have been shown to undergo uridylylation *in vitro* (44). In FMDV, 3A protein has been reported to play a role on viral host range, as a single amino acid replacement (Q44R) conferred FMDV the ability to cause vesicular lesions in guinea pigs (48). As 2B and 2C, FMDV nonstructural protein 3A contains a hydrophobic domain that in other picornaviruses mediates its targeting to intracellular membranes (19), which could be responsible for the location of the replication complex within a membrane context (20, 23, 27, 69). The C-terminal fragment of 3A (from the C terminus of the hydrophobic domain) is considerably

Received 6 March 2012 Accepted 3 July 2012

Published ahead of print 11 July 2012

Address correspondence to Francisco Sobrino, fsobrino@cbm.uam.es.

M.G.-M. and R.P. contributed equally to the work.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.00580-12

TABLE 1 Synthetic peptide sequences

Wild type or mutation	Amino acid sequence ^a	Avg mol wt (calculated/found)
Wild type	ISIPSQKSVLYFLIEKGGHEAAIEFFEGMVHDSIKEELRPLIQQT ^u TSFVKRAF	6,036/6,035
L38E	ISIPSQKSVLYFLIEKGGHEAAIEFFEGMVHDSIKEE <u>ER</u> RPLIQQT ^u TSFVKRAF	6,051/6,052
L41E	ISIPSQKSVLYFLIEKGGHEAAIEFFEGMVHDSIKEELRPE <u>IE</u> IQQT ^u TSFVKRAF	6,051/6,052
L38L41E	ISIPSQKSVLYFLIEKGGHEAAIEFFEGMVHDSIKEE <u>ERPEIE</u> IQQT ^u TSFVKRAF	6,068/6,069
M29R	ISIPSQKSVLYFLIEKGGHEAAIEFFEG <u>RV</u> HDSIKEELRPLIQQT ^u TSFVKRAF	6,061/6,063

^a Sequences correspond to residues 1 to 52 of the 3A protein. Bold, underlined letters refer to replacements relative to the 3A sequence of FMDV C-S8c1.

longer in FMDV (77 amino acids [aa]) than in other picornaviruses (i.e., 7 aa for PV), and deletions and mutations in 3A are known to contribute both to viral attenuation in cattle (8) and to decreased replication rates in bovine epithelial cells (49). However, little is known on the interactions of 3A with other viral and cellular proteins, and no structural data are available for this protein.

Homodimer formation has been revealed by the NMR structure determined for a soluble version lacking the trans-membrane domain (aa 1 to 59) of PV 3A (65). Each monomer has a structured region consisting of two amphipathic α -helices (aa 23 to 29 and 32 to 41) separated by a 180° loop that forms a helical hairpin, flanked by nonstructured N and C regions. The N terminus of 3A from PV also contains a conserved patch of anionic residues at the top of the dimer structure, in the loop between the two α -helices, as well as three solvent-exposed charged residues (E38, K39, and K40) that may be important for viral replication (65). A role for 3A homodimer formation in both RNA replication and inhibition of cellular protein transport has also been reported for coxsackievirus (CV) B3. In this case, while the general organization of the CVB3 dimer was similar to that of PV, the establishment of salt bridges between residues D24 and K41 was found critical for dimer stability; using an optimized PV 3A structure, these salt bridges were also found in equivalent PV residues (D23 and K40) (72).

To gain insight into the structure-function relationship of FMDV 3A protein, we devised a molecular model for the N-terminal region of this protein, using as the template the structure reported for PV 3A. This model predicted hydrophobic interactions between residues at two α -helices in each monomer as the main homodimerization determinant. Here, we show that amino acid replacements L38E and L41E, located at the predicted hydrophobic dimerization interface, and expected to contribute to dimer stability, decrease 3A dimerization in cells transiently expressing 3A, and abolish dimer/multimer formation in peptides reproducing the N terminus of 3A. Replacements L38E and L41E significantly reduced the homodimerization signal detected for transiently expressed 3A by means of an *in situ* proximity ligation assay (63). In addition, replacements L38E and L41E were detrimental for virus growth, leading to selection of viruses that for mutants L38E and L41E restored the hydrophobicity of the residues, suggesting that 3A dimer formation plays a relevant role in FMDV replication. On the other hand, replacement Q44R that favors or replacement Q44E that impairs the polar interactions that, according to the model, Q44 could establish with residue D32 of the opposite monomer did not abolish dimer formation of transiently expressed 3A, indicating that these polar interactions are not critical for 3A dimerization. Nevertheless, while Q44R led to infectious virus recovery, Q44D resulted in the selection of infective viruses with substitution D44E with acidic charge but

with structural features similar to those of the parental virus, suggesting that residue Q44, despite not being essential for 3A dimerization, is involved in biological functions relevant for virus multiplication.

MATERIALS AND METHODS

Modeling procedures of FMDV 3A proteins. Three-dimensional (3D) models of FMDV 3A protein dimer (primary UniProtKB/TrEMBL accession code Q9DJC8) and 3A mutants Q44R, Q44D, M29R, L38E, and L41E were generated using comparative modeling procedures. As a structural template, the soluble domain of human PV 3A protein was used, attending to its hypothetical structural similarity to the target sequence (Protein Data Bank code 1NG7) (65). Best representative conformer in the NMR spectroscopy ensemble was selected as a source of coordinates for the FMDV 3A wild type and subsequent models. All models were built using the SWISS-MODEL server (31, 51, 59), available at <http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>, and their structural quality was checked using the analysis programs provided by the same server (Anolea/Gromos). Global model quality estimation was performed in terms of QMEAN4 raw score (10). To optimize geometries, models were energy minimized using the GROMOS43B1 force field implemented in DeepView (31), using 500 steps of steepest descent minimization followed by 500 steps of conjugate-gradient minimization. Figures were generated using the Pymol Molecular Graphics System (Schrödinger, LLC). Structurally based sequence alignment of wild-type model templates and other 3A proteins was refined with T-COFFEE (46).

Peptides. The N-terminal region of 3A, spanning residues I1 to F52, as well as four analogues with the M29R, L38E, L41E, and L38E-L41E replacements (N-ter peptides; see Table 1), were made in C-terminal carboxamide form on rink amide ChemMatrix resin in a Prelude synthesizer (Protein Technologies, Tucson, AZ). Standard 9-fluorenylmethoxy carbonyl (Fmoc) protocols at a 0.05-mmol scale were used, with 5-fold molar amounts of Fmoc-amino acids and *O*-benzotriazole-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate and 10-fold molar amounts of *N,N*-diisopropylethylamine, with systematic double coupling for all residues. After deprotection and cleavage with trifluoroacetic acid-water-triisopropylsilane (95:2.5:2.5 [vol/vol], 90 min, room temperature), peptides were precipitated with chilled diethyl ether, redissolved in water, lyophilized, and purified by preparative reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) to a minimum purity of 95% by analytical HPLC. Their identities were confirmed by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in a Voyager DE-STR instrument (Applied Biosystems), using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix and linear mode acquisition (Table 1).

For SDS-PAGE analysis, aliquots containing 1.87 μ g and 0.187 μ g of each peptide were prepared from 5-mg/ml stock solutions of the lyophilized peptides in Milli-Q water, mixed with Laemmli sample buffer containing 2% SDS and 100 mM dithiothreitol (DTT), and incubated for 25 min at room temperature. Samples were resolved on 12% SDS-PAGE gels, stained with Coomassie blue, transferred to nitrocellulose membranes, and immunoblotted with 3A-specific rabbit polyclonal antibody (Ab) and a goat anti-rabbit horseradish peroxidase-coupled secondary Ab (GE Healthcare). Samples were subsequently developed using a chemiluminescence kit (Perkin-Elmer).

TABLE 2 Oligonucleotides used for construction of mutants in the 3A protein

Oligonucleotide ^a	Sequence (5'→3') ^b	Position ^b
3AF	GAAGATCTCCGACTCGCTCTCCAG	4199
3AR	ATCGGACCGCGTAAGGTCCCTC	5839
L38E-F	CATTAAGGAGGAAGAGCGGCCCTCATC	5397
L38E-R	GATGAGGGGCGGCTTCCTCTTAATG	5424
L41E-F	GAATCCGGCCCGAGATCCAACAAC	5407
L41E-R	GTTTGTGGATCTCGGGCCGGAGTTC	5432
L38EL41E-F	TTAGGAGGAAGAGCGGCCCGAGATCCA	5398
L38EL41E-R	TTGGATCTCGGGCCCGCTTCCTCTTA	5437
Q44R-F	CCTCATCCAAGCAACTTATTGTGAAACGT	5418
Q44R-R	CACAAATGAAGTTCGTTGGATGAGGGGC	5442
Q44D-F	CCTCATCCAAGATATCTTATTGTGAAACGTG	5418
Q44D-R	CACAAATGAAGTATCTTGGATGAGGGGC	5442
M29R-F	CTTTGAGGGCCGAGTACACGACTCC	5373
M29R-R	GGAGTCTGTACTCGGCCCTCAAAG	5397

^a Forward and reverse primers are indicated by F and R, respectively.

^b Sequences in bold and nucleotide numbering correspond to those of FMDV C-S8c1 (GenBank no. AJ133357), and substituted nucleotides are in italics. Restriction sites are indicated, and their nucleotides are underlined.

Cells and viruses. Vero, IBRS-2, and BHK-21 cells were grown at 37°C and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco-BRL), supplemented with 5% fetal bovine serum (Gibco-BRL), 1 µg/ml streptomycin, and 1 µg/ml penicillin. A viral stock from a type C FMDV C-S8c1 (61) isolate was produced by amplification in BHK-21 cells. Procedures for infections and virus titration in semisolid agar medium were as described previously (54).

Antibodies and reagents. Monoclonal Ab (MAb) 2C2 to nonstructural protein 3A (21) was used in the proximity ligation assay. Rabbit polyclonal anti-β-tubulin 196 was used in Western blot analysis (4). Anti-rabbit IgGs secondary Ab coupled to Alexa Fluor (AF) 647, used in immunofluorescence assays, was from Molecular Probes (Invitrogen). Polyclonal Ab 443 against the N terminus of 3A protein was produced by immunizing two New Zealand White rabbits with a synthetic peptide spanning 3A residues F26 to Q43 (FE GMVHDSIKEELRPLIQ) coupled to Cys-KLH. To generate polyclonal Ab 346 against the C terminus of 3A, plasmid pRSET-C (Invitrogen) was used for the inducible isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) expression in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS of a His-tagged polypeptide spanning 3A residues 81 to 153 fused to 3BBB, whose sequence was amplified from the pMT28 clone with primers 5'-TAGCGCTAGCAGACA GAAGATGGTG-3' and 5'-GCAGATCTTTACTCAGTGACAATCAA-3'. The restriction enzymes NheI and BglII (New England Biolabs) were used for cloning. The His-tagged protein was purified in an Ni column (Probond resin; Invitrogen) with a pH 4.5 elution buffer, and two New Zealand White rabbits were immunized with the purified protein. Rabbit immunizations were as described previously (54).

Plasmids. To assess their effect on FMDV infectivity, 3A mutations were introduced in plasmid pMT28 encoding the type C FMDV isolate C-S8c1 full-length sequence (29). Substitutions of selected amino acids were performed by site-directed mutagenesis (41), using the primers shown in Table 2. To this end, a 3A-containing fragment was amplified from pMT28 using primer 3A-F and the corresponding mutated reverse primer (-R) or primer 3A-R and the corresponding mutated forward primer (-F) at a 1 mM concentration, in a reaction, including the Expand high-fidelity PCR system BioTaq (Bioline) polymerase (1.25 U), plus *Pfu* (Biotools) polymerase (0.15U), 2 mM MgCl₂, and 1 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTPs) (Roche). After amplification, each PCR fragment was purified and an overlap extension PCR was performed using outer primers 3A-F and 3A-R. The resulting amplicons were digested with BglII and RsrII and cloned into pMT28 digested with the same restriction enzymes, as described previously (40). The correct orientation and sequence of the resulting plasmids were confirmed by sequencing with primers 3A-F and 3A-R (Table 2), as well as primers 3A-1 and 3ABB-2 (30). For

transient expression, plasmid pRSV3Awt (30) and derivatives of pRSV/L in which the luciferase gene was replaced by the 3A coding sequence of the different mutants described above were used. To this end, 3A-containing sequences were amplified from the corresponding pMT28 derivatives using oligonucleotides 3A-1 and 3A-2 (30), which included restriction sites for cloning into pRSV (HindIII and KpnI).

RNA synthesis, transfection, and infectivity. For RNA synthesis, plasmids were linearized with NdeI (New England Biolabs) and *in vitro* transcribed using SP6 RNA polymerase (Promega). After transcription, the reaction mixture was treated with RQ1 DNase (1U/µg RNA; Promega). Then, RNA was extracted with phenol-chloroform and precipitated with ethanol. The RNA integrity and concentration were determined by electrophoresis on agarose gels. *In vitro*-transcribed RNAs were transfected into BHK-21 cells using the Lipofectin reagent (Invitrogen), as described previously (40). Cells were maintained at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-supplemented fetal bovine serum (FBS). To assess RNA infectivity, at 4 h posttransfection (hpt) cells were maintained in semisolid DMEM-0.5% agar supplemented with 5% FBS. At 24 hpt, the viral titer was determined by plaque assay (54).

Viral RNA extraction, cDNA synthesis, and DNA sequencing. Viral RNA was extracted from supernatants of cell cultures or tissue homogenates from suckling mice (7), using TRI reagent (Sigma), as described by the manufacturer. cDNA was synthesized by reverse transcription of viral RNA using M-MuLV reverse transcriptase (Roche) and primers 3A-F and 3A-R. cDNA was amplified by PCR using the same primers and BioTaq DNA polymerase (Bioline) supplemented with 10% of Expand high-fidelity polymerase (Biotools) for proofreading activity. PCR products were purified with Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega) and their sequences determined by automatic DNA sequencing. DNA sequences, spanning the nucleotides corresponding to residues 105 of 2B to 5 of 3B2 viral proteins, were confirmed by at least two independent sequencing reactions using the primers indicated above. Nucleotide positions correspond to those previously described for the FMDV C-S8c1 isolate (GenBank no. AJ133357).

In vitro translation. Rabbit lysate reticulocytes (Promega) were incubated with 1 µg of transcribed RNAs and 14.3 µCi of [³⁵S]methionine and cysteine (Amersham) for 1 h at 30°C and treated with 50 µg of RNase A for 15 min at room temperature, as described previously (56). Translated proteins were analyzed by 10% SDS-PAGE.

In situ PLA. Samples were processed as described by the manufacturer (OLINK Bioscience). Briefly, IBRS cells were grown on glass coverslips and transfected with 1 µg of pRSV3Awt and derivatives using Lipofectamine (Invitrogen) as described by the manufacturer or infected with FMDV C-S8c1 at a multiplicity of infection (MOI) of 5 PFU/cell. At 24 hpt, or 3 h postinfection (hpi), monolayers were washed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature, blocked, and permeabilized with PBTG buffer (0.1% Triton X-100, 1% bovine serum albumin [BSA], and 1 M glycine in PBS) for 15 min at room temperature. Primary Ab was prepared using the Probe-maker kit (OLINK, Bioscience) by using the manufacturer's recommendations: 1 mg/ml of monoclonal Ab (IgG class) 2C2, affinity purified through a protein G column, was independently conjugated to each of a pair of oligonucleotides to generate plus and minus proximity ligation assay (PLA) probes. Cells on coverslips were incubated with conjugated primary antibodies diluted in PBS with 1% BSA for 1 h at room temperature and then washed twice with buffer A (0.01 M Tris, 0.15 M NaCl, and 0.05% Tween 20) for 5 min. The signal development (ligation, amplification, and hybridization) was performed according to the manufacturer's instructions in PLA Duolink II. Briefly, a ligation-ligase solution was added to each sample, and slides were incubated in a preheated humidity chamber for 30 min at 37°C and washed twice in buffer A for 2 min with gentle agitation. Then, the amplification-polymerase solution, including the fluorescent probe (λ_{exc} of 554 nm), was added and slides were incubated in the preheated humidity chamber for 100 min at 37°C. Finally, the slides were washed three times in buffer B (0.2 M Tris, 0.1 M NaCl [pH

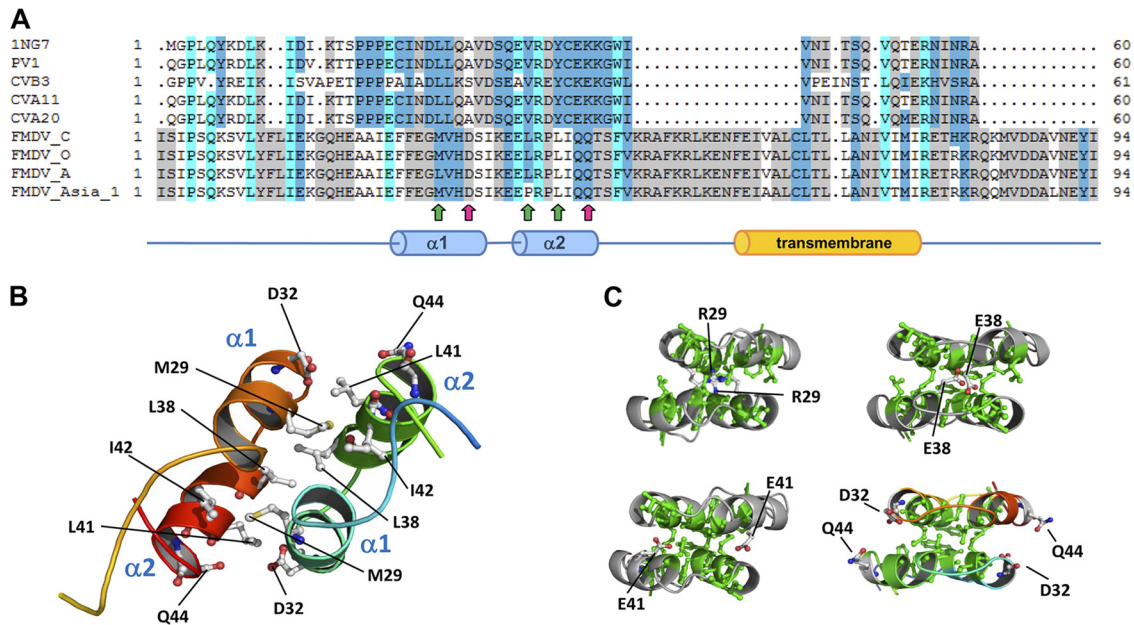


FIG 1 (A) Top, structure-derived multiple sequence alignment of the soluble domain and vicinities of diverse 3A proteins of enteroviruses and FMDVs (Uniprot IDs are given in parenthesis): 1NG7, poliovirus type 1 strain Mahoney (P03300), sequence used as the template for homology modeling procedures (65); PV1, poliovirus type 1, CHN-Guangdong/92-2 isolate (Q9E912); CVB3 (P03313); CVA11 (Q7T7P4); CVA20 (Q7T7N8); FMDV type C, C-58c1 isolate, (Q9E2G4); FMDV type O (P03305); FMDV type A (P49303); FMDV type Asia 1 (Q7TDB3). Positions in the alignment are colored according to sequence conservation by average BLOSUM 62 score (similar residues according to BLOSUM 62 score are colored as the most conserved one using standard Belvu colors: <0.50, white; 0.51 to 1.50, light gray; 1.51 to 3.00, medium blue; >3.00, cyan) (<http://sonnhammer.sbc.su.se/Belvu.html>) (64). Positions of D32 and Q44 residues in the FMDV-3A modeled sequence are indicated by magenta arrows. Position of hydrophobic residues M29, L38, and L41 are marked by green arrows. (B) General view of the 3D model of wild-type FMDV 3A protein dimer. Position of selected residues hypothetically forming the binding interface and involved in FMDV 3A dimerization is indicated. Secondary structure elements $\alpha 1$ and $\alpha 2$ are also indicated. (C) 3D models of analyzed mutants at the dimerization binding face. From left to right and top to bottom: M29R, L38E, L41E, and the relative positions of D32 and Q44 residues (mutants Q44D and Q44R).

7.5]) for 10 min with agitation and protected from light. In the case of transiently transfected cells, samples were further incubated with primary polyclonal Ab 346 and anti-rabbit IgG secondary antibodies coupled to Alexa Fluor 647 (Invitrogen) to detect 3A protein. Slides were mounted with a coverslip using a minimal volume of Duolink II mounting medium with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Cells were observed with a confocal LSM710 vertical (Bio-Rad/Zeiss) microscope. As reported for dimerization detection by PLA (45), fluorescence was quantified using the ImageJ software (analyze particles plug-in). The percentage of the fluorescence intensity, relative to that determined for cells expressing 3Awt protein, was plotted for each mutant protein \pm standard error.

Western blot analysis. Vero cells were grown on 35-mm tissue culture plates and transfected as described above with 1 μ g of different plasmids. At 24 hpt, the cells were scraped on ice into NP-40 lysis buffer (10 mM EGTA, 2.5 mM MgCl₂, 1% NP-40, 20 mM HEPES [pH 7.4]) and sonicated. Equal amounts of total protein of each sample, estimated by Bradford (13), were mixed with Laemmli sample buffer and boiled. Samples were separated by 12% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked, and proteins were detected by incubation with the corresponding 3A-specific polyclonal rabbit Ab as described above.

Mouse experiments. The infectivity of the FMDV 3A mutants in suckling mice was tested as described previously (7). Briefly, *in vitro*-transcribed viral RNA (from 10² to 10⁵ ng) mixed with 20 μ l of Lipofectin (Invitrogen) in a final volume of 100 μ l in PBS was inoculated intraperitoneally in litters (4 to 5 mice per RNA) of Swiss newborn mice. Dead animals were scored up to 11 days after infection. Mice showing severe signs of disease (tremors ataxia, paralysis of the hind limbs) were euthanized. All animals in this study were handled in the BSL-3 facilities at CISA-INIA (Madrid, Spain), in strict accordance with the guidelines of the European Community 86/609/CEE. The protocol was approved by

the Committee on the Ethics of Animal Experiments of INIA (permit number CBS 2008/016).

Data analysis. One-way analysis of variance was performed with statistical package SPSS 19.0 (SPSS, Inc.) for Windows. Data are presented as means \pm standard errors.

RESULTS

Homology model of the 3A protein and dimerization interface.

To provide basic insights into the structure-function relationships of the FMDV 3A protein, 3D structural models of its N-terminal region (residues 1 to 94) were generated by bioinformatic procedures, using the analogous structure of the soluble domain of human poliovirus 3A protein (65) as the template. As a result, compatible unaligned models were rendered for residues 15 to 48 of the FMDV 3A protein, in correspondence to the structured region in solution from the experimental template. Quality QMEAN4 raw scores for the model of wild-type protein monomers in this region were 0.622 (Z score = 0.09) and 0.621 (Z score = 0.09), respectively. These values are comprised within the range of quality standards for accepted homology-based structure models (10). The tertiary structure of each monomer is organized mainly on the structural basis of two α -helices ($\alpha 1$, residues 25 to 33, and $\alpha 2$, residues 37 to 44) connected by a 3-residue loop (Fig. 1A and B), hypothetically responsible for the dimerization process. Consensus from diverse methods of transmembrane domain predictions (6, 33, 70) points to the region comprised between residues 59 to 76 as putatively responsible for 3A protein anchorage to membrane (Fig. 1A). General inspection of a minimized 3D structure of the wild-type FMDV 3A homodimer model showed a

quaternary organization of the N-terminal region protein similar to that of PV 3A protein obtained by NMR spectroscopy (65). The dimerization interface in FMDV 3A would include all residues in the 25-to-44 stretch of the two antiparallel monomers. As in PV 3A, a number of hydrophobic contacts between $\alpha 1$ and $\alpha 2$ helices could provide physical stability to the dimer. Such interactions would involve residues F25, F26, M29, V30, L38, L41, and I42, in both monomers. Genotypes carrying mutations introducing similar electrostatic repulsive interactions in the hydrophobic core could be unable to be functionally competent. In addition, gradations of that biological effect would be also related to the differential local accumulation of heterogeneous repulsive interactions. Thus, mutations L38E, L41E, and M29R within the hydrophobic core could disrupt the binding interaction in the region by creating repulsions from facing negatively (or positively) charged residues (Fig. 1C). On the other hand, polar contacts such as that of residues D32 and Q44 (Fig. 1C), flanking the C-terminal ends of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ helices and exposed to the solvent, could also modulate the interactions between both monomers. Mutation Q44R, found to mediate FMDV adaptation to the guinea pig (48), could significantly modify the electrostatic surface of the region, favoring the formation of salt bridges between both R44 and D32 residues and eventually increasing dimer stability.

Based on these predictions, residues at positions 29, 38, and 41, highly conserved among FMDVs of different serotypes (16), were selected to be replaced by a negatively charged E residue, which would interfere in the hydrophobic interactions predicted in this 3A region. On the other hand, two replacements at residue 44 were analyzed: Q44R and Q44D, predicted to influence dimer stability.

Substitutions at the predicted hydrophobic interface affect 3A dimerization. Identification of protein bands potentially corresponding to 3A dimers in FMDV-infected cells is impaired by the presence of protein precursors from the 3ABBB region (30). Therefore, we first addressed the effect of the substitutions selected on FMDV 3A protein transiently expressed in cultured cells. In cells transfected with plasmid pRSV3Awt, a major protein band of the expected mobility was observed by Western blotting using a 3A-specific Ab (Fig. 2A). Additional lower-mobility bands suggestive of 3A dimer/multimer formation were also observed. When cells were transfected with pRSV derivatives expressing 3A with mutations M29R, L38E, or L41E or double-mutant L38-L41E, expected to destabilize dimer formation, no bands corresponding to putative dimers were observed (Fig. 2A). Dimerization was also observed in cells expressing mutant proteins Q44D and Q44R, with the intensity of the dimer band in both cases slightly lower than that of 3Awt.

To further characterize 3A homodimerization, we set up an *in situ* protein ligation assay previously used to visualize protein-protein interaction in the cell by fluorescence microscopy (3, 28, 45). The strategy, detailed in Materials and Methods and summarized in Fig. 3A, is based on coupling a monoclonal Ab that recognizes a single epitope on each 3A molecule to two different oligonucleotide probes, + and -, which subsequently hybridize to oligonucleotides included in a ligation solution. Should the pair of antibodies locate close enough (<40 nm), their attached probes would ligate, forming a circle; amplification of this circle upon addition of fluorescently labeled nucleotides allows visualization of each single interaction by fluorescence microscopy (71). The monoclonal Ab selected for this assay was directed against an epitope on the C-terminal region of 3A, distant from the N-ter-

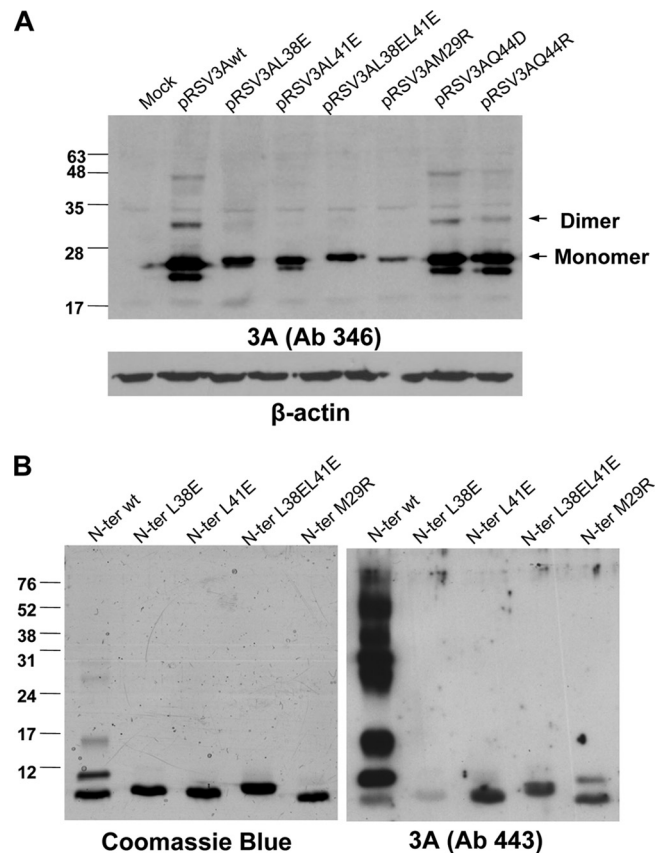


FIG 2 Analysis of 3A proteins and peptides, including mutations potentially affecting dimerization. (A) Expression in eukaryotic cells of 3A proteins. Immunoblot of lysates of Vero cells transfected with 1 μ g of each of the plasmids indicated. Proteins were resolved on a 12% SDS-PAGE gel, transferred to a membrane, and incubated with polyclonal Ab 346 generated against the C terminus of 3A. The protein bands whose migrations correspond to the monomeric and the dimeric forms of 3A are indicated with arrows. Membranes were reprobed with a MAb against β -tubulin, as a control for protein loading. (B) Analysis of synthetic peptides from the N terminus of the 3A wild-type protein and L38E, L41E, L38E/L41E, and M29R mutants. Each peptide (1.25 μ g) was resolved on two 12% SDS-PAGE parallel gels, one of which was stained with Coomassie blue. The second gel was transferred to nitrocellulose membrane and blotted with polyclonal Ab 443 produced against the N terminus of 3A. The migrations and sizes of the molecular weight markers are indicated on the left.

terminal region analyzed to avoid loss of recognition due to the mutations introduced. The assay included a biological control of noninfected or transfected cells and two technical controls lacking one of the probes each. As shown in Fig. 3B, when cells were FMDV infected and incubated with probes 2C2+ and 2C2-, a dimer fluorescent signal was observed. Fluorescence was also noticed in cells transfected with pRSV3Awt. Significant reductions in the fluorescence intensity, of about 40% of that of 3Awt, were detected in cells transfected with mutant plasmids pRSV3AL38E and pRSV3AL41E (Fig. 3C and D). When plasmid pRSV3AL38E-L41E bearing the two substitutions was analyzed, the signal reduction observed was higher, at about 80% (Fig. 3C). These results support the capacity of 3A to form homodimers and suggest that replacements L38E and L41E impaired dimer formation.

Replacements M29R, L38E, and L41E also prevent dimer formation by synthetic peptides spanning the 3A dimerization interface. To study the potential of the N terminus of 3A to form

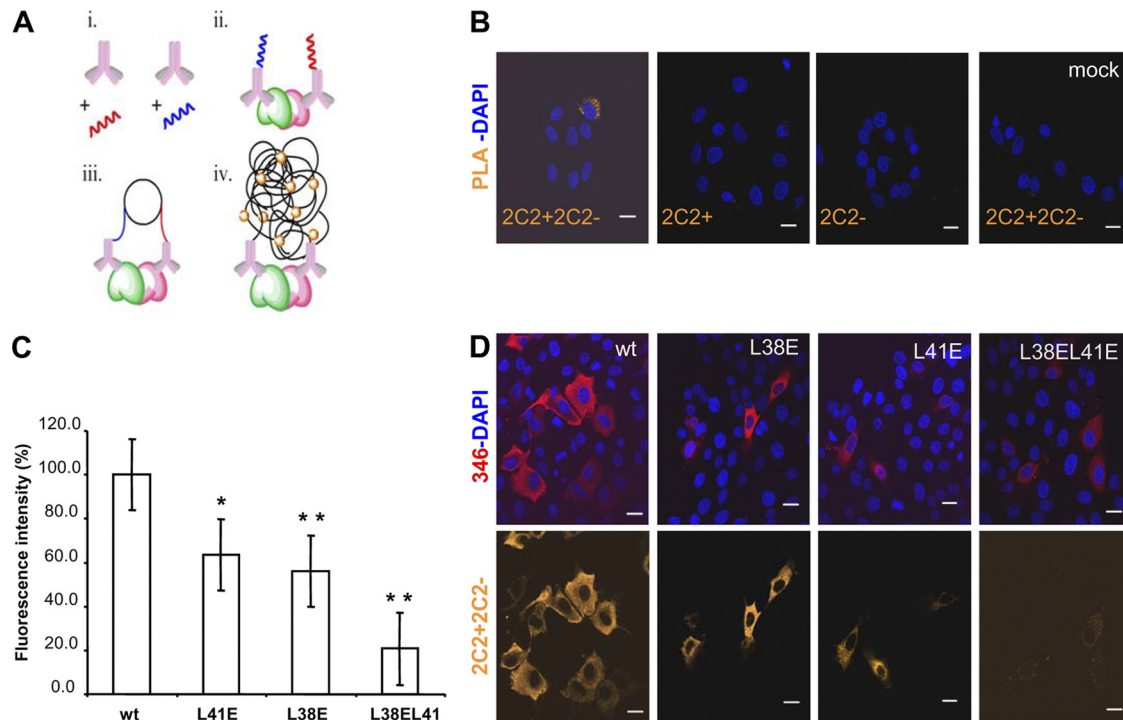


FIG 3 Proximity ligation assay to confirm homodimer protein complexes. (A) The scheme summarizes the procedure: (i) conjugation of primary monoclonal Ab 2C2, with PLA probes + (red) and - (blue); (ii) incubation of the sample where dimerized proteins are represented in green and cherry, with the two conjugates of monoclonal Ab 2C2, probes + and -; (iii) hybridization and ligation reaction with oligonucleotides complementary to the PLA probes; (iv) final rolling-circle amplification and detection of the amplified products with the nucleotide fluorescent probe (orange balls). (B) Confocal fluorescence microscopy, from left to right: (i) PLA reaction in cells infected with FMDV (MOI of 5 PFU/ml); negative controls of infected cells incubated with (ii) 2C2-probe + or (iii) 2C2-probe -; and (iv) PLA reaction in mock-infected cells with probes + and -. (C) Plot of percentage of fluorescence intensity, relative to that of cells transfected with pRSV3Awt, in cells transfected with pRSV3AL38E, pRSV3AL41E, and pRSV3AL38EL41E. Raw data were quantified using the ImageJ program, $n \geq 40$. Mean values and standard errors are represented. Statistically significant differences, relative to pRSV3Awt, are indicated by * ($P \leq 0.05$) or ** ($P \leq 0.005$). (D) PLA reaction (orange) in cells transfected with the plasmids in panel C (24 hpt) and incubated with rabbit polyclonal Ab 346 (red) detected with Alexa Fluor 647 anti-rabbit Ab. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar, 20 μm .

dimers and multimers, peptides spanning residues I1 to F52 (termed N peptides) were synthesized by solid-phase procedures, as described in Materials and Methods. The electrophoretic mobility of peptide N-wt, spanning the sequence corresponding to the parental C-S8c1 FMDV, revealed by Western blotting with an Ab against the N terminus of 3A protein, showed a band of a size about that corresponding to the monomeric peptide, as well as additional bands corresponding to higher-order forms (Fig. 2B). A pattern of bands similar to that observed by Western blotting was revealed by mass staining; in this case, the monomeric form was the major band, indicating that the Ab used preferentially recognized dimer/multimeric peptide forms. The inverse relationship observed between the higher-order forms revealed by the Ab recognition or by mass staining could be related to an increase of Ab recognition due to epitope multimerization. On the other hand, only monomeric bands were detected by mass staining of mutant peptides, which showed slight differences in mobility, as reported to occur among 48-mer peptides differing in single residues (53). In addition, the Ab staining showed a dramatic decrease of higher-order forms, N-M29R being the only peptide for which a faint dimeric band was observed. The poor Ab recognition of peptide N-L38E could be explained by either an altered conformation adopted by this peptide or by a possible implication of the mutated residue in the peptide-Ab interaction.

Thus, the overall results indicate that (i) FMDV 3A protein can

form dimers and multimers, (ii) its N-terminal fragment is involved in this process, and (iii) replacement of the hydrophobic residue L at positions 38 and 41 by a charged amino acid E diminishes dimerization.

Mutations that abolish hydrophobic interactions at residues L38 and L41 of the 3A protein are detrimental for virus infectivity. To assess the effect of replacements L38E and L41E located at the predicted hydrophobic dimerization interface on the FMDV life cycle, the infectivity of mutant RNAs transcribed from plasmids pMT28L38E and pMT28L41E carrying these substitutions was compared with that of the corresponding parental C-S8c1 RNA derived from plasmid pMT28. To this end, plaque formation was determined after 24 h of transfection with different amounts of RNA (from 1 to 10^3 ng) of BHK-21 cell monolayers maintained in semisolid medium. No infectious virus was recovered after transfection of cells with up to 1 μg of RNA transcribed from pMT28L38E or pMT28L41E (data not shown), indicating that RNAs with these mutations showed an infectivity at least five log lower than that of the RNA control pMT28. When transfected cells were incubated in liquid medium, a delay in the recovery of infectious virus, relative to transcript pMT28, was observed for transcripts pMT28L38E and pMT28L41E (no infective virus was found at 24 hpt, and limited titers of about 1×10^2 and 10 PFU/ml were detected at 72 hpt, respectively) (Fig. 4). Upon two additional passages of the transfection supernatant, the viral titers re-

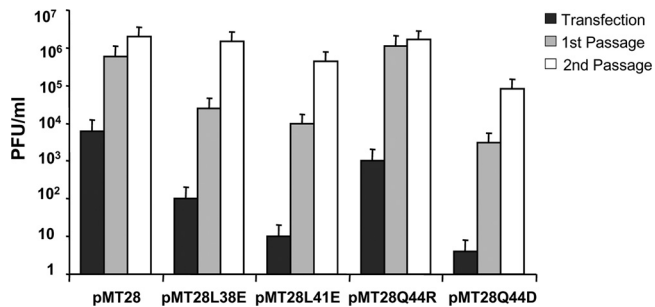


FIG 4 Effect of 3A mutations on FMDV infectivity. (A) Viral titers of viruses harboring different 3A mutations recovered after transfection, first or second passage on BHK-21 cells, were determined at the time of complete CPE, as follows: 24 hpt for pMT28 and pMT28Q44R or 72 hpt for pMT28L38E, pMT28L41E, and pMT28Q44E; 24 hpi for pMT28 and pMT28Q44R or 48 hpi for pMT28L38E, pMT28L41E, and pMT28Q44D after the first passage; 24 hpi for all the viruses after the second passage. Data are the averages from three independent transfections; one out of the three experiments for pMT28-L41E RNA failed to yield infectious virus.

covered from transcripts pMT28L38E and pMT28 were similar, while those recovered from transcript pMT28L41E were about 1 log lower (Fig. 4). Emergence of infectious virus was concomitant with the imposition in the viral populations of replacements for each of the mutant RNAs analyzed—E38V and E41A—that restored the hydrophobicity of the residues, as determined by sequencing of the viral RNA at the second cell passage given to the transfection medium (Table 3). Selection mutant E38V was observed in the two additional transfections of RNA from pMT28L38E performed. On the other hand, infectious virus was recovered in only one of the three additional transfections carried out with RNA from pMT28L41E, in which replacement E41A was found imposed on the viral populations (Table 3). These results indicate that replacement of hydrophobic residues by charged residues at positions 38 and 41 of 3A drastically reduces viral multiplication, leading to selection of substitutions to nonpolar V and A residues that restore hydrophobicity and favor dimer stability.

To study whether the point mutations introduced in 3A could alter the translation of the viral polyprotein, *in vitro*-transcribed RNAs from pMT2-L38E and pMT28L41E were *in vitro* translated in a rabbit reticulocytes lysate. The protein pattern obtained for the different mutants was similar to that of pMT28 control RNA (data not shown).

Mutation Q44D is detrimental for virus infectivity. To study the effect of electrostatic charge acquisition at residue Q44 on FMDV life cycle, the infectivity of mutants with replacements Q44R and Q44D, which resulted in a slightly lower dimer detection in transiently expressed 3A mutants (Fig. 2A), was analyzed. An infectivity of about 197 PFU/ng of RNA was determined for transcript pMTQ44R, a value slightly higher than that observed for the control RNA from pMT28 (data not shown). When transfected cells were incubated in liquid medium, RNA from mutant Q44R produced a cytopathic effect at a time similar to that of pMT28, comparable viral titers were found in the culture medium at 24 hpt and upon the two additional passages of the transfection supernatant (Fig. 4), and the viruses recovered maintained the substitution over 3 additional cell passages. Similar results were obtained from two additional transfections performed with pMTQ44R RNA. These results confirm that replacement Q44R

does not exert a detrimental effect on FMDV infectivity in cultured cells.

On the contrary, an infectivity of <1 PFU/μg was found for RNA from pMTQ44D, a delay in the recovery of infectious virus was observed after its transfection (no infective virus was found at 24 hpt, and limited titers of about <10 PFU/ml were detected at 72 hpt), and the viral titers recovered after two passages of the supernatant of cells transfected were about 1 log lower than those recovered from pMT28 RNA. Emergence of infectious virus was associated with the imposition of replacement D44E, which was also observed in three additional transfections of RNA from pMT28-Q44D (Table 3).

On the other hand, *in vitro* translation of RNAs from pMT28Q44R and pMT28Q44D showed a protein pattern similar to that of pMT28 control RNA (data not shown). Thus, while replacement Q44R leads to viruses with infectivity similar to that of the parental C-S8c1 virus, introduction of an acidic residue at position 44 (replacement Q44D) imposes selection of an E residue that maintains the negative charge but acquires a structure similar to that of the parental Q.

Mutations at residues L38, L41, and Q44 of 3A protein abolish infectivity in suckling mice. To assess the effect of the mutations introduced in 3A on the replication of the virus in an animal model, RNAs transcribed from pMT28L38E, pMT28L41E, pMT28Q44R, and pMT28Q44D were injected into suckling mice, and the emergence of clinical signs and instances of death were followed for 10 days. RNA from pMT28 was used as a control. An amount of 100 ng RNA from pMT28 killed 4 of the 5 animals injected, a lethality value similar to that reported for other FMDV RNAs derived from full-length infectious clones (7). RNA from pMT28-Q44R was also lethal for suckling mice, as 100 ng of RNA killed 3 out of 4 injected animals, and sequencing of the 3A coding region of RNA extracted from dead mice showed the presence of replacement Q44R, confirming the capacity of the virus carrying this mutation to infect suckling mice (47). Conversely, RNAs from pMT28Q44D, pMT28L38E, and pMT28L41E were not lethal at doses of RNA up to 10⁵ ng (Table 4), suggesting that these replacements allow viral replication in cultured cells, enabling selection of revertant mutants, and abolish viral multiplication in an animal model, such as suckling mice.

DISCUSSION

The self-association of proteins to form dimers and higher-order oligomers is a common biological phenomenon. Recent structural

TABLE 3 Replacements selected from RNAs with mutations in 3A

Residue ^a	Substitution introduced	Sequence recovered ^b
L38(CTC)	E38(GAG)	V38(GTG) ^c
L41(CTC)	E41(GAG)	A41(GCG) ^d
Q44(CAA)	R44(CGA)	R44(CGA) ^c
Q44(CAA)	D44(GAT)	E44(GAA) ^c

^a Amino acid residue and position in 3A are indicated relative to the C-S8c1 sequence. The corresponding codon is given in parenthesis.

^b Replacement selected in the virus recovered upon RNA transfection of BHK-21 cells (see Materials and Methods for details). In each case, the substitution shown was the only mutation found in the RNA region sequenced.

^c Sequence of the viral population recovered from the 3 independent experiments performed.

^d Sequence of the viral population recovered from 2 of the 4 independent experiments performed.

TABLE 4 RNA infectivity in suckling mice of FMDV 3A mutants

RNA	RNA dose (ng)	No. of dead mice/total no. of mice
pMT28	10 ²	4/5
	10 ³	5/5
pMT28L38E	10 ⁵	0/5
pMT28L41E	10 ⁵	0/5
pMT28Q44D	10 ⁵	0/4
pMT28Q44R	10 ²	3/4
	10 ³	4/4

and biophysical studies show that protein dimerization or oligomerization is a key factor in the regulation of different protein functions (38), including proteins relevant for virus replication (36). In this line, dimerization/multimerization has been shown to be relevant for the biological role of nonstructural proteins of different picornaviruses (15, 17, 57, 77), including FMDV (67). In this study, we describe experiments aimed to gain insight on the structure-function relationship of FMDV 3A protein, a nonstructural protein relevant for virus replication, virulence, and host range for which the molecular mechanisms that mediate its biological activity are poorly understood. Previous attempts to obtain structural data from *E. coli*-expressed 3A and peptides corresponding to the N terminus of 3A showed an aggregation tendency that impaired subsequent analyses. In this work, using the NMR structure of PV 3A as a template, a molecular model for the N-terminal 94 residues of FMDV 3A was derived. The model shows that 3A contains two α helices (α 1, residues 25 to 33, and α 2, residues 37 to 44) and that, as in PV and CVB3 3A structures, a number of hydrophobic contacts in helices α 1 and α 2 could provide physical stability to the dimer. In addition, in FMDV 3A, the two alpha-helices are connected by a 3-residue loop (I34, K35, and E36) that conforms a patch of charged residues. In the equivalent loop positions, a patch of negatively charged residues is present in PV (D29 and E32) (65) and in CVB3 (D30 and E32) (72) 3A proteins.

According to the model, the analysis of the transiently expressed FMDV 3A protein suggested that 3A forms dimers/multimers as shown by Western blotting analyses (Fig. 2A). Protein oligomerization even in the presence of SDS, has been previously described for PV 3AB (35, 74). This homodimerization of 3A was also evidenced by an *in situ* protein ligation assay designed to visualize protein-protein interactions in the cell by fluorescence microscopy (Fig. 3). The contribution of the N-terminal fragment of 3A to the dimerization was detected using the N-wt synthetic peptide, spanning residues 1 to 52 of 3A, whose mobility in SDS-PAGE revealed by mass staining showed a major band of a size about that corresponding to the monomeric peptide, as well as bands corresponding to higher-order oligomers (Fig. 2B).

Based on the model and on sequence conservation among FMDV isolates, hydrophobic interactions between residues at the helical regions of both monomers were expected to be the main dimerization determinant. Indeed, replacements L38E, L41E, and M29R, involving charge acquisition at residues predicted to contribute to the hydrophobic interface, abolished formation of dimer bands in transiently expressed 3A (Fig. 2A). Moreover, the single replacements L38E and L41E and, to a higher extent, the double replacement L38EL41E showed a reduced fluorescence

signal in the proximity ligation assay (Fig. 2B), while expression of 3A was evidenced by conventional immunofluorescence with a different anti-3A antibody (Ab 346). A similar decrease in the dimerization signal in a double hybrid system has been reported for CVB3 3A carrying a double mutation (by alanine replacement) at residues L25 and L26 (72). On the other hand, peptides from the N terminus of 3A with substitutions L38E, L41E, M29R, or L38E-L41E showed a dramatic reduction of the electrophoretic bands of a size higher than that corresponding to their monomeric forms. Overall, these results suggest that, as reported for CVB3, preservation of a cluster of hydrophobic interactions in this region is essential for 3A dimer stability.

When FMDV RNA with replacement L38E was transfected in BHK-21 cells, a delay, relative to cells transfected with parental C-8c1 RNA, in both the emergence of cytopathic effect and the recovery of infectious virus was observed in three independent experiments. Viruses recovered from the second passage in cultured cells of the transfection medium displayed replacement E38V that resembled the nonpolar (L) residue of the parental C-8c1 virus. On the other hand, infectious virus could be recovered in two of the four independent transfection experiments performed with RNA carrying replacement L41E, and the sequencing of the viral populations obtained displayed the replacement E41A, which again restored the nonpolar nature of this position. The lower viral titers recovered from transfections with L41E RNA, relative to those produced by L38E RNA, as well as the lack of recovery of infectious virus from two of the transfections with RNA L41E, suggest that this replacement could affect FMDV replication more severely than L38E. While direct reversion to the parental residue L at E38 and E44 residues requires at least 2 nucleotide substitutions, single transversions mediate replacements E38V (A5411T) and E41A (A5420C) (Table 3), making their selection more likely. These results indicate that the presence of nonpolar hydrophobic residues at positions 38 and 41 of 3A is essential for virus replication and that no second-site suppressor mutations at other 3A residues, unlike as reported for coxsackievirus RNA with replacements at analogous 3A hydrophobic residues (72), are frequently selected during the limited replication of RNA mutants L38E and L41E. Thus, taken together, our results suggest that the conservation of hydrophobic interactions at the predicted dimerization interface is required for efficient FMDV replication in cultured cells.

In CVB3, polar interactions, other than the hydrophobic contacts such as those contributed by residues L25 and L26, have been shown to participate in 3A dimer stability; thus, the establishment of salt bridges between residues D24 and K41 was found critical for dimer stability, RNA replication, and inhibition of protein transport (72). K41 is part of a cluster of charged residues located at the C terminus of CVB 3A α -helix 2. A similar cluster of charged, solvent exposed residues is found in PV 3A α -helix 2, and mutations at these residues (E38, K39, and K40) yield nonviable viruses, indicating the biological relevance of these polar, charged residues located at the α -helix 2 (75). In contrast, the equivalent positions at the C terminus of FMDV 3A α -helix 2 are occupied by a cluster of polar but not charged residues: Q43, Q44, and T45. According to our model, residues D32 and Q44 of FMDV 3A, located flanking the C-terminal extremes of helices α 1 and α 2 and exposed to the solvent, could establish polar interactions between both monomers. Replacement Q44R, which mediates adaptation to the guinea pig (48), could allow formation of an intermolecular

salt bridge with D32 with the consequent dimer stabilization. Conversely, replacement Q44D would impair polar interactions with D32. Despite these predictions, neither of these substitutions produced a marked effect on the dimer formation of transiently expressed 3A, suggesting that the polar interactions between Q44 and D32 are not critical for 3A dimerization, albeit they could modulate dimer stability. A similar observation was reported for CVB3 3A in which replacements to A at polar residues S28 and Y37, predicted to establish an intermolecular hydrogen bond, did not affect dimerization and protein transport, while only replacement Y37A impaired virus replication, leading to recovery of a second-site suppressor mutation (72).

When the effect of electrostatic charge acquisition at position 44 on the infectiveness of FMDV RNA was analyzed, transfected RNA with replacement Q44R produced a cytopathic effect and infectious virus in a manner similar to that of the parental RNA pMT28, and the viruses recovered maintained the substitution over 3 additional cell passages, indicating that this change is not detrimental for virus replication in cultured cells. This result is consistent with the ability of the guinea pig-adapted virus carrying replacement Q44R to kill suckling mice and to cause acute disease in the pig (47). On the contrary, in cells transfected with RNA carrying the replacement Q44D, a delay in the production of infectious virus was observed and the recovered virus displayed replacement D44E. In this case, substitution of D by E did not restore a polar, uncharged side chain, maintaining a milder negative charge and structural features similar to those of the parental Q. Direct reversion to the parental residue Q requires 2 nucleotide substitutions, while a single transversion mediates replacement D44E (T5430A) (Table 3). Residue Q44 is rather conserved among FMDVs, and replacements at these residue have been found in guinea pig-adapted isolates (16). Our results suggest that, despite the fact that replacements at Q44 do not substantially affect the capacity of transiently expressed 3A to form dimers, this residue is relevant for virus replication. Thus, while replacement Q44R retains infectivity in cultured cells at levels similar to that of the parental C-S8c1, Q44D leads to the recovery of the D44E mutant.

Despite the fact that replication impairment introduced by mutations L38E, L41E, and Q44D permitted selection of revertant mutants able to grow in cultured cells, RNAs carrying these substitutions caused no death or clinical signs when inoculated in suckling mice, opposite to what was observed for RNA from C-S8c1 (pMT28) and from mutant Q44R. These results indicate that, as previously reported (7), *in vivo* multiplication frequently imposes different constraints for virus replication and disease emergence compared to those found in cultured cells.

Although further work is required to assess the contribution of dimerization inhibition on the detrimental effect of the mutants studied, our results suggest that, despite the unique characteristics of FMDV 3A protein among picornaviruses, FMDV requires 3A dimerization for efficient replication. Our data support that the hydrophobic interactions established between the α -helices of both monomers are the main determinant for dimerization and its impairment is detrimental for virus multiplication. On the other hand, mutations affecting polar interactions between residues at the α -helices can affect FMDV replication, without abolishing 3A dimerization.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank E. Domingo and C. Escarmis for infectious clone pMT28. We are indebted to B. Borrego for advice and help with animal experiments and to M. A. Martín-Acebes and M. Sáiz for discussions and critical reading of the manuscript.

Work at the F.S. laboratory was supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Spain): BIO2008-0447-C03-01, CSD2006-0007, and BIO2011-24351. Work at the D.A. laboratory was supported by MICINN grants BIO2008-0447-C03-01 and SAF2011-24899 and by Generalitat de Catalunya (SGR2009-0492). Work at the P.G.-P. laboratory was supported by MICINN grants SAF2007-61926, IPT2011-0964-900000, and SAF2011-13156-E and by the European Commission through grants FP7 HEALTH-F3-2009-223431 (EU project "Divinocell") and FP7 HEALTH-2011-278603 (EU project "Dorian"). Support from the Fundación Ramón Areces and the Centro de Computación Científica CCC-UAM (computational support) is also acknowledged. Work at Biomol-Informatics was partially financed by the European Social Fund. Work at the L.K. laboratory was supported by MICINN grants PI 201120E007 and PI 201120E089 and by MSC grant FIS 2010-PI10/00594.

REFERENCES

- Andino R, Boddeker N, Silvera D, Gamarnik AV. 1999. Intracellular determinants of picornavirus replication. *Trends Microbiol.* 7:76–82.
- Andino R, Rieckhof GE, Achacoso PL, Baltimore D. 1993. Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J.* 12:3587–3598.
- Antonio LS, et al. 2011. P2X4 receptors interact with both P2X2 and P2X7 receptors in the form of homotrimeric. *Br. J. Pharmacol.* 163:1069–1077.
- Armas-Portela R, Parrales MA, Albar JP, Martinez AC, Avila J. 1999. Distribution and characteristics of betaII tubulin-enriched microtubules in interphase cells. *Exp. Cell Res.* 248:372–380.
- Bachrach HL. 1977. Foot-and-mouth disease virus, properties, molecular biology and immunogenicity, p 3–32. *In* Romberger JA (ed), Beltsville symposia in agricultural research, vol I. Virology in agriculture. Allanheld, Osmund, Monclair, NJ.
- Bagos PG, Liakopoulos TD, Hamdrakas SJ. 2006. Algorithms for incorporating prior topological information in HMMs: application to transmembrane proteins. *BMC Bioinformatics* 7:189.
- Baranowski E, Molina N, Nunez JI, Sobrino F, Saiz M. 2003. Recovery of infectious foot-and-mouth disease virus from suckling mice after direct inoculation with *in vitro*-transcribed RNA. *J. Virol.* 77:11290–11295.
- Beard CW, Mason PW. 2000. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 74:987–991.
- Belsham GJ. 2005. Translation and replication of FMDV RNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 288:43–70.
- Benkert R, Templin T, Schim SM, Doorenbos AZ, Bell SE. 2011. Testing a multigroup model of culturally competent behaviors among underrepresented nurse practitioners. *Res. Nurs. Health* 34:327–341.
- Bienz K, Egger D, Pasamontes L. 1987. Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* 160:220–226.
- Bienz K, Egger D, Rasser Y, Bossart W. 1983. Intracellular distribution of poliovirus proteins and the induction of virus-specific cytoplasmic structures. *Virology* 131:39–48.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- Buenz EJ, Howe CL. 2006. Picornaviruses and cell death. *Trends Microbiol.* 14:28–36.
- Cameron CE, Suk Oh H, Moustafa IM. 2010. Expanding knowledge of P3 proteins in the poliovirus lifecycle. *Future Microbiol.* 5:867–881.
- Carrillo C, et al. 2005. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 79:6487–6504.
- Cuconati A, Xiang W, Lahser F, Pfister T, Wimmer E. 1998. A protein linkage map of the P2 nonstructural proteins of poliovirus. *J. Virol.* 72:1297–1307.
- Cho MW, Teterina N, Egger D, Bienz K, Ehrenfeld E. 1994. Membrane

- rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology* 202:129–145.
19. Choe SS, Kirkegaard K. 2004. Intracellular topology and epitope shielding of poliovirus 3A protein. *J. Virol.* 78:5973–5982.
 20. Datta U, Dasgupta A. 1994. Expression and subcellular localization of poliovirus VPg-precursor protein 3AB in eukaryotic cells: evidence for glycosylation *in vitro*. *J. Virol.* 68:4468–4477.
 21. De Diego M, Brocchi E, Mackay D, De Simone F. 1997. The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch. Virol.* 142:2021–2033.
 22. Deitz SB, Dodd DA, Cooper S, Parham P, Kirkegaard K. 2000. MHC I-dependent antigen presentation is inhibited by poliovirus protein 3A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:13790–13795.
 23. Doedens JR, Giddings TH, Jr, Kirkegaard K. 1997. Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *J. Virol.* 71:9054–9064.
 24. Domingo E, et al. 1990. Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus, p 233–266. *In* Murphy FA, Van Regenmortel MHV (ed), *Applied virology research*, vol 2. Plenum Publishing Corporation, New York, NY.
 25. Egger D, Teterina N, Ehrenfeld E, Bienz K. 2000. Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J. Virol.* 74:6570–6580.
 26. Falk MM, et al. 1990. Foot-and-mouth disease virus protease 3C induces specific proteolytic cleavage of host cell histone H3. *J. Virol.* 64:748–756.
 27. Fujita K, et al. 2007. Membrane topography of the hydrophobic anchor sequence of poliovirus 3A and 3AB proteins and the functional effect of 3A/3AB membrane association upon RNA replication. *Biochemistry* 46: 5185–5199.
 28. Gajadhar A, Guha A. 2009. A proximity ligation assay using transiently transfected, epitope-tagged proteins: application for *in situ* detection of dimerized receptor tyrosine kinases. *Biotechniques* 48:145–152.
 29. García-Arriaza J, Manrubia SC, Toja M, Domingo E, Escarmís C. 2004. Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation. *J. Virol.* 78:11678–11685.
 30. García-Briones M, et al. 2006. Differential distribution of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells. *Virology* 349: 409–421.
 31. Guex N, Diemand A, Peitsch MC. 1999. Protein modelling for all. *Trends Biochem. Sci.* 24:364–367.
 32. Hope DA, Diamond SE, Kirkegaard K. 1997. Genetic dissection of interaction between poliovirus 3D polymerase and viral protein 3AB. *J. Virol.* 71:9490–9498.
 33. Kall L, Krogh A, Sonnhammer EL. 2007. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius Web server. *Nucleic Acids Res.* 35:W429–W432.
 34. Knowles NJ, Samuel AR, Davies PR, Kitching RP, Donaldson AI. 2001. Outbreak of foot-and-mouth disease virus serotype O in the UK caused by a pandemic strain. *Vet. Rec.* 148:258–259.
 35. Lama J, Paul AV, Harris KS, Wimmer E. 1994. Properties of purified recombinant poliovirus protein 3aB as substrate for viral proteinases and as co-factor for RNA polymerase 3Dpol. *J. Biol. Chem.* 269:66–70.
 36. Li S, et al. 2009. Dimerization of hepatitis E virus capsid protein E2s domain is essential for virus-host interaction. *PLoS Pathog.* 5:e1000537. doi:10.1371/journal.ppat.1000537.
 37. Lyle JM, et al. 2002. Similar structural basis for membrane localization and protein priming by an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 277:16324–16331.
 38. Marianayagam NJ, Sunde M, Matthews JM. 2004. The power of two: protein dimerization in biology. *Trends Biochem. Sci.* 29:618–625.
 39. Martin-Acebes MA, et al. 2008. Subcellular distribution of swine vesicular disease virus proteins and alterations induced in infected cells: a comparative study with foot-and-mouth disease virus and vesicular stomatitis virus. *Virology* 374:432–443.
 40. Martin-Acebes MA, Rincon V, Armas-Portela R, Mateu MG, Sobrino F. 2010. A single amino acid substitution in the capsid of foot-and-mouth disease virus can increase acid lability and confer resistance to acid-dependent uncoating inhibition. *J. Virol.* 84:2902–2912.
 41. Martin-Acebes MA, Vazquez-Calvo A, Rincon V, Mateu MG, Sobrino F. 2011. A single amino acid substitution in the capsid of foot-and-mouth disease virus can increase acid resistance. *J. Virol.* 85:2733–2740.
 42. Moffat K, et al. 2005. Effects of foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins on the structure and function of the early secretory pathway: 2BC but not 3A blocks endoplasmic reticulum-to-Golgi transport. *J. Virol.* 79:4382–4395.
 43. Monaghan P, Cook H, Jackson T, Ryan M, Wileman T. 2004. The ultrastructure of the developing replication site in foot-and-mouth disease virus-infected BHK-38 cells. *J. Gen. Virol.* 85:933–946.
 44. Nayak A, Goodfellow IG, Belsham GJ. 2005. Factors required for the uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) *in vitro*. *J. Virol.* 79:7698–7706.
 45. Nilsson I, et al. 2010. VEGF receptor 2/-3 heterodimers detected *in situ* by proximity ligation on angiogenic sprouts. *EMBO J.* 29:1377–1388.
 46. Notredame C, Higgins DG, Heringa J. 2000. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 302:205–217.
 47. Nunez JI, et al. 2007. Guinea pig-adapted foot-and-mouth disease virus with altered receptor recognition can productively infect a natural host. *J. Virol.* 81:8497–8506.
 48. Nuñez JI, et al. 2001. A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *J. Virol.* 75:3977–3983.
 49. O'Donnell VK, Pacheco JM, Henry TM, Mason PW. 2001. Subcellular distribution of the foot-and-mouth disease virus 3A protein in cells infected with viruses encoding wild-type and bovine-attenuated forms of 3A. *Virology* 287:151–162.
 50. Pacheco JM, Henry TM, O'Donnell VK, Gregory JB, Mason PW. 2003. Role of nonstructural proteins 3A and 3B in host range and pathogenicity of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 77:13017–13027.
 51. Peitsch MC. 1996. ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.* 24:274–279.
 52. Pereira HG. 1981. Foot-and-mouth disease, p 333–363. *In* Gibbs EPJ (ed), *Virus diseases of food animals*. Academic Press Inc., London, United Kingdom.
 53. Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM. 2009. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:1760–1765.
 54. Rosas MF, et al. 2008. Susceptibility to viral infection is enhanced by stable expression of 3A or 3AB proteins from foot-and-mouth disease virus. *Virology* 380:34–45.
 55. Ryan MD, et al. 2004. Foot-and-mouth disease virus proteinases. *In* Sobrino F, Domingo E (ed), *Foot and mouth disease: current perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom.
 56. Saiz M, Gomez S, Martinez-Salas E, Sobrino F. 2001. Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *J. Gen. Virol.* 82:93–101.
 57. Samuilova O, Krogerus C, Poyry T, Hyypia T. 2004. Specific interaction between human parechovirus nonstructural 2A protein and viral RNA. *J. Biol. Chem.* 279:37822–37831.
 58. Sanz-Parra A, Sobrino F, Ley V. 1998. Infection with foot-and-mouth disease virus results in a rapid reduction of MHC class I surface expression. *J. Gen. Virol.* 79(Pt 3):433–436.
 59. Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31: 3381–3385.
 60. Semler BL, Anderson CW, Hanecak R, Dorner LF, Wimmer E. 1982. A membrane-associated precursor to poliovirus VPg identified by immunoprecipitation with antibodies directed against a synthetic heptapeptide. *Cell* 28:405–412.
 61. Sobrino F, Dávila M, Ortín J, Domingo E. 1983. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* 128:310–318.
 62. Sobrino F, et al. 2001. Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet. Res.* 32:1–30.
 63. Soderberg O, et al. 2006. Direct observation of individual endogenous protein complexes *in situ* by proximity ligation. *Nat. Methods* 3:995–1000.
 64. Sonnhammer EL, Hollich V. 2005. Scoredist: a simple and robust protein sequence distance estimator. *BMC Bioinformatics* 6:108.
 65. Strauss DM, Glustrom LW, Wuttke DS. 2003. Towards an understanding of the poliovirus replication complex: the solution structure of the soluble domain of the poliovirus 3A protein. *J. Mol. Biol.* 330:225–234.
 66. Suhay DA, Giddings TH, Jr, Kirkegaard K. 2000. Remodeling the endo-

- plasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J. Virol.* 74:8953–8965.
67. Sweeney TR, et al. 2010. Foot-and-mouth disease virus 2C is a hexameric AAA+ protein with a coordinated ATP hydrolysis mechanism. *J. Biol. Chem.* 285:24347–24359.
 68. Takegami T, Kuhn RJ, Anderson CW, Wimmer E. 1983. Membrane-dependent uridylylation of the genome-linked protein VPg of poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80:7447–7451.
 69. Towner JS, Ho TV, Semler BL. 1996. Determinants of membrane association for poliovirus protein 3AB. *J. Biol. Chem.* 271:26810–26818.
 70. Tusnady GE, Simon I. 2001. Topology of membrane proteins. *J. Chem. Infect. Comput. Sci.* 41:364–368.
 71. Weibrecht I, et al. 2010. Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. *Expert Rev. Proteomics* 7:401–409.
 72. Wessels E, et al. 2006. Structure-function analysis of the coxsackievirus protein 3A: identification of residues important for dimerization, viral RNA replication, and transport inhibition. *J. Biol. Chem.* 281:28232–28243.
 73. Whitton JL, Cornell CT, Feuer R. 2005. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:765–776.
 74. Xiang W, Cuconati A, Hope D, Kirkegaard K, Wimmer E. 1998. Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3Dpol with VPg and with genetic variants of 3AB. *J. Virol.* 72:6732–6741.
 75. Xiang W, Cuconati A, Paul AV, Cao X, Wimmer E. 1995. Molecular dissection of the multifunctional poliovirus RNA-binding protein 3AB. *RNA* 1:892–904.
 76. Xiang W, Harris KS, Alexander L, Wimmer E. 1995. Interaction between the 5'-terminal cloverleaf and 3AB/3CDpro of poliovirus is essential for RNA replication. *J. Virol.* 69:3658–3667.
 77. Zell R, Seitz S, Henke A, Munder T, Wutzler P. 2005. Linkage map of protein-protein interactions of porcine teschovirus. *J. Gen. Virol.* 86: 2763–2768.

Differential distribution of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells

Mercedes García-Briones^{a,b}, María F. Rosas^a, Mónica González-Magaldi^a,
Miguel A. Martín-Acebes^a, Francisco Sobrino^{a,b,*}, Rosario Armas-Portela^{a,c,*}

^a Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Spain

^b Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA, Valdeolmos, 28130 Madrid, Spain

^c Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Received 14 November 2005; returned to author for revision 13 December 2005; accepted 28 February 2006

Available online 19 April 2006

Abstract

Differences in the kinetics of expression and cell distribution among FMDV non-structural proteins (NSPs) have been observed in BHK-21-infected cells. 3D^{pol} was the first protein detected by immunofluorescence (1.5 h p.i.), showing a perinuclear distribution. At 2–2.5 h p.i., 2B, 2C, 3B and 3C were detected, mostly exhibiting a punctuated, scattered pattern, while 3A and 3D^{pol} appeared concentrated at one side of the nucleus. This distribution was exhibited by all the NSPs from 3 h p.i., being 2C and, to a lesser extent, precursors 2BC and 3ABBB, the only proteins detected by Western blotting at that infection time. From 4 h p.i., all mature NSPs as well as precursors 2BC, 3ABBB, 3ABB, 3AB and 3CD^{pol} were detected by this technique. In spite of their similar immunofluorescence patterns, 2C and 3A co-localized partially by confocal microscopy at 3.5 h p.i., and 3A, but not 2C, co-localized with the ER marker calreticulin, suggesting differences in the distribution of these proteins and/or their precursors as infection proceeded. Transient expression of 2C and 3AB resulted in punctuated fluorescence patterns similar to those found in early infected cells, while 3A showed a more diffuse distribution. A shift towards a fibrous pattern was noticed for 3ABB, while a major change was observed in cells expressing 3ABBB, which displayed a perinuclear fibrous distribution. Interestingly, when co-expressed with 3D^{pol}, the pattern observed for 3ABBB fluorescence was altered, resembling that exhibited by cells transfected with 3AB. Transient expression of 3D^{pol} showed a homogeneous cell distribution that included, as determined by confocal microscopy, the nucleus. This was confirmed by the detection of 3D^{pol} in nuclear fractions of transfected cells. 3D^{pol} and its precursor 3CD^{pol} were also detected in nuclear fractions of infected cells, suggesting that these proteins can directly interact with the nucleus during FMDV infection.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: FMDV; Non-structural proteins; Subcellular distribution; Infection; Transient expression

Introduction

Foot-and-mouth disease virus (FMDV), an aphthovirus that belongs to the Picornaviridae family, is the causative agent of one of the most economically damaging animal diseases (Bachrach, 1977; Domingo et al., 1990; Pereira, 1981; Sobrino et al., 2001). FMD affects domestic and wild artiodactyls, mainly cattle, swine, goats and sheep, producing a typical

vesicular disease (Burrows et al., 1981). FMDV genome consists of a positive-sense RNA molecule of approximately 8500 nucleotides that encodes a unique polypeptide, which is processed in infected cells to yield different polypeptide precursors and the mature viral proteins (Belsham, 2005). Replication and translation of FMDV RNA occur in the cytoplasm (Arlinghaus and Polatnick, 1969) and for certain Picornaviruses its capacity to replicate in enucleated infected cells has been reported (Follett et al., 1975). FMDV polypeptide synthesis can initiate at two in frame AUG codons (Beck et al., 1983) following ribosome recognition of the adjacent internal ribosome entry site (IRES) region (Belsham, 2004; Martinez-Salas, 1999). The open reading frame of FMDV sequentially

* Corresponding authors. Mailing address: CBMSO, Cantoblanco 28049, Madrid, Spain. Fax: +34 91 4978087.

E-mail addresses: fsobrino@cbm.uam.es (F. Sobrino), rarmas@cbm.uam.es (R. Armas-Portela).

encodes a viral protease (L), the capsid or structural proteins, and a total of nine additional mature, non-structural proteins (NSPs). Enzymatic activities have been identified for proteases L, 2A and 3C, the latter responsible for most of the proteolytic processing of the viral polyprotein (Ryan et al., 2004), and for 3D^{pol}, the virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase (Newman et al., 1979).

The analysis of interactions of NSPs with cell structures in the context of FMDV infection is limited by the detection sensitivity of the specific antibodies available, as well as by the complexity of the virus–cell interactions occurred during viral cycle. Transient expression has provided a good tool to achieve information on the functional role of these proteins and has been extensively used to study Picornavirus cell interactions (Cho et al., 1994; Egger et al., 2000; Moffat et al., 2005; O'Donnell et al., 2001; Sandoval and Carrasco, 1997; Towner et al., 1996).

In other Picornaviruses, such as poliovirus, each of the equivalent NSPs and most of their precursors are known to be involved in multiple functions needed for RNA replication, particle formation and viral pathogenesis (Andino et al., 1999; Choe et al., 2005; Porter, 1993; Whitton et al., 2005). Thus, rearrangements of the host cell membranes to generate vesicular structures associated to genomic RNA replication have been reported (Bienz et al., 1987; Gazina et al., 2002; Gosert et al., 2000) and proteins 2B, 2BC, 2C and 3A are involved in these interactions (Aldabe and Carrasco, 1995; Cho et al., 1994; Towner et al., 1996).

FMDV proteins 2B, 2C and 3A are predicted to contain hydrophobic domains (Forss et al., 1984) and have been recently found associated to crude membrane extracts in infected cultured cells (Moffat et al., 2005). The genomic organization of the region encoding FMDV proteins 3A and 3B is unique among the Picornaviridae family in that 3A extends its carboxy-terminus in at least 60 amino acid residues in length. Mutations in this protein are associated with modifications of the virus host range (Beard and Mason, 2000; Nunez et al., 2001). In addition, three non-identical copies of 3B are encoded and expressed in susceptible cells, and deletions of redundant copies lead to a decrease in replication efficiency in cell culture (Falk et al., 1992) and attenuation in pigs (Pacheco et al., 2003). It has been recently shown that 3D can uridylylate *in vitro* the three copies of 3B (Nayak et al., 2005), an initial step required to initiate replication of positive-sense genomic RNA in Picornavirus (reviewed in Andino et al. (1999)). In poliovirus, 3AB has a non-specific RNA-binding activity and associates with the cloverleaf structure in the 5' end of viral RNA and with precursor 3CD to form a ribonucleoprotein complex required for poliovirus RNA synthesis (Hope et al., 1997; Lama et al., 1994; Xiang et al., 1995, 1998).

Specific membrane rearrangements induced by FMDV in infected cells have been recently reported, such as its insensitivity to brefeldin A (O'Donnell et al., 2001). This drug blocks the function of ADP ribosylation factor 1 (ARF1) that is necessary for COPI-coated vesicle formation and disrupts the Golgi complex (Jackson and Casanova, 2000; Klausner et al., 1992). A collapse of cell organelles at one side of the cells (Monaghan et al., 2004) and the lack of ER or Golgi markers in

the infection-recruited membranes (Knox et al., 2005) have also been reported as differential effects of FMDV infection. In poliovirus and coxsackievirus, 3A, but not 3AB, is responsible of the inhibition of the anterograde traffic between the ER and the Golgi (Doedens et al., 1997), resulting in a reduction of the secretion of proteins such as MHC class I molecules (Choe et al., 2005), which is observed during Picornavirus infection (Deitz et al., 2000; Sanz-Parra et al., 1998). This mechanism could contribute to the evasion of the host immune system. Recent results with FMDV indicate that transient expression of 2BC, but not of 3A, inhibits host protein secretion in Vero cells (Moffat et al., 2005).

Host membrane recruitment to form the replication complex in Picornaviruses can involve components from different membrane compartments (Schlegel et al., 1996; Suhy et al., 2000). Early-induced vesicles by poliovirus infection are mostly recruited from ER-derived membranes (Bienz et al., 1987), while markers from other organelles, such as the Golgi and lysosomes, can be found in vesicles formed at later stages of infection (Bolten et al., 1998).

Despite of the information available, much remains to be understood on the detailed intracellular distribution of the FMDV NSPs precursors and mature proteins during the infection cycle and its relationship with the mechanism contributing to FMDV replication and pathogenesis. As a first step to address the functional role of the FMDV NSPs, we have analyzed the kinetics of detection and intracellular location of viral proteins 2B, 2C, 3A, 3B, 3C and 3D^{pol}, and their precursors, in BHK-21 cells. This cell line has been widely used for basic FMDV studies, as well as for diagnostic assays and production of vaccine antigens (Barteling, 2004; Brown, 1998). This study has revealed differences in their early kinetics of expression and in the immunofluorescence patterns that NSPs display in infected cells. In addition, transient expression of single FMDV NSP products has provided evidences of distinct interactions of proteins 3D^{pol}, 3A, 3AB, 3ABB and 3ABBB with host cell components.

Results

Expression and subcellular distribution of NSPs in FMDV-infected cells

The kinetics of NSPs expression in BHK-21-infected cells was first analyzed by Western blotting of cell extracts collected at different times upon infection, using specific antibodies to 2C, 3A, 3B, 3C and 3D^{pol} proteins. Detection of 2B expression was not possible as the serum available for this protein did not work in this assay. An MAbs specific to capsid protein VP1 was also included in this analysis (Fig. 1A). The earliest protein detected (2.5 h p.i.) was 2C. A band corresponding to VP1 and faint bands corresponding to precursors P1, 2BC and 3ABBB (the latter with the anti 3B antibody) were observed at 3 h p.i. All the mature proteins analyzed were clearly observed at 4 h p.i., as well as precursors 2BC, 3ABBB, 3ABB, 3AB, and P1. Due to its similar size, 3A and 3AB co-migrated in the gel revealed with the antibody to 3A shown in Fig. 1A; however, the two proteins

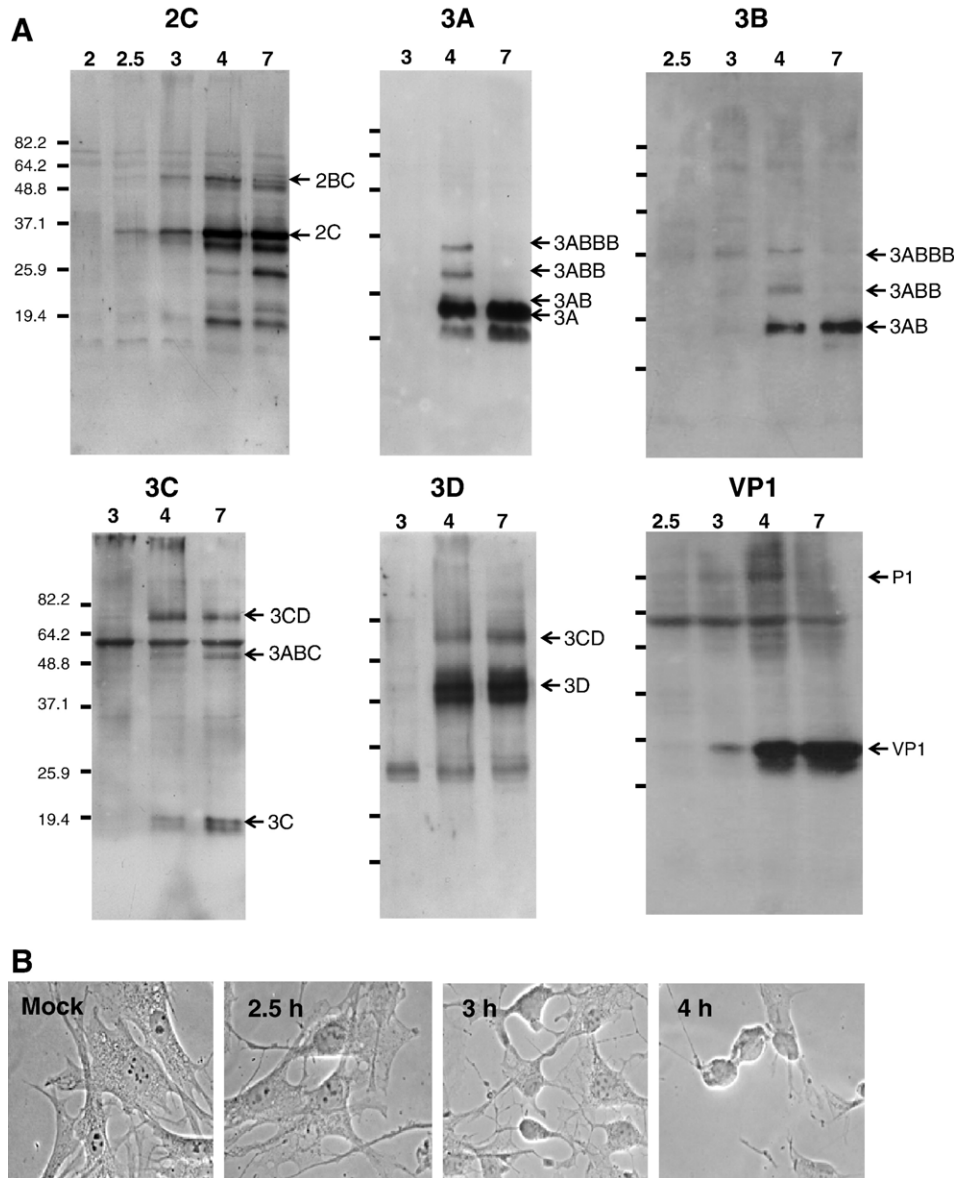


Fig. 1. Kinetics of FMDV infection in BHK-21 cells. (A) Western blot assays of cells collected at different times p.i. using antibodies to each of the viral proteins indicated. The migration of the markers and their molecular weight are indicated. Arrows point to the protein bands corresponding to the different FMDV proteins and their major precursors, according to Belsham (2004) and Toja et al. (1999). The predicted sizes (in kDa) of the FMDV proteins identified were: 52.7 (2BC), 35.8 (2C), 17.4 (3A), 20.1 (3AB), 22.7 (3ABB), 25.3 (3ABBB), 3ABC (47.4) 22.1 (3C), 75.7 (3CD^{pol}), 52.7 (3D^{pol}), 81 (P1), 22.9 (VP1). The mobility observed for 3A, 3AB, 3ABB and 3ABBB was slightly lower than that predicted, as also reported for other FMDV serotypes (O'Donnell et al., 2001). Doublets observed for 3D and VP1 could result from incomplete reduction of these proteins. The specific antibodies used are described in Materials and methods (MAb 1C8 and 2C2 were used for 2C and 3A detection, respectively). (B) Morphological alterations induced in infected cells at different times p.i., as determined by contrast-phase microscopy.

could be resolved using a higher polyacrylamide concentration (data not shown). By 7 h p.i., all mature proteins were detected as well as precursors 2BC, 3AB, 3ABC and 3CD and a protein band of a size corresponding to 3ABC was observed with the antibody to 3C. Antibodies to 2C and 3A also revealed the presence of protein bands of a size lower than expected at 4 and 7 h p.i. These products could result from proteolysis of these proteins and/or its precursors.

Accumulation of FMDV proteins correlated with the emergence of morphological signs of cytopathic effect in infected cells observed by contrast-phase microscopy. Progress of morphological alterations was not synchronic, and cells with

different degrees of alteration could be observed during infection. In average, cells started losing their characteristic morphology by 3 h p.i., turning by 4 h p.i. into rounded cells that became progressively detached from the plates (Fig. 1B).

A parallel analysis by immunofluorescence microscopy revealed differences in the temporal distribution of these proteins and their processing precursors in infected cells (Fig. 2). Specific 3D^{pol} immunostaining was detected, mostly showing a perinuclear distribution, as soon as 1.5 h p.i. From 2 h p.i., 3D^{pol} appeared concentrated at one side of the nucleus. Fluorescence of antibodies to VP1, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C and their precursors was only observed from 2 to 2.5 h p.i. Immunostaining to 3A

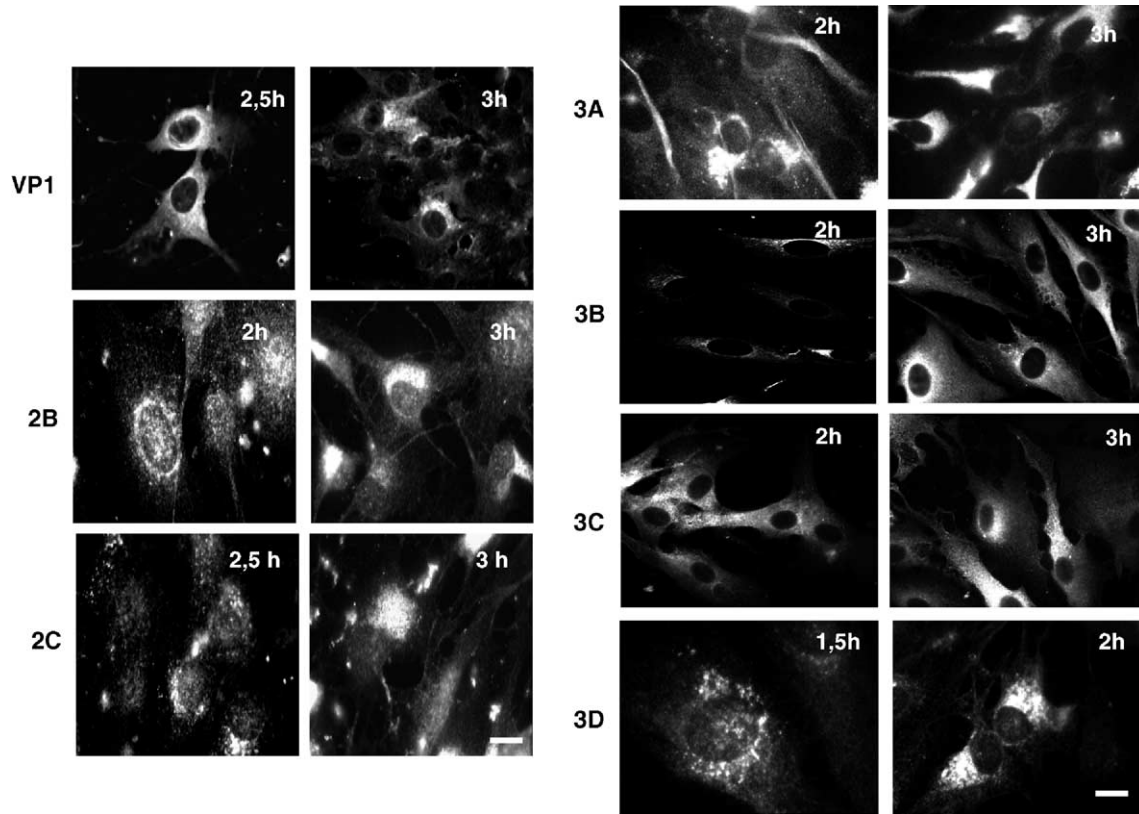


Fig. 2. Distribution of FMDV NSPs in BHK-21 cells at different times after infection. Infected cells were processed for immunofluorescence staining as described in Materials and methods. The following MAb and rabbit specific sera were used as primary antibodies: VP1 (SD6), DM21 (2B), E39 (2C), 2C2 (3A), IF8 (3B), 2D2 (3C) and E56 (3D). Alexa Fluor 488 anti-rabbit and Alexa Fluor 594 anti-mouse antibodies were used as secondary antibodies to detect rabbit sera and MAbs, respectively. Scale bar, 10 μ m.

showed a juxtannuclear distribution at 2 h p.i., similar to that of 3D^{pol} at this time of infection. Conversely, VP1, 2B, 2C and 3C mostly exhibited a punctuated and scattered pattern.

As infection proceeded (3 h p.i.), fluorescence to all the proteins analyzed accumulated in a juxtannuclear region that resembled that exhibited at earlier times (2 h p.i.) by 3D^{pol} and 3A (Fig. 2), probably reflecting their association to the replication complex. By 3 h p.i., a significant fraction of infected cells had already developed morphological alterations, as judged by contrast-phase microscopy (Fig. 1B).

In spite of their similar immunofluorescence patterns, differences in the distribution of 2C and 3A could be observed from 3.5 h p.i. by double labeling and confocal microscopy. Staining to antibodies E12 (3A) and 1C8 (2C) exhibited a similar bright pattern in most of the cells. However, the merge image revealed an incomplete co-localization of these proteins (Fig. 3A). This was confirmed by confocal image analyses using Metamorph co-localization menu, which rendered a correlation value of 0.60 ± 0.02 . Interestingly, around 10% of infected cells mainly showed fluorescence to either 3A or 2C. In this case, lower correlation values (0.3) were obtained. These results suggest differences in the kinetics of accumulation and the intracellular location between these two proteins during the infection progress.

The involvement of 2C and 3A in interactions with cell membranes described for FMDV and other Picornaviruses led

us to study a possible co-localization of these NSPs with ER or the Golgi markers. By using a rabbit antibody against calnexin, an ER marker, a reticular fluorescence pattern distributed throughout the cytoplasm was noticed, and no evidences of co-localization with proteins 3A (Fig. 3A) and 2C (data not shown) were observed by confocal microscopy of infected cells. Fluorescence to a different ER marker, calreticulin, appeared distributed with a more diffuse pattern and showed a partial co-localization (0.64 ± 11) with that of 3A, while no co-localization was observed with protein 2C (Fig. 3B). On the other hand, double immunofluorescence using MAb to p58 K protein (an anti-Golgi stacks marker) showed a partial co-localization with 3A and 2C after 3.5 h of BHK-21 infection (Fig. 3C). The thickness of the sections required to detect fluorescence of MAb CC92 to the *cis*-Golgi network protein gp74 impaired a confocal analysis of its co-localization with the anti-FMDV 3A and 2C antibodies in infected cells. However, an alteration of the distribution pattern of gp74 was noticed in infected cells (Fig. 3D), indicating a relocation of this *cis*-Golgi protein during infection.

Subcellular distribution of single NSPs transiently expressed in BHK-21 cells

As a complementary approach to study the role of FMDV NSPs in cell pathogenesis, we analyzed their distribution and

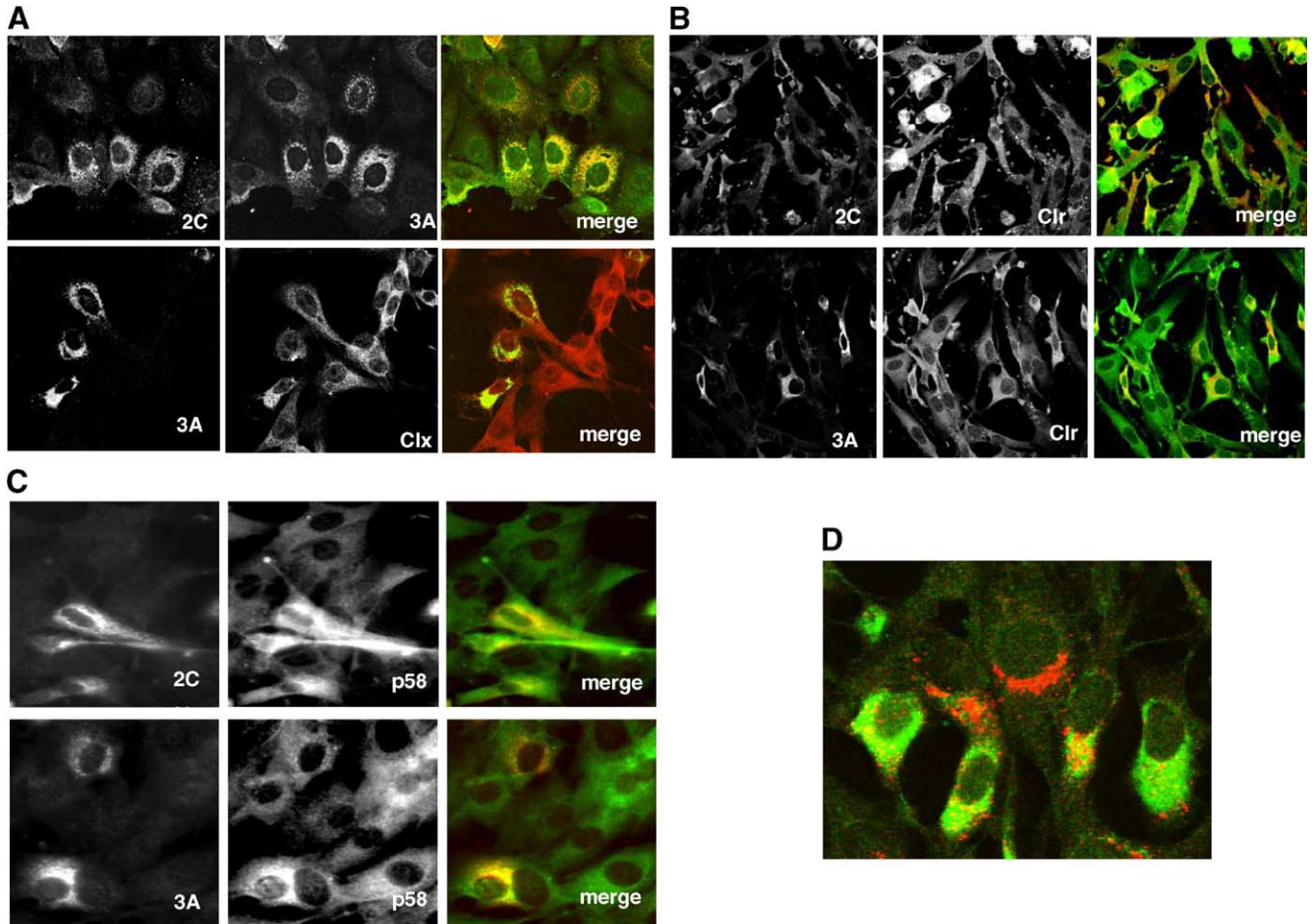


Fig. 3. Double immunofluorescence analysis of the distribution of 2C, 3A and ER or Golgi markers in BHK-21-infected cells. (A) Confocal images of partial co-localization of 2C and 3A revealed with MAb 1C8 and E12 rabbit serum (3A) (top) and of 3A and calnexin stained with MAb 2C2 and a rabbit anti-calnexin serum, respectively (clx, bottom). (B) Confocal images of co-localization of 2C and 3A and calreticulin (clr). MAbs 1C8 (2C) and 2C2 (3A) and a rabbit serum anti-calreticulin were used as primary antibodies. (C) Partial co-localization of 2C and 3A with Golgi stacks. Rabbit antisera E39 (2C) and E12 (3A) and MAb anti-p58 were used as primary antibodies. (D) Double immunofluorescence to 3A and the *cis*-Golgi network protein gp74 revealed with rabbit antiserum E12 and MAb CC92, respectively. The following secondary antibodies were used: A and C, Alexa 594 anti-rabbit (red) and Alexa 488 anti-mouse IgGs (green); B and D, Alexa 488 anti-rabbit (green) and Alexa 594 anti-mouse IgGs (red).

the cellular effects they produced when transiently expressed in BHK-21 cells from plasmid pRSV derivatives (see Materials and methods for details). Expression of 2B protein could not be detected at different times p.t. with plasmid pRSV-2B, neither by Western blotting nor by immunofluorescence. Transfection with pRSV-2C resulted in detectable levels of protein by Western blotting (data not shown), and cells exhibiting specific 2C fluorescence were observed at 24 and 48 h p.t. The rate of expressing cells was low (about 1%), as was the intensity of the fluorescence in positive cells, which showed a perinuclear distribution pattern (Fig. 4A). This pattern was similar to that observed for 2C at early times upon infection (Fig. 2). Cells positive to 2C showed an elongated morphology that impaired conclusive results in the analysis of the co-localization of 2C with PDI or the Golgi p58 protein.

About 10% of the cells transfected with pRSV-3A showed high levels of specific fluorescence at 24 h p.t., being these values lower at 48 h p.t. Expression of 3A was detected by Western blotting (Fig. 4B), and its fluorescence displayed a cytoplasmic diffuse pattern in most of the positive cells (Fig. 4A).

Since 3A precursors including one, two or the three non-identical copies of 3B proteins were found in FMDV-infected cells (see Fig. 1A), we analyzed the fluorescence pattern to 3A in cells transfected with pRSV-3AB, pRSV-3ABB or pRSV-3ABBB, whose expression levels, detected with an anti-3A MAb, were similar to that found in cells transfected with pRSV-3A (Fig. 4A). Expression of 3AB, a precursor found in infected cells at both early and late phases of infection (Fig. 1A), was distributed in a scattered punctuated fluorescence pattern (Fig. 4A), and a protein band of the expected size was observed by Western blotting (Fig. 4B). Double immunofluorescence experiments did not show co-localization with PDI or with Golgi p58, and no significant alterations in the distribution pattern of these cell proteins were observed in cells expressing 3A or 3AB (data not shown).

The fluorescence shown by cells expressing 3ABB appeared more compact, displayed a fibrous pattern and a protein band corresponding to this polypeptide was detected in cell extracts (Figs. 4A, B). Remarkably, expression of 3ABBB resulted in a different distribution that showed a fibrous and often perinuclear

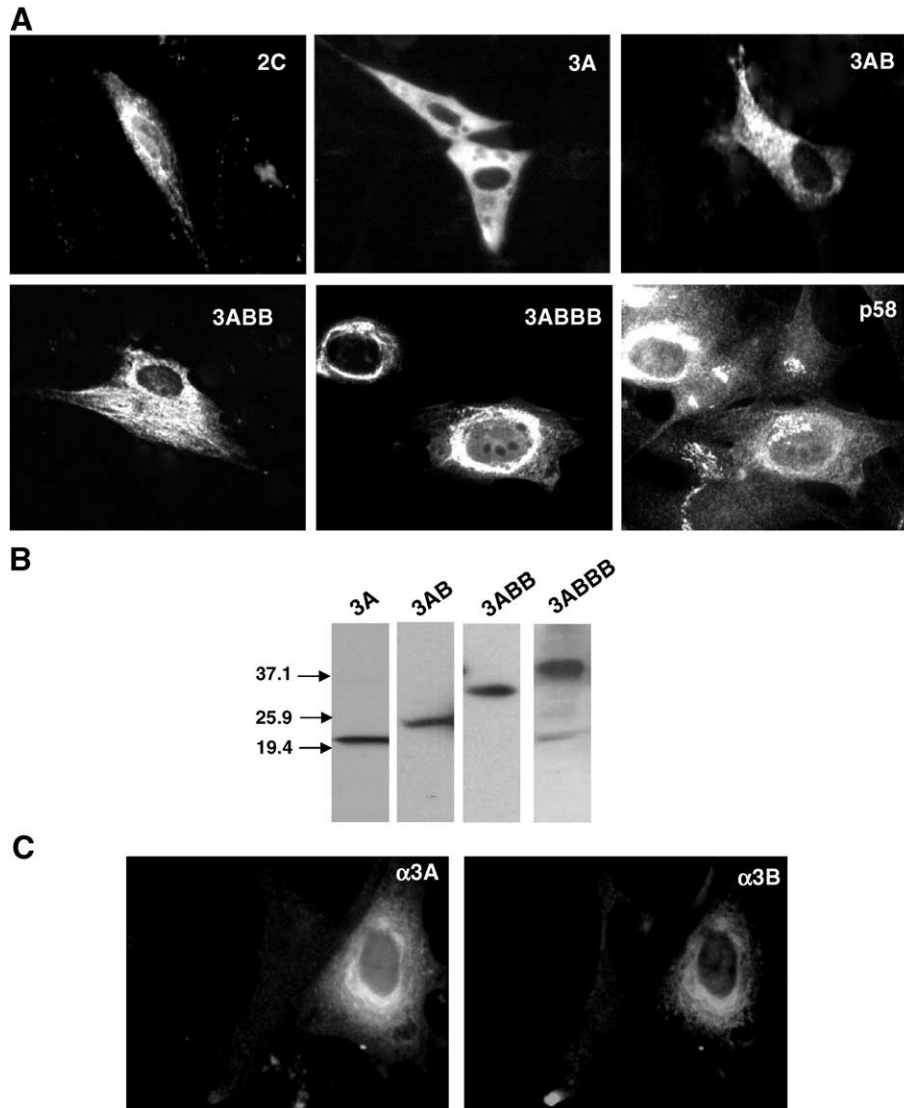


Fig. 4. Transient expression of different FMDV NSPs. BHK-21 cells were transfected with plasmids expressing the proteins indicated, as described in Materials and methods. Results correspond to 24 h p.t. In both immunofluorescence staining (A) or Western blotting (B), 2C expression was detected with MAb 1C8 and MAb 2C2 was used to evaluate the expression of 3A, 3AB, 3ABB and 3ABBB proteins. (C) Expression of 3A or 3B detected, in cells transfected with pRSV-3ABBB, by using rabbit antiserum E12 and MAb 1F8, respectively.

pattern (Fig. 4A). This distribution was maintained when an MAb to 3B (1F8) was used in the immunofluorescence assays (Fig. 4C). In this case, double immunofluorescence studies showed a partial co-localization of 3ABBB with p58 K (Fig. 4A) and no overlap with PDI (data not shown). When 3ABBB was detected in transfected cell extracts, a minor additional band corresponding to mature 3A was also observed (Fig. 4B), supporting a limited proteolytic processing of 3ABBB. The identity of this 3A band was confirmed as it was not recognized by MAb 1F8 to 3B. Processed 3A could also be observed in Western blots from cells transiently expressing 3ABB and 3AB, and the intensity of the band corresponding to mature 3A varied between experiments (data not shown). Further experiments, including other cell lines, are in progress to characterize this processing, which suggests that cellular proteases can cleave the 3B copies included in these precursors.

Transient expression of FMDV 3C was reported as toxic for BHK-21 cells (Martinez-Salas and Domingo, 1995), resulting in a very low number of viable cells; therefore, this protein was not included in our analysis.

Cells transfected with pRSV-3D showed a higher expression efficiency of about 30%. Fluorescence to 3D^{pol} was also more intense than that observed for the other FMDV polypeptides analyzed (Fig. 5A). Interestingly, 3D^{pol} staining was present all over the cytoplasm and in the nucleus. In these experiments, when double labeling to PDI and 3D^{pol} was performed, alterations in the ER could be observed in most of the 3D^{pol} expressing cells. Some transfected cells exhibited a more compact and bright ER fluorescence (Fig. 5A, a, c), whereas in cells exhibiting a more intense 3D^{pol} nuclear staining, a diffuse ER was frequently observed, including cells in which PDI staining was not detected (Fig. 5A, b, d). This result suggests

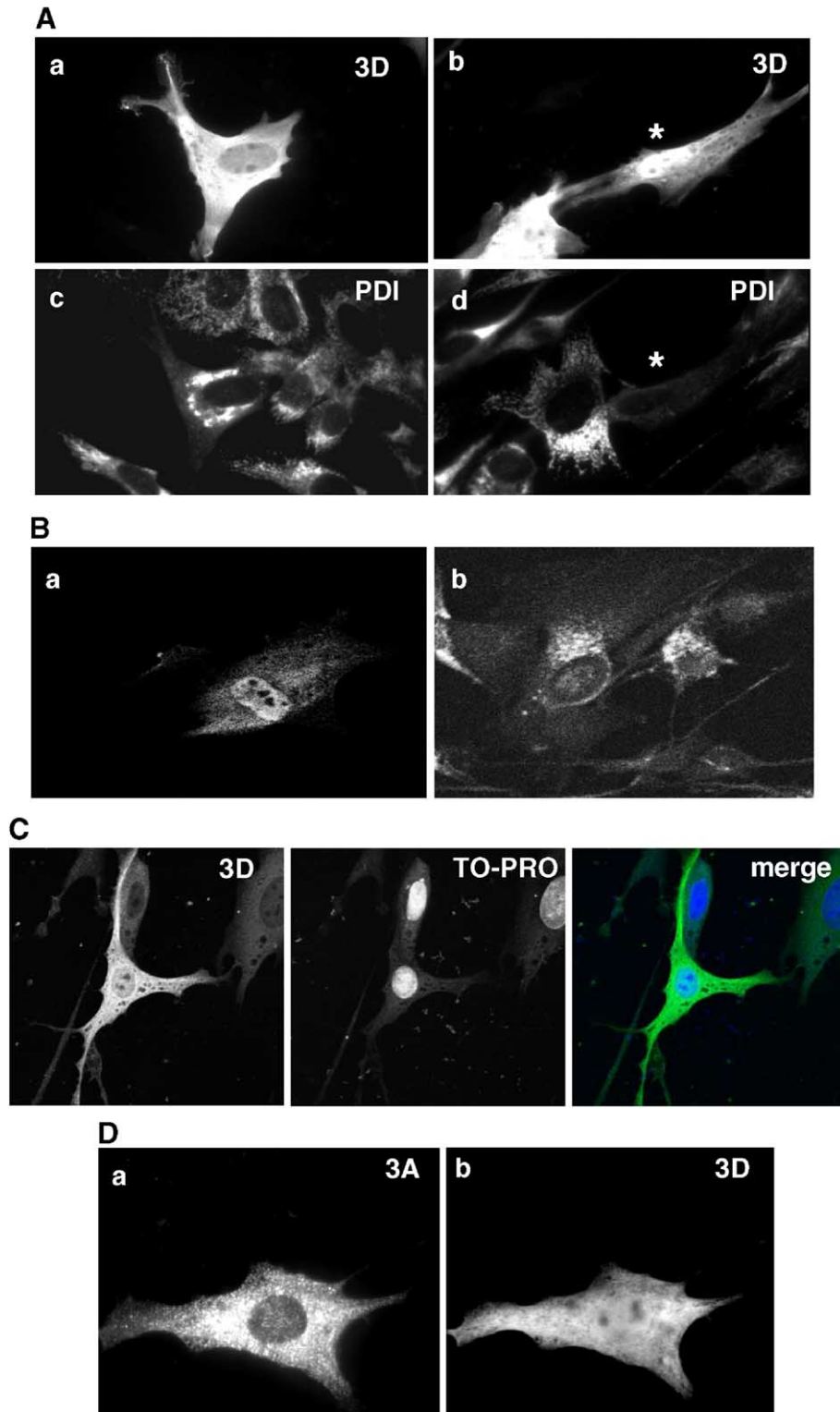


Fig. 5. Effects of expression of 3D in transfected and infected BHK-21 cells. (A) Double immunofluorescence to 3D^{pol} (E56) (a, b) and PDI (1D3) (c, d) in cells transfected with pRSV-3D; (*) denotes a cell with a high level of nuclear expression that showed a decrease in ER staining. (B) Immunostaining to 3D in confocal sections of cells transfected with pRSV-3D (a) or after 3.5 h of infection with FMDV (b). (C) Fluorescence to 3D^{pol}, nuclear staining with TO-PRO-3 and the merge image in cells transfected with p-RSV-3D. (D) Immunostaining to 3A and 3D in cells co-transfected with plasmids pRSV-3ABBB and pRSV-3D. Transfected cells were analyzed, in all cases, at 24 h p.t. Expression of 3D^{pol} and 3A was detected with rabbit serum E56 and MAb 2C2, respectively. In all cases, Alexa Fluor 488 anti-rabbit and Alexa Fluor 594 anti-mouse IgGs were used as secondary antibodies.

alone (see Fig. 4A), to a spotted pattern (Fig. 5D, a). Thus, when co-expressed, 3D^{pol} modifies the cellular distribution of 3ABBB.

Discussion

The analysis by immunofluorescence of the kinetics of expression and cell distribution of type C FMDV NSPs in infected cells indicates that, from 3 h p.i., fluorescence to 2B, 2C, 3A, 3B, 3C and 3D^{pol}, as well as to capsid protein VP1, appeared accumulated at one side of the nucleus, as reported for serotype O viruses (Knox et al., 2005; Monaghan et al., 2004; O'Donnell et al., 2001). This location pattern has been associated to the viral replication complex (Monaghan et al., 2004) as it is well established in other Picornaviruses such as poliovirus (Bienz et al., 1992). However, the partial co-localization of 2C and 3A observed at 3.5 h p.i. suggests that these NSPs can interact with different cell components at advanced stages of FMDV infection.

Detection of FMDV proteins by Western blotting during infection was delayed in time compared to that achieved by immunofluorescence, probably reflecting the asynchrony in the infection progress shown by individual cells and/or a lower sensitivity in this technique of the antibodies used. The earliest protein detected (2.5 h p.i.) was 2C, followed by 2BC, 3ABBB, P1 and VP1 at 3.5 h p.i. From 4 h p.i., all mature proteins analyzed were detected, as well as precursors 2BC, 3AB and 3CD (Fig. 1A).

The origin of the membranes generated at FMDV replication site is unclear (Knox et al., 2005). By electron microscopy, type O FMDV-infected BHK-38 cells showed independent virus-induced vesicles with a low proportion of double membranes (Monaghan et al., 2004), similar to those observed in type C FMDV-infected BHK-21 cells (García-Briones, unpublished results). Previous analyses of FMDV NSPs distribution by immunofluorescence focused on times beyond 3 h p.i., an infection stage in which cells have already developed clear morphological alterations (Monaghan et al., 2004). Protein 3A was reported to co-localize by conventional fluorescence microscopy with the ER marker calreticulin in bovine and porcine keratinocytes ex-vivo-infected with a type O virus (O'Donnell et al., 2001). At the other hand, no co-localization was found in confocal microscopy studies between 2C and markers from ER (ERp57 and ERGIC53) and Golgi (ManII) in CHO-K1 cells or markers of post-Golgi membranes in GMK cells, both infected with a different type O FMDV strain (Knox et al., 2005). Our results indicate that, as described by O'Donnell et al. (2001), 3A co-localizes by confocal microscopy with calreticulin but not with calnexin, while co-localization of 2C with these ER markers was not observed (Figs. 3A, B). On the other hand, 3A and 2C partially co-localize with the Golgi stacks marker p58, but not with the *cis*-Golgi network protein gp74 (Figs. 3C, D). Our observations, which could be related to the cell line used, suggest that, at advanced stages of infection, FMDV NSPs can associate to markers from different membrane compartments.

Interestingly, our results also suggest that NSPs can interact with different cell components during the early steps of FMDV

infection. This is probably required to take control of cell machinery and to recruit the cellular factors needed for the formation of the replication complex as it is observed at later stages of infection. Differences have been found in the kinetics and distribution of NSPs fluorescence in infected cells at early times post-infection (1.5–2.5 h p.i.). Specific 3D^{pol} immunostaining was detected as soon as 1.5 h pi, while the rest of NSPs and VP1 were detected only from 2 to 2.5 h p.i. (Fig. 2). This delay can be due to a higher sensitivity of the 3D^{pol} antiserum used, although differences such as protein accessibility and/or different local concentration cannot be excluded. At these early times of infection, VP1, 2B, 2C and 3C mostly exhibited a punctuated and scattered pattern, while immunostaining to 3A showed a perinuclear distribution similar to that of 3D^{pol} (2 h p.i.), which suggests that early interactions can be established between these two proteins.

Transient expression analyses in BHK-21 cells have revealed differences in the cellular distribution of some of the FMDV NSPs studied. The lack of detection of 2B upon transfection with pRSV-2B is likely to result from low levels of protein expression, probably due to cell toxicity. Thus, detection of 2B transient expression has been reported by using a modified 2B, including a tag motif (Moffat et al., 2005). Besides, the low levels of expression and the elongated morphology of cells transfected with 2C also suggest a detrimental effect of its expression on cell viability. In this case, the subcellular distribution observed for 2C (Fig. 4A) was similar to that displayed at early times post-infection (Fig. 2).

Higher levels of expression were detected by using an MAb to 3A in cells transfected with plasmids corresponding to the different products of the 3ABBB region. Expression of 3A resulted in a diffused and spotted pattern, similar to that shown by cells soon after infection (Fig. 2), which suggested the localization of 3A at small vesicles, as it has been reported for FMDV type O in BHK-21 and other cultured cells (Moffat et al., 2005; O'Donnell et al., 2001). No previous information was available, to our knowledge, on the cellular distribution of the remaining products from the FMDV 3AB region. Remarkably, our results indicate that sequential addition of protein B copies resulted in a relocation of 3A fluorescence that became progressively compact and fibrous. A typical vesicular pattern was clearly observed upon 3AB transfection, indicating that 3AB can become associated to cell vesicles. 3AB is the most abundant 3B-containing precursor in FMDV-infected cells (Fig. 1A) even at late times post-infection, as also found for type A and type O FMDV-infected cells (O'Donnell et al., 2001). This vesicular pattern shifted to a fibrous network in cells expressing 3ABB, being the change most evident in 3ABBB expressing cells (Fig. 4A), which exhibited a fibrous perinuclear distribution when visualized with antibodies to either 3A or 3B (Fig. 4C). The interactions leading to these different distributions remain to be determined. Experiments are in progress to analyze the cell distribution of transiently expressed 3B products as well as their effect in co-expression experiments with 3A. Double staining with Golgi p58 or PDI only revealed a partial co-localization of 3ABBB with the Golgi stacks; however, this co-localization was not observed for 3A and 3AB. In poliovirus,

expression of 3A alone inhibits ER to Golgi protein traffic (Doedens and Kirkegaard, 1995) and dramatically alters the ER structure (Doedens et al., 1997), an effect not observed when 3AB is expressed alone (Egger et al., 2000).

Cells transfected with 3D^{pol} showed the highest level of expression of all NSPs. 3D^{pol} was homogeneously distributed in the cell, including the nucleus, and induced partial reorganization of the ER, as estimated by the use of an anti-PDI antibody. A confocal analysis confirmed the nuclear localization of 3D^{pol} in transfected cells (Figs. 5B, C). This observation led us to perform a similar analysis in FMDV-infected cells that showed 3D^{pol} nuclear staining in the sections analyzed (Fig. 5B). The presence of 3D^{pol} in the nucleus was confirmed by its detection in the nuclear fraction of transfected and infected cells (Fig. 6). Ultrastructural modifications of the nuclear membrane have been recently described in FMDV-infected cells (Monaghan et al., 2004). Furthermore, nuclear location of NSPs, including precursors containing 3D^{pol}, has been recently reported for rhinovirus and encephalomyocarditis virus, suggesting that Picornaviruses can reprogram the cell nucleus as part of their replication cycle (Aminev et al., 2003; Amineva et al., 2004). These authors also identified a nuclear localization motif (PnKTKLnPS) near the N-terminus of 3D^{pol}. A similar sequence (MRKTKLnPT) is present at equivalent positions of FMDV 3D^{pol} sequences (residues 16–24) among a wide variety of FMDV isolates representing the seven serotypes (Carrillo et al., 2005), including the C-S8c1 isolate used in this study. In FMDV, histone H3 can be in vitro cleavage by 3C (Falk et al., 1990), a processing also reported in BHK-21 cells transiently expressing 3C (Tesar and Marquardt, 1990) and 3ABC (Capozzo et al., 2002). Our results indicate that a protein band corresponding to 3CD^{pol} is also present, with a weaker intensity than that of 3D^{pol}, in nuclear fractions of infected cells (Fig. 6). Translocation of 3CD^{pol} to the nucleus might favor and/or modulate 3C nuclear activity in FMDV-infected cells. To our knowledge, these results are the first evidences of nuclear localization of FMDV proteins and experiments are in progress to understand their functional implications in FMDV replication.

Co-expression with 3D^{pol} modified the distribution of 3ABBB that shifts to a pattern similar to that observed in cells expressing 3AB (Fig. 5D). Interactions between 3A and 3D^{pol} are suggested by their common fluorescence pattern observed early upon infection (Fig. 2). However, further work is required to establish the protein regions involved in this relocation of 3ABBB and whether it is mediated by an interaction with 3D^{pol}, as that reported in poliovirus (Lama et al., 1994; Xiang et al., 1995) or by cell modifications induced by this protein in transfected cells.

Materials and methods

Cells and viruses

BHK-21 cells (ATCC) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco-BRL) supplemented with 5% fetal bovine serum (Gibco-BRL), 2 mM L-

glutamine, 1 µg/ml streptomycin and 1 µg/ml penicillin. Cells from passages 10–20 were infected with the type C FMDV isolate, C-S8c1 (Sobrino et al., 1986).

Construction of plasmids

Plasmids for transient expression were derived from plasmid pRSV/L (de Wet et al., 1987) in which the luciferase gene was replaced by each of the following NSPs coding sequences: 2B, 2C, 3A, 3AB, 3ABB, 3ABBB and 3D^{pol}. Each of these sequences was amplified by PCR from either FMDV C-S8c1 RNA or plasmid MT15 (Toja et al., 1999), using the primers detailed in Table 1, which included restriction sites for cloning into plasmid pRSV/L. Integrity of all PCR-amplified regions within the recombinant vectors was confirmed by nucleotide sequencing.

Virus infections and cell transfections

BHK-21 confluent cells were infected with a multiplicity of infection (m.o.i) of 10 PFU/cell. After 1 h of virus adsorption, which was considered as 1 h post-infection (p.i.), cells were washed and the infection allowed proceeding in fresh medium. Subconfluent monolayers of cells grown on 10 mm Ø glass

Table 1
Oligonucleotides used for PCR amplification of NSPs sequences

Oligonucleotide ^a	Sequence (5'-3') ^b
2B-1	<u>ATACCCGGGTCTAGAA</u> <u>TGCCCTTCTTCTCTCT</u> <i>Sma</i> I 2B
2B-2	<u>GCGGTACCCCATGGTCTAGATT</u> <u>TATTGTTTCTCTGCTCT</u> <i>Kpn</i> I 2B
2C-1	<u>TCTAGAAAGCTTATGCTCAAGACCGTGAC</u> <i>Hind</i> III 2C
2C-2	<u>TCTAGAGGTACCTT</u> <u>TATGCTTAAAAATTGG</u> <i>Kpn</i> I 2C
3A-1	<u>GCGAAGCTTCTAGAA</u> <u>TGATCTCAATACCTTCC</u> <i>Hind</i> III 3A
3A-2	<u>TATAGTTCTGGTACCTT</u> <u>TATTCAGCTTGCGGTTG</u> <i>Kpn</i> I 3A
3AB-2	<u>AGGTACCCCATGGTCTAGATT</u> <u>ACTCTTGTGCGGGAG</u> <i>Kpn</i> I 3B
3ABB-2	<u>TAGGTACCTT</u> <u>TATTCCTTGACGACCGGGGC</u> <i>Kpn</i> I 3B
3ABBB-2	<u>TCTAGAGGTACCTT</u> <u>ACTCAGTGACAATCAA</u> <i>Kpn</i> I 3B
3D-1	<u>CGCCCGGATGGGTTGATCGTTGAT</u> <i>Sma</i> I 3D
3D-2	<u>CAGGTACCTT</u> <u>TATGCGTCGCCGACACGC</u> <i>Kpn</i> I 3D

^a Forward and reverse primers are indicated by -1 and -2, respectively.

^b Restriction sites introduced for cloning into pRSV vector are indicated and their nucleotides underlined. AUG initiator is shown in italics. UAA stop codon is shown in bold. The specific nucleotides for each NSPs are underlined.

coverslips in 24-well tissue culture dishes were transfected with 0.25 µg of each of the different pRSV derivatives, using Lipofectamine Plus reagent (Gibco-BRL).

Antibodies and stains

Rabbit polyclonal sera against the following FMDV proteins were used: 2B (DM21) kindly provided by D. Mackay (Institute of Animal Health of Pirbright, UK), 2C (E39), 3A (E12) and 3D^{pol} (E56) (Strebel et al., 1986). In addition, MAbs to 2C (1C8), 3A (2C2), 3B (1F8) and 3C (2D2), kindly provided by E. Brocchi (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia, Italy) and to VP1 (SD6) (Mateu et al., 1987), were employed. The following antibodies to cell proteins were employed: MAb anti-Golgi stacks protein p58 (Sigma), MAb 1D3 against PDI (protein disulfide isomerase) and rabbit serum anti-calnexin (ER markers, obtained from Stressgene), MAb CC92 to the *cis*-Golgi network protein gp74 (Alcalde et al., 1994), as well as rabbit sera to human calreticulin (Abcam) and βII-tubulin (Armas-Portela et al., 1999). Horseradish-peroxidase (HRP)-coupled anti-mouse or anti-rabbit antibodies were from Amersham. Goat antibodies anti-mouse and anti-rabbit IgGs coupled to Alexa 594 or 488 were from Molecular Probes. TO-PRO-3 double-stranded nucleic acid stain (Molecular Probes) was used for nuclear staining.

Western blot analysis

BHK-21 cell monolayers either FMDV-infected or transfected with different plasmids as described above were collected from cultured dishes (35 mm Ø) in lysis buffer (10 mM EGTA, 2.5 mM MgCl₂, 1% NP-40 and 20 mM HEPES, pH 7.4) supplemented with a 1 mM PMSF and protease inhibitor cocktail (Roche). After 10 min sonication, samples were boiled for 4 min in Laemmli buffer and resolved on a 12% SDS-PAGE. Proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane and incubated with specific FMDV antibodies, then with HRP-coupled anti-mouse or anti-rabbit antibodies and subsequently developed using an ECL kit (Amersham).

Cellular fractionation

Monolayers of BHK-21 cells (grown in 60 mm Ø dishes), either FMDV-infected or transfected with plasmids, were washed with PBS, detached from plates by scrapping, collected by centrifugation at 110 × *g* for 5 min and resuspended in 0.25 M sucrose in buffer A (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100), supplemented with 1 mM PMSF and protease inhibitor cocktail. Suspensions were homogenized in ice by needle (20-gauge) passage and sonication (total homogenate). Nuclei were separated from cytoplasmic and membrane components (cytoplasmic fraction) by centrifugation at 440 × *g* for 20 min at 4 °C. The resulting pellet (nuclear fraction) was washed three times with sucrose buffered and resuspended in buffer A. Protein concentration was determined by Bradford, and equal amounts from each fraction, in Laemmli

buffer, were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, as described above.

Immunofluorescence assays

Cells cultured on coverslips were infected or transfected as detailed above. At different times p.i., or 24 h post-transfection (p.t.), cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min, blocked and permeabilized by incubating in PBTG buffer (0.1% Triton X-100; 1% bovine serum albumin; 1 M glycine in phosphate-buffered saline, PBS) for 15 min at room temperature. Subsequently, cells were incubated with primary antibodies for 1 h, washed in PBS, incubated with fluorescent-labeled secondary antibodies for 30 min and mounted in Fluoromount-G (Southern Biotech. Assoc., USA). Nuclear staining with TO-PRO-3 was performed as recommended by the manufacturers.

Microscopy and confocal analyses

Cell preparations were viewed with an Olympus BX61 or a Confocal Radiance-2000 (BioRad/Zeiss) microscope. Images were processed with Adobe Photoshop software. Co-localization analyses after confocal images were realized using the Metamorph offline software.

Acknowledgments

We wish to thank E. Beck, E. Brocchi and D. McKay for providing us with antibodies to FMDV NSPs. We also thank C. Aparicio for her contribution to pRSV-3ABB construction, I. Sandoval, I. Correas and L. Kremer for providing us with antibodies to cell proteins and M. Saiz for her critical review of the manuscript. This work was supported by grants from CICYT, Spain (BIO2005-07592-C02-01), EU (QLK2-2001-1304) and by Fundación Severo Ochoa.

References

- Alcalde, J., Egea, G., Sandoval, I.V., 1994. gp74 a membrane glycoprotein of the *cis*-Golgi network that cycles through the endoplasmic reticulum and intermediate compartment. *J. Cell Biol.* 124 (5), 649–665.
- Aldabe, R., Carrasco, L., 1995. Induction of membrane proliferation by poliovirus proteins 2C and 2BC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206 (1), 64–76.
- Aminev, A.G., Amineva, S.P., Palmenberg, A.C., 2003. Encephalomyocarditis virus (EMCV) proteins 2A and 3BCD localize to nuclei and inhibit cellular mRNA transcription but not rRNA transcription. *Virus Res.* 95 (1–2), 59–73.
- Aminev, S.P., Aminev, A.G., Palmenberg, A.C., Gem, J.E., 2004. Rhinovirus 3C protease precursors 3CD and 3CD' localize to the nuclei of infected cells. *J. Gen. Virol.* 85 (Pt. 10), 2969–2979.
- Andino, R., Boddeker, N., Silvera, D., Gamarnik, A.V., 1999. Intracellular determinants of picornavirus replication. *Trends Microbiol.* 7 (2), 76–82.
- Arlinghaus, R.B., Polatnick, J., 1969. The isolation of two enzyme-ribonucleic acid complexes involved in the synthesis of foot-and-mouth disease virus ribonucleic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 62 (3), 821–828.
- Armas-Portela, R., Parrales, M.A., Albar, J.P., Martinez, A.C., Avila, J., 1999. Distribution and characteristics of betaII tubulin-enriched microtubules in interphase cells. *Exp. Cell Res.* 248 (2), 372–380.

- Bachrach, H.L., 1977. Foot-and-mouth disease virus, properties, molecular biology and immunogenicity. In: Romberger, J.A. (Ed.), *Beltsville Symposia in Agricultural Research. Virology in Agriculture*, vol. 1. Allanheld, Osmun & Co., Montclair, NJ.
- Barteling, S.J., 2004. Modern inactivated Foot-and-mouth disease (FMD) vaccines: historical background and key elements in production and use. In: Domingo, F.S.a.E. (Ed.), *Foot-and-Mouth Disease: Current Perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk.
- Beard, C.W., Mason, P.W., 2000. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 74 (2), 987–991.
- Beck, E., Forss, S., Strebel, K., Cattaneo, R., Feil, G., 1983. Structure of the FMDV translation initiation site and of the structural proteins. *Nucleic Acids Res.* 11 (22), 7873–7885.
- Belsham, G.J., 2005. Translation and replication of FMDV RNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 288, 43–70.
- Belsham, G.J.a.M.-S., E., 2004. Genome organization, translation and replication of foot-and-mouth disease virus. In: Domingo, F.S.A.E. (Ed.), *Foot-and-mouth Disease. Current Perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk, UK, pp. 19–52.
- Bienz, K., Egger, D., Pasamontes, L., 1987. Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* 160 (1), 220–226.
- Bienz, K., Egger, D., Pfister, T., Troxler, M., 1992. Structural and functional characterization of the poliovirus replication complex. *J. Virol.* 66 (5), 2740–2747.
- Bolten, R., Egger, D., Gosert, R., Schaub, G., Landmann, L., Bienz, K., 1998. Intracellular localization of poliovirus plus- and minus-strand RNA visualized by strand-specific fluorescent in situ hybridization. *J. Virol.* 72 (11), 8578–8585.
- Brown, F., 1998. Problems with BHK 21 cells. *Dev. Biol. Stand.* 93, 85–88.
- Burrows, R., Mann, J.A., Garland, A.J., Greig, A., Goodridge, D., 1981. The pathogenesis of natural and simulated natural foot-and-mouth disease infection in cattle. *J. Comp. Pathol.* 91 (4), 599–609.
- Capozzo, A.V., Burke, D.J., Fox, J.W., Bergmann, I.E., La Torre, J.L., Grigera, P.R., 2002. Expression of foot and mouth disease virus non-structural polypeptide 3ABC induces histone H3 cleavage in BHK21 cells. *Virus Res.* 90 (1–2), 91–99.
- Carrillo, C., Tulman, E.R., Delhon, G., Lu, Z., Carreno, A., Vagnozzi, A., Kutish, G.F., Rock, D.L., 2005. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 79 (10), 6487–6504.
- Cho, M.W., Teterina, N., Egger, D., Bienz, K., Ehrenfeld, E., 1994. Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology* 202 (1), 129–145.
- Choe, S.S., Dodd, D.A., Kirkegaard, K., 2005. Inhibition of cellular protein secretion by picornaviral 3A proteins. *Virology* 337 (1), 18–29.
- de Wet, J.R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R., Subramani, S., 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7 (2), 725–737.
- Deitz, S.B., Dodd, D.A., Cooper, S., Parham, P., Kirkegaard, K., 2000. MHC I-dependent antigen presentation is inhibited by poliovirus protein 3A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (25), 13790–13795.
- Doedens, J.R., Kirkegaard, K., 1995. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *EMBO J.* 14 (5), 894–907.
- Doedens, J.R., Giddings Jr., T.H., Kirkegaard, K., 1997. Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *J. Virol.* 71 (12), 9054–9064.
- Domingo, E., Mateu, M.G., Martínez, M.A., Dopazo, J., Moya, A., Sobrino, F., 1990. Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. In: Kurstak, R.G.M.E., Murphy, S.A., Van-Regenmortel, M.H.V. (Eds.), *Applied Virology Research. Virus Variation and Epidemiology*, vol. 2. Academic Press Inc., London.
- Egger, D., Teterina, N., Ehrenfeld, E., Bienz, K., 2000. Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J. Virol.* 74 (14), 6570–6580.
- Falk, M.M., Grigera, P.R., Bergmann, I.E., Zibert, A., Multhaupt, G., Beck, E., 1990. Foot-and-mouth disease virus protease 3C induces specific proteolytic cleavage of host cell histone H3. *J. Virol.* 64 (2), 748–756.
- Falk, M.M., Sobrino, F., Beck, E., 1992. VPg gene amplification correlates with infective particle formation in foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 66 (4), 2251–2260.
- Follett, E.A., Pringle, C.R., Pennington, T.H., 1975. Virus development in enucleate cells: echovirus, poliovirus, pseudorabies virus, reovirus, respiratory syncytial virus and Semliki Forest virus. *J. Gen. Virol.* 26 (2), 183–196.
- Forss, S., Strebel, K., Beck, E., Schaller, H., 1984. Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res.* 12 (16), 6587–6601.
- Gazina, E.V., Mackenzie, J.M., Gorrell, R.J., Anderson, D.A., 2002. Differential requirements for COPI coats in formation of replication complexes among three genera of Picornaviridae. *J. Virol.* 76 (21), 11113–11122.
- Gosert, R., Egger, D., Bienz, K., 2000. A cytopathic and a cell culture adapted hepatitis A virus strain differ in cell killing but not in intracellular membrane rearrangements. *Virology* 266 (1), 157–169.
- Hope, D.A., Diamond, S.E., Kirkegaard, K., 1997. Genetic dissection of interaction between poliovirus 3D polymerase and viral protein 3AB. *J. Virol.* 71 (12), 9490–9498.
- Jackson, C.L., Casanova, J.E., 2000. Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol.* 10 (2), 60–67.
- Klausner, R.D., Donaldson, J.G., Lippincott-Schwartz, J., 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* 116 (5), 1071–1080.
- Knox, C., Moffat, K., Ali, S., Ryan, M., Wileman, T., 2005. Foot-and-mouth disease virus replication sites form next to the nucleus and close to the Golgi apparatus, but exclude marker proteins associated with host membrane compartments. *J. Gen. Virol.* 86 (Pt. 3), 687–696.
- Lama, J., Paul, A.V., Harris, K.S., Wimmer, E., 1994. Properties of purified recombinant poliovirus protein 3aB as substrate for viral proteinases and as co-factor for RNA polymerase 3Dpol. *J. Biol. Chem.* 269 (1), 66–70.
- Martinez-Salas, E., 1999. Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 (5), 458–464.
- Martinez-Salas, E., Domingo, E., 1995. Effect of expression of the aphthovirus protease 3C on viral infection and gene expression. *Virology* 212 (1), 111–120.
- Mateu, M.G., Rocha, E., Vicente, O., Vayreda, F., Navalpotro, C., Andreu, D., Pedroso, E., Giralt, E., Enjuanes, L., Domingo, E., 1987. Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an episode of foot-and-mouth disease. *Virus Res.* 8 (3), 261–274.
- Moffat, K., Howell, G., Knox, C., Belsham, G.J., Monaghan, P., Ryan, M.D., Wileman, T., 2005. Effects of foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins on the structure and function of the early secretory pathway: 2BC but not 3A blocks endoplasmic reticulum-to-Golgi transport. *J. Virol.* 79 (7), 4382–4395.
- Monaghan, P., Cook, H., Jackson, T., Ryan, M., Wileman, T., 2004. The ultrastructure of the developing replication site in foot-and-mouth disease virus-infected BHK-38 cells. *J. Gen. Virol.* 85 (Pt. 4), 933–946.
- Nayak, A., Goodfellow, I.G., Belsham, G.J., 2005. Factors required for the uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) in vitro. *J. Virol.* 79 (12), 7698–7706.
- Newman, J.F., Cartwright, B., Doel, T.R., Brown, F., 1979. Purification and identification of the RNA-dependent RNA polymerase of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* 45 (2), 497–507.
- Nunez, J.I., Baranowski, E., Molina, N., Ruiz-Jarabo, C.M., Sanchez, C., Domingo, E., Sobrino, F., 2001. A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *J. Virol.* 75 (8), 3977–3983.
- O'Donnell, V.K., Pacheco, J.M., Henry, T.M., Mason, P.W., 2001. Subcellular distribution of the foot-and-mouth disease virus 3A protein in cells infected with viruses encoding wild-type and bovine-attenuated forms of 3A. *Virology* 287 (1), 151–162.
- Pacheco, J.M., Henry, T.M., O'Donnell, V.K., Gregory, J.B., Mason, P.W., 2003. Role of nonstructural proteins 3A and 3B in host range and pathogenicity of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 77 (24), 13017–13027.

- Pereira, H.G., 1981. Foot-and-mouth disease. In: Gibbs, E.P.J. (Ed.), *Virus Disease of Food Animals*, vol. 2. Academic Press Inc, London.
- Porter, A.G., 1993. Picornavirus nonstructural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *J. Virol.* 67 (12), 6917–6921.
- Ryan, M.D., Donnelly, M.L.L., Flint, M., Cowton, V.M., Luke, G., Hughes, L.E., Knox, C., de Felipe, P., 2004. Foot-and-mouth disease proteinases. In: Domingo, F.S.a.E. (Ed.), *Foot-and-Mouth Disease. Current Perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk, UK, pp. 53–76.
- Sandoval, I.V., Carrasco, L., 1997. Poliovirus infection and expression of the poliovirus protein 2B provoke the disassembly of the Golgi complex, the organelle target for the antipoliovirus drug Ro-090179. *J. Virol.* 71 (6), 4679–4693.
- Sanz-Parra, A., Sobrino, F., Ley, V., 1998. Infection with foot-and-mouth disease virus results in a rapid reduction of MHC class I surface expression. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt. 3), 433–436.
- Schlegel, A., Giddings Jr., T.H., Ladinsky, M.S., Kirkegaard, K., 1996. Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J. Virol.* 70 (10), 6576–6588.
- Sobrino, F., Palma, E.L., Beck, E., Davila, M., de la Torre, J.C., Negro, P., Villanueva, N., Ortin, J., Domingo, E., 1986. Fixation of mutations in the viral genome during an outbreak of foot-and-mouth disease: heterogeneity and rate variations. *Gene* 50 (1–3), 149–159.
- Sobrino, F., Saiz, M., Jimenez-Clavero, M.A., Nunez, J.I., Rosas, M.F., Baranowski, E., Ley, V., 2001. Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet. Res.* 32 (1), 1–30.
- Strebel, K., Beck, E., Strohmaier, K., Schaller, H., 1986. Characterization of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion proteins. *J. Virol.* 57 (3), 983–991.
- Suhy, D.A., Giddings Jr., T.H., Kirkegaard, K., 2000. Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J. Virol.* 74 (19), 8953–8965.
- Tesar, M., Marquardt, O., 1990. Foot-and-mouth disease virus protease 3C inhibits cellular transcription and mediates cleavage of histone H3. *Virology* 174 (2), 364–374.
- Toja, M., Escarmis, C., Domingo, E., 1999. Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res.* 64 (2), 161–171.
- Towner, J.S., Ho, T.V., Semler, B.L., 1996. Determinants of membrane association for poliovirus protein 3AB. *J. Biol. Chem.* 271 (43), 26810–26818.
- Whitton, J.L., Cornell, C.T., Feuer, R., 2005. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat. Rev., Microbiol.* 3 (10), 765–776.
- Xiang, W., Harris, K.S., Alexander, L., Wimmer, E., 1995. Interaction between the 5'-terminal cloverleaf and 3AB/3CDpro of poliovirus is essential for RNA replication. *J. Virol.* 69 (6), 3658–3667.
- Xiang, W., Cuconati, A., Hope, D., Kirkegaard, K., Wimmer, E., 1998. Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3Dpol with VPg and with genetic variants of 3AB. *J. Virol.* 72 (8), 6732–6741.

Subcellular distribution of swine vesicular disease virus proteins and alterations induced in infected cells: A comparative study with foot-and-mouth disease virus and vesicular stomatitis virus[☆]

Miguel A. Martín-Acebes^a, Mónica González-Magaldi^a, María F. Rosas^a, Belén Borrego^b, Emiliana Brocchi^c, Rosario Armas-Portela^{a,d,†}, Francisco Sobrino^{a,b,*}

^a Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Cantoblanco 28049, Madrid, Spain

^b Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA, Valdeolmos, 28130 Madrid, Spain

^c Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia Romagna (IZSLER), 25124 Brescia, Italy

^d Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Received 7 November 2007; returned to author for revision 4 December 2007; accepted 30 December 2007

Available online 14 February 2008

Abstract

The intracellular distribution of swine vesicular disease virus (SVDV) proteins and the induced reorganization of endomembranes in IBRS-2 cells were analyzed. Fluorescence to new SVDV capsids appeared first upon infection, concentrated in perinuclear circular structures and colocalized to dsRNA. As in foot-and-mouth disease virus (FMDV)-infected cells, a vesicular pattern was predominantly found in later stages of SVDV capsid morphogenesis that colocalized with those of non-structural proteins 2C, 2BC and 3A. These results suggest that assembly of capsid proteins is associated to the replication complex. Confocal microscopy showed a decreased fluorescence to ER markers (calreticulin and protein disulfide isomerase), and disorganization of *cis*-Golgi gp74 and *trans*-Golgi caveolin-1 markers in SVDV- and FMDV-, but not in vesicular stomatitis virus (VSV)-infected cells. Electron microscopy of SVDV-infected cells at an early stage of infection revealed fragmented ER cisternae with expanded lumen and accumulation of large Golgi vesicles, suggesting alterations of vesicle traffic through Golgi compartments. At this early stage, FMDV induced different patterns of ER fragmentation and Golgi alterations. At later stages of SVDV cytopathology, cells showed a completely vacuolated cytoplasm containing vesicles of different sizes. Cell treatment with brefeldin A, which disrupts the Golgi complex, reduced SVDV (~5 log) and VSV (~4 log) titers, but did not affect FMDV growth. Thus, three viruses, which share target tissues and clinical signs in natural hosts, induce different intracellular effects in cultured cells. © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: SVDV; Infection; Proteins; Subcellular distribution; Endomembranes; Brefeldin A; FMDV; VSV

Introduction

Swine vesicular disease virus (SVDV) is a member of the genus *Enterovirus* within the family *Picornaviridae* and it is assumed to be derived from the human pathogen coxsackievirus B5 (CVB5) (Zhang et al., 1993, 1999). SVDV is the aetiological agent of an important and highly contagious disease of pigs

(SVD). Outbreaks have periodically affected Europe and East Asia (Brocchi et al., 1997; Knowles et al., 2007; Lin and Kitching, 2000) since SVD was first reported in Italy in 1966 (Nardelli et al., 1968). In contrast to human coxsackievirus, which are the responsible for myocarditis, pancreatitis and meningitis (Whitton et al., 2005), SVDV tropism is related to epithelial tissues (Mulder et al., 1997). Since SVDV and CVB are able to use the same cellular receptors (Jimenez-Clavero et al., 2005), differences in viral tropism may be a consequence of post-entry factors (Whitton et al., 2005). The vesicular lesions produced by SVDV are indistinguishable from those caused by foot-and-mouth disease virus (FMDV), another picornavirus that belongs to the genus *Aphthovirus* (Rowlands, 2003; Sobrino and Domingo, 2004),

[☆] Dedicated to the memory of Rosario Armas-Portela.

* Corresponding author. CBMSO, UAM, Cantoblanco 28049, Madrid, Spain. Fax: +34 91 1964420.

E-mail address: fsobrino@cbm.uam.es (F. Sobrino).

† Deceased.

and vesicular stomatitis virus (VSV), a member of the genus *Vesiculovirus*, family *Rhabdoviridae* (Letchworth et al., 1999; Lin and Kitching, 2000). Although SVDV does not usually produce a severe disease, the need for a differential diagnosis with FMD makes this virus important for international trade as reflected by its inclusion in the list of diseases notifiable to the OIE.

SVDV and FMDV genomes are composed of a single-stranded RNA molecule of positive polarity that is translated using an internal ribosome entry site (IRES) to produce a polyprotein. This polyprotein is then processed into mature viral proteins (Belsham and Martínez-Salas, 2004; Escribano-Romero et al., 2000; Zhang et al., 1993). The four structural proteins (VP1–VP4) conform an icosahedral capsid of approximately 25–30 nm in diameter. Seven non-structural (NS) proteins (and some of their precursors) are implicated in viral cycle: 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C and 3D, plus L protein in the case of FMDV (Buenz and Howe, 2006; Whitton et al., 2005). Among them, L, 2A and 3C are the proteases that catalyze polyprotein processing to yield mature viral proteins. 3D is an RNA dependent RNA polymerase and 3B (VPg) is a peptide which links covalently to the 5' end of viral genome. The SVDV genome encodes a single copy of 3B gene. Three tandem copies are present in the FMDV RNA (Forss et al., 1984). Hydrophobic domains for membrane anchor are predicted for 2B, 2C and 3A proteins (Echeverri and Dasgupta, 1995; Towner et al., 1996; van Kuppeveld et al., 1996; Wessels et al., 2006c).

Studies performed mainly with poliovirus (PV) have revealed that picornavirus RNA replication takes place at the surface of cytoplasmic vesicles derived from cellular membranes of endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi complex (Bienz et al., 1987; Garcia-Briones et al., 2006; Knox et al., 2005; O'Donnell et al., 2001; Schlegel et al., 1996; Suhy et al., 2000). Picornavirus infection impairs protein trafficking along the secretory pathway (Cornell et al., 2006; Doedens and Kirkegaard, 1995; Moffat et al., 2005) and inhibits host cell protein and RNA synthesis (Ehrenfeld, 1982; Holland, 1962). The differences in the morphology of cytoplasmic vesicles induced in infected cells and in the sensitivity to the Golgi disrupting agent brefeldin A (BFA) suggest diverse cellular requirements among picornaviruses to build the replication complex (Gazina et al., 2002; Moffat et al., 2005; Monaghan et al., 2004; Wessels et al., 2006a).

Although SVDV was described forty years ago, most aspects of its interaction with host cells remain undetermined and they are assumed to be similar to those described for other enteroviruses, mainly PV. In this study, we have performed a comparative analysis of the reorganizations induced by SVDV infection on the ER and Golgi architecture by using confocal and electron microscopy analyses. The alterations found were compared with those produced by two important animal vesicular viruses: FMDV and VSV, the effects induced in cultured cells by the latter being well established (Letchworth et al., 1999). Experiments were performed in a cell line IBRS-2 susceptible to these three viruses. Our results support that SVDV infection disassembles the ER and the Golgi and that viral replication takes place at the surface of cytoplasmic vesicles likely originated from these cell structures. The alterations induced by FMDV were in part similar to those

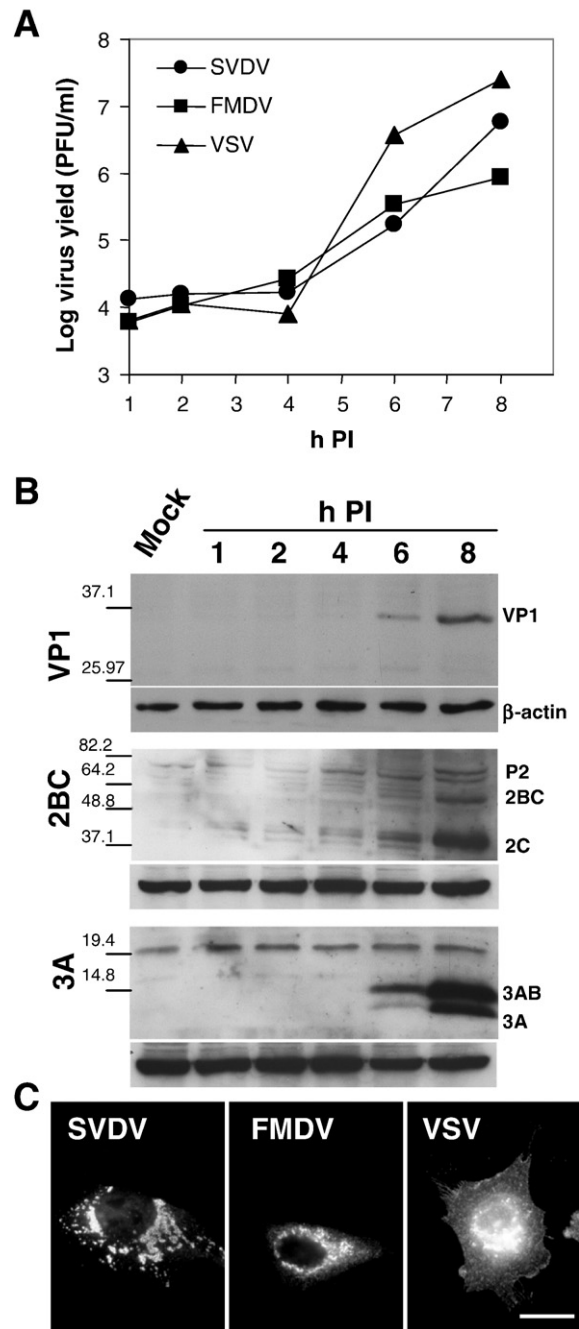
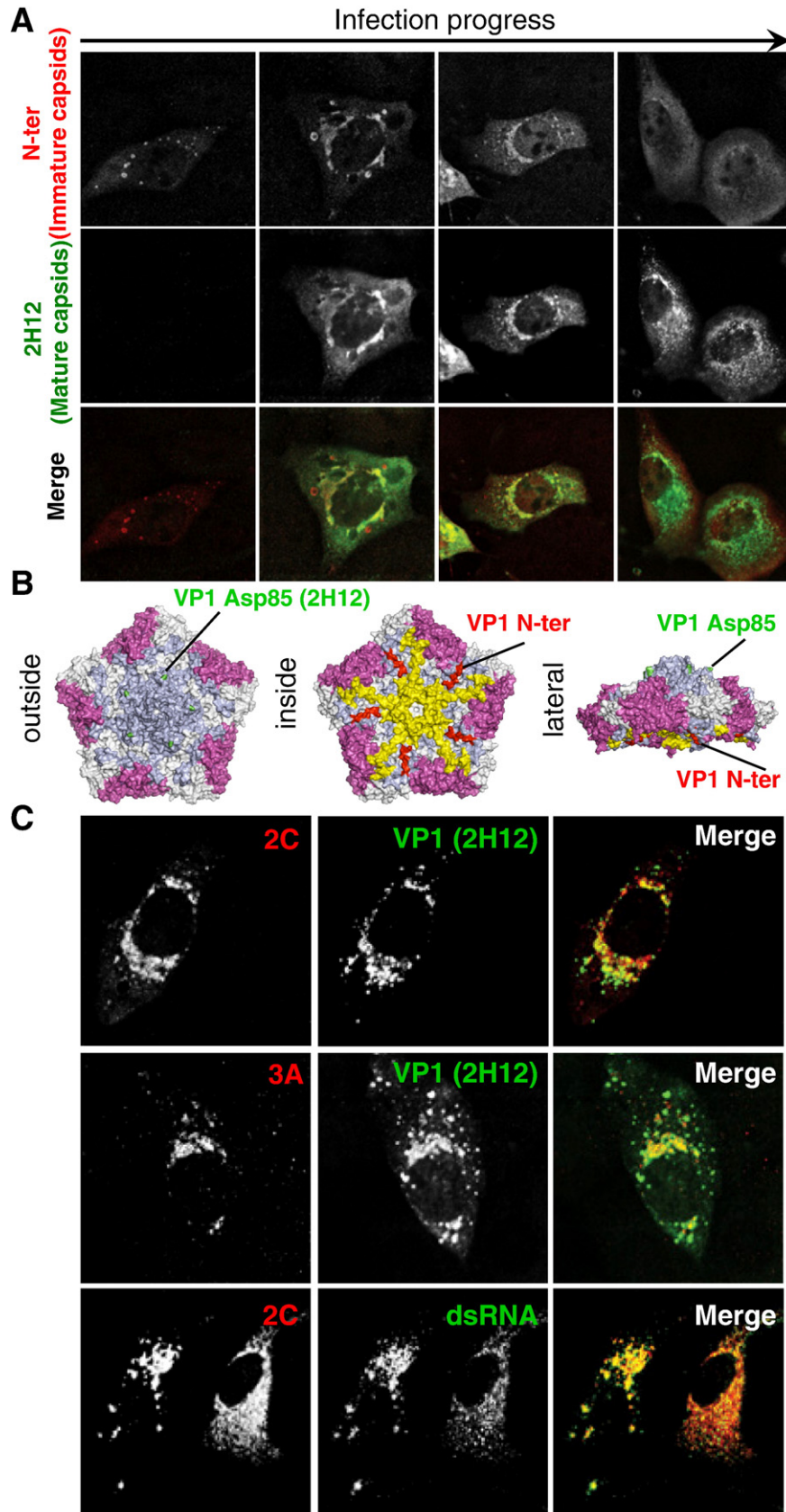


Fig. 1. SVDV, FMDV and VSV efficiently infect IBRS-2 cells. A) Single step growth curve of the three viruses. IBRS-2 cells were infected (MOI of 0.5) and at different times PI supernatant virus yield was determined by plaque assay. B) Time-course of accumulation of SVDV proteins in infected cells. Mock and SVDV-infected cells (as in A) were lysed and viral proteins were detected by Western-blotting using rabbit polyclonal antisera against the N-terminus of SVDV VP1, and to 2BC or 3A proteins from CVB3. Cellular β -actin is shown as control of protein loading. Expected protein molecular weights (in kDa): VP1 (31.6), 2C (37.3), 2BC (48.3), P2 (64.7), 3A (9.89) and 3AB (12.3). C) Representative examples of immunofluorescence patterns of infected cells. Infected cells (MOI of 0.5) were processed for immunofluorescence at 8 h PI, using MAbs 2H12, SD6 and I1 to detect SVDV or FMDV VP1 proteins or VSV-G protein, respectively, and a secondary antibody coupled to Alexa Fluor 594. Bar: 20 μ m.

caused by FMDV, while VSV did not disassemble ER or Golgi complex. Differences were also found in the sensitivity to BFA as it did not affect FMDV growth, but highly inhibited SVDV

and VSV infections. Overall, these results suggest differential requirements to build the replication complex among the three viruses studied.



Results

SVDV, FMDV and VSV infect IBRS-2 cells

Each of the viruses studied productively grew in IBRS-2 cells (Fig. 1A), showing a parallel time-course and producing a morphologically similar cytopathic effect (data not shown). When the time-course of SVDV protein detection was studied by Western-blotting, a protein band of the expected size was revealed by the antibody to N-ter of VP1. The protein band recognized by antibody N-ter was first detected at 6 h PI, being more intense at 8 h PI (Fig. 1B). Antiserum to 2BC from the related CVB3 recognized SVDV 2C, 2BC and P2 precursor at 8 h PI. This antibody did not recognize protein 2B as described (Cornell et al., 2006). Similar results were obtained using an anti-CVB3 2C antibody (data not shown). Likewise, the antibody to CVB3 3A detected, from 6 h PI, a protein band which size corresponded to that of SVDV 3A and an additional band of a mobility compatible with that of precursor 3AB (Fig. 1B). The Western-blot detection of the SVDV proteins analyzed was delayed when compared to FMDV-infected cells (Fig. S1 in Supplementary data, and data not shown). Fluorescence studies were performed at 8 h PI of cells infected with a low MOI of about 0.5, which allowed detection of cells with different degrees of infection progress for the three viruses compared. Infected cells showed specific fluorescence to epitopes exposed in mature viral capsids, corresponding to the structural protein VP1 for SVDV (2H12) and FMDV (Mab SD6) or to the G glycoprotein for VSV (Mab I1), and representative images are shown in Fig. 1C. In average, emergence of fluorescence was delayed in SVDV-infected cells (from 4–5 h PI) when compared to cells infected with FMDV or VSV (from 2.5 to 3 h PI) (data not shown). Fluorescence to Mab 2H12 in SVDV-infected cells showed a vesicular perinuclear pattern combined with a cytoplasmic granular distribution. As described for other FMDV-infected cell lines (Garcia-Briones et al., 2006; Knox et al., 2005), VP1 distribution in IBRS-2 infected cells was more diffuse and appeared concentrated in smaller vesicles with a preferential perinuclear location (Garcia-Briones et al., 2006; Monaghan et al., 2004). In VSV-infected cells, G protein accumulated perinuclearly and also at the cell periphery. A similar distribution was reported for BHK-21 infected cells (Arnheiter et al., 1984). This distribution likely corresponds to part of the ER and Golgi complexes and the plasma membrane where newly synthesized virions acquire their envelope (de Silva et al., 1990; Odenwald et al., 1986).

Intracellular location of SVDV capsid proteins

Two antibodies that recognized epitopes differentially exposed in SVDV capsid intermediates were used to study the emergence and location of capsid proteins in infected cells. Antibody to the N-terminus of VP1 recognizes an internal epitope that only becomes accessible following the conformational rearrangements induced by the interaction of the virion with cell receptors (Jimenez-Clavero et al., 2001). N-ter also reacts with denatured SVDV VP1 protein in Western-blotting (Fig. 1B), suggesting that this antibody is able to detect unfolded forms of SVDV capsid precursors. On the other hand, Mab 2H12 recognized a discontinuous epitope that is exposed in mature capsids and virions at later stages of viral morphogenesis (Borrego et al., 2002; Jimenez-Clavero et al., 2001) (Fig. 2A). Fig. 2B shows the location on a SVDV capsid pentamer model of the VP1 residues used to produce antibody N-ter, and of the VP1 residue where replacements in mutants escaping neutralization by Mab 2H12 were found (Borrego et al., 2002). Double immunofluorescence labelling experiments performed at 8 h PI in SVDV-infected cells (MOI of 0.5), allowed detection of SVDV-infected cells positive for antibody N-ter that did not show fluorescence to the discontinuous epitope recognized by Mab 2H12 (Fig. 2A). This fluorescence was considered to correspond to capsid precursors antigenically similar to the modified virions generated following the interaction with cell receptors, termed immature capsids. In cells showing this early pattern, fluorescence of antibody N-ter was concentrated in perinuclear circular structures, including “ring-like” images that likely corresponded to the surface of vesicles where de novo capsid protein synthesis takes place. As infection progressed, an increase in a perinuclear and granular cytoplasmic accumulation of fluorescence to the discontinuous epitope recognized by Mab 2H12 was observed and colocalized to antibody N-ter. Concomitantly, a fading and more diffuse staining with antibody N-ter was observed (see merge images in Fig. 2A). In order to confirm that these patterns represented different infection stages, we performed infections at high MOI, in an attempt to synchronize infection, and fixed cells at defined time intervals. Cells showing only fluorescence for N-ter antibody accounted for 80% of the total positive cells at 3.5 h PI. This ratio drastically reduced from 5 h PI, when at least 90% of positive cells showed fluorescence to Mab 2H12 (Fig. S2, Supplementary data). Remarkably under these experimental conditions not all the cells in the culture showed equal levels of protein accumulation and cytopathic effect, confirming the asynchronous progress of SVDV infection. In some instances

Fig. 2. Subcellular distribution of fluorescence to immature and mature capsids and to NS proteins in SVDV-infected cells. A) Confocal sections of representative immunofluorescence patterns shown by IBRS-2 cells infected with SVDV (8 h PI). Cells were infected (MOI of 0.5) and immunostained using rabbit antiserum N-ter (red) and Mab 2H12 (green). Images were ordered to represent different stages of infection, based on the relative intensity of fluorescence to Mab 2H12. B) Location of the amino acids contributing to the epitopes recognized by antibody N-ter and Mab 2H12 on a SVDV capsid pentamer model (Verdaguer et al., 2003) (PDB accession number: 1mqf), created using oligomer generator at Viperdb (Shepherd et al., 2006). The VP1 residue Asp 85, functionally involved in the epitope recognized by Mab 2H12 (Borrego et al., 2002), is indicated in green; the sequence of the 20 N-terminal VP1 residues used to produce antibody N-ter is shown in red (Jimenez-Clavero et al., 2001). VP1 (blue), VP2 (white), VP3 (magenta) and VP4 (yellow). C) Confocal sections of cells infected and processed as in (A), using polyclonal sera to 2C or 3A CVB3 proteins (red) in combination with Mab 2H12 to VP1 (green), or Mab J2 to dsRNA (green). Yellow fluorescence denotes colocalization in the merged images.

confocal images of IBRS-2 infected cells showed fluorescence to MAb 2H12 at ring-like structures of lower size than those observed with antibody N-ter (Fig. S4, Supplementary data). Similar results were obtained in double immunofluorescences combining antibody N-ter and MAb 5C4; the latter recognizing a conformational epitope only exposed in mature SVDV capsids, for which mutants escaping neutralization showed mutations at VP3 protein (Borrego et al., 2002) (Fig. S3, Supplementary data).

SVDV capsids assemble close to replication site

SVDV NS proteins were detected by antibodies specific for CVB3 2C, 2BC and 3A (Fig. 2C and Fig. S5A in Supplementary data). These proteins were mainly located perinuclearly and exhibited a punctuated pattern. Their fluorescence colocalized with that of mature capsids recognized by MAb 2H12, suggesting that SVDV capsid maturation occurred close to the replication complex as described for other picornaviruses (Egger et al., 2000; Krogerus et al., 2003). This possibility was supported by double labelling experiments with a MAb to dsRNA whose accumulation at the replication complexes built by other picornaviruses has been reported (Gazina et al., 2002). The confocal sections analyzed showed a punctuated perinuclear pattern corresponding to dsRNA in SVDV-infected cells, but not in mock-infected cells (Fig. 2C and Fig. S5B in Supplementary data). Fluorescence to dsRNA colocalized with SVDV NS proteins 2B, 2BC and 3A, as well as with immature capsids recognized by antibody N-ter.

Alterations induced on ER and Golgi morphology by SVDV infection

Picornavirus replication takes place associated to cellular membranes (see Introduction), so we investigated the effects of SVDV infection on the ER and Golgi structures and compared them with those produced by FMDV and VSV. Infected cells which showed major morphological effects were not considered in these analyses as these alterations impaired recognition and comparison of cell structures. Confocal microscopy of SVDV-infected cells using antibodies to ER markers showed decreased fluorescence intensity against calreticulin and PDI when compared with mock-infected cells (Fig. 3A). A parallel decrease in fluorescence to PDI was observed in FMDV-infected cells, while the calreticulin pattern was shown perinuclearly dispersed (Fig. 3B). Conversely, in VSV-infected cells, calreticulin staining appeared perinuclearly concentrated (Fig. 3C). In this case the intensity of the fluorescence allowed the analysis of thinner sections that revealed the colocalization of VSV-G protein and calreticulin.

SVDV infection of IBRS-2 cells dispersed and reduced the fluorescence intensity to the *cis*-Golgi complex marker gp74 (Fig. 4A). This Golgi alteration was also observed in FMDV-infected cells (Fig. 4B), as previously described for BHK-21 infected cells (Garcia-Briones et al., 2006). Likewise the perinuclear accumulation of caveolin-1, a protein that resides at the *trans*-Golgi and cycles through caveolae at plasma

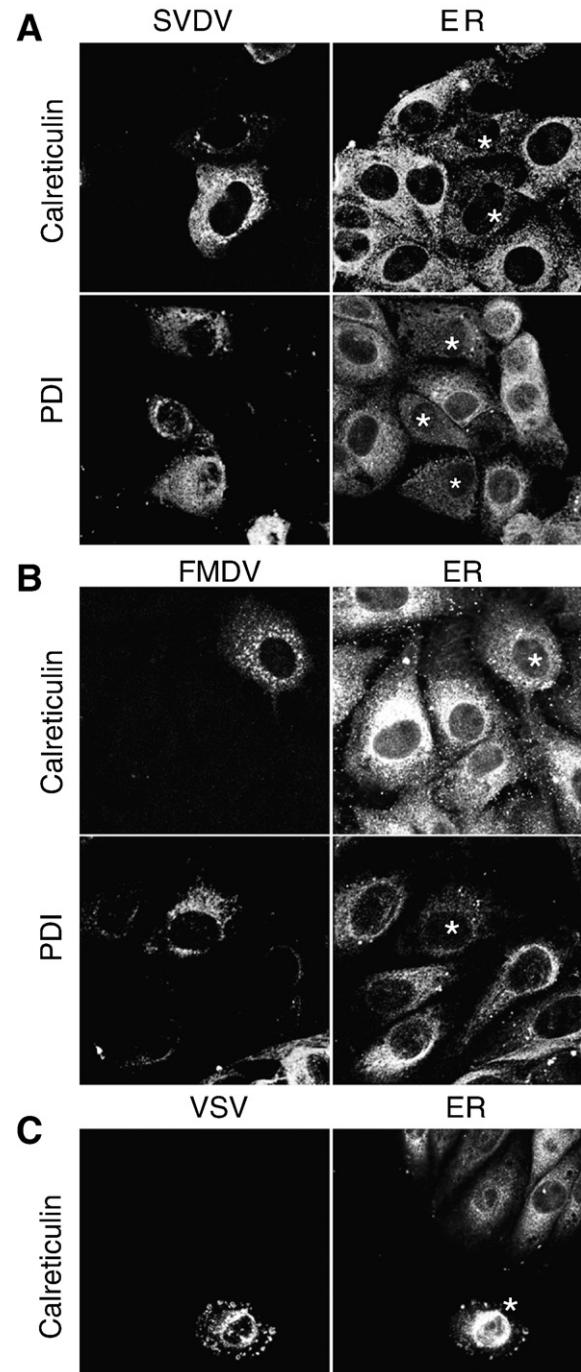


Fig. 3. SVDV, FMDV or VSV infection induces different effects on ER. Optical sections of IBRS-2 cells infected with SVDV, FMDV or VSV (MOI of 0.5) and processed for double immunofluorescence, at 8 h PI, using rabbit polyclonal antiserum to calreticulin or MAb 1D3 to PDI and the corresponding virus-specific antibodies 2H12, SD6 and I1 or N-ter and VP1, respectively. A) Changes in ER pattern fluorescence induced by SVDV infection. B) FMDV infection disperses and decreases ER fluorescence. C) Changes in the ER pattern fluorescence induced by VSV infection. Asterisks denote infected cells.

membrane (Kurzchalia et al., 1994), was also dispersed in SVDV and FMDV-infected cells confirming the ER disruption. In contrast, VSV infection did not alter the caveolin-1 staining pattern of the Golgi (Fig. 4C).

Ultrastructural changes in SVDV-infected cells

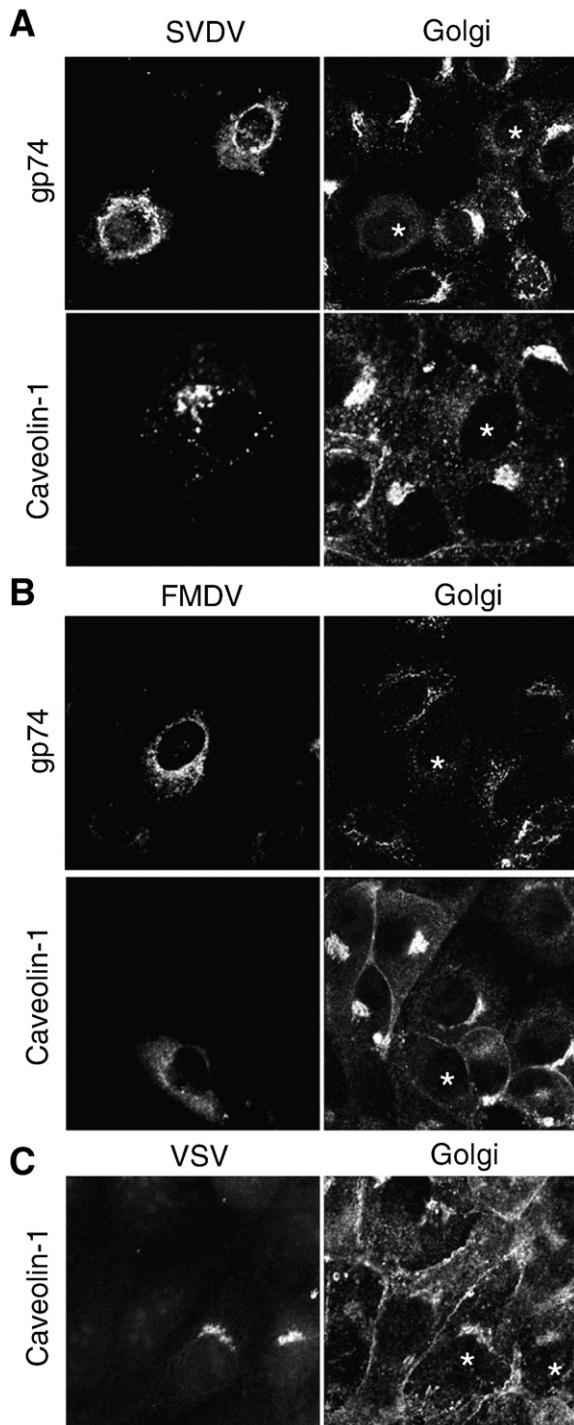


Fig. 4. SVDV, FMDV or VSV infection induces different effects on the Golgi. Optical sections of IBRS-2 cells infected with SVDV, FMDV or VSV (MOI of 0.5) and processed for double immunofluorescence, at 8 h PI, using MAb 25H8 to gp74 (*cis*-Golgi marker) or anti-caveolin-1 rabbit polyclonal serum (*trans*-Golgi marker) and the corresponding virus-specific antibodies 2H12, SD6 and I1 or N-ter and VP1, respectively. A) Golgi dispersion induced by SVDV infection. B) FMDV infection disperses Golgi. C) VSV infection does not alter Golgi staining pattern. Asterisks denote infected cells.

The differences in the alterations induced at the ER and Golgi complexes by the infection of IBRS-2 cells with SVDV or FMDV were further analyzed by TEM. Infections were performed at high MOI and cells were analyzed when the cytopathic effect was evident: 6 h PI for FMDV and 8 h PI for SVDV (Fig. 5). Two populations of SVDV-infected cells could be distinguished. One with cells exhibiting a low cytopathic effect, and a second population defined by rounded cells showing advanced cytopathic effect that was assumed to correspond to late stages of infection. In cells presenting low cytopathic effect (Fig. 5A) it was possible to identify the different cell compartments. As reported for BHK-21 cells (Monaghan et al., 2004), two populations of FMDV-infected IBRS-2 cells could be identified. Those that exhibited low cytopathology and those with an advanced cytopathology that detached from the plates. Thus, a comparative study of the changes on intracellular architecture induced by SVDV and FMDV was performed among the attached cells showing low cytopathic effect. These SVDV-infected cells exhibited fragmented ER cisternae with an expanded lumen, while FMDV-infected cells were characterized by longer and not so swollen cisternae (Fig. 5A). On the other hand, abundant and larger vesicles were identified near the Golgi complex in SVDV-infected cells suggesting that infection altered vesicle traffic through Golgi compartments. In FMDV-infected cells abundant vesicles were also found besides the presence of swollen cisternae (Fig. 5A).

At later stages of SVDV infection, cells with an advanced cytopathic effect showed a completely vacuolated cytoplasm that impaired identification of any vestige of ER or Golgi complex (Fig. 5Ba). Two populations of vesicles could be distinguished. One included vesicles with more than 100 nm in diameter (Fig. 5Ba1) and a second population integrated by smaller vesicles, tightly clustered (Fig. 5Ba2). Double membrane vesicles were identified in the two populations, being more frequently found among the smaller vesicles. In some cases, cells demonstrating advanced cytopathic effect (Fig. 5Bb) exhibited a whole vacuolated cytoplasm, including long dilated cisternae and clustered vesicles. Breaking up cellular nuclei suggests that apoptosis could also take place in these cells (Fig. 5Ba). Thus, electrodense circular inclusions observed in the cytoplasm (Fig. 5Ba and b), would be more likely remnants of cell nuclei than virus containing bodies.

Treatment with BFA differentially affects the infection of IBRS-2 cells by SVDV, FMDV or VSV

BFA, a Golgi disrupting agent, affects picornavirus replication differentially (Gazina et al., 2002; Maynell et al., 1992; Monaghan et al., 2004; O'Donnell et al., 2001; Pietiainen et al., 2004) so we evaluated the effects of BFA on SVDV, FMDV and VSV infection (Fig. 6). As reported for NRK cells (Alcalde et al., 1994), BFA caused on IBRS-2 cells a rapid dispersion of the *cis*-Golgi marker gp74 (Fig. 6A), which indicates Golgi disruption. VSV infection of HeLa cells is very sensitive to Golgi disruption by BFA, since it depends on the function of the

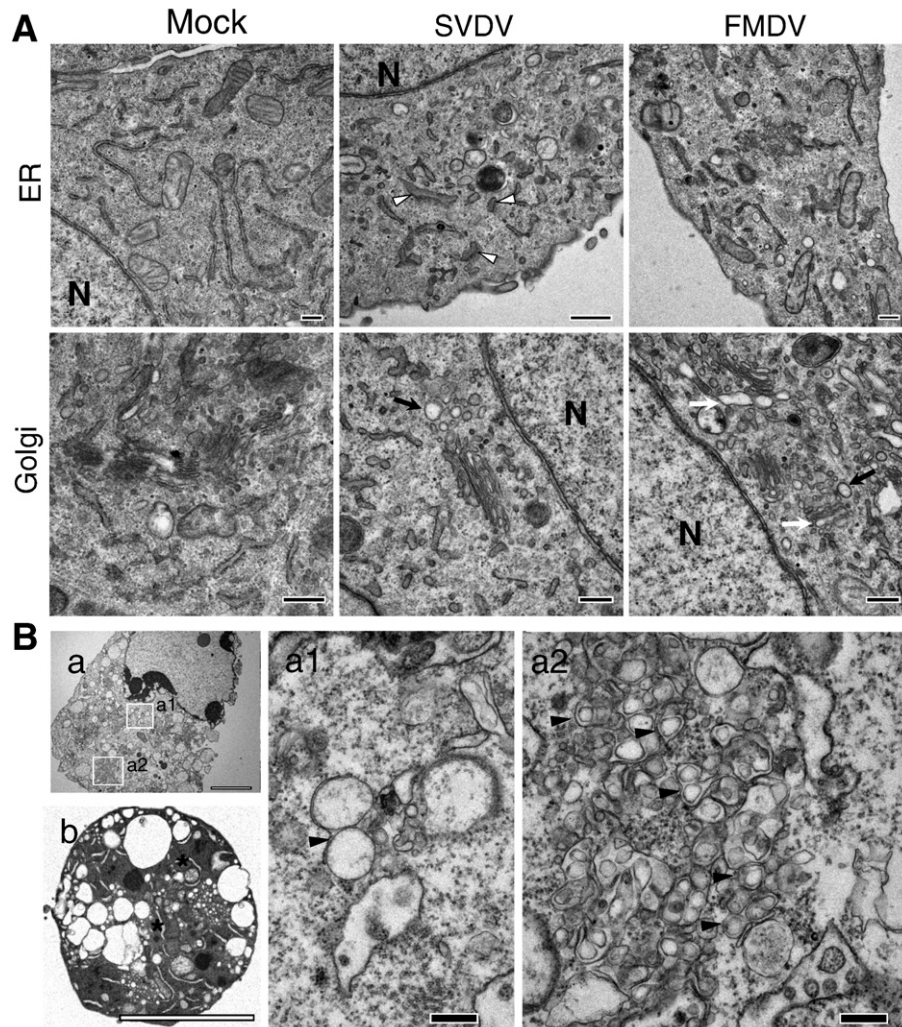


Fig. 5. Ultrastructural alterations in SVDV and FMDV-infected cells. IBRS-2 cells were infected with SVDV (MOI of 40) or FMDV (MOI of 3), fixed after 8 h and 6 h PI, respectively, and the ultrastructure of Golgi and the ER was examined by TEM. The figure shows representative images of: A) Golgi and ER rearrangements in infected cells presenting low cytopathic effect. B) Ultrastructure of SVDV-infected cells presenting two stages of advanced cytopathic effect (a,b). Areas of interest are magnified in a1 and a2. N: cell nucleus; white arrowheads: swollen ER cisternae; black arrows: vesicles near Golgi complex; white arrows: swollen Golgi cisternae; black arrowheads: double membrane vesicles; asterisks: long dilated cisternae; black bars: 100 nm, white bars: 5 μm.

secretory pathway (de Silva et al., 1990; Irurzun et al., 1993; Oda et al., 1990). This was also observed in IBRS-2 cells treated with BFA that showed a decrease in the virus yield (about 4 log) and in the percentage of infected cells (90%) (Fig. 6B). A higher inhibition of the virus yield (about 5 log) was found after SVDV infection and no infected cells could be detected by immunofluorescence staining. Similar reductions of SVDV yield were found when BFA was added from 3 h PI. This confirmed that the inhibition exerted by with this drug, which can also affect virus entry (Pietinen et al., 2004; Sieczkarski and Whittaker, 2002), was mostly affecting post-internalization stages of virus replication (data not shown). Conversely, FMDV infection and virus yield were not inhibited by the BFA treatment of IBRS-2 cells (Fig. 6B), as reported for other FMDV-infected cell lines (Monaghan et al., 2004; O'Donnell et al., 2001). No differences in the VP1 staining pattern between BFA-treated or untreated FMDV-infected cells were noticed (Fig. 6C). In contrast, upon VSV infection fluorescence to G protein

appeared dispersed in BFA-treated cells, reflecting its retention at the ER. The inhibition of SVDV infectivity by BFA correlated with a lack of capsid protein detection by Western blotting. This was not observed in BFA-treated cells following FMDV infection (Fig. 6D).

Thus, BFA affects differentially the yield of infection of the three viruses compared and shows no effect in FMDV-infected IBRS-2 cells.

Discussion

The study of the molecular mechanisms exploited by different viruses to produce similar pathologies in natural hosts is challenging and can provide valuable information to understand virus–host interactions. The intracellular aspects of *in vivo* pathogenesis are complex since not only the viral receptor/s but also the subsequent interactions between the virus and host cells are relevant for the final outcome of infections (Domingo et al.,

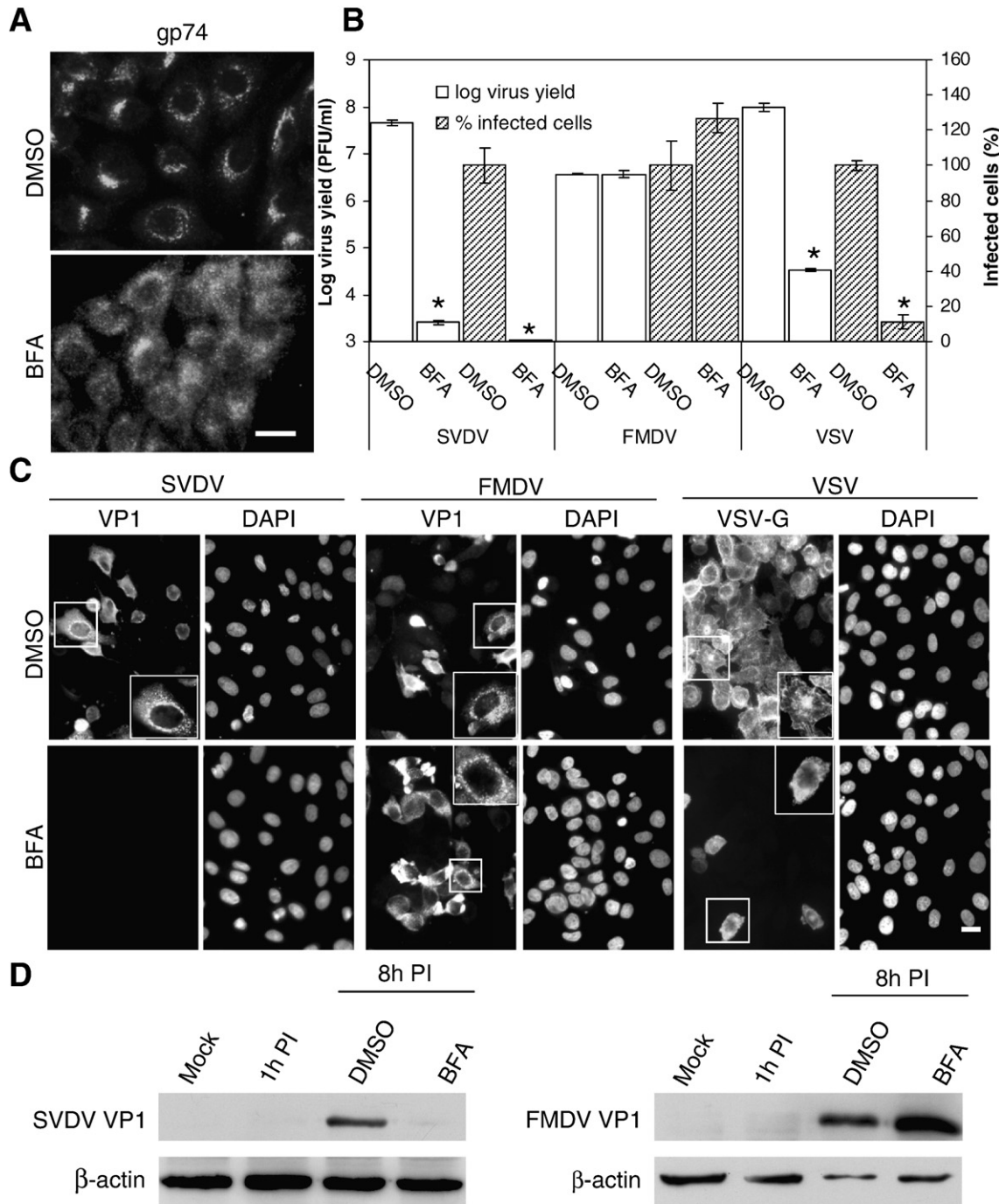


Fig. 6. Effects of Golgi disruption induced by BFA on SVDV, FMDV or VSV infection. A) BFA causes Golgi dispersion. IBRS-2 cells treated for 30 min. with BFA (5 μ g/ml) or DMSO (control cells) were immunostained using MAb 25H8 to the *cis*-Golgi marker gp74. B) Effects of BFA treatment on SVDV, FMDV and VSV infection. BFA-treated and non-treated cells were infected (MOI of 0.5). At 8 h PI, the total virus yield and the percentage of infected cells (relative to untreated cells) were determined by plaque assay and by immunofluorescence using MAbs 2H12 (SVDV VP1), SD6 (FMDV VP1) and I1 (VSV-G), respectively. Asterisks denote statistically significant differences (ANOVA: $p < 0.05$). C) Representative immunofluorescence micrographs corresponding to SVDV, FMDV and VSV-infected cells. Cells were infected and processed for immunofluorescence as described in (B). Infected cells for which enlargements are shown boxed. Bar: 20 μ m. D) Western-blot analysis of SVDV and FMDV production in BFA-treated cells. Infected cells, treated or not with the drug, were lysed at 8 h PI. A lysate from infected control cells (1 h PI) was also included. Western-blotting was performed as described in Materials and methods and membranes were incubated with the rabbit polyclonal antiserum N-ter (SVDV) or with MAb SD6 (FMDV). Membranes incubated with an anti- β -actin antibody were included as a control for protein loading.

2003; Nunez et al., 2007). In this wide scenario, the comparative analysis of specific aspects of virus infection in cultured cells, such as the compartmentalization of virus gene expression and the reorganization of cell structures, is a useful tool. Here, we

have attempted such kind of analyses by using the three viruses causing the main vesicular diseases of domestic animals. The SVDV analyzed in this study is a field isolate that enter cultured cells using the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR)

and heparan sulfate (Escribano-Romero et al., 2004; Jimenez-Clavero et al., 2005). The FMDV and VSV compared here enter cultured cells using integrins or phosphatidyl serine as receptors, respectively (Baranowski et al., 1998; Jackson et al., 2000; Schlegel et al., 1983). Upon serial passages in cultured cells FMDV can acquire the ability to enter cells via heparan sulfate (Baranowski et al., 1998; Jackson et al., 1996). SVDV, FMDV and VSV similarly infect IBRS-2 cells, a porcine-derived cell line widely used for SVDV and FMDV growth and characterization (Burman et al., 2006; Jimenez-Clavero et al., 2001). The time-course of virus yield was similar between SVDV and FMDV. However, the detection of capsid and NS proteins was delayed for SVDV (Fig. 1). Even when a lower sensitivity in Western-blotting and immunofluorescence of the different SVDV antibodies used cannot be excluded, these results suggest a delayed accumulation of SVDV proteins relative to those observed in FMDV-infected cells.

Fluorescence to antibody N-ter was detected first upon infection. This suggests that an early step in capsid protein synthesis and assembly occur at large, circular structures, interpreted as spherical vesicles, localized close to the nucleus. As infection proceeded, fluorescence to the mature capsids recognized by MAbs 2H12 became predominant and showed lower size and a distribution pattern similar to that observed in FMDV-infected cells (Fig. 2A), while N-ter staining faded. Further experiments are required to understand the capsid modifications mediating these observations. However, these results suggest that immature capsids expose the N-terminus of VP1 and that mature SVDV capsids displaying discontinuous epitopes present in mature virions, mainly accumulate at vesicles with a different average morphology and location than those initially associated to immature capsids.

The colocalization of immature capsids and NS proteins with discrete cumuli of dsRNA suggests that SVDV capsid synthesis and assembly occur associated to the replication complex. This colocalization is also observed between NS proteins and mature capsids, indicating that capsid maturation also associates to the replication complex. These findings are consistent with the coupled viral RNA replication and translation reported to occur for other picornaviruses at the surface of cytoplasmic vesicles originated from membranes derived from ER and Golgi (Egger et al., 2000; Krogerus et al., 2003).

Immunofluorescence studies also showed that SVDV and FMDV disassembled ER and Golgi complexes. Disruption of the ER by FMDV was slightly lower than that induced by SVDV (Figs. 3 and 4). The dispersion of ER and Golgi markers impaired colocalization analyses with SVDV and FMDV proteins (data not shown). Disruption of the Golgi complex has been previously reported for different picornaviruses including FMDV (Cornell et al., 2006; Garcia-Briones et al., 2006; O'Donnell et al., 2001; Sandoval and Carrasco, 1997), and the reorganization of ER by 2B protein has also been observed in enterovirus infected cells (van Kuppeveld et al., 1997). These alterations at ER and Golgi complexes induced by picornaviruses inhibit MHC-I molecules secretion to the cell surface (Deitz et al., 2000; Sanz-Parra et al., 1998), and may contribute to evade host immune response. As expected from

the VSV requirement for an intact secretory pathway (de Silva et al., 1990; Irurzun et al., 1993; Oda et al., 1990), VSV-infected cells did not show alterations of ER and Golgi.

SVDV-infected cells showed by TEM a high proportion of double membrane vesicles and clusters of small membrane-associated vesicles. These structures were not frequently observed in FMDV-infected cells, as described (Monaghan et al., 2004). The differences in the endomembrane reorganizations induced by SVDV and FMDV (Fig. 5) may reflect differential cellular requirements in the organization of the replication complex, such as those reported among different picornaviruses for the cellular components of COP-I coat (Gazina et al., 2002). BFA blocks ADP ribosylation factor 1 (Arf1) by inhibiting specific guanine nucleotide exchange factors (GEFs) involved in recycling of inactive GDP-bound to active GTP-bound forms. Since these factors are required for COP-I retrograde vesicle transport between Golgi and ER complexes, BFA causes Golgi disruption and redistribution of Golgi markers to the ER (Belov et al., 2007; Jackson and Casanova, 2000). BFA inhibited efficiently SVDV infection (one log higher than VSV multiplication) as described for other enteroviruses (Gazina et al., 2002; Maynell et al., 1992). Conversely, BFA did not inhibit FMDV replication, as reported for BHK cells infected with type O and A FMDVs (Monaghan et al., 2004; O'Donnell et al., 2001).

In PV, 3A and 3CD have been shown to mediate translocation of specific Arfs and their GEFs – GBF1 and BIG1/2, respectively –, which are susceptible for BFA inhibition (Belov et al., 2007, 2005; Niu et al., 2005). In addition, BFA-resistant PV mutants carried mutations in 2C and 3A proteins (Crotty et al., 2004), which also indicates a possible role for 2C protein in membrane recruiting. The sensitivity to BFA observed for SVDV infection (Fig. 6) suggests a role for BFA-susceptible GEFs in the membrane recruiting induced by this virus. On the other hand, 3A protein from CVB3, a close relative to SVDV, can interact with GBF1 blocking Arf-1 mediated COP-I assembly and causing protein transport blockage (Wessels et al., 2006b). This is also observed for PV but not for FMDV 3A proteins (Wessels et al., 2006a). Thus, the differential effect of BFA on SVDV or FMDV replication suggests differences in the capacity of their 3A proteins to interact with GEFs.

Autophagy and COP-II dependent transport, which are not inhibited by BFA (Belov et al., 2005), have been also implicated in the intracellular vesicle formation induced by PV and other picornaviruses (Jackson et al., 2005; Rust et al., 2001; Schlegel et al., 1996; Suhy et al., 2000). The double membrane structures observed in Fig. 5 might indicate an autophagy origin of part of the vesicles induced in SVDV-infected cells. The contribution of autophagy and COP-II dependent transport to FMDV membrane recruitment remains to be clarified.

Overall, the results reported here suggest that despite being able to infect similar epithelia and to produce undistinguishable lesions in natural hosts (Alexandersen and Mowat, 2005; Cornish et al., 2001; Mulder et al., 1997), SVDV and FMDV utilize different mechanisms to build their replication complex, and that these mechanisms share little in common to that used by the rhabdovirus VSV.

Materials and methods

Cells and viruses

The two cell lines employed in this study were IBRS-2 (De Castro, 1964) derived from swine kidney, and BHK-21 derived from Syrian golden hamster kidney (Macpherson and Stoker, 1962). Both cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco-BRL) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS) (Sigma), L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml). The SVDV isolate SPA/1/93 (Jimenez-Clavero et al., 1998) was propagated on IBRS-2 cells. Viral stocks from type C FMDV C-S8c1 (Sobrino et al., 1983) and VSV Indiana serotype isolates were produced by amplification in BHK-21 cells.

Antibodies and reagents

SVDV mature capsids were visualized using MAb 2H12 and 5C4 (Borrego et al., 2002). A rabbit polyclonal antiserum to a synthetic peptide spanning the 20 N-terminal residues of VP1 (Jimenez-Clavero et al., 2001) was used to detect this protein in Western-blotting assays or when incorporated as part of immature capsids (fluorescence assays). FMDV VP1 was detected by MAb SD6, which recognizes a continuous epitope exposed in viral capsids (Mateu et al., 1987), or by a rabbit polyclonal antiserum (Strebel et al., 1986). VSV-G glycoprotein was detected using mouse MAb II (Lefrancois and Lyles, 1982). Rabbit polyclonal antisera against coxsackievirus B3 (CVB3) NS proteins 2BC, 3A (Cornell et al., 2006) and 2C (Whitton et al., unpublished results) were employed for SVDV NS protein detection. *cis* and *trans*-Golgi networks were stained using MAb 25H8 to gp74 (Alcalde et al., 1994) or a polyclonal rabbit antiserum to caveolin-1 (BD Transduction Laboratories), respectively. Calreticulin rabbit polyclonal antiserum (Abcam) and MAb 1D3 against protein disulfide isomerase (PDI) (Stressgene) were used for ER staining, and MAb AC-15 (Sigma) was employed to detect β -actin. MAb J2 (English & Scientific Consulting) was employed to detect double-stranded RNA (dsRNA). Alexa Fluor 488 (green) and 594 or 555 (red) conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies (Invitrogen) were used to recognize primary antibodies in immunofluorescence assays. For Western-blotting, anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary antibodies (GE Healthcare) were utilized. A stock solution (20 mg/ml) of BFA (Sigma) was prepared in DMSO.

Infections and virus titrations

Cells were washed twice with DMEM and infected with different multiplicities of infection expressed as PFU/cell (hence MOI). After 1 h adsorption, inoculum was removed and fresh medium containing 5% FCS was added. This time-point was considered 1 h post-infection (PI). For BFA treatment, the drug was added to cultures 30 min before infection, and it was maintained during the whole infection time to avoid cellular recuperation. The virus released in infection medium and the

total virus produced (intracellular and medium-released, recovered by three freeze–thaw cycles) were quantified as PFU/ml by plaque assay (Sobrino et al., 1983). FMDV and VSV titers were obtained in BHK-21 (at 24 h PI), while SVDV titers were determined in IBRS-2 cells (at 48 h PI).

Immunofluorescence and confocal microscopy

Infected cells, grown on coverslips, were fixed with 4% paraformaldehyde or in cold absolute methanol for *cis*-Golgi staining, and processed for immunofluorescence assays as reported (Garcia-Briones et al., 2006). Nuclei were counterstained with 1 µg/ml DAPI (Molecular Probes) or with To-Pro-3 (Molecular Probes) and samples were examined using an Olympus BX61 epifluorescence microscope coupled to a digital cooled charge-coupled-device (CCD) camera DP70 (Olympus). Images were acquired using Olympus DP controller software. For confocal laser scanning microscopy, images were collected using an Axiovert S100 TV microscope (Zeiss) equipped with a confocal Radiance 2000 system (Bio-Rad) and acquired using Lasersharp2000 5.2 software (Bio-Rad). Sequential scanning for different laser lines was performed to avoid false colocalization and images were processed using Adobe Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems Inc.).

Transmission electron microscopy (TEM)

Mock or infected cell monolayers, grown on 100 mm Ø dishes, were washed 3 times with PBS and fixed 30 min at 37 °C in 4% paraformaldehyde–2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.4 supplemented with 5 mM CaCl₂. Cells were scrapped and postfixed in 1% osmium tetroxide–1% potassium ferricyanide for 1 h at 4 °C, washed three times with bidistilled water and treated with 0.15% tannic acid in phosphate buffer pH 7.4 for 1 min. Cells were washed with the buffer and with bidistilled water prior to the staining with 2% uranyl acetate for 1 h at RT. After three washes with bidistilled water samples were dehydrated in ethanol and embedded in TAAB 812 resin (TAAB laboratories, Berkshire, UK). Samples were examined using a Jeol JEM-1010 electron microscope (Jeol, Japan) operating at 80 kV and images were acquired using a digital camera Bioscan792 (Gatan, Inc. 5933 Coronado Lane, Pleasanton, CA 94588).

Western-blot assay

Infected cells, grown on 35 mm Ø dishes, were lysed and their proteins resolved on SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane, as described (Garcia-Briones et al., 2006). Membranes were blocked with 3% skimmed milk in PBS, washed with PBS–0.5% Tween and incubated over night at 4 °C with the primary antibody diluted in PBS–1% BSA. After washing with PBS–0.5% Tween, membranes were incubated with appropriated secondary antibody coupled to HRP in PBS–1% BSA for 1 h at RT, and washed with PBS–0.5% Tween. Proteins were detected by using Western Lighting Chemiluminescence Reagent (Perkin Elmer).

Data analysis

Analysis of the variance (ANOVA), using *F* Fischer–Snedecor distribution, was performed with statistical package SPSS 13.0 (SPSS Inc.) for Windows.

Acknowledgments

We wish to thank L. Whitton for offering us the use of sera to non-structural CVB3 proteins. We also thank V. Ley and M.A. Jiménez-Clavero for providing us with SVDV isolate SPA/1/93 and with serum to SVDV VP1, M. Dávila and E. Domingo for VSV Indiana isolate and MAb I1, I. Sandoval for MAb 25H8, E. Beck for FMDV VP1 antiserum, and M. López for her excellent technical assistance. This work was supported by Spanish grants from CICYT (BIO2005-07592-C02-01), MEC (CSD2006-0007) and by Fundación Severo Ochoa.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bone.2007.08.047.

References

- Alcalde, J., Egea, G., Sandoval, I.V., 1994. gp74 a membrane glycoprotein of the cis-Golgi network that cycles through the endoplasmic reticulum and intermediate compartment. *J. Cell Biol.* 124 (5), 649–665.
- Alexandersen, S., Mowat, N., 2005. Foot-and-mouth disease: host range and pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 288, 9–42.
- Arnheiter, H., Dubois-Dalcq, M., Lazzarini, R.A., 1984. Direct visualization of protein transport and processing in the living cell by microinjection of specific antibodies. *Cell* 39 (1), 99–109.
- Baranowski, E., Sevilla, N., Verdaguer, N., Ruiz-Jarabo, C.M., Beck, E., Domingo, E., 1998. Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J. Virol.* 72 (8), 6362–6372.
- Belov, G.A., Altan-Bonnet, N., Kovtunovych, G., Jackson, C.L., Lippincott-Schwartz, J., Ehrenfeld, E., 2007. Hijacking components of the cellular secretory pathway for replication of poliovirus RNA. *J. Virol.* 81 (2), 558–567.
- Belov, G.A., Fogg, M.H., Ehrenfeld, E., 2005. Poliovirus proteins induce membrane association of GTPase ADP-ribosylation factor. *J. Virol.* 79 (11), 7207–7216.
- Belsham, G.J., Martínez-Salas, E., 2004. Genome organization, translation and replication of foot-and-mouth disease virus. In: Sobrino, F., Domingo, E. (Eds.), “Foot-and-Mouth Disease. Current Perspectives.”. Horizon Bioscience, Norfolk, UK.
- Bienz, K., Egger, D., Pasamontes, L., 1987. Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* 160 (1), 220–226.
- Borrego, B., Carra, E., Garcia-Ranea, J.A., Brocchi, E., 2002. Characterization of neutralization sites on the circulating variant of swine vesicular disease virus (SVDV): a new site is shared by SVDV and the related coxsackie B5 virus. *J. Gen. Virol.* 83 (Pt 1), 35–44.
- Brocchi, E., Zhang, G., Knowles, N.J., Wilsden, G., McCauley, J.W., Marquardt, O., Ohlinger, V.F., De Simone, F., 1997. Molecular epidemiology of recent outbreaks of swine vesicular disease: two genetically and antigenically distinct variants in Europe, 1987–94. *Epidemiol. Infect.* 118 (1), 51–61.
- Buenz, E.J., Howe, C.L., 2006. Picornaviruses and cell death. *Trends Microbiol.* 14 (1), 28–36.
- Burman, A., Clark, S., Abrescia, N.G., Fry, E.E., Stuart, D.I., Jackson, T., 2006. Specificity of the VP1 GH loop of foot-and-mouth disease virus for {alpha} v integrins. *J. Virol.* 80 (19), 9798–9810.
- Cornell, C.T., Kiesses, W.B., Harkins, S., Whitton, J.L., 2006. Inhibition of protein trafficking by coxsackievirus b3: multiple viral proteins target a single organelle. *J. Virol.* 80 (13), 6637–6647.
- Cornish, T.E., Stallknecht, D.E., Brown, C.C., Seal, B.S., Howerth, E.W., 2001. Pathogenesis of experimental vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype) infection in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*). *Vet. Pathol.* 38 (4), 396–406.
- Crotty, S., Saleh, M.C., Gitlin, L., Beske, O., Andino, R., 2004. The poliovirus replication machinery can escape inhibition by an antiviral drug that targets a host cell protein. *J. Virol.* 78 (7), 3378–3386.
- De Castro, M.P., 1964. Behaviour of the foot-and-mouth disease virus in cell cultures: susceptibility of the IB-RS-2 cell line. *Arq. Inst. Biol. Sao Paulo* 31, 63–78.
- de Silva, A.M., Balch, W.E., Helenius, A., 1990. Quality control in the endoplasmic reticulum: folding and misfolding of vesicular stomatitis virus G protein in cells and in vitro. *J. Cell Biol.* 111 (3), 857–866.
- Deitz, S.B., Dodd, D.A., Cooper, S., Parham, P., Kirkegaard, K., 2000. MHC I-dependent antigen presentation is inhibited by poliovirus protein 3A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (25), 13790–13795.
- Doedens, J.R., Kirkegaard, K., 1995. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *Embo J.* 14 (5), 894–907.
- Domingo, E., Escarmis, C., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Carrillo, E., Nunez, J.I., Sobrino, F., 2003. Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.* 91 (1), 47–63.
- Echeverri, A.C., Dasgupta, A., 1995. Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology* 208 (2), 540–553.
- Egger, D., Teterina, N., Ehrenfeld, E., Bienz, K., 2000. Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J. Virol.* 74 (14), 6570–6580.
- Ehrenfeld, E., 1982. Poliovirus-induced inhibition of host-cell protein synthesis. *Cell* 28 (3), 435–436.
- Escribano-Romero, E., Jimenez-Clavero, M.A., Gomes, P., Garcia-Ranea, J.A., Ley, V., 2004. Heparan sulphate mediates swine vesicular disease virus attachment to the host cell. *J. Gen. Virol.* 85 (Pt 3), 653–663.
- Escribano-Romero, E., Jimenez-Clavero, M.A., Ley, V., 2000. Swine vesicular disease virus. Pathology of the disease and molecular characteristics of the virion. *Anim. Health Res. Rev.* 1 (2), 119–126.
- Forss, S., Strebel, K., Beck, E., Schaller, H., 1984. Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res.* 12 (16), 6587–6601.
- Garcia-Briones, M., Rosas, M.F., Gonzalez-Magaldi, M., Martín-Acebes, M.A., Sobrino, F., Armas-Portela, R., 2006. Differential distribution of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells. *Virology* 349 (2), 409–421.
- Gazina, E.V., Mackenzie, J.M., Gorrell, R.J., Anderson, D.A., 2002. Differential requirements for COPI coats in formation of replication complexes among three genera of *Picornaviridae*. *J. Virol.* 76 (21), 11113–11122.
- Holland, J.J., 1962. Inhibition of DNA-primed RNA synthesis during poliovirus infection of human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 9, 556–562.
- Irurzun, A., Perez, L., Carrasco, L., 1993. Brefeldin A blocks protein glycosylation and RNA replication of vesicular stomatitis virus. *FEBS Lett.* 336 (3), 496–500.
- Jackson, C.L., Casanova, J.E., 2000. Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol.* 10 (2), 60–67.
- Jackson, W.T., Giddings Jr., T.H., Taylor, M.P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R.R., Kirkegaard, K., 2005. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol.* 3 (5), e156.
- Jackson, T., Sheppard, D., Denyer, M., Blakemore, W., King, A.M., 2000. The epithelial integrin alphavbeta6 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 74 (11), 4949–4956.
- Jackson, T., Ellard, F.M., Ghazaleh, R.A., Brookes, S.M., Blakemore, W.E., Corteyn, A.H., Stuart, D.I., Newman, J.W., King, A.M., 1996. Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* 70 (8), 5282–5287.
- Jimenez-Clavero, M.A., Escribano-Romero, E., Ley, V., Spiller, O.B., 2005. More recent swine vesicular disease virus isolates retain binding to coxsackie-adenovirus receptor, but have lost the ability to bind human decay-accelerating factor (CD55). *J. Gen. Virol.* 86 (Pt 5), 1369–1377.

- Jimenez-Clavero, M.A., Escribano-Romero, E., Douglas, A.J., Ley, V., 2001. The N-terminal region of the VP1 protein of swine vesicular disease virus contains a neutralization site that arises upon cell attachment and is involved in viral entry. *J. Virol.* 75 (2), 1044–1047.
- Jimenez-Clavero, M.A., Escribano-Romero, E., Sanchez-Vizcaino, J.M., Ley, V., 1998. Molecular cloning, expression and immunological analysis of the capsid precursor polypeptide (P1) from swine vesicular disease virus. *Virus Res.* 57 (2), 163–170.
- Knowles, N.J., Wilsden, G., Reid, S.M., Ferris, N.P., King, D.P., Paton, D.J., Fevereiro, M., Brocchi, E., 2007. Reappearance of swine vesicular disease virus in Portugal. *Vet. Rec.* 161 (2), 71.
- Knox, C., Moffat, K., Ali, S., Ryan, M., Wileman, T., 2005. Foot-and-mouth disease virus replication sites form next to the nucleus and close to the Golgi apparatus, but exclude marker proteins associated with host membrane compartments. *J. Gen. Virol.* 86 (Pt 3), 687–696.
- Krogerus, C., Egger, D., Samuilova, O., Hyypia, T., Bienz, K., 2003. Replication complex of human parechovirus 1. *J. Virol.* 77 (15), 8512–8523.
- Kurzchalia, T.V., Dupree, P., Monier, S., 1994. VIP21-Caveolin, a protein of the trans-Golgi network and caveolae. *FEBS Lett.* 346 (1), 88–91.
- Lefrancois, L., Lyles, D.S., 1982. The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus. II. Monoclonal antibodies of nonneutralizing and cross-reactive epitopes of Indiana and New Jersey serotypes. *Virology* 121 (1), 168–174.
- Letchworth, G.J., Rodriguez, L.L., Del carrera, J., 1999. Vesicular stomatitis. *Vet. J.* 157 (3), 239–260.
- Lin, F., Kitching, R.P., 2000. Swine vesicular disease: an overview. *Vet. J.* 160 (3), 192–201.
- Macpherson, I., Stoker, M., 1962. Polyoma transformation of hamster cell clones—an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16, 147–151.
- Mateu, M.G., Rocha, E., Vicente, O., Vayreda, F., Navalpotro, C., Andreu, D., Pedrosa, E., Giralt, E., Enjuanes, L., Domingo, E., 1987. Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an episode of foot-and-mouth disease. *Virus Res.* 8 (3), 261–274.
- Maynell, L.A., Kirkegaard, K., Klymkowsky, M.W., 1992. Inhibition of poliovirus RNA synthesis by brefeldin A. *J. Virol.* 66 (4), 1985–1994.
- Moffat, K., Howell, G., Knox, C., Belsham, G.J., Monaghan, P., Ryan, M.D., Wileman, T., 2005. Effects of foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins on the structure and function of the early secretory pathway: 2BC but not 3A blocks endoplasmic reticulum-to-Golgi transport. *J. Virol.* 79 (7), 4382–4395.
- Monaghan, P., Cook, H., Jackson, T., Ryan, M., Wileman, T., 2004. The ultrastructure of the developing replication site in foot-and-mouth disease virus-infected BHK-38 cells. *J. Gen. Virol.* 85 (Pt 4), 933–946.
- Mulder, W.A., van Poelwijk, F., Moormann, R.J., Reus, B., Kok, G.L., Pol, J.M., Dekker, A., 1997. Detection of early infection of swine vesicular disease virus in porcine cells and skin sections. A comparison of immunohistochemistry and in-situ hybridization. *J. Virol. Methods* 68 (2), 169–175.
- Nardelli, L., Lodetti, E., Gualandi, G.L., Burrows, R., Goodridge, D., Brown, F., Cartwright, B., 1968. A foot and mouth disease syndrome in pigs caused by an enterovirus. *Nature* 219 (5160), 1275–1276.
- Niu, T.K., Pfeifer, A.C., Lippincott-Schwartz, J., Jackson, C.L., 2005. Dynamics of GBF1, a brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi. *Mol. Biol. Cell* 16 (3), 1213–1222.
- Nunez, J.I., Molina, N., Baranowski, E., Domingo, E., Clark, S., Burman, A., Berryman, S., Jackson, T., Sobrino, F., 2007. Guinea pig-adapted foot-and-mouth disease virus with altered receptor recognition can productively infect a natural host. *J. Virol.* 81 (16), 8497–8506.
- O'Donnell, V.K., Pacheco, J.M., Henry, T.M., Mason, P.W., 2001. Subcellular distribution of the foot-and-mouth disease virus 3A protein in cells infected with viruses encoding wild-type and bovine-attenuated forms of 3A. *Virology* 287 (1), 151–162.
- Oda, K., Fujiwara, T., Ikehara, Y., 1990. Brefeldin A arrests the intracellular transport of viral envelope proteins in primary cultured rat hepatocytes and HepG2 cells. *Biochem. J.* 265 (1), 161–167.
- Odenwald, W.F., Arnheiter, H., Dubois-Dalq, M., Lazzarini, R.A., 1986. Stereo images of vesicular stomatitis virus assembly. *J. Virol.* 57 (3), 922–932.
- Pietiainen, V., Marjomaki, V., Upla, P., Pelkmans, L., Helenius, A., Hyypia, T., 2004. Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events. *Mol. Biol. Cell* 15 (11), 4911–4925.
- Rowlands, D.J., 2003. Foot-and-mouth disease. Special issue *Virus Res.* 91 (1).
- Rust, R.C., Landmann, L., Gosert, R., Tang, B.L., Hong, W., Hauri, H.P., Egger, D., Bienz, K., 2001. Cellular COPII proteins are involved in production of the vesicles that form the poliovirus replication complex. *J. Virol.* 75 (20), 9808–9818.
- Sandoval, I.V., Carrasco, L., 1997. Poliovirus infection and expression of the poliovirus protein 2B provoke the disassembly of the Golgi complex, the organelle target for the antipoliovirus drug Ro-090179. *J. Virol.* 71 (6), 4679–4693.
- Sanz-Parra, A., Sobrino, F., Ley, V., 1998. Infection with foot-and-mouth disease virus results in a rapid reduction of MHC class I surface expression. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 3), 433–436.
- Schlegel, A., Giddings Jr., T.H., Ladinsky, M.S., Kirkegaard, K., 1996. Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J. Virol.* 70 (10), 6576–6588.
- Schlegel, R., Tralka, T.S., Willingham, M.C., Pastan, I., 1983. Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell* 32 (2), 639–646.
- Shepherd, C.M., Borelli, I.A., Lander, G., Natarajan, P., Siddavanahalli, V., Bajaj, C., Johnson, J.E., Brooks III, C.L., Reddy, V.S., 2006. VIPERdb: a relational database for structural virology. *Nucleic Acids Res.* 34, D386–D389 (Database issue).
- Sieczkarski, S.B., Whittaker, G.R., 2002. Dissecting virus entry via endocytosis. *J. Gen. Virol.* 83 (Pt 7), 1535–1545.
- Sobrino, F., Domingo, E. (Eds.), 2004. Foot-and-Mouth Disease. *Current Perspectives.* Horizon Bioscience, Norfolk, UK.
- Sobrino, F., Davila, M., Ortin, J., Domingo, E., 1983. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* 128 (2), 310–318.
- Strebel, K., Beck, E., Strohmaier, K., Schaller, H., 1986. Characterization of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion proteins. *J. Virol.* 57 (3), 983–991.
- Suhy, D.A., Giddings Jr., T.H., Kirkegaard, K., 2000. Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J. Virol.* 74 (19), 8953–8965.
- Towner, J.S., Ho, T.V., Semler, B.L., 1996. Determinants of membrane association for poliovirus protein 3AB. *J. Biol. Chem.* 271 (43), 26810–26818.
- van Kuppeveld, F.J., Hoenderop, J.G., Smeets, R.L., Willems, P.H., Dijkman, H.B., Galama, J.M., Melchers, W.J., 1997. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *Embo J.* 16 (12), 3519–3532.
- van Kuppeveld, F.J., Galama, J.M., Zoll, J., van den Hurk, P.J., Melchers, W.J., 1996. Coxsackie B3 virus protein 2B contains cationic amphipathic helix that is required for viral RNA replication. *J. Virol.* 70 (6), 3876–3886.
- Verdaguer, N., Jimenez-Clavero, M.A., Fita, I., Ley, V., 2003. Structure of swine vesicular disease virus: mapping of changes occurring during adaptation of human coxsackie B5 virus to infect swine. *J. Virol.* 77 (18), 9780–9789.
- Wessels, E., Duijsings, D., Lanke, K.H., van Dooren, S.H., Jackson, C.L., Melchers, W.J., van Kuppeveld, F.J., 2006a. Effects of picornavirus 3A proteins on protein transport and GBF1-dependent COP-I recruitment. *J. Virol.* 80 (23), 11852–11860.
- Wessels, E., Duijsings, D., Niu, T.K., Neumann, S., Oorschot, V.M., de Lange, F., Lanke, K.H., Klumperman, J., Henke, A., Jackson, C.L., Melchers, W.J., van Kuppeveld, F.J., 2006b. A viral protein that blocks Arf1-mediated COP-I assembly by inhibiting the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Dev. Cell* 11 (2), 191–201.
- Wessels, E., Notebaart, R.A., Duijsings, D., Lanke, K., Vergeer, B., Melchers, W.J., van Kuppeveld, F.J., 2006c. Structure–function analysis of the coxsackievirus protein 3A: identification of residues important for dimerization, viral RNA replication, and transport inhibition. *J. Biol. Chem.* 281 (38), 28232–28243.
- Whitton, J.L., Cornell, C.T., Feuer, R., 2005. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (10), 765–776.
- Zhang, G., Haydon, D.T., Knowles, N.J., McCauley, J.W., 1999. Molecular evolution of swine vesicular disease virus. *J. Gen. Virol.* 80 (Pt 3), 639–651.
- Zhang, G., Wilsden, G., Knowles, N.J., McCauley, J.W., 1993. Complete nucleotide sequence of a coxsackie B5 virus and its relationship to swine vesicular disease virus. *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 5), 845–853.



Foot-and-mouth disease virus particles inactivated with binary ethylenimine are efficiently internalized into cultured cells

Miguel A. Martín-Acebes^{a,1}, Ángela Vázquez-Calvo^a, Mónica González-Magaldi^a,
Francisco Sobrino^{a,b,*}

^a Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Cantoblanco 28049, Madrid, Spain

^b Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA, Valdeolmos, 28130 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 June 2011

Received in revised form 7 October 2011

Accepted 13 October 2011

Available online 24 October 2011

Keywords:

FMDV

Binary ethylenimine

Inactivated vaccine

Endocytosis

Endosomes

Integrin

ABSTRACT

Conventional foot-and-mouth disease (FMD) vaccines are produced from virus grown in cell culture that is chemically inactivated by using binary ethylenimine (BEI). Here, we show that BEI treatment preserves both the architecture of FMDV particles, as inactivated viral particles showed by electron microscopy characteristics similar to those of infectious virions, as well as the general features of infectious virus internalization. Binding of inactivated particles to BHK-21 cells was blocked by preincubation with either a FMDV-specific monoclonal antibody or a synthetic peptide spanning the integrin-binding viral motif Arg-Gly-Asp (RGD). In addition, these particles were internalized into cultured cells through endocytosis, being directed to early endosomes, as indicated by their colocalization with the marker protein Rab5. When purified BEI-inactivated virions were labelled and their interaction with live cultured cells analyzed by time-lapse fluorescence microscopy, a major subpopulation of virus particles, about 80%, was shown to undergo internalization into a static endosome population, insensitive to the microtubule depolymerization exerted by nocodazole, while the remaining subpopulation (about 20%) was dynamic and sensitive to this drug. Thus, BEI-inactivated particles provide an interesting tool to study early steps in FMDV–cell interactions enabling a distinction between FMDV internalization and productive infection. Possible implications for FMDV immune response elicited following vaccine administration are discussed.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) is the aetiological agent of a highly contagious disease of cloven-hoofed animals [1,2]. As FMDV hosts include important livestock species (i.e. sheep, goats, cattle and swine) disease outbreaks cause large economic losses derived from reductions in dairy and meat industries, slaughter policies and restrictions for national and international trading [3–6]. These factors make FMD to be included within the list of diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health (former OIE). At present, vaccination is the best tool for disease control together with culling programs and animal movement restrictions in and from infected areas. Considerable effort has been paid on the design of novel vaccines including approaches such as

engineered attenuated viruses [7,8], recombinant DNA immunization [9,10] or peptide subunits [11,12]. However vaccines based on chemical inactivation of viral preparations produced in cultured cells remain as the only strategy approved by the OIE. Binary ethylenimine (BEI) has progressively displaced other virus inactivants such as formaldehyde for vaccine production [13,14]. While the mechanism of FMDV inactivation by BEI remains to be known in detail, it seems to imply modification (alkylation) of viral RNA preserving the antigenic structure of the viral capsid [15]. Immune responses derived from BEI-inactivated vaccines showed a good correlation between induction of neutralizing antibodies and the protection they confer [2,16]; however, the molecular mechanisms underlying this protection have not been studied in depth. Little is known on the role in protection of crossreactive CD8+ T cell responses mediated by MHC class I, recently reported to be induced upon FMDV infection or vaccination [17]. The contribution of CTL responses to protection is suggested by the observation of protected animals showing low neutralizing antibody levels [18].

The internalization of viral particles is important for the presentation of antigenic peptides to T cells as well as to trigger innate immunity [18,19]. Cell entry of FMDV has been proven to be dependent on the usage of cellular receptors, followed by

* Corresponding author at: Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Cantoblanco 28049, Madrid, Spain. Tel.: +34 91 1964493; fax: +34 91 1964420.

E-mail address: fsobrino@cbm.uam.es (F. Sobrino).

¹ Present address: Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), 28040 Madrid, Spain.

internalization via endocytosis and its delivery to endosomal compartments [20–22]. Field FMDV isolates attach to several molecules of the integrin family as a receptor via the binding of a Arg-Gly-Asp (RGD) triplet exposed on the viral capsid [23,24]. In addition, tissue culture adapted FMDV variants can expand its receptor spectrum and are able to bind alternative receptors such as heparan sulfate glycosaminoglycans or other not well characterized molecules [25–27].

To gain information on the cell interactions of inactivated FMDV we determined the ability of BEI-inactivated viral particles to enter into cultured cells. By electron microscopy particles with similar characteristics to those of infectious virions were found in BEI-inactivated viral samples. Binding of these particles was blocked by preincubation with a FMDV-specific monoclonal antibody, and inactivated particles were internalized into cultured cells through endocytosis in an integrin-dependent pathway. Thus, BEI-inactivated particles provide a new tool to study the early steps in FMDV–host cell interaction. Possible implications for FMDV immune response following vaccine administration are also discussed.

2. Materials and methods

2.1. Cells and viruses

The origin and culture procedures for BHK-21, CHO and IBRS-2 cells have been extensively described, as well as procedures for infections and virus titration in semisolid agar medium [21,28]. C-S8c1 is a biological clone of a type C FMDV isolated from a naturally infected pig in Spain [29]. FMDV MARLS is a monoclonal antibody (MAb)-resistant mutant selected with MAb SD6 from a population of highly tissue culture passaged C-S8c1 [26]. Encephalomyocarditis virus (EMCV) [30] was also used as control for the specificity of the internalization assay.

2.2. Viral inactivation

Chemical inactivation of FMDV and EMCV with BEI was performed following the standard protocol for vaccine preparation [13]. BEI was prepared from a 0.01 M solution of 2-bromomethylamine hydrobromide (BEA) (Merck) in 0.7% NaOH. After the addition of 0.05 ml/l of β -naftol, the solution was incubated at 37 °C until a colour shift from violet to orange (indicative of the complete conversion from BEA to BEI) was observed. Then, the solution was filtered through a 0.22 μ m filter and added to the viral suspension at a final concentration of 3%. Viral suspensions were incubated for 24 h at 37 °C with gently rocking and residual BEI was hydrolyzed with 2% of 1 M Na₂SO₃. The efficacy of viral inactivation was confirmed by the absence of cytopathic effect after three blind passages in monolayers of BHK-21 cells. The amount of inactivated virus was estimated from the viral titer of the sample prior to inactivation.

2.3. Virion purification and electron microscopy

Virion purification was performed by sucrose gradient centrifugation [31]. Inactivated virus samples were centrifuged through a cushion of 20% sucrose in TNE buffer [10 mM Tris–HCl (pH 7.5), 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA] in an AH-625 rotor (Sorvall) at 25,000 rpm, 2.5 h, 4 °C. The viral pellet was resuspended in TNE and centrifuged in 7.5–30% sucrose density gradients in the same buffer at 37,000 rpm, 1 h at 4 °C in a SW40 rotor (Beckman). Relative amounts of viral protein and RNA were determined by UV-spectrophotometry using a Nanodrop equipment. A drop from the fraction corresponding to virion peak (sedimentation coefficient of 140 s) was adsorbed to the ionized face of an electron microscopy copper grid and viral particles were fixed in 2% glutaraldehyde

and negatively stained with 2% uranyl acetate [32]. Samples were observed using a Jeol JEM-1010 electron microscope operating at 80 kV and images were acquired using a digital camera Bioscan792 (Gatan).

2.4. Inhibition of viral cell binding

The ability of BEI-inactivated FMDV particles to bind cells was investigated by two different approaches. (i) Infectious virus (10^7 plaque forming units (PFU), corresponding to a MOI of 100 PFU/cell), or the equivalent amount of inactivated virus were preincubated with MAbs SD6 or irrelevant MAb I1 against vesicular stomatitis virus G protein (supernatant from hybridoma cultures diluted 1:10 in culture medium) for 1.5 h at room temperature (RT) prior to addition to cell monolayers [33]. After 25 min of incubation at 37 °C, cells were fixed and immunostained [31]. (ii) Cells were preincubated with RGD-containing peptide SARGDLAHLTTTHAR (positions 139–153 of VP1 in C-S8c1) diluted in phosphate-buffered saline (PBS) completed with Ca²⁺ and Mg²⁺ at a final peptide concentration of 1 mM, for 30 min at 37 °C. Then cells were washed and incubated with the amounts of infective or inactivated virus used in (i) diluted in complete PBS for 25 min at 37 °C [31]. Cells were finally fixed and immunostained.

2.5. Drug treatments

Inhibition of clathrin-mediated endocytosis was performed by sucrose treatment [20,21]. Cells grown on coverslips were extensively washed with culture medium and pre-treated or not for 30 min with sucrose (0.45 M). Infectious virus (10^7 PFU, corresponding to a MOI of 100 PFU/cell), or the equivalent amount of inactivated virus were incubated 25 min with the cells in the presence or in the absence of sucrose, fixed and processed for immunofluorescence. Microtubule depolymerization was performed using 40 μ m nocodazole (Sigma) [28].

2.6. Immunofluorescence microscopy

Procedures for immunofluorescence staining of FMDV particles have been described [21,31]. Samples were observed with an Axioskop (Zeiss) epifluorescence microscope coupled to a digital monochrome camera Coolsnap FX (Roper Scientific). Confocal laser scanning microscopy was performed with an Axiovert S100 TV microscope (Zeiss) coupled to a confocal Radiance 2000 system (Bio-Rad). Images were processed using ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) and Adobe Photoshop CS2 (Adobe, Inc.).

2.7. Transfections

Plasmid encoding a wt form of Rab 5 fused to green fluorescent protein (GFP) [34] was transfected using Lipofectamine Plus (Invitrogen) as described by the manufacturer.

2.8. Fluorescent labelling of BEI-inactivated virions and time-lapse fluorescence microscopy

Fractions containing the peak of inactivated virions after sucrose gradient sedimentation (Section 2.3) were pooled and dialyzed against PBS. Inactivated virions were incubated with amine reactive dye Alexa Fluor 555 succinimidyl ester (Invitrogen) following manufacturers instructions for protein labelling. Dye excess was eliminated from samples by extensive dialysis. Cells were grown on glass bottom tissue culture plates and experiments were carried out in medium without phenol red. Fluorescently labelled inactivated particles were adsorbed to cell monolayers for 1 h on ice. Non-bound particles were eliminated by washing and samples

were transferred to the microscope incubator previously warmed at 37 °C. Images (5 different planes along Z axis at intervals of 15 s for 20 min) were acquired using an inverted Axiovert200 microscope (Zeiss) coupled to a digital camera C9100-02 (Hamamatsu). Humidity, CO₂ and temperature (37 °C) were controlled using the In Vivo Cell Observer system (Zeiss). Trajectory and speed analysis of fluorescent particles were carried out automatically using Track Object tool of Metamorph 6.2r6 (Universal Imaging). After automated object tracking, it was revised and manually corrected if necessary.

3. Results

3.1. Inactivated FMDV can be internalized into cultured cells

To study how BEI affected FMDV particles, a stock of FMDV C-S8c1, produced in BHK-21 cells, was inactivated by BEI treatment and subjected to ultracentrifugation in a sucrose gradient under the standard conditions for purification of FMDV virions [31]. A single peak corresponding to protein (280 nm) and nucleic acid (260 nm) was observed by UV spectrophotometry of gradient fractions (Fig. S1A). The corresponding fractions contained spherical particles of around 30 nm in diameter, as revealed by electron microscopy (Fig. S1B). The observation that BEI inactivation preserved virion architecture prompted us to study the ability of these particles to be internalized into cultured cells, which, for the FMDV isolate C-S8c1 studied, is mediated by integrin recognition [35,36]. Inactivated FMDV was incubated with BHK-21 cells for 5 or 25 min. Cells were fixed and immunostained using MAb 5C4, which recognizes the discontinuous antigenic site D on FMDV capsid [37]. When these samples were observed by confocal microscopy after 5 min of incubation, FMDV antigen was detected mainly at cell periphery, being its distribution perinuclear after 25 min (Fig. 1A). Confirming the specificity of the assay, no fluorescence was observed either in mock-incubated cells or in cells incubated with BEI-treated EMCV, a picornavirus belonging to the cardiovirus genus (Fig. S2). Orthogonal sections of cells incubated 25 min with inactivated FMDV were performed from a series of optical sections across Z axis. In these sections, fluorescent spots were located inside the cell (Fig. 1B). Similar results were obtained for IBRS-2 cells incubated

with BEI-inactivated FMDV (Fig. S3). These results indicate that BEI-inactivated FMDV retains its ability to be internalized by host cells.

3.2. Internalization of inactivated FMDV is dependent on integrins as cellular receptors

BEI-inactivation of FMDV does not affect the antigenicity of the G-H loop on VP1 protein (antigenic site A) [38], where the RGD motif that mediates FMDV attachment to cellular integrins is located [23,24]. The implication of VP1 G-H loop for cell entry of the BEI-inactivated FMDV was tested by using neutralizing MAb SD6, which recognizes an epitope located within the G-H loop [37]. Infectious or inactivated FMDV particles were preincubated with MAb SD6 and then added to cultured cells (Fig. 2). Immunofluorescence staining revealed that preincubation with MAb SD6 inhibited adsorption of infectious as well as BEI-inactivated FMDV particles. When the viruses were preincubated with the control irrelevant MAb I1 [39] specific fluorescence was detected, confirming the specificity of the inhibition exerted by MAb SD6. The antigenic preservation of the epitope recognized by MAb SD6 in BEI-inactivated FMDV suggested that these particles might be using integrins as cellular receptor for attachment and internalization. To test this possibility, BHK-21 cells were first incubated with synthetic peptides containing the RGD motif in VP1 and then with infectious or BEI-inactivated FMDV. In these experiments, MARLS, a derivative of C-S8c1 that is internalized using cellular receptors different from integrins [25,26] was included to probe the specificity of the inhibition of RGD-dependent entry of FMDV. Fluorescence to capsid proteins, revealed with MAb 5C4, could be detected only in those cells incubated with MARLS (Fig. 3A). When these viruses were tested in CHO cells, which lack expression of the integrin receptors used by FMDV [40], fluorescence to viral antigen was detected again only in cells incubated with MARLS (Fig. 3B). Taken together, these results indicate that, as described for infectious FMDV C-S8c1, BEI-inactivated C-S8c1 uses integrins as cellular receptors for attachment and internalization into cultured cells and that this interaction is mediated by residues located within G-H loop of VP1 capsid protein.

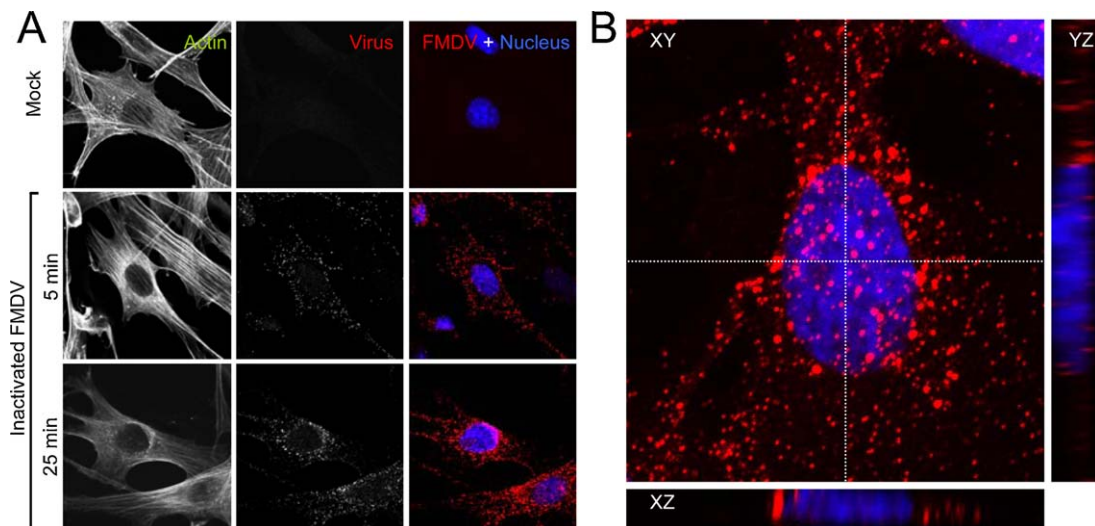


Fig. 1. BEI-inactivated FMDV antigens are internalized by cells. (A) BHK-21 cells were incubated with inactivated FMDV (10^7 PFU prior to inactivation, quantity equivalent at a MOI of 100) for 5 or 25 min at 37 °C, fixed and processed for immunofluorescence using MAb 5C4 and a secondary antibody coupled to Alexa Fluor 555. Actin staining using phalloidin coupled to Alexa Fluor 488 reveals cell shape. Cell nuclei were stained using To-Pro 3. Confocal images correspond to single optical sections at the middle plane level of the cell. (B) Maximum intensity projection of a series of planes through Z axis of cell incubated with inactivated FMDV (25 min) and processed for immunofluorescence as in (A). Dashed lines indicate the position of orthogonal sections (XZ and YZ) displayed.

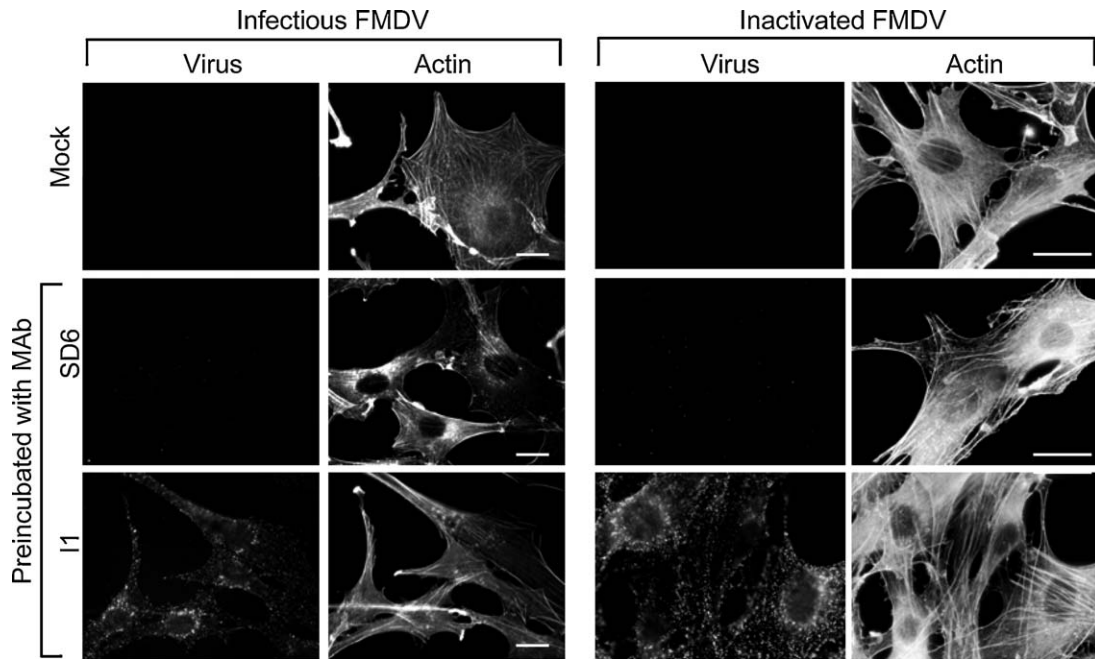


Fig. 2. Inhibition of inactivated FMDV cell binding by preincubation with neutralizing MAb SD6. Infectious or BEI-inactivated FMDV were preincubated with neutralizing MAb SD6 or the irrelevant MAb I1 as control. Samples were incubated with BHK-21 cells (as in Fig. 1, equivalent to a MOI of 100) for 25 min, fixed and processed for immunofluorescence using MAb 5C4 and a secondary antibody labelled with Alexa Fluor 555. Actin staining using phalloidin coupled to Alexa Fluor 488 reveals cell shape. Scale bars: 20 μ m.

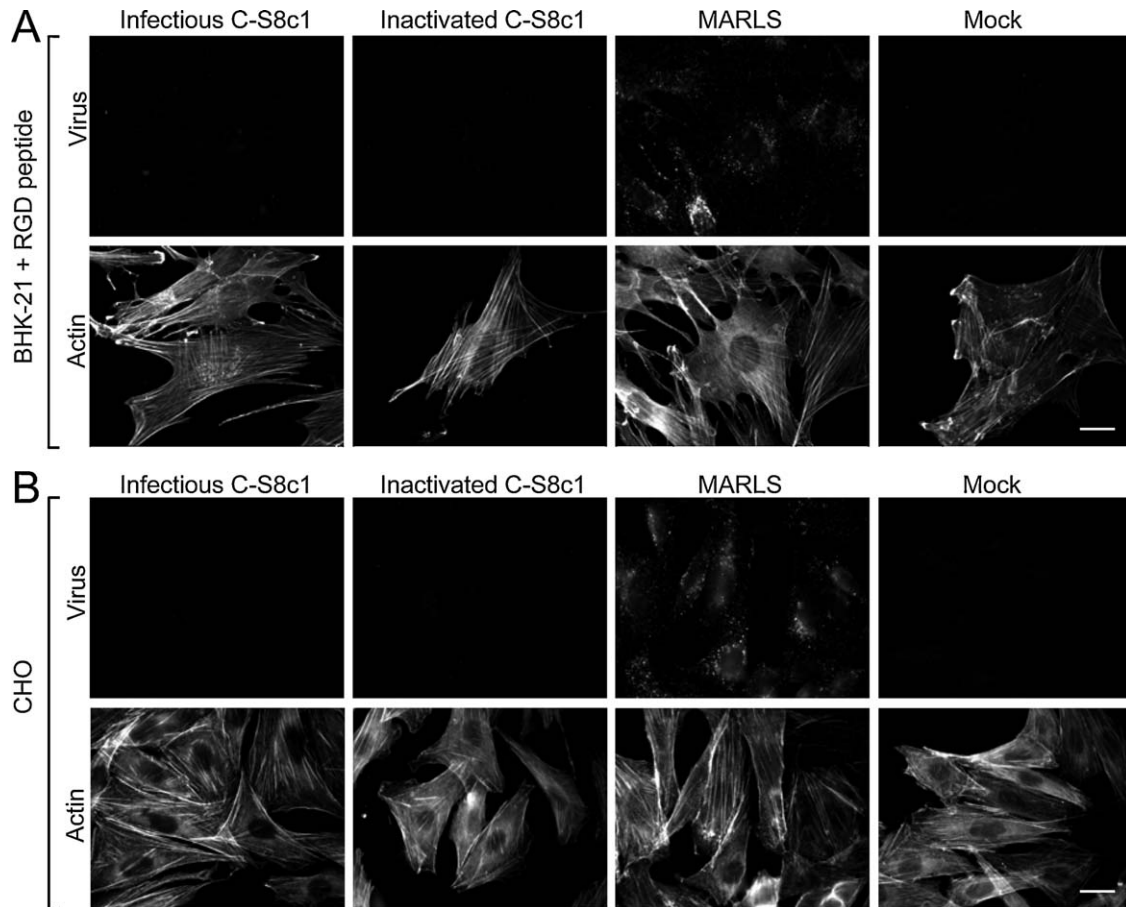


Fig. 3. Inactivated FMDV uses integrins as a receptor for cell entry. (A) Preincubation with RGD peptides inhibits inactivated FMDV cell binding. BHK-21 cells were preincubated with synthetic peptides and next incubated with infectious or inactivated viruses for 25 min (as in Fig. 1, equivalent to a MOI of 100). Cells were fixed and processed for immunofluorescence using MAb 5C4 and a secondary antibody labelled with Alexa Fluor 555. (B) Inactivated FMDV does not bind CHO cells. CHO cells were incubated with the different viruses, fixed and processed for immunofluorescence as in (A). Actin staining using phalloidin coupled to Alexa Fluor 488 reveals cell shape. Scale bars: 20 μ m.

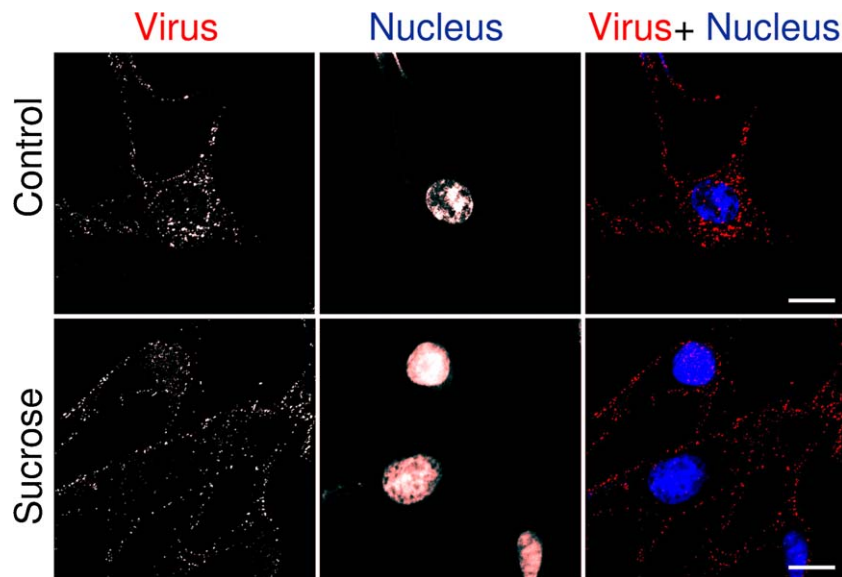


Fig. 4. Hypertonic medium inhibits internalization of inactivated FMDV. BHK-21 cells treated or not with 0.45 M sucrose were incubated with inactivated FMDV (as in Fig. 1, equivalent to a MOI of 100) for 25 min and processed for immunofluorescence using MAb 5C4 and a secondary antibody labelled with Alexa Fluor 555. Cell nuclei were stained with To-Pro 3. Confocal images correspond to a single optical section at the middle plane level of the cell. Scale bars: 20 μm .

3.3. Internalization of inactivated FMDV is inhibited by hypertonic medium

Hypertonic medium decreases the number of clathrin coated pits at the plasma membrane and reduces entry and infection of FMDV variants that use integrins as cellular receptors [20,21]. Cells treated or not with sucrose were incubated with BEI-inactivated FMDV and the location of viral antigens was revealed by immunofluorescence and confocal microscopy (Fig. 4). Control cells displayed an immunostaining pattern in which viral fluorescence mainly accumulated at the perinuclear region, as reported for infectious C-S8c1 [21]. In contrast, viral fluorescence was located at the cellular periphery in sucrose-treated cells, indicating that incubation with hypertonic medium inhibits internalization of BEI-inactivated FMDV.

3.4. Inactivated FMDV particles are sorted to early endosomes

It has been reported that FMDV particles are sorted to endosomal compartments after internalization [20,22,31]. To analyze whether BEI-inactivated FMDV particles followed this route, BHK-21 cells were transfected with a plasmid encoding the GFP-fused GTPase Rab5, a marker of early endosomes implicated in FMDV

infection [41]. Transfected cells were incubated with inactivated FMDV and examined by confocal microscopy. Colocalization of inactivated FMDV with Rab5 was observed (Fig. 5), showing that inactivated particles of FMDV were directed to early endosomes.

3.5. Analysis of the interaction of inactivated FMDV with cultured cells by live fluorescence microscopy

A number of reports have shown the ability to track single virus particles by fluorescence microscopy after labelling with amino reactive dyes [42–44]. Following this approach, purified BEI-inactivated virions were labelled using an amine reactive dye (Alexa Fluor 555 succinimidyl ester), and their interaction with live cultured cells was analyzed by time-lapse fluorescence microscopy. After adsorption of fluorescent FMDV particles on ice, samples were transferred to the microscope chamber and incubated at 37 °C. A representative time-lapse experiment is shown in Movie S1. Remarkably, two distinct populations could be distinguished among fluorescent viral particles: one nearly static and the other displaying long and rapid displacements. Members of each of these populations are indicated in Fig. 6A. Particle speed along time was measured applying a single particle tracking algorithm, and maximum speed distribution was plotted as a histogram (Fig. 6B)

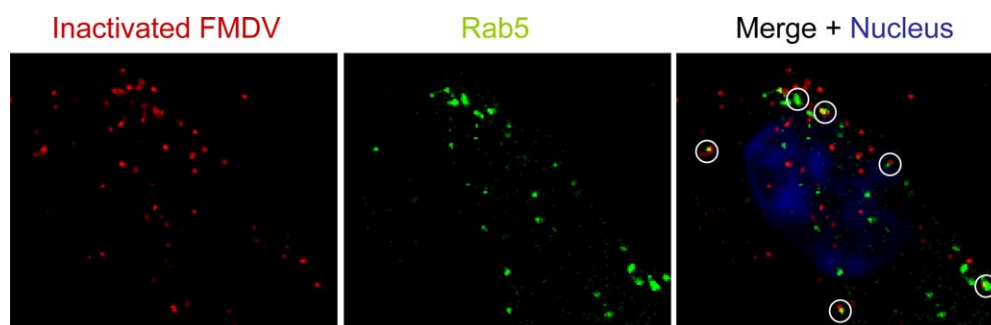


Fig. 5. Inactivated FMDV particles are sorted to early endosomes. BHK-21 cells transfected 24 h with a plasmid encoding Rab5 fused to GFP (green) were incubated with inactivated FMDV (as in Fig. 1, equivalent to MOI of 100) for 10 min, fixed and processed for immunofluorescence and confocal microscopy using MAb 5C4 and a secondary antibody labelled with Alexa Fluor 555 (red). Cell nucleus was stained with To-Pro 3 (blue). (For interpretation of the references to color in this figure caption, the reader is referred to the web version of the article.)

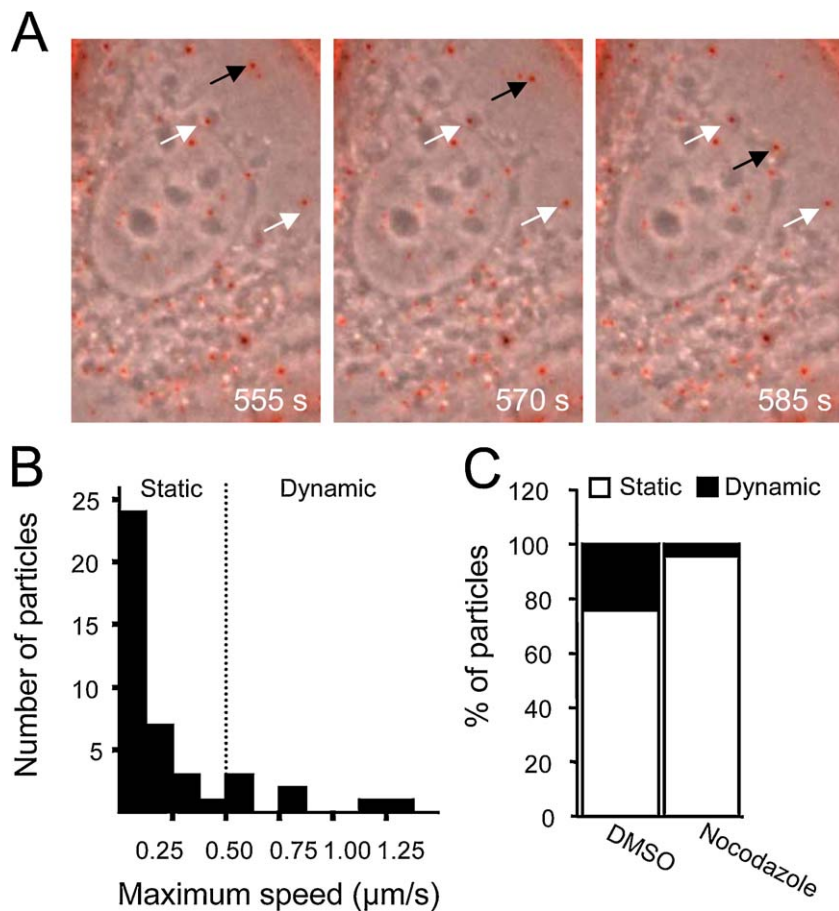


Fig. 6. Time-lapse microscopy analysis of labelled inactivated FMDV. (A) Selected time-lapse microscopy images from a cell incubated with fluorescently labelled BEI-inactivated FMDV (red) (see Section 2 for details). Black arrows indicate highly mobile spots while white arrows point to static spots. (B) Histogram summarizing the distribution of maximum speeds of the 42 fluorescent particles analyzed by single particle tracking. (C) Reduction on the proportion of dynamic spots upon nocodazole treatment. (For interpretation of the references to color in this figure caption, the reader is referred to the web version of the article.)

and individualized plots of the speed of each of the particles analyzed along time are shown in Fig. S4. Particles showing a speed of $0.5 \mu\text{m/s}$ or lower were considered as static while particles with higher speeds were considered as dynamic [45]. Based on this classification, about 80% of virus particles fell within static group while the remaining particles could be considered as dynamic. High speed movements of viral particles after uptake, could rely on the internalization on endosomes that are subjected to transport mediated by microtubules [46,47]. To test this hypothesis, live fluorescence microscopy experiments were carried out in the presence or in the absence of the microtubule depolymerizing agent nocodazole (Fig. 6C). These experiments showed a statistically significant reduction in the proportion of dynamic particles (ANOVA P -value 0.034), suggesting the involvement of microtubules in the rapid movements of these particles. These results illustrate the potential for the study of virus cell interaction of the use of BEI-inactivated FMDV in combination with fluorescent labels and time-lapse microscopy.

4. Discussion

Vaccines based on BEI inactivation play a key role in FMD control and BEI has replaced other less efficient inactivants, such as formaldehyde, in vaccine production [14,48]. By means of sucrose sedimentation and electron microscopy analyses, viral particles were observed in BEI-inactivated FMDV samples, indicating that BEI preserved virion architecture, which is consistent with the antigenic preservation of BEI-treated FMDVs [38,49]. Inactivated

particles were efficiently internalized by cultured cells, maintaining the general features described for the integrin-dependent internalization of the infectious C-S8c1 FMDV used in these experiments [21,28]. Thus, binding and internalization of inactivated particles was shown to be dependent on residues encompassed in the VP1 G-H loop of FMDV capsid and on the use of cellular integrins as viral receptors. Internalization was also inhibited by hypertonic medium, suggesting that it was dependent on clathrin-mediated endocytosis, and inactivated viral particles were directed to early endosomes. These results are consistent with those previously reported for infectious FMDV [20,21,28,31,41], confirming that BEI treatment renders inactivated virus particles that reproduce the attachment and internalization of infectious FMDV.

The results obtained enabled us to perform time-lapse fluorescence microscopy studies on the internalization of FMDV using BEI-inactivated particles as a model for virus entry. Live fluorescence microscopy showed two distinct behaviours within viral particles. One major population (about 80%) displayed slow movements in contrast to a minority of particles (about 20%) that underwent rapid microtubule-mediated movements, since proportion of the latter population could be reduced by nocodazole treatment. These two different populations of particles undergoing internalization have been reported for other viral models such as dengue virus as well as for cellular ligands [45,46]. The observation that the majority of FMDV particles did not display microtubule-mediated motility was consistent with the lack of effect of nocodazole treatment on FMDV infection [20,28]. Ligands destined for degradation are preferentially targeted to the

small population of dynamic early endosomes (which rapidly undergoes microtubule-mediated maturation towards late endosomes/lysosomes), whereas recycling ligands as transferrin are non-selectively targeted to all early endosomes and being enriched in the larger population of static, slowly maturing early endosomes [46]. As the major proportion of internalized FMDV particles was sorted to the static endosome population, this should imply that only a small fraction of inactivated FMDV particles easily reaches late endosomal compartments. Indeed, colocalization of infectious FMDV particles with the recycling ligand transferrin, but not with lysosomes has been reported [20,22]. In this way, the ability of BEI-inactivated FMDV to gain entry into cultured cells through a pathway similar to that of infectious virions, provides an interesting tool to study FMDV–cell interactions in the absence of translation and replication of viral RNA.

Studies performed with infectious FMDV have shown that viral particles can be internalized into diverse types of antigen presenting cells using RGD-independent receptors, such as heparan sulfate or Fc receptors, the latter after viral binding with specific antibodies [50–52]. In addition, and regarding the analysis of inactivated FMDV–cell interactions, the limited evidence available suggests that inactivated FMDV can be also internalized by dendritic cells in a receptor specific pathway [51,53]. Our results indicate that viral particles included within BEI-inactivated suspensions used for vaccine formulation, could be also internalized (via an RGD-dependent pathway) by cells that express integrins susceptible to be used as FMDV receptors. This scenario opens new possibilities for understanding the modulation of the immune response elicited by conventional FMDV vaccines. Thus, internalization of inactivated virus by susceptible cells could diminish the amount of viral immunogen able to interact with immune cells and establish a protective immune response. On the other hand, internalization of inactivated virus could trigger immune innate response mechanisms as those based on viral sensors located along the endocytic pathway [54]. This potential innate response should localize at specific tissues susceptible for FMDV infection, thus generating an antiviral state that could help to prevent FMDV infection and spread, since innate immune response may play an important role in FMDV protection [55,56]. In addition, internalization of BEI-inactivated particles to early endosomes could allow antigen processing and epitope presentation by pathways other than that mediated by the MHC class II [57]. Such possibility could contribute to explain previous reports on the induction of CD8+ T cell responses in pigs and cattle vaccinated with BEI-inactivated vaccines [58–60]. Along this line, the small proportion of inactivated viral particles sorted to the dynamic early endosome population revealed by time lapse microscopy (about 20%) could also be relevant for immune response they elicit, as these endosomes are supposed to rapidly mature to late endosomes/lysosomes and could modulate antigen presentation either by promoting antigen processing or by favouring antigen degradation.

The findings here presented indicate that BEI-inactivated FMDV particles used for vaccine formulation can be internalized in an integrin-dependent pathway to early endosomal compartments. Modulation of the interaction of these particles with different host cells may open new possibilities for vaccine optimization. On the other hand, BEI-inactivated particles provide an interesting tool to study the early steps of FMDV–cell interactions enabling separation between FMDV internalization and productive infection.

Acknowledgements

We thank E. Domingo for FMDV MARLS and MAb SD6, E. Brocchi for MAb 5C4, M. Sáiz for CHO cell line, J. A. Esteban for plasmid encoding Rab5, and M. T. Rejas for her assistance with electron

microscopy. This work was supported by Spanish grants BIO2008-0447-C03-01, CSD2006-0007 and by an institutional grant from Fundación Ramón Areces.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.vaccine.2011.10.031.

References

- [1] Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev* 2004;17(April (2)):465–93.
- [2] Saiz M, Nunez JI, Jimenez-Clavero MA, Baranowski E, Sobrino F. Foot-and-mouth disease virus: biology and prospects for disease control. *Microbes Infect/Institut Pasteur* 2002;4(September (11)):1183–92.
- [3] Cottam EM, Wadsworth J, Shaw AE, Rowlands RJ, Goatley L, Maan S, et al. Transmission pathways of foot-and-mouth disease virus in the United Kingdom in 2007. *PLoS Pathog* 2008;4(April (4)):e1000050.
- [4] Plumiers FH, Akkerman AM, van der Wal P, Dekker A, Bianchi A. Lessons from the foot and mouth disease outbreak in The Netherlands in 2001. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 2002;21(December (3)):711–21.
- [5] Sobrino F, Domingo E. Foot-and-mouth disease in Europe, FMD is economically the most important disease of farm animals. Its re-emergence in Europe is likely to have consequences that go beyond severe alterations of livestock production and trade. *EMBO Rep* 2001;2(June (6)):459–61.
- [6] Thompson D, Muriel P, Russell D, Osborne P, Bromley A, Rowland M, et al. Economic costs of the foot and mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 2002;21(December (3)):675–87.
- [7] Chinsangaram J, Mason PW, Grubman MJ. Protection of swine by live and inactivated vaccines prepared from a leader proteinase-deficient serotype A12 foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 1998;16(October (16)):1516–22.
- [8] Mason PW, Piccone ME, McKenna TS, Chinsangaram J, Grubman MJ. Evaluation of a live-attenuated foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology* 1997;227(January (1)):96–102.
- [9] Niborski V, Li Y, Brennan F, Lane M, Torche AM, Remond M, et al. Efficacy of particle-based DNA delivery for vaccination of sheep against FMDV. *Vaccine* 2006;24(November (49–50)):7204–13.
- [10] Wong HT, Cheng SC, Chan EW, Sheng ZT, Yan WY, Zheng ZX, et al. Plasmids encoding foot-and-mouth disease virus VP1 epitopes elicited immune responses in mice and swine and protected swine against viral infection. *Virology* 2000;278(December (1)):27–35.
- [11] Cubillos C, de la Torre BG, Jakab A, Clementi G, Borrás E, Barcena J, et al. Enhanced mucosal immunoglobulin A response and solid protection against foot-and-mouth disease virus challenge induced by a novel dendrimeric peptide. *J Virol* 2008;82(July (14)):7223–30.
- [12] Taboga O, Tami C, Carrillo E, Nuñez JI, Rodríguez A, Sáiz JC, et al. A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. *J Virol* 1997;71(April (4)):2606–14.
- [13] Bahnemann HG. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch Virol* 1975;47(1):47–56.
- [14] Barteling SJ. Modern inactivated foot-and-mouth disease (FMD) vaccines: historical background and key elements in production and use. In: Sobrino F, Domingo E, editors. *Foot and mouth disease: current perspectives*. Norfolk: Horizon Bioscience; 2004.
- [15] Brown F. Inactivation of viruses by aziridines. *Vaccine* 2001;20(November (3–4)):322–7.
- [16] Barnett PV, Statham RJ, Vosloo W, Haydon DT. Foot-and-mouth disease vaccine potency testing: determination and statistical validation of a model using a serological approach. *Vaccine* 2003;21(July (23)):3240–8.
- [17] Guzman E, Taylor G, Charleston B, Ellis SA. Induction of a cross-reactive CD8(+) T cell response following foot-and-mouth disease virus vaccination. *J Virol* 2010;84(December (23)):12375–84.
- [18] McCullough KC, Sobrino F. Immunology of foot-and-mouth disease. In: Sobrino F, Domingo E, editors. *Foot and mouth disease: current perspectives*. Norfolk: Horizon Bioscience; 2004.
- [19] Isaacson MK, Juckem LK, Compton T. Virus entry and innate immune activation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;325:85–100.
- [20] Berryman S, Clark S, Monaghan P, Jackson T. Early events in integrin alphavbeta6-mediated cell entry of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 2005;79(July (13)):8519–34.
- [21] Martín-Acebes MA, González-Magaldi M, Sandvig K, Sobrino F, Armas-Portela R. Productive entry of type C foot-and-mouth disease virus into susceptible cultured cells requires clathrin and is dependent on the presence of plasma membrane cholesterol. *Virology* 2007;369(December (1)):105–18.
- [22] O'Donnell V, LaRocco M, Duque H, Baxt B. Analysis of foot-and-mouth disease virus internalization events in cultured cells. *J Virol* 2005;79(July (13)):8506–18.

- [23] Baxt B, Becker Y. The effect of peptides containing the arginine-glycine-aspartic acid sequence on the adsorption of foot-and-mouth disease virus to tissue culture cells. *Virus Genes* 1990;4(June (1)):73–83.
- [24] Burman A, Clark S, Abrescia NG, Fry EE, Stuart DI, Jackson T. Specificity of the VP1 GH loop of foot-and-mouth disease virus for alphav integrins. *J Virol* 2006;80(October (19)):9798–810.
- [25] Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Sevilla N, Andreu D, Beck E, Domingo E. Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J Virol* 2000;74(February (4)):1641–7.
- [26] Baranowski E, Sevilla N, Verdaguer N, Ruiz-Jarabo CM, Beck E, Domingo E. Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* 1998;72(August (8)):6362–72.
- [27] Sá-Carvalho D, Rieder E, Baxt B, Rodarte R, Tanuri A, Mason PW. Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J Virol* 1997;71(July (7)):5115–23.
- [28] Martín-Acebes MA, González-Magaldi M, Vázquez-Calvo A, Armas-Portela R, Sobrino F. Internalization of swine vesicular disease virus into cultured cells: a comparative study with foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 2009;83(May (9)):4216–26.
- [29] Sobrino F, Dávila M, Ortín J, Domingo E. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* 1983;128(July (2)):310–8.
- [30] Rosas MF, Vieira YA, Postigo R, Martín-Acebes MA, Armas-Portela R, Martínez-Salas E, et al. Susceptibility to viral infection is enhanced by stable expression of 3A or 3AB proteins from foot-and-mouth disease virus. *Virology* 2008;380(October (1)):34–45.
- [31] Martín-Acebes MA, Rincón V, Armas-Portela R, Mateu MG, Sobrino F. A single amino acid substitution in the capsid of foot-and-mouth disease virus can increase acid lability and confer resistance to acid-dependent uncoating inhibition. *J Virol* 2010;84(March (6)):2902–12.
- [32] García-Arriaza J, Manrubia SC, Toja M, Domingo E, Escarmís C. Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation. *J Virol* 2004;78(November (21)):11678–85.
- [33] Martín-Acebes MA, Herrera M, Armas-Portela R, Domingo E, Sobrino F. Cell density-dependent expression of viral antigens during persistence of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* 2010;403(July (1)):47–55.
- [34] Brown TC, Tran IC, Backos DS, Esteban JA. NMDA receptor-dependent activation of the small GTPase Rab5 drives the removal of synaptic AMPA receptors during hippocampal LTD. *Neuron* 2005;45(January (1)):81–94.
- [35] Mateu MG, Valero ML, Andreu D, Domingo E. Systematic replacement of amino acid residues within an Arg-Gly-Asp-containing loop of foot-and-mouth disease virus and effect on cell recognition. *J Biol Chem* 1996;271(May (22)):12814–9.
- [36] Nuñez JI, Molina N, Baranowski E, Domingo E, Clark S, Burman A, et al. Guinea pig-adapted foot-and-mouth disease virus with altered receptor recognition can productively infect a natural host. *J Virol* 2007;81(August (16)):8497–506.
- [37] Lea S, Hernandez J, Blakemore W, Brocchi E, Curry S, Domingo E, et al. The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* 1994;2(February (2)):123–39.
- [38] Patil PK, Suryanarayana V, Bist P, Bayry J, Natarajan C. Integrity of GH-loop of foot-and-mouth disease virus during virus inactivation: detection by epitope specific antibodies. *Vaccine* 2002;20(January (7–8)):1163–8.
- [39] Lefrançois L, Lyles DS. The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus. II. Monoclonal antibodies of non-neutralizing and cross-reactive epitopes of Indiana and New Jersey serotypes. *Virology* 1982;121(August (1)):168–74.
- [40] Gutierrez-Rivas M, Pulido MR, Baranowski E, Sobrino F, Sáiz M. Tolerance to mutations in the foot-and-mouth disease virus integrin-binding RGD region is different in cultured cells and in vivo and depends on the capsid sequence context. *J Gen Virol* 2008;89(October (Pt 10)):2531–9.
- [41] Johns HL, Berryman S, Monaghan P, Belsham GJ, Jackson T. A dominant-negative mutant of rab5 inhibits infection of cells by foot-and-mouth disease virus: implications for virus entry. *J Virol* 2009;83(June (12)):6247–56.
- [42] Brandenburg B, Lee LY, Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X, Hogle JM. Imaging Poliovirus Entry in Live Cells. *PLoS Biol* 2007;5(July (7)):e183.
- [43] Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* 2001;3(May (5)):473–83.
- [44] Pietiäinen V, Marjomäki V, Upla P, Pelkmans L, Helenius A, Hyytiä T. Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events. *Mol Biol Cell* 2004;15(November (11)):4911–25.
- [45] van der Schaar HM, Rust MJ, Waarts BL, van der Ende-Metselaar H, Kuhn RJ, Wilschut J, et al. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *J Virol* 2007;81(November (21)):12019–28.
- [46] Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X. Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell* 2006;124(March (5)):997–1009.
- [47] Vonderheit A, Helenius A. Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS Biol* 2005;3(July (7)):e233.
- [48] Doel TR. FMD vaccines. *Virus Res* 2003;91(January (1)):81–99.
- [49] Aarthi D, Ananda Rao K, Robinson R, Srinivasan VA. Validation of binary ethyleneimine (BEI) used as an inactivant for foot and mouth disease tissue culture vaccine. *Biologicals* 2004;32(September (3)):153–6.
- [50] Baxt B, Mason PW. Foot-and-mouth disease virus undergoes restricted replication in macrophage cell cultures following Fc receptor-mediated adsorption. *Virology* 1995;207(March (2)):503–9.
- [51] Harwood LJ, Gerber H, Sobrino F, Summerfield A, McCullough KC. Dendritic cell internalization of foot-and-mouth disease virus: influence of heparan sulfate binding on virus uptake and induction of the immune response. *J Virol* 2008;82(July (13)):6379–94.
- [52] Robinson L, Windsor M, McLaughlin K, Hope J, Jackson T, Charleston B. Foot-and-mouth disease virus exhibits an altered tropism in the presence of specific immunoglobulins, enabling productive infection and killing of dendritic cells. *J Virol* 2011;85(March (5)):2212–23.
- [53] Jin H, Xiao C, Zhao G, Du X, Yu Y, Kang Y, et al. Induction of immature dendritic cell apoptosis by foot and mouth disease virus is an integrin receptor mediated event before viral infection. *J Cell Biochem* 2007;102(November (4)):980–91.
- [54] Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1143(November):1–20.
- [55] Summerfield A, Guzylack-Piriou L, Harwood L, McCullough KC. Innate immune responses against foot-and-mouth disease virus: current understanding and future directions. *Vet Immunol Immunopathol* 2009;128(March (1–3)):205–10.
- [56] Grubman MJ, Moraes MP, Diaz-San Segundo F, Pena L, de los Santos T. Evading the host immune response: how foot-and-mouth disease virus has become an effective pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;53(June (1)):8–17.
- [57] Burgdorf S, Kurts C. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 2008;20(February (1)):89–95.
- [58] Saiz JC, Rodriguez A, Gonzalez M, Alonso F, Sobrino F. Heterotypic lymphoproliferative response in pigs vaccinated with foot-and-mouth disease virus. Involvement of isolated capsid proteins. *J Gen Virol* 1992;73(October (Pt 10)):2601–7.
- [59] Garcia-Valcarcel M, Doel T, Collen T, Ryan M, Parkhouse RM. Recognition of foot-and-mouth disease virus and its capsid protein VP1 by bovine peripheral T lymphocytes. *J Gen Virol* 1996;77(April (Pt 4)):727–35.
- [60] Guzman E, Taylor G, Charleston B, Skinner MA, Ellis SA. An MHC-restricted CD8+ T-cell response is induced in cattle by foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection and also following vaccination with inactivated FMDV. *J Gen Virol* 2008;89(March (Pt 3)):667–75.