



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**CONTRIBUCIONES AL ESTUDIO DE LA
FUNCIONALIDAD DE PROTEÍNAS NO
ESTRUCTURALES DEL VIRUS DE LA FIEBRE
AFTOSA**

TESIS DOCTORAL

Yuri Allende Vieira Prado
Madrid, 2015

Memoria presentada por el Licenciado en bioquímica Yuri Allende Vieira Prado para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, Febrero de 2015

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el “Centro de Biología Molecular Severo Ochoa”, bajo la co-dirección del Dr. Francisco Sobrino Castelló y de la Dra. María Flora Rosas Kuz. Se ha contado con la financiación de una beca FPU otorgada por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

A mi Familia

Agradecimientos

La realización de esta Tesis Doctoral no habría sido posible sin la ayuda de numerosas personas tanto dentro como fuera del laboratorio, esperando no dejarme a nadie y disculpándome por si ello ocurriese, me gustaría agradecer a:

A mi director y co-directora de Tesis, los doctores Francisco Sobrino (Pachi) y María Flora Rosas (Mari). A Pachi por darme la oportunidad de trabajar con él y su grupo y a Mari por su dirección y sus consejos.

A mis compañeros de laboratorio. Los que ya se doctoraron: Maite, Raúl, Miguel Ángel, Miguel, Mónica González, Ángela; y quien está en proceso Flavia; Así como los Doctores Rosario Armas (Charo), Antonio Talavera, a Margarita Saiz (Marga), Belén Borrego y Mónica Gutiérrez. Por vuestra compañía, ayuda, consejos, comentarios y enseñanzas.

A los Doctores Encarnación Martínez-Salas y Paulino Gómez Puertas por su colaboración en el desarrollo de del replicón de VFA y del modelado del dímero de la proteína 3A, respectivamente.

A los miembros de los laboratorios 121, 205 y los de VPPA por su compañía y ayuda.

Al resto del personal del CBM, especialmente a los miembros Seguridad Biológica (M.Cruz, Gema, Jose) y de Cocinas de P2-virus (M^a Ángeles, Alfonso, Anuncia y Mercedes).

A mi madre y mis abuelos maternos por apoyarme, soportarme y darme todo lo que necesito.

A Claudia, Raquel, Eduardo, Ernesto, Aitor, Oliver, María Luisa, Ricci, Rosana, Juan Alberto, Javi, Ana y Adriana, por su amistad e innumerables horas de diversión.

Y finalmente, a mis compañeros del Clan Ignis: Aerdire, Apöcalypsis, Elowind, Fingkimon, Hildor, Kleinbaum, Kwashiorkor, Moxy, Toni, Agrom, Asturian, Elrohir, Guete, Kalir, Klom, Morris, Nalea, Nocty, Sidreru, Sokey, Wae, Bardessa, Drytu, Escaflown, Facee, Mamuchiman, Mindel, Niusa, Purifikador, Rizzo, Vaicho, Warelement, Zapso, Zellgadis, Aggie, Bannor, Bethor, Delavilah, Fisterran, Iassume, Kednok, Krasso, Kyler, Marie, Papuchiman, Percivall, Quiroga, Rhavker, Sanxez, Txiorus, Atheo, Avalanch, Cjay, Hitsuko, Keka, Laxi, Maelways, Ñufistófeles, Pikarona, Romuh, Agostino, Alev, Archangel, Caotica, Corduroy, Daputnikmek, Derevrian, Draalion, Hacozy, Hitzaille, Kheys, Mishy, Nightcrawler, Picarel, Soulcrow, Bobmarley, Matoycuro, Mx, Osiris, Senda, Tmetoeltotem, Baan, Chispa, Doro, Esneik, Gaborn, Maricel, Oyuky, Parrynoico, Reysergio, Shinrae, Varela, Archeón, Artza, Bladessong, Corneliosila, Crassus, Eredhel, Híbrido, Hosmar, Prohibida, Ragnorik, Sasiro, Steelstorm, Vicmara, RazoR, Miriel... por ayudarme a liberar estrés mediante la eliminación de numerosos monstruos: Antiguos dioses, elementales, constructos, gigantes,

humanoides de diversa índole (orcos, trolls, múrlocs...), no-muertos, abominaciones, dragones, fénixes y demás fauna arcana.

Índice

Abreviaturas

Abreviaturas	1
--------------	---

Resumen en inglés

Resumen en inglés	7
-------------------	---

Introducción

I.1 La fiebre aftosa	11
I.2 El virus de la fiebre aftosa	12
I.2.1 Organización genómica del VFA	12
I.2.2 Ciclo Infeccioso	13
I.2.2.1 Internalización celular	14
I.2.2.2 Traducción y procesamiento proteolítico de la poliproteína viral	14
I.2.2.3 Replicación del ARN	16
I.2.2.4 Encapsidación	17
I.3 Proteínas del VFA	18
I.3.1 Proteínas derivadas del precursor P3 del VFA y de otros picornavirus	19
I.3.1.1 La proteína 3A	22
I.3.1.1.1 La proteína 3A del VFA	23
I.3.1.2 Proteína 3C de picornavirus y de VFA	26
I.4 Replicones: Virus con el ciclo infeccioso truncado	28

Objetivos

Objetivos	33
-----------	----

Material y Métodos

M.1 Líneas celulares y su manejo	37
M.1.1 Cuantificación de la supervivencia celular	37
M.2 Virus y su amplificación en cultivos celulares	37
M.2.1 Transfección de ARN de VFA y estimación de su capacidad para producir virus infecciosos	38
M.3 Clones infecciosos	38
M.4 Cuantificación de la producción de partículas virales	39
M.4.1 Titulación	39
M.4.2 Infecciosidad específica de los ARNs	40
M.5 Estimación de la concentración de ácidos nucleicos	40
M.6 Producción y aislamiento de ADN plasmídico	40
M.7 Aislamiento de ARN	40
M.8 Amplificación de ácidos nucleicos	41
M.8.1 RT-PCR	41
M.8.2 PCR cuantitativa (QPCR)	41
M.8.3 Cebadores	42

M.9 Aislamiento de fragmentos de ADN	42
M.10 Clonajes moleculares	43
M.10.1 Mutaciones puntuales	43
M.10.1.1 Mutaciones introducidas por <i>overlap extension</i>	43
M.10.1.2 Mutaciones introducidas mediante sustitución	44
M.10.2 Construcción de plásmidos derivados de pRSV portando proteínas de la región P3 del VFA	45
M.11 Secuenciación	46
M.12 Transcripción in vitro	47
M.13 Transfección de cultivos celulares	47
M.13.1 Transfección con ADN	47
M.13.2 Transfección con ARN	48
M.14 Traducción in vitro	48
M.15 Preparación de extractos celulares	48
M.15.1 Células eucariotas	48
M.15.2 Bacterias	49
M.16 Fraccionamiento celular	49
M.17 Análisis electroforético de las proteínas	49
M.18 Inmunoensayos	50
M.18.1 Western-Blot (<i>wb</i>)	50
M.18.2 Inmunofluorescencia	51
M.19 Microscopía	51
M.19.1 Microscopía de fluorescencia convencional	51
M.19.2 Microscopía de fluorescencia confocal	52
M.20 Estimación de radioactividad incorporada	52
M.20.1 Autorradiografía de SDS-PAGE	52
M.21 Tratamientos y mediciones enzimáticas	52
M.21.1 Medición del nivel de expresión del gen CAT	52
M.22 Ensayo de letalidad en ratón lactante	53
M.23 Construcción de replicones del VFA de serotipo C	53
M.23.1 Replicones RepMTS/L y RepMTC/L	53
M.23.2 Replicones RepMTS/L-3D-D388A y RepMTC/L-3D-D388A	55
M.24 Alineamiento de secuencias	55
M.25 Métodos estadísticos y tratamiento de datos	55

Resultados

R.1 Estudio de mutantes en la interfaz de dimerización de la proteína 3A	59
R.1.1 Clones infecciosos con mutaciones en las regiones de α -hélice implicadas en la interfaz de dimerización de 3A	59
R.1.2 Infectividad del ARN de mutantes en M29 e I42 de 3A en células BHK-21	62
R.1.2.1 Citopatogenicidad y producción viral de los ARNs conteniendo mutaciones en la interfaz de dimerización de 3A	62
R.1.2.2 Infectividad específica del ARN	66
R.1.3 Replicación del ARN de mutantes en la interfaz de dimerización de 3A	67
R.1.4 Expresión de proteínas virales de los mutantes en los residuos M29 e I42 de 3A	69
R.1.4.1 Análisis mediante western-blot	69
R.1.4.2 Análisis por inmunofluorescencia	70

R.1.5 Estudio de la expresión transitoria de la proteína 3A con sustituciones en M29 e I42	71
R.1.5.1 Análisis por inmunofluorescencia	71
R.1.5.2 Análisis mediante western-blot	72
R.2. Análisis funcional de la relevancia del procesamiento de la proteína 3A	74
R.2.1 Construcción de un clon infeccioso para la obtención de VFA con la mutación 3A-∇G	74
R.2.2 Traducción <i>in vitro</i> de la poliproteína viral codificada por el mutante 3A-∇G	75
R.2.3 Infectividad del ARN de VFA con la mutación 3A-∇G en células BHK-21	76
R.2.3.1 Citopatogenicidad del ARN 3A-∇G	76
R.2.3.2 Cuantificación de la producción viral del mutante 3A-∇G	77
R.2.3.3 Infectividad específica del ARN del mutante 3A-∇G	78
R.2.3.4 Análisis de la producción de ARN del mutante 3A-∇G	79
R.2.3.5 Expresión de proteínas virales del mutante 3A-∇G en cultivos celulares	80
R.2.3.5.1 Análisis mediante <i>western-blot</i>	80
R.2.3.5.2 Análisis por inmunofluorescencia	81
R.2.4 Cinética de crecimiento del virus mutante 3A-∇G	82
R.2.5 Patogenicidad de los ARNs del mutante pMT28-3A-∇G en ratón lactante	84
R.3 Expresión transitoria de los precursores 3ABC y P3	86
R.3.1 Aparición de mutaciones espontáneas en 3C de 3ABC y P3	86
R.3.2 Toxicidad de los mutantes espontáneos en 3C de 3ABC y P3 en células BHK-21	89
R.3.3 Localización subcelular de los mutantes espontáneos en 3C de 3ABC y P3	90
R.3.3.1 Detección por inmunofluorescencia de la expresión y distribución celular de las proteínas 3ABC y P3 mutadas en 3C	90
R.3.3.2 Distribución de las proteínas 3ABC y P3 en ensayos de fraccionamiento celular	92
R.3.4 Efecto de las mutaciones seleccionadas en 3C en la infectividad del VFA	95
R.3.4.1 Clones infecciosos pMT28 con 3C mutadas	95
R.3.4.2 Infectividad en cultivos celulares del ARN con las mutaciones L151F, S182F y H181Y en 3C	95
R.4 Replicones de VFA	98
R.4.1 Caracterización del replicón de VFA de serotipo O: pT7Rep	98
R.4.2 Construcción de replicones de VFA de serotipo C	101
R.4.3 caracterización de replicones de VFA de serotipo C	102

Discusión

D.1 Estudio de mutantes en la interfaz de dimerización de la proteína 3A	107
D.2 Análisis funcional de la relevancia del procesamiento de la proteína 3A	110
D.3 Expresión transitoria de los precursores 3ABC y P3	113
D.4 Replicones de VFA	117

Conclusiones

Conclusiones	123
---------------------	------------

Bibliografía

Bibliografía 129

Anexo

Anexo 145

Abreviaturas

Abreviaturas

ACBD3	Proteína con dominio de unión a acil-Coenzima A 3(<i>Acyl-Coenzyme A binding domain containing 3</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Amc	Anticuerpo monoclonal
ARN	Ácido ribonucleico
ARN+	ARN de polaridad positiva
ARN-	ARN de polaridad negativa
ARN _v	ARN viral (ARN+/ARN-)
ATCC	Colección americana de cultivos tipo (<i>American Type Culture Collection</i>)
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
BHK-21	Células de riñón de hamster (<i>Baby Hamster Kidney</i>)
ADN _c	ADN copia
CBMSO	Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”
c.p.m.	Cuentas por millón
<i>Cre</i>	Elemento de replicación en <i>cis</i> (<i>Cis replication element</i>)
C-ter	Carboxilo terminal
CV	Coxsackievirus
DEAE	Dietilaminoetil
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	2'-desoxinucleósido-5'-trifosfato
DAPI	4', 6-diamino-2-fenilindol
DTT	Ditiotreitol
ECP	Efecto citopático
EDTA	Etilen-diamino-tetraacetato
FA	Fiebre aftosa
GBF1	Factor de intercambio de nucleótidos de guanosina resistente a brefeldina A específico de Golgi de tipo 1 (<i>Golgi-specific Brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange Factor 1</i>)
GEF	Factor de intercambio de guanina (<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>)
h.p.t	Horas pos-transfección
h.p.i	Horas pos-infección
IFN	Interferón

Abreviaturas

IRES	Sitio interno de entrada de ribosomas (<i>Internal Ribosomal Entry Site</i>)
IRF3	Factor de regulación de interferón 3 (<i>Interferon Regulation Factor 3</i>)
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
M	Molar
MAVS	Proteína de señalización antiviral de la mitocondria (<i>Mitochondrial AntiViral Signalling protein</i>)
m.d.i	Multiplicidad de infección
mg	Miligramo
MHC-I	Complejo principal de histocompatibilidad I (<i>Main Histocompatibility Complex</i>)
ITAF	Factor trans-activante del IRES (<i>IRES Trans-Acting Factor</i>)
MDA5	Proteína asociada a la diferenciación de melanoma de tipo 5 (<i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i>)
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
N-ter	Amino terminal
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal (antigua Oficina Internacional de Epizootias)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PABP	Proteína de unión a poli-A (<i>Poli-A Binding Protein</i>)
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>)
PTBP	Proteína de unión a tramo de polipirimidinas (<i>Polypyrimidine Tract Binding Protein</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Proteína estructural
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PNE	Proteína no estructural
Poli-A	Poliadenilato

Abreviaturas

Poli-C	Polirribocitidilato
PV	Poliovirus
RE	Retículo endoplásmico
RNC	Región no codificante
rNTPs	Ribonucleótido 5'-trifosfato
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscriptasa
RT-PCR	Reacción de retrotranscripción seguida de una amplificación por PCR
RVH	Rhinovirus humano
SDS	Dodecil sulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SLN	Señal de localización nuclear
TLR-3	Receptor de tipo toll 3 (<i>Toll Like Receptor 3</i>)
TPD-2	5'-tirosina-DNA fosfodiesterasa-2 (<i>5'-Tyrosyl-DNA PhosphoDiesterase-2</i>)
UFP	Unidad formadora de placa
V	Voltio
Vai	Virus Aichi
VEMC	Virus de la encefalomiocarditis
VERO	Células epiteliales de mono verde africano
VFA	Virus de la fiebre aftosa
VHA	Virus de la Hepatitis A
VSR	Virus del sarcoma de Rous
VRB-2	Virus de la rinitis bovina 2
VRE-A	Virus de la rinitis equina A
<i>wb</i>	<i>Western Blot</i>
<i>wt</i>	Tipo silvestre (<i>wild type</i>)
RNC 5'	Región 5' no codificante
RNC 3'	Región 3' no codificante
°C	Grado centígrado
μCi	Microcurio
μg	Microgramo
μl	Microlitro

Códigos de una y tres letras de aminoácidos

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

Resumen en inglés

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) is a positive strand RNA virus that belongs to the picornaviridae family. The FMDV RNA encodes structural and nonstructural proteins (NSP). In picornaviruses, the NSP 3A contributes to the cell rearrangements associated to the infection and is responsible for anchoring the replication complex to intracellular membranes. This protein contains a hydrophobic domain and shows the ability to form antiparallel dimers, whose function is not yet known. To study the functional role of residues involved in this dimerization, mutations were introduced in the infectious clone available in the laboratory (plasmid pMT28) at residues M29 and I42 of 3A, that are located at the hydrophobic α -helices predicted to contribute to dimer stability. Replacements M29D and I42D that introduce negative charges were lethal to FMDV. The mutations to positive charges, M29R and I42R, were viable in only one of three independent assays performed. The viruses recovered from mutant I42R showed the reversion to a hydrophobic residue (R42L), while that recovered from mutant M29R selected two additional mutations: replacement I42L, in a residue predicted to interact with M29, and S140F. These results support the relevance of the hydrophobic interface formed by residues 25-33 and 37-44 of 3A for FMDV multiplication.

Previous results indicated that introduction of a Gly at residue 5 within the sequence ISIP – predicted as target cleavage 2C/3A by viral protease 3C – was lethal for viral RNA infectivity. Here, we have determined that the analogous insertion of a Gly at 3A residue 151, corresponding to the equivalent sequence (PQAE) predicted for cleavage 3A/3B1 (mutant 3A- ∇ G) rendered RNAs infectious in cultured cells. Upon serial passages in BHK-21, 3A- ∇ G mutant exhibited a kinetic growth similar to that of the wt virus, despite showing an abolished 3A/3B1 processing, indicating that efficient virus multiplication can occur in the presence of small amounts of mature 3A protein.

Transient expression of viral proteins is an approach widely used to study the requirements for viral replication. To explore the feasibility of reconstructing a cellular environment in which different FMDV nonstructural proteins were transiently expressed, we attempted the cloning and expression in pRSV of 3ABC and P3 (3ABCD) FMDV protein precursors. All the pRSV inserts either incorporating 3ABC or P3, found in the positive bacterial clones showed a variety of mutations in the viral 3C protease. The only single aminoacid replacements were found at residues – L151F, H181Y and S182F – involved in the protease activity of the protein, suggesting that the toxicity exerted by 3C drove the selection of mutations that decreased such effect. Indeed, replacements L151F, H181Y and S182F severely decreased 3C protease activity while they were lethal for RNA infectivity in cultured cells.

Finally, the use of viral RNA replicons as an alternative tool for the study of the interactions between FMDV and the host cell was explored. Thus, replicons in which the capsid protein coding region (P1) was replaced by the CAT gene sequence and that included or not NSP L, were constructed from plasmid pMT28. The preliminary results presented indicate that the replicon lacking the L gene produced higher levels of CAT and NSP than that including this protein.

Introducción

I.1 La fiebre aftosa

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad aguda que afecta animales de pezuña hendida (artiodáctilos) tanto salvajes como domésticos, entre los que se incluyen más de 70 especies diferentes, destacando entre ellas cerdos, vacas, ovejas y cabras (Thomson et al., 2003). La FA se caracteriza por producir lesiones vesiculares (aftas) en pata, morro y lengua, así como fiebre y debilidad (Pereira, 1981, Donaldson, 2004). La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida, siendo endémica en zonas de África, Asia, Oriente Medio y América del Sur, en tanto que Europa Occidental y América del Norte se consideran actualmente libres de la enfermedad (Grubman and Baxt, 2004). La FA no produce una mortalidad elevada, sin embargo su morbilidad puede llegar hasta el 100% de los animales infectados (Pereira, 1981). Esta alta morbilidad unida a su elevada transmisibilidad, la principal vía de infección natural es la respiratoria (Alexandersen et al., 2003), ha llevado a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) a considerarla como la principal enfermedad animal de declaración obligatoria (<http://www.oie.int>). La FA produce un notable descenso en la producción ganadera, así como restricciones en el tráfico de animales y sus productos derivados (Sutmoller et al., 2003). Ejemplos de las consecuencias de los brotes de FA se pueden encontrar en las epizootias ocurridas en Taiwán (1997) (Kitching, 1998), Reino Unido (2001) (Knowles et al., 2001b), Holanda (2001) (Pluimers et al., 2002) y Japón y Corea del Sur (2010) (Sobrino F., 2012)

El empleo de vacunas basadas en virus inactivados como método de control de la enfermedad (Barteling and Vreeswijk, 1991) permitió la erradicación del virus en la unión Europea (Brown, 1992) a finales de la década de los 80 del siglo pasado. No obstante, una serie de desventajas, entre las que destaca la dificultad de distinguir entre animales infectados y animales vacunados en países libres de la enfermedad, llevó a la UE a adoptar políticas de no vacunación que, en caso de nuevos brotes, han ido acompañadas del sacrificio de los animales infectados y de restricciones severas en el tráfico de ganado desde las zonas afectadas (De Diego et al., 1997, Doel et al., 1994, Doel, 1999). No obstante, los sacrificios masivos de animales ocurridos durante los episodios de reintroducción de FA en países como Reino Unido (2001) han llevado a la UE a volver a contemplar la vacunación en caso de nuevos brotes.

El diagnóstico de la enfermedad se centra, en un primer momento, en el reconocimiento de los signos clínicos de la enfermedad, que debe ser confirmado mediante técnicas de laboratorio (aislamiento viral, pruebas serológicas y detección de antígenos o ácidos nucleicos virales) que permitan un diagnóstico diferencial respecto a enfermedades vesiculares producidas por otros virus, como el virus de la enfermedad vesicular del cerdo y el virus de la

estomatitis vesicular (Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres. OIE, 2013).

I.2 El virus de la fiebre aftosa

El agente etiológico de la FA es el virus de la fiebre aftosa (VFA), que junto al virus de la Rinitis Equina A (VRE-A) (Li et al., 1996) y al virus de la Rinitis Bovina 2 (VRB-2) (Hollister et al., 2008) forman el género *Aphthovirus* dentro de la familia *Picornaviridae*, de la que el virus de la polio (PV) es el prototipo.

La alta variabilidad antigénica del VFA ha llevado a clasificar al virus en siete serotipos diferentes (A, O, C, Asia1, SAT 1, SAT 2 y SAT 3), en los que se han identificado numerosos subtipos y variantes (Pereira, 1976, Pereira, 1981). Por tanto, una buena caracterización de los virus circulantes es esencial para el control de la FA.

El VFA maduro es un virus sin envuelta, cuya cápsida icosaédrica de unos 30 nm de diámetro (Acharya et al., 1989, Wild et al., 1969) está formada por el ensamblaje de 12 pentámeros constituidos a su vez por 5 protómeros, cada uno de los cuales contiene una copia de cada una de las cuatro proteínas estructurales (PE) (Vasquez et al., 1979). Estas PE son VP4, VP2, VP3 y VP1, también denominadas 1A, 1B, 1C y 1D (Rueckert and Wimmer, 1984). La cápsida preserva al genoma viral que está formado por una única molécula de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 8,5 Kb (ARN+), en cuyo extremo 5' está unida covalentemente una proteína viral no estructural llamada 3B o VPg (Sangar et al., 1977).

I.2.1 Organización genómica del VFA

El genoma de los picornavirus en general y del VFA en particular presenta una única fase de lectura abierta que está flanqueada por dos regiones no codificantes (RNC) altamente estructuradas. En la región no codificante en 5' (RNC 5') se distinguen los elementos que se representan en la Figura I.1, cuyas características y funciones se describen al pie de la misma. Entre ellos cabe destacar por su implicación en la virulencia viral la secuencia homopolimérica de poli-C (Mason et al., 2003, Rieder et al., 1993), el *Cre*, esencial para la replicación del ARN viral (ARNv) (Rieder et al., 2000, McKnight and Lemon, 1998) y el IRES, que dirige la traducción del genoma viral (Belsham et al., 2000, Kuhn et al., 1990, Martínez-Salas and Fernandez-Miragall, 2004).

La fase de lectura abierta codifica una poliproteína viral con dos codones AUG de iniciación, separados por 84 nucleótidos (Clarke et al., 1985), lo que origina 2 posibles versiones de la proteasa L (Lab y Lb) (Figura I.1). La RNC 3', de unos 90 nucleótidos, también

se encuentra altamente estructurada (Chatterjee et al., 1976) y es esencial para la infectividad viral (Rodríguez Pulido et al., 2009, Saiz et al., 2001). A continuación de la RNC 3' se localiza una secuencia homopolimérica de poli-A de longitud variable, codificada por el virus.

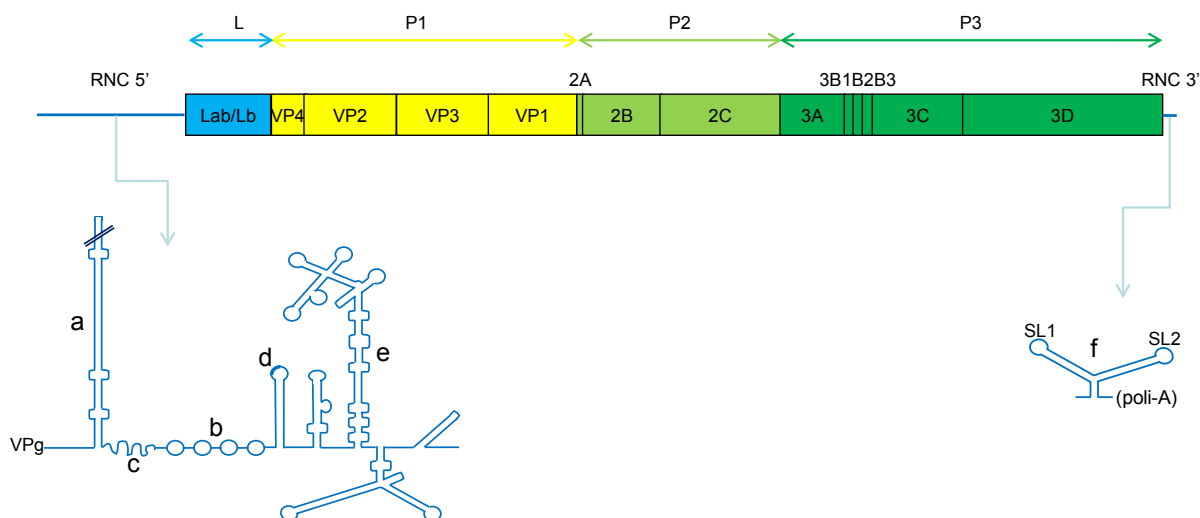


Figura I.1. Esquema de la organización genómica del VFA. Los rectángulos representan las regiones codificantes (poliproteína viral) correspondientes a la proteína L (azul), la región P1 (amarillo), P2 (verde claro) y P3 (verde oscuro). Con líneas azules se representan las regiones no codificantes RNC 5' unida a la proteína VPg (3B) y RNC 3' que flanquean la poliproteína viral, para las que se muestran los elementos estructurales que contienen: **(a)** fragmento S, de unos 360 nucleótidos de longitud; el análisis *in silico* predice para él una estructura en horquilla (Clarke et al., 1987, Escarmis et al., 1992); **(b)** segmento homopolimérico de poli-C, de entre 80 y 400 nucleótidos (Brown et al., 1974, Escarmis et al., 1992, Harris and Brown, 1977) que podría estar implicado en la virulencia viral (de la Torre et al., 1988, Diez et al., 1990, Rieder et al., 1993); **(c)** región de pseudonudos (*pseudoknots*), de unos 250 nucleótidos, que contiene de 2 a 4 fragmentos con estructura terciaria, sin función conocida (Grubman et al., 1984, Clarke et al., 1987); **(d)** elemento *Cre* (*cis replication element*) consistente en un bucle de unos 55 nucleótidos que presenta la secuencia altamente conservada AAACA que interviene en la replicación viral por servir de molde para la uridilación de la proteína 3B (Rieder et al., 2000, McKnight and Lemon, 1998); **(e)** elemento IRES, (*internal ribosomal entry site*) de unos 460 nucleótidos de secuencia altamente estructurada, en la que se pueden diferenciar 5 dominios que media la traducción del ARN+ de manera cap-independiente (Belsham et al., 2000, Kuhn et al., 1990, Ramos and Martinez-Salas, 1999, Martinez-Salas et al., 2002, Martinez-Salas and Fernandez-Miragall, 2004); **(f)** RNC3' en la que se indican las dos estructuras en horquilla que se predicen SL1 y SL2 (Saiz et al., 2001).

I.2.2 Ciclo Infeccioso

En las células habitualmente empleadas para el estudio de su ciclo viral, BHK-21 e IBRS-2, el VFA se comporta como un virus lítico, produciendo la reorganización de membranas intracelulares (Monaghan et al., 2004, Garcia-Briones et al., 2006, Grubman and Baxt, 2004). En estas células, el VFA presenta un ciclo infeccioso de corta duración. Para su estudio, el ciclo se puede dividir en las etapas que se describen a continuación.

I.2.2.1 Internalización celular

El ciclo infeccioso se inicia con la unión del VFA a receptores específicos de la membrana de las células susceptibles a la infección, las integrinas $\alpha\beta3$ (Neff et al., 1998), $\alpha\beta1$, $\alpha\beta6$ y $\alpha\beta8$ (Jackson et al., 2000, Jackson et al., 2002, Jackson et al., 2004). Esta unión se produce a través del motivo de aminoácidos RGD localizado en un bucle expuesto (bucle G-H) de la proteína de la cápsida VP1 (Robertson et al., 1983).

La posterior internalización del virus se realiza mediante endocitosis en vesículas revestidas de clatrina (Berryman et al., 2005, O'Donnell et al., 2005, Martin-Acebes et al., 2007). Una vez internalizado, el virus sufre el desensamblaje de la cápsida en compartimentos endosomales ácidos correspondientes a endosomas tempranos, habiéndose propuesto que la protonación de residuos de His de la proteína VP3 dispara el desensamblaje de la cápsida en pentámeros, con la consiguiente liberación al citoplasma del ARN+ unido covalentemente en su extremo 5' a la proteína VPg (Curry et al., 1995, Ellard et al., 1999, van Vlijmen et al., 1998, O'Donnell et al., 2008). El VFA (principalmente para el serotipo O) puede adaptarse durante su propagación en cultivos celulares a utilizar como receptor heparán sulfato, empleando en este caso vesículas revestidas de caveolina para su internalización (Sa-Carvalho et al., 1997, O'Donnell et al., 2008).

I.2.2.2 Traducción y procesamiento proteolítico de la poliproteína viral

Tras la internalización y la liberación del genoma al citoplasma celular se produce la traducción primaria del ARN+, que está dirigida por el IRES (I.2.1). Se sabe que VPg es escindida del ARN+ presente en los viriones por un enzima celular, la TPD-2 (5'-tirosina-DNA fosfodiesterasa-2) (Ambros et al., 1978, Golini et al., 1980, Rozovics et al., 2011, Gulevich et al., 2002, Virgen-Slane et al., 2012). Ésta primera ronda de traducción produce las proteínas necesarias para la replicación viral. Las nuevas moléculas de ARN+ sintetizadas son, a su vez, traducidas a gran escala (traducción secundaria) (Mason et al., 2003).

A medida que van siendo sintetizadas, las proteínas virales comienzan a producir las modificaciones celulares asociadas a la infección. Las proteasas virales son responsables de la proteólisis de varios factores implicados en la traducción cap-dependiente de mensajeros celulares (Devaney et al., 1988). La traducción del ARN+ dependiente de IRES es estimulada por la unión a este elemento de proteínas celulares como la proteína de unión a poli-C (PCBP), la proteína de unión a tramo de polipirimidinas (PTBP) y el factor asociado a proliferación ITAF₄₅ (Martinez-Salas et al., 2001, Martinez-Salas et al., 2008). Además, se piensa que la interacción de PCBP con el IRES, la proteína de unión a poli-A (PABP) y el propio poli-A de

3' produce la circularización del ARN⁺ que es necesaria para poder iniciar la síntesis de cadena negativa de ARN (ARN⁻), lo que facilitaría la transición (*switch*) del proceso traducción al de replicación (Serrano et al., 2006, Herold and Andino, 2001).

La traducción del genoma viral origina una única poliproteína de 2.330 aminoácidos, que es procesada cotraduccionalmente y postraduccionalmente por las proteasas virales para dar lugar primero a los polipéptidos precursores, para muchos de los cuales se conocen implicaciones funcionales en el ciclo de replicación del virus, y finalmente a las proteínas maduras (Figura I.2). Las proteasas L y 2A intervienen solo en el procesamiento primario, en tanto que 3C interviene tanto en el primario como en el secundario. En el procesamiento primario, la proteasa L se auto escinde de P1-2A (Strebel and Beck, 1986), la proteína 2A se escinde autocatalíticamente de 2BC (Ryan and Flint, 1997, Ryan et al., 1991, de Felipe et al., 2003, Donnelly et al., 2001) y la proteasa 3C lleva cabo el corte 2C/3A. Durante el procesamiento secundario se produce la escisión de los diferentes polipéptidos precursores tanto de las proteínas estructurales como de las no estructurales (PNE), excepto la separación VP4/VP2 que es posterior a la encapsidación (Figura I.2).

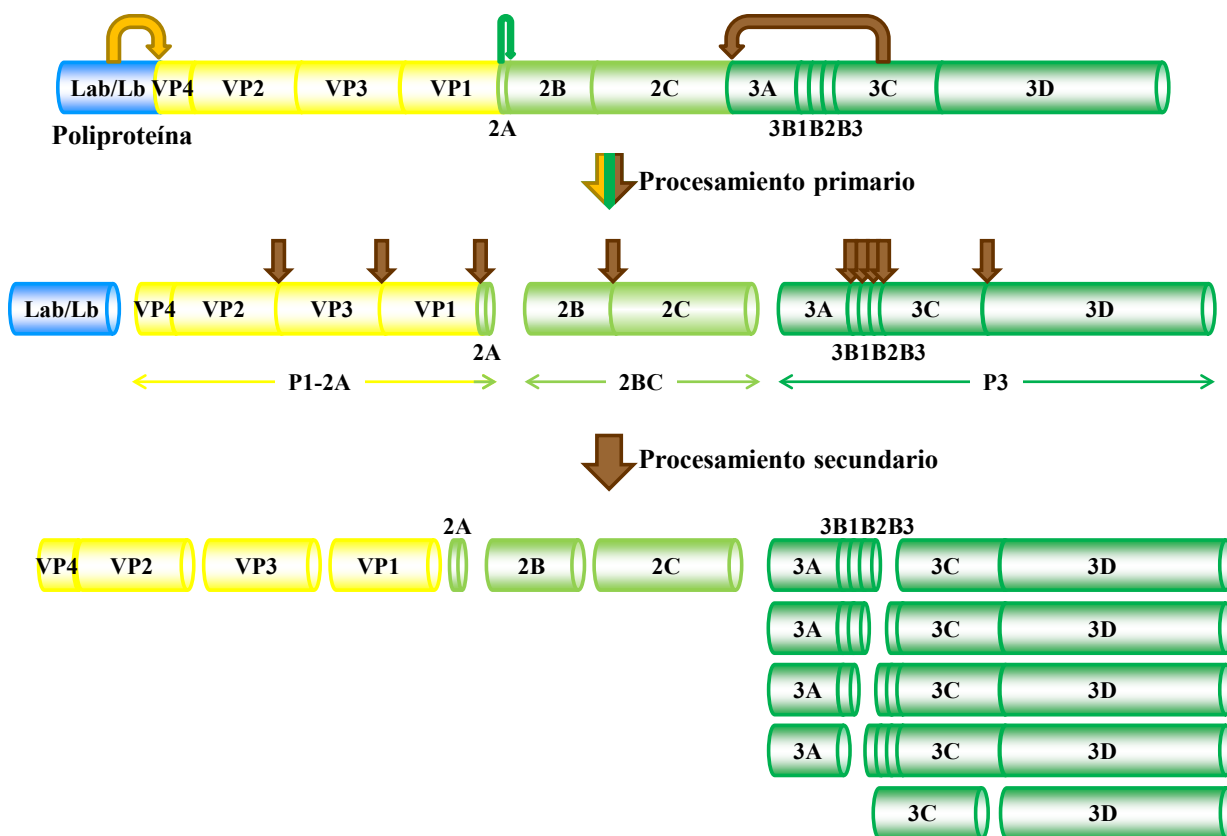


Figura I.2. Esquema del procesamiento proteolítico de la poliproteína del VFA. El procesamiento catalizado por la proteasa Lab/Lb se indica con la flecha naranja, el procesamiento catalizado por la proteína 2A se muestra con la flecha verde y los procesamientos catalizados por la proteasa 3C se señalan con las flechas marrones (Ryan M.D., 2004).

I.2.2.3 Replicación del ARN

Existe poca información sobre el proceso de replicación del ARNv del VFA. Los modelos que se proponen para explicarla derivan de lo conocido para PV. En estos modelos el ARN+ viral actúa de molde para la síntesis de ARN-, proceso en el que 3B uridilada unida al extremo 5' del ARN+ actuaría de cebador para la actividad ARN polimerasa ARN-dependiente de la proteína 3D. El ARN- sintetizado *de novo* sirve, a su vez, de molde para la síntesis de nuevas moléculas de ARN+, en las que la proteína 3B se encuentra unida a su extremo 5', actuando, de nuevo, como cebador (Pettersson et al., 1978, Murray and Barton, 2003, Herold and Andino, 2000, Paul et al., 1998, Paul et al., 2000, Steil et al., 2010). De esta manera, la uridilación de la proteína 3B de los picornavirus constituye un proceso esencial para la replicación del ARNv.

La replicación del ARNv de los picornavirus está asociada a membranas celulares derivadas del retículo endoplasmático (RE) y/o del aparato de Golgi (Fujita et al., 2007, Schlegel et al., 1996, Teterina et al., 1997, Barco and Carrasco, 1995, Bolten et al., 1998); no obstante el origen de las membranas utilizadas por el VFA es poco conocido (Midgley et al., 2013). El conjunto formado por el ARN y las proteínas virales, las membranas celulares y otros elementos celulares que contribuyen a la replicación se denomina “complejo de replicación” (Harris et al., 1994, Xiang et al., 1995b, Giachetti et al., 1992, Paul et al., 1994). En la Tabla I.1 se resumen los elementos que se postulan esenciales para la replicación del ARN del PV.

Tabla I.1. Elementos requeridos para la síntesis de ARN de PV.

Elemento	Función	Cita
3D	ARN polimerasa dependiente de ARN encargada de la replicación del ARNv.	(Baltimore et al., 1963, Newman et al., 1979)
3CD	Cofactor de 3D interaccionando con PCBP y el ARNv.	(Andino et al., 1993, Parsley et al., 1997)
3B uridilada	Actúa como cebador.	(Nomoto et al., 1977, Paul et al., 2003, Pathak et al., 2007)
3AB	Localiza a 3D y 3CD en membranas celulares, estimula la actividad polimerasa de 3D.	(Harris et al., 1994, Lama et al., 1994, Fujita et al., 2007)
2C	Necesaria para la replicación del ARN- viral	(Barton and Flanagan, 1997)
PCBP	Su unión al IRES favorece el inicio de la replicación.	(Gamarnik and Andino, 1998)
PI4PKB	Cataliza la producción de Fosfatidil inositol-4-fosfato (PI4P) en membranas celulares. Favorece la unión de 3D, que presenta afinidad <i>in vitro</i> con PI4P, a las membranas del complejo de replicación.	(Hsu et al., 2010)

Se especifican las funciones descritas para cada elemento y se citan las publicaciones donde se describen.

I.2.2.4 Encapsidación

El ciclo viral se completa con la encapsidación del genoma de VFA, que se asocia con la miristoilación del extremo amino del precursor VP4/VP2 y su proteólisis (Grubman and Baxt, 2004). En el virus Aichi (VAi), se ha descrito la presencia de una señal de encapsidación en un bucle de ARN cercano al extremo 5' del ARN+ (Sasaki and Taniguchi, 2003). Sin embargo, en PV y en VFA no se han identificado estructuras análogas, habiéndose propuesto para PV que la encapsidación no requiere una señal específica en el ARN+, aunque sí la interacción entre las proteínas 2C y VP3 (Liu et al., 2010).

Existen dos modelos para explicar la encapsidación del ARN+ de VFA, en el primero las proteínas de la región P1 forman cápsidas vacías en las que a continuación se introduce el ARN. En el segundo, las proteínas de la cápsida interaccionan con el ARN+ formando el provirión, que luego evoluciona a virión maduro (Grubman and Baxt, 2004).

En la Figura I.3 se resume esquemáticamente el ciclo infectivo de los picornavirus, comentado anteriormente.

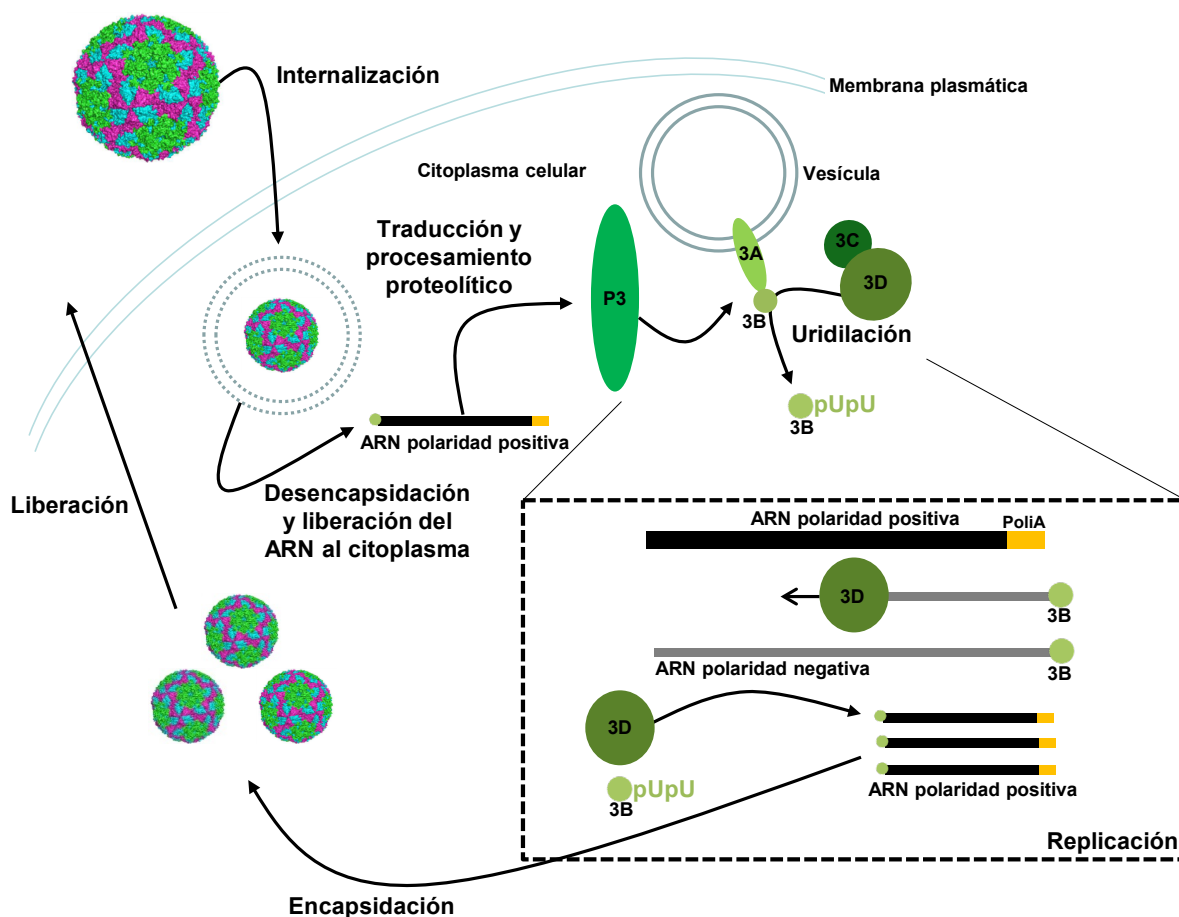


Figura I.3. Representación esquemática del ciclo infectivo de los picornavirus. Adaptación de (Postigo, 2009).

I.3 Proteínas del VFA

A continuación se resumen las características fundamentales de las proteínas derivadas de las regiones L, P1 y P2 de la poliproteína y en el siguiente apartado se comentan con más detalle las de las proteínas de la región P3.

La proteína L (en cualquiera de sus dos versiones Lab o Lb) es una proteasa viral responsable de su escisión de la poliproteína viral así como de la proteólisis de proteínas celulares, como el factor de traducción celular eIF4G que inhibe la síntesis de proteínas *cap*-dependiente (Devaney et al., 1988).

La región P1 contiene las proteínas estructurales (VP4, VP2, VP3 y VP1) cuyo ensamblaje origina la cápsida viral. Exceptuando VP4, que se localiza en la cara interna de la cápsida y está unida en su extremo amino terminal (N-ter) a un residuo de ácido mirístico (Belsham et al., 1991), todas ellas se hayan expuestas en el exterior de la cápsida, pudiendo participar en la antigenicidad y en el reconocimiento y unión a los receptores de las células susceptibles (Jackson et al., 2002).

A las PNE de las regiones P2 (2A, 2B y 2C) se les atribuyen distintas funciones, además de las comentadas como parte del complejo de replicación (I.2.2.3). La proteína 2A es un péptido de 16 aminoácidos que cataliza en *cis* la escisión de P1-2A de 2BC (Figura I.2; (Vakharia et al., 1987). En el caso específico del VFA, el precursor 2BC es el responsable de la inhibición del tráfico de proteínas entre el RE, el aparato de Golgi y la superficie celular, producida en las células infectadas (Moffat et al., 2005). Esta inhibición sería responsable de la disminución de la expresión de moléculas de MHC de clase I observada en células infectadas (Sanz-Parra et al., 1998), que se ha propuesto como uno de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune celular empleados por el virus.

La proteína 2B contiene dominios hidrofóbicos y ha sido relacionada con modificaciones de la permeabilidad de membranas de células infectadas con PV (Doedens and Kirkegaard, 1995) y con la inhibición de la secreción de proteínas en células infectadas con coxsackievirus (CV) B3 (Van kuppeveld et al., 1997).

La proteína 2C de PV contiene regiones de unión a nucleótidos trifosfato, presenta un dominio de helicasa y estaría implicada en la replicación y en la encapsidación del genoma viral y en la reorganización de estructuras membranosas celulares (Pfister and Wimmer, 1999). Mutaciones en la proteína 2C de VFA confieren resistencia a cloruro de guanidinio, droga que inhibe la replicación viral (Saunders and King, 1982). Así mismo, la interacción de 2C y 3A con la ARN helicasa A y la proteína celular PABP promueve la formación del complejo de replicación (Lawrence and Rieder, 2009). Cuando se deletiona su extremo N-ter, la proteína 2C

de VFA forma hexámeros, una estructura propia de las ATPasas AAA+ en cuyo grupo ha sido incluida (Sweeney et al., 2010). Por otro lado, la ausencia de la fusión de lisosomas con autofagosomas que contienen proteínas virales durante la infección con VFA, podría deberse a la interacción de 2C con el factor que estimula la fusión de lisosomas con autofagosomas Beclin1 (Gladue et al., 2012).

Al igual que ocurre con otros picornavirus, las proteínas 2B y 2C de VFA colocalizan parcialmente con marcadores de vesículas que derivan del RE en células infectadas (Moffat et al., 2005) y con el marcador de autofagosomas LC3 (O'Donnell et al., 2011). Además, se ha descrito que 2B y 2C pueden participar en el reordenamiento de membranas celulares durante la infección viral, dando lugar a estructuras membranosas a las que se asocia el ARNv para formar los complejos de replicación, e inhibir la secreción de proteínas celulares cuando se co-expresan como 2BC (Moffat et al., 2005, Moffat et al., 2007, García-Briones et al., 2006).

I.3.1 Proteínas derivadas del precursor P3 del VFA y de otros picornavirus

Las proteínas 3A, 3B (tres copias no idénticas), 3C y 3D forman el precursor P3. La información disponible sobre las proteínas maduras 3A y 3C, por ser estas proteínas objeto directo de estudio de esta Tesis Doctoral, se discute en detalle en los siguientes apartados. La proteína 3D es la ARN polimerasa ARN dependiente que cataliza la replicación del ARNv (Sánchez-Aparicio, 2010, Ferrer-Orta et al., 2006, Newman et al., 1979). Se trata de una proteína globular de 470 aminoácidos. Las ARN polimerasas ARN dependientes no presentan actividad correctora de errores lo que origina altas tasas de mutación durante la replicación. Como consecuencia de estas altas tasas de mutación y del elevado tamaño de las poblaciones de virus ARN, estas se comportan como cuasiespecies, estando constituidas por espectros de mutantes con diferentes eficacias biológicas (*fitness*) frente a las condiciones ambientales (Arias et al., 2013, Domingo et al., 2006, Domingo et al., 1985). Esta característica explica la alta adaptabilidad de los virus ARN a cambios ambientales, como se refleja en la rápida selección de variantes virales frente a anticuerpos neutralizantes (Lea et al., 1994) o tratamientos farmacológicos (Sierra et al., 2007).

Otra función realizada por 3D es la de catalizar la uridilación de 3B, proceso fundamental para la replicación del ARNv (Nomoto et al., 1977, Gerber et al., 2001). Se ha determinado la estructura tridimensional de la proteína 3D de VFA en un complejo con un ARN sintético molde-cebador de la replicación del ARNv (Ferrer-Orta et al., 2004), lo que ha permitido conocer los residuos de 3D implicados en la interacción con el ARNv. Se han

resuelto, también, las estructuras de los complejos catalíticos de 3D con la proteína 3B (Ferrer-Orta et al., 2006). Por otro lado, se ha identificado una señal de localización nuclear (SLN), en la secuencia aminoacídica de 3D, responsable de la localización nuclear, tanto de 3D como del precursor 3CD (Sanchez-Aparicio et al., 2013, Sánchez-Aparicio, 2010, De la Higuera et al., 2011).

Como se ha descrito en PV, el precursor 3CD de VFA actuaría como cofactor, necesario al menos *in vitro*, para la uridilación de 3B empleando *Cre* como molde (Nayak et al., 2005) aunque puede ser sustituido por 3C como cofactor (Nayak et al., 2006). En PV 3CD favorece la apertura de la horquilla del *Cre*, facilitando el acceso de la polimerasa 3D e incrementando la replicación (Pathak et al., 2007). Por otro lado, mientras que 3CD es la principal proteasa viral en PV, esta función es realizada principalmente por 3C en VFA (Ypma-Wong et al., 1988, Bablanian and Grubman, 1993). Se han descrito otras funciones para 3CD, como la descrita en el virus de la hepatitis A (VHA), donde 3CD produce el corte de la proteína adaptadora TRIF que contribuye a la inhibición de la señalización por receptores tipo Toll 3 (TLR-3) que intervienen en la activación del sistema inmune innato (Qu et al., 2011). El procesamiento de VP1-2A en VAI se produce por 3CD en lugar de 3C (Sasaki et al., 2012b).

Otra de las proteínas pertenecientes a la región P3 es 3B, que en su forma uridilada actúa como cebador para la replicación tanto del ARN⁺ como del ARN⁻. Los ensayos *in vitro* de uridilación demuestran un comportamiento de 3B similar a lo descrito para 3B de los picornavirus en general (Nayak et al., 2005). El hecho diferencial más importante es que la proteína 3B de VFA está presente en el ARN_v como tres copias no idénticas en tándem (3B1, 3B2, 3B3) (Forss and Schaller, 1982). Estudios realizados *in vivo* mostraron que ARNs con solo la copia 3B3 permiten recuperar virus infectivos (Falk et al., 1992), aunque con menor eficiencia que los genomas completos. El número de copias de 3B podría estar relacionado con el grado de patogenicidad y con el rango de hospedador del VFA, pues virus que expresan solo la copia 3B3 están atenuados en porcino (Pacheco et al., 2003), mientras que virus con dos copias de 3B no presentan diferencias de virulencia en vacuno (Pacheco et al., 2010). Se ha descrito que de las tres copias de esta proteína, 3B3 es la más relevante para la replicación del ARN_v (Falk et al., 1992). Las 3Bs también pueden estar implicadas en procesos de maduración y liberación del virus, ya que virus que expresan una sola copia de 3B no producen ECP, ni liberan virus al medio extracelular, fenotipo que se puede recuperar con mutaciones compensatorias en 2C, 3A y en la propia 3B (Arias et al., 2010). En cualquier caso, la razón de la existencia de tres copias de 3B en el genoma de VFA sigue por esclarecerse.

Se han propuesto otras posibles funciones para la proteína 3B, una de ellas la de impedir la detección del ARNv con un 5'trifosfato libre por parte de los sensores celulares RIG-1 y PKR que inducen, a través de una cascada de señales, la producción de interferón de tipo 1 en células infectadas (Goodfellow, 2011).

Se asume que el precursor 3ABBB del VFA, de forma análoga a lo observado para el precursor 3AB de PV, interviene en la formación del complejo de replicación, pudiendo estimular la actividad polimerasa de 3D (Fujita et al., 2007, Teterina et al., 2001, Capozzo et al., 2002, Mason et al., 2003, Nayak et al., 2005). En PV, 3AB estimula el autoprosesamiento de 3CD para generar 3C y 3D, así como la actividad proteasa de 3C sobre el precursor 2BC (Molla et al., 1994). Así mismo, se ha descrito una actividad chaperona de ácidos nucleicos en el precursor 3AB de PV, que estaría mediada por los últimos 7 residuos del extremo carboxilo terminal (C-ter) de 3A y por los residuos de la proteína 3B (DeStefano and Titilope, 2006). Esta actividad chaperona contribuiría a la apertura de la horquilla de ARN del elemento *Cre* para permitir el acceso de la polimerasa viral, favoreciendo de este modo la uridilación de VPg. La actividad chaperona podría, también, ayudar a la polimerasa viral en su recorrido por el molde de ARNv durante la replicación, mejorar la hibridación de cadenas negativas incompletas que se han disociado del molde con nuevas cadenas positivas, o catalizar cambios estructurales iniciados por la unión de componentes tales como la polimerasa viral, proteínas de la cápsida o ribosomas (Gangaramani et al., 2010). Por otra parte, la capacidad de la proteína 3AB de unirse inespecíficamente al ARN de PV, podría facilitar el reclutamiento del ARNv al complejo de replicación (DeStefano and Titilope, 2006, Gangaramani et al., 2010, Paul et al., 1994). El procesamiento de 3AB para originar 3A y 3B parece requerir de un equilibrio para promover una replicación productiva en los picornavirus, como se ha visto en estudios con el VHA (Kusov and Gauss-Muller, 1999). Se ha descrito para PV, VHA y virus de la encefalomiocarditis (VEMC) que algunas de las funciones en el ciclo viral atribuidas a 3A son en realidad desarrolladas por precursores de mayor tamaño. Así cuando se bloquea o incrementa la eficiencia del procesamiento proteolítico de la región P3 mediante mutaciones puntuales en las dianas de reconocimiento de la proteasa 3C, o se modifican las secuencias consenso de corte que flanquean a los demás precursores de la proteína 3A (3AB y 3ABC), se producen defectos en la infectividad y capacidad de replicar del ARN de dichos mutantes (Hall and Palmenberg, 1996, Kusov and Gauss-Muller, 1999, Paul et al., 1994, Lama et al., 1995, Birtley et al., 2005). De esta manera, los picornavirus deben conservar un cierto balance en la proporción de los niveles de los precursores de 3A y la propia proteína madura, pues alteraciones en la escisión de la proteína 3A por la proteasa 3C pueden afectar en distinto grado

la capacidad de mantener una replicación productiva (Kusov and Gauss-Muller, 1999). El precursor 3ABC es responsable de algunos de los efectos de la infección del virus sobre el metabolismo celular (*shut off*). En VHA, 3ABC proteoliza la proteína de señalización antiviral de la mitocondria (MAVS) inhibiendo la activación del factor de regulación de interferón 3 (IRF3) a través de la vía del receptor de reconocimiento de ARN de doble cadena MDA5, y con ello la respuesta de IFN de tipo 1 (Yang et al., 2007). En VAI, 3ABC parece interactuar con la RNC 5' para favorecer la replicación del ARN- (Nagashima et al., 2008).

I.3.1.1 La proteína 3A

Existen evidencias de que la proteína 3A de picornavirus interactúa con el RE y puede desorganizar el aparato de Golgi, estando implicada en otros procesos que pueden variar dependiendo del virus. Así, la proteína 3A de CV-B3 y otros picornavirus reduce el tránsito de proteínas a través del aparato de Golgi y con ello disminuye la expresión de MHC I en la membrana celular (Cornell et al., 2007, Dotzauer and Kraemer, 2012). En el rinovirus humano (RVH) 1A la proteína 3A participa en la fragmentación del complejo de Golgi y en la formación de vesículas asociada a la replicación del ARNv (Quiner and Jackson, 2010), mientras que en el virus encefalomiélitis aviar, 3A modifica la permeabilidad de la membrana celular (Liu et al., 2004).

La secuencia aminoacídica de la proteína 3A de picornavirus permite predecir la existencia de un dominio hidrofóbico en su extremo C-ter y de dos dominios de α -hélice en el extremo N-ter (Fig. I.4). La estructura tridimensional del extremo N-ter de la proteína 3A de PV, determinada mediante espectroscopia de RMN (Strauss et al., 2003), muestra la existencia de dos dominios de α -hélice que forman un homodímero simétrico, como ya se había propuesto a partir de experimentos con el sistema de doble híbrido (Xiang et al., 1998). Este dímero se produce por la interacción intermolecular de las regiones hidrofóbicas presentes en los dos dominios de α -hélice. Mutaciones en estas regiones producen alteraciones en funciones de 3A, tales como la estimulación de la actividad proteasa de 3CD o la inhibición del tráfico de vesículas entre el RE y el aparato de Golgi (Xiang et al., 1995a, Doedens and Kirkegaard, 1995). La inhibición de este tráfico vesicular (Wessels et al., 2006a, Belov et al., 2008) también afecta a la exportación de moléculas de MHC de clase I, lo que parece constituir uno de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedador (Choe et al., 2005, Doedens et al., 1997, Deitz et al., 2000).

El dominio hidrofóbico que se localiza en la región C-ter es el responsable de la unión de 3A a membranas celulares, interacción que hace posible su contribución a la formación del complejo de replicación viral (Bienz et al., 1987, Semler et al., 1982). La proteína 3A en PV también interviene en la síntesis de ARN⁺, pues las mutaciones M79V o M79T, producen virus defectivos en la síntesis de nuevas moléculas de polaridad positiva, lo que se manifiesta como una aparición tardía y un rendimiento de síntesis reducido de ARN_v (Teterina et al., 2003). Por otra parte, se ha demostrado que 3A tiene un papel fundamental en alteraciones en el rango de hospedador *in vitro* (Lama et al., 1998). Así mismo, existen indicios de que 3A favorece el reclutamiento de Fosfatidil inositol-4-fosfato kinasa III β (PI4PKB), a través de su interacción con factores de intercambio de guanina (GEFs) de las Arf GTPasas como GBF1 (Factor de intercambio de nucleótidos de guanosina resistente a brefeldina A específico de Golgi) y con la proteína que contiene dominio de unión a acil-Coenzima A 3 (ACBD3) de las membranas en las que se ancla el complejo de replicación, para colaborar en su enriquecimiento con PI4P necesario para la replicación viral (Hsu et al., 2010, Greninger et al., 2012, Sasaki et al., 2012a, Belov and Ehrenfeld, 2007, Belov et al., 2007, Wessels et al., 2007). Por último, mutaciones en la secuencia de 3A, como la sustitución A70T, inducen resistencia a fármacos que interfieren con la replicación de PV, como el enviroxime que inhibe preferentemente la síntesis de ARN de polaridad positiva, o PIK93 que inhibe la PI4PKB (Arita et al., 2009, Heinz and Vance, 1995, Arita et al., 2011, van der Schaar et al., 2012).

I.3.1.1.1 La proteína 3A del VFA

La proteína 3A del VFA es esencial para la replicación viral ya que su delección es letal para el virus, tanto en células BHK-21 como en el modelo de ratón lactante. Además, la expresión en *trans* de 3A no permite el rescate del virus que porta su delección (Postigo, 2009). Asimismo, mutantes con una inserción de Gly en las secuencias diana de la proteasa 3C en el extremo N-ter y el extremo C-ter de la proteína (posiciones 5 y 151) o con una única Gly insertada en el extremo amino de 3A (posición 5) también son inviables, ya que en estos mutantes se bloquea la replicación del ARN_v (Postigo, 2009).

A diferencia de otros picornavirus como PV y CV, la proteína 3A de VFA no se haya implicada en la inhibición del tráfico de vesículas entre el RE y el aparato de Golgi (Doedens and Kirkegaard, 1995), función que realiza en VFA el precursor 2BC (Moffat et al., 2005), aunque si se la puede encontrar asociada en infección a marcadores de RE (calreticulina) y del aparato de Golgi (p58) (O'Donnell et al., 2001, Garcia-Briones et al., 2006). En un estudio que sugiere que la autofagia puede tener implicaciones en la replicación de VFA, se ha observado la

colocalización de 3A con marcadores de autofagosomas (O'Donnell et al., 2011), colocalización que no ha sido encontrada por otros autores (Berryman et al., 2012). A diferencia de lo descrito para otros picornavirus, la expresión transitoria de la proteína 3A de VFA no produce modificaciones en de las estructuras membranas y la proteína se localiza en vesículas citoplasmáticas (Garcia-Briones et al., 2006, O'Donnell et al., 2001). Su patrón de distribución se vuelve progresivamente más compacto y fibroso con la adición de sucesivas copias de 3B al expresarse como 3AB, 3ABB y 3ABBB (Garcia-Briones et al., 2006). Por otro lado la infección con VFA de células BHK-21 que expresan establemente las proteínas de 3A y 3ABBB, produce un aumento significativo del título viral recuperado (Rosas et al., 2008).

La proteína 3A de VFA difiere notablemente en tamaño y secuencia de la de PV y otros picornavirus (Figura I.4). Frente a los 87 aminoácidos de la proteína 3A de PV, la 3A de VFA contiene entre 143 y 153 aminoácidos dependiendo del aislado, diferencia debida a la presencia de inserciones/delecciones en su región C-ter (Carrillo et al., 2005). Las proteínas 3A que más se asemejan a la de VFA son las de los otros dos virus pertenecientes al género *aphtovirus*: el VRE-A y el VRB-2 (Li et al., 1996, Hollister et al., 2008). No obstante, el nivel de homología de las proteínas 3A de VRE-A y VRB-2 con la de VFA es bajo (en torno al 8%), presentando regiones N-ter y C-ter de tamaños diferentes (Figura I.4). De hecho, la sustitución de la proteína 3A en la secuencia del ARNV del VFA por la del VRE-A es letal (Postigo, 2009).

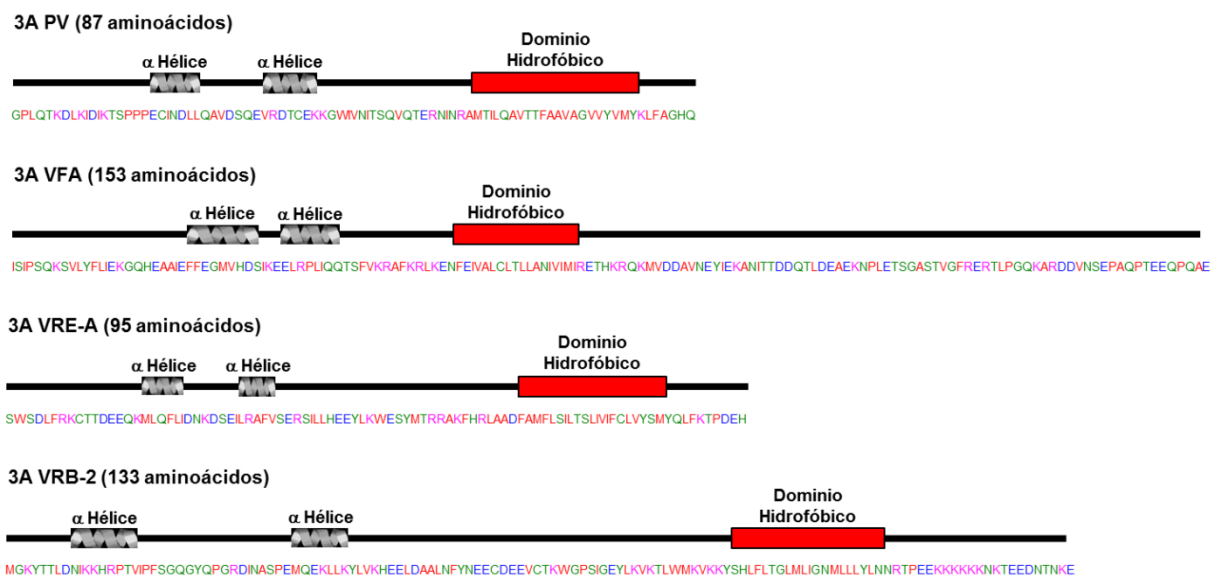


Figura I.4. Proteínas 3A de diferentes picornavirus. Sobre cada una de las secuencias se indica la posición del dominio hidrofóbico (recuadro rojo) predicho mediante el análisis de las diferentes secuencias con los programas HMMTOP (Hungarian Academy of Sciences) y TMPred (EMBNET-CH), así como las posiciones que se predice forman una α -hélice (recuadros con hélice) empleando el programa SWISS-MODEL server (Guex et al., 1999, Peitsch, 1996, Schwede et al., 2003). Los aminoácidos se representan en distintos colores en función de sus características físico-químicas: verde, polar sin carga; rojo, apolar; azul, polar con carga negativa; rosa, polar con carga positiva.

La proteína 3A de VFA presenta una gran variabilidad – el porcentaje de residuos conservados entre distintos serotipos del virus es del 37% (Carrillo et al., 2005) – que se acumula preferentemente en su extremo C-ter.

La proteína 3A del VFA presenta entre los residuos 59 a 76 un dominio que se predice hidrofóbico responsable de su capacidad de unión a membranas (Gonzalez-Magaldi et al., 2012, Moffat et al., 2005, O'Donnell et al., 2001, Postigo, 2009), que divide la proteína en una región N-ter y otra C-ter. Esta última región está involucrada en procesos de patogenicidad y rango de hospedador (Beard and Mason, 2000, Giraudo et al., 1990, Nuñez et al., 2001). Se han hallado deleciones en la región C-ter en virus atenuados por pases en huevos embrionados (Sagedahl et al., 1987) y en virus presentes en el brote de FA ocurrido en Taiwán en 1997, causado por la cepa “porcinofilica” de serotipo O O/TAW/97, que está atenuada para el ganado vacuno (Huang et al., 2000, Dunn and Donaldson, 1997). Asimismo, la generación de una deleción de 20 aminoácidos en el VFA O1Campos, entre los residuos 87 y 106, produce atenuación en ganado vacuno (Pacheco et al., 2013). Además, el extremo C-ter de 3A de VFA admite inserciones de hasta 11 aminoácidos, sin modificar su capacidad de replicación en células BHK-21 (Li et al., 2012).

No se conoce la estructura tridimensional de la proteína 3A de VFA. Sin embargo, estudios de modelado comparativo realizados en colaboración con el Dr. Paulino Gómez Puertas (CBMSO), empleando el SWISS-MODEL server (Guex et al., 1999, Peitsch, 1996, Schwede et al., 2003) y la estructura determinada para la región N-ter de 3A de PV (Strauss et al., 2003), han permitido obtener un modelo en el que aparecen dos α -hélices, entre los residuos 25-33 y 37-44. Estas α -hélices mediarían la formación de dímeros y oligómeros de 3A (Figura I.5). En nuestro laboratorio se había descrito que un único cambio en un residuo que forma parte de una de estas α -hélices, Q44R, es responsable de la adaptación del VFA a cobaya (Nuñez et al., 2001). Posteriormente, como se detalla en el apartado R1, se pudo establecer que dos de los residuos que el modelo elaborado identificaba como relevantes para el establecimiento de la interfaz hidrofóbica, L38 y L41, eran necesarios para la dimerización eficiente de la proteína 3A y para la correcta replicación e infectividad del virus, y que su sustitución por E provocaba la selección de virus con sustituciones que restauran el carácter hidrofóbico del residuo (González-Magaldi, 2012).

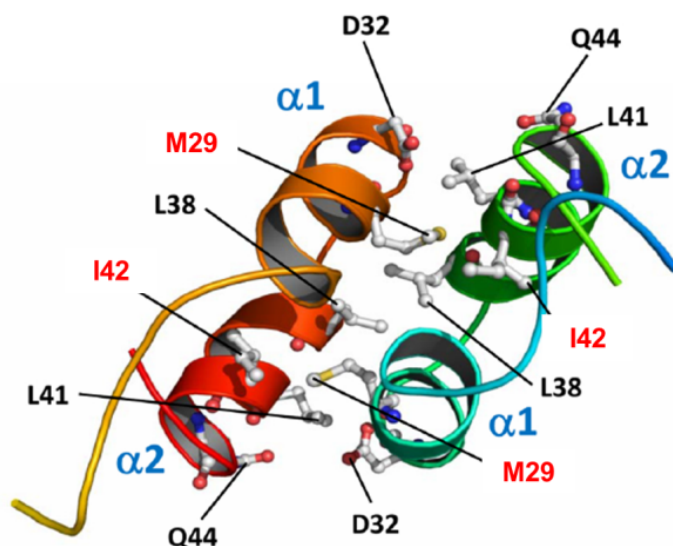


Figura I.5. Vista general del modelo en 3D del dímero de la proteína 3A del VFA. Se indican (en rojo) los principales residuos implicados en la interfaz hidrofóbica que media la dimerización de 3A, que son objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral, así como los elementos de estructura secundaria, hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (en azul). Extraído y adaptado de (Gonzalez-Magaldi et al., 2012).

El modelo de la estructura tridimensional del extremo N-ter de la proteína 3A del VFA indica la existencia de otros residuos (fundamentalmente M29 e I42) implicados en la dimerización y la funcionalidad de 3A (Figura I.5). Por todo ello, la producción y caracterización de VFAs y de proteínas aisladas con mutaciones en los residuos M29 e I42 ha constituido uno de los objetivos del trabajo de esta Tesis Doctoral.

I.3.1.2 Proteína 3C de picornavirus y de VFA

La proteína 3C de los picornavirus es una serín proteasa de la familia de la tripsina (Gorbalenya et al., 1989) que tiene como dianas de proteólisis los pares de aminoácidos Q-I, E-G, Q-G, Q-L, Q-T y E-T (Robertson et al., 1985, Palmenberg, 1990). Además de ser responsable de catalizar la escisión de las diferentes proteínas estructurales y no estructurales maduras a partir de los polipéptidos virales precursores (Fig. I.2) (Clarke and Sangar, 1988, Vakharia et al., 1987), 3C participa en otras funciones en diferentes picornavirus. En VHA, 3C degrada al factor de traducción PBT, y en PV 3C/3CD degrada PCBP2, inhibiendo de este modo la traducción IRES-dependiente, lo que se postula como una forma de disminuir la traducción del genoma viral para favorecer su replicación (Kanda et al., 2010, Perera et al., 2007). Asimismo, en VEMC se ha observado que 3C degrada al factor de traducción PABP como parte del sistema de regulación de la replicación viral (Kobayashi et al., 2012). En el RVH 3C altera el transporte, tanto activo como pasivo, núcleo-citoplasma (Ghildyal et al.,

2009), mientras que en CV-B3 proteoliza las proteínas MAVS y TRIF para atenuar la inducción de interferón tipo I y la señalización de apoptosis (Mukherjee et al., 2011).

Los residuos que constituyen el sitio catalítico de la proteína 3C de VFA han sido identificados (Grubman et al., 1995) y su estructura tridimensional resuelta (Birtley et al., 2005) (Figura I.6). La proteína 3C de VFA se detecta en el núcleo celular en forma de 3CD (Sánchez-Aparicio, 2010) y está implicada en la proteólisis de varias proteínas del núcleo celular como la histona H3, la proteína de unión a ARN Sam68 (Falk et al., 1990, Lawrence et al., 2012), los factores de traducción eIF4GI y eIF4A (Belsham et al., 2000) y NEMO (modulador esencial de NF- κ B) cuya degradación interfiere con la respuesta inmune innata de la célula hospedadora (Wang et al., 2012). Asimismo, la actividad proteasa de 3C se asocia con la fragmentación del Aparato de Golgi, la disrupción de la organización de la tubulina, y la ralentización de la formación de microtúbulos desde los centrómeros y del transporte dentro del Aparato de Golgi, lo que bloquea el transporte de proteínas hasta la membrana celular (Zhou et al., 2013).

A diferencia de lo descrito para PV o VAI, la proteína 3C de VFA no requiere estar unida a 3D, como 3CD, para desarrollar su actividad proteolítica (Ryan et al., 1989, Sasaki et al., 2012b). La ruptura del enlace entre 2BC y P3 se produce en las etapas iniciales de la traducción, siendo procesados posteriormente (postraduccionalmente) los precursores proteicos virales restantes (Figura I.2). Entre estas proteólisis posteriores, se encuentra la del precursor P1 que da lugar a las proteínas de la cápsida (Belsham, 2004, Ryan et al., 1989).

La expresión de 3C aislada es tóxica para la supervivencia celular (Martinez-Salas and Domingo, 1995), lo que ha dificultado el estudio de su funcionalidad *in vivo*.

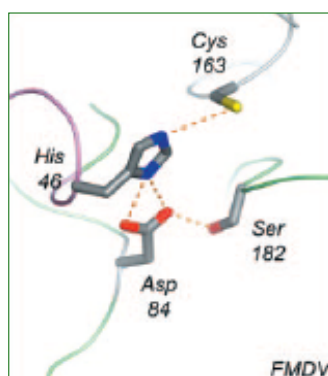


Figura I.6. Esquema de la estructura tridimensional del centro activo de la proteasa 3C de VFA. Los residuos H46, D84 y C163 junto con el residuo S182, que colabora en su estabilización, forman el centro activo del enzima (Birtley et al., 2005).

I.4 Replicones: Virus con el ciclo infeccioso truncado

Los replicones virales son ARN+ sub-genómicos que tienen la capacidad de auto-replicarse pero no de infectar nuevas células (Li et al., 2013). Estos replicones, contienen las secuencias correspondientes a las proteínas no estructurales esenciales para la replicación del genoma viral y, generalmente, carecen de las correspondientes a las proteínas estructurales, que son eliminadas o reemplazados por genes exógenos. Esta replicación no infecciosa proporciona una plataforma valiosa para el estudio de la función, estructura, replicación y traducción de genoma viral, así como para la expresión de proteínas foráneas y el desarrollo de nuevas vacunas (Kaplan and Racaniello, 1988, Young et al., 1988, Zhou et al., 1994). Debido a la incapacidad de encapsidar el ARN+ y liberar el virus al exterior, la infección y, por tanto, el efecto citopático (ECP) producido por los replicones no se expande por la monocapa celular (Figura I.7).

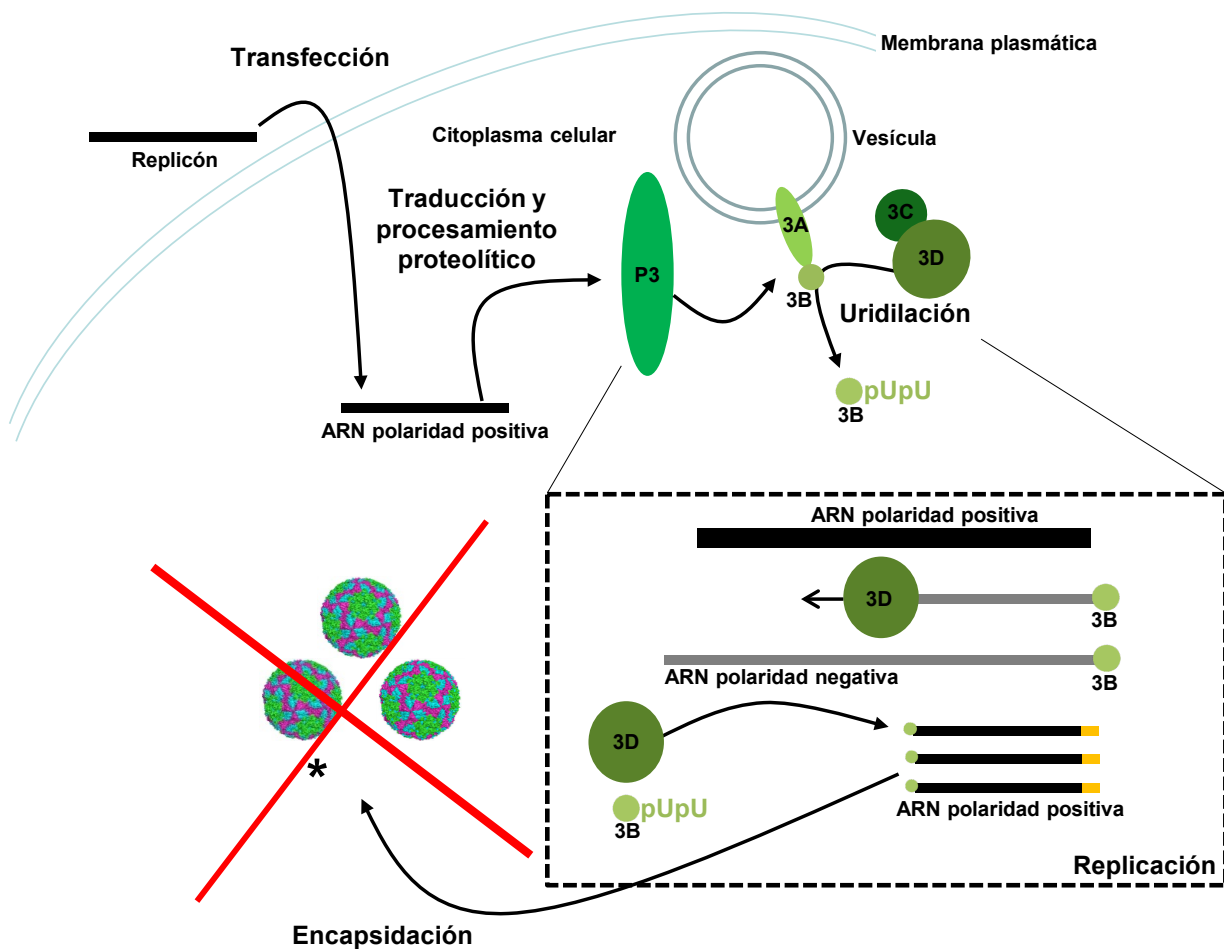


Figura I.7. Representación esquemática del ciclo replicativo no infeccioso de replicones de picornavirus. * La cruz roja indica que no se produce encapsidación, por ausencia de las PE en el replicón. Adaptación de (Postigo, 2009).

Con anterioridad, se habían construido replicones para otros picornavirus, como el de PV donde se deleccionaron grandes fragmentos de la región P1 (Kaplan and Racaniello, 1988). Se pretendía usarlos para estudiar la replicación y traducción del ARN_v, no obstante estas construcciones presentaban el inconveniente de que las mutaciones que afectan a la replicación o traducción del genoma viral son de difícil estudio en virus de un solo ciclo (Kaplan and Racaniello, 1988, Percy et al., 1992). Por ello, otros autores remplazaron el fragmento eliminado de la región P1 por el gen de la cloranfenicol acetil-transferasa (CAT), de tal forma que el nivel de actividad de CAT o la cantidad del enzima reflejasen de forma directa los niveles del ARN⁺ expresado por el replicón (Percy et al., 1992). En otros casos también se ha empleado el gen de la luciferasa para sustituir fragmentos de la región P1 (Johansen and Morrow, 2000). Asimismo, estas construcciones se han empleado para estudiar la encapsidación del ARN⁺ del replicón, mediante el empleo de virus *helper*, que complementen *in trans* las proteínas de la cápsida (Johansen and Morrow, 2000, McInerney et al., 2000, Percy et al., 1992).

En VFA se han construido replicones del serotipo O (O₁K), en los que delecciones en secuencias de la proteasa L y de las proteínas estructurales de la región P1, han sido reemplazados por el gen CAT (McInerney et al., 2000). Estos replicones permiten la detección tanto de proteínas virales como de actividad CAT. Con estas construcciones se ha comprobado que las proteínas estructurales de la región P1 no son esenciales en la replicación del ARN_v.

Por tanto, el empleo de replicones constituye una forma alternativa de estudiar las PNE del VFA y su implicación en la replicación y traducción del genoma viral, al tiempo que se evita el manejo de partículas virales infectivas.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Contribuir a conocer las implicaciones funcionales de proteínas no estructurales del VFA, mediante su expresión transitoria y la introducción de mutaciones en el ARN viral, así como mediante el empleo de replicones de ARN.

Objetivos parciales

1. Estudiar la relevancia de los residuos apolares M29 e I42 de la proteína 3A, que se predice están implicados en la estabilización de los dímeros que forma esta proteína, en la infectividad y capacidad replicativa viral.
2. Analizar el efecto sobre la infectividad y replicación del virus de la inserción de un residuo de Gly en la posición 151 de la proteína 3A que altera la secuencia diana de corte proteolítico 3A/3B por parte de la proteasa viral 3C.
3. Estudiar la expresión transitoria y la funcionalidad de proteínas correspondientes a los precursores 3ABC y P3.
4. Construir y caracterizar replicones del VFA.

Materiales y métodos

M.1 Líneas celulares y su manejo

La línea celular BHK-21, derivada de fibroblastos de riñón de hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) (Stoker and Macpherson, 1964) y permisiva para el VFA, fue adquirida a la American Type Culture Collection (ATCC).

Esta línea celular se creció en una atmósfera con 7% de CO₂ y 98% de humedad relativa, en medio DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco-BRL), penicilina G (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Al llegar a la confluencia, las células se despegaron de la superficie de cultivo mediante tratamiento con 0,05 mg/ml de tripsina (Difco) en 0,016% EDTA (Merck), y se subcultivaron, sin exceder los 30 pases, como está descrito (Sobrino et al., 1983).

La conservación de las células se realizó por congelación en nitrógeno líquido, previa resuspensión en un 90% de SFB con un 10% de DMSO (Sigma) (Celis, 1994).

M.1.1 Cuantificación de la supervivencia celular

Se emplearon células previamente despegadas de la superficie de cultivo mediante tratamiento con tripsina (Difco) 0,05 mg/ml en 0,016% EDTA (Merck), y tratadas con azul tripan 0,4% que fueron dispuestas en una cámara de Neubauer y cuantificadas como se describe en (Sambrook, 2001).

M.2 Virus y su amplificación en cultivos celulares

El virus estudiado fue el aislado C-S8c1 del VFA, clon biológico obtenido tras tres aislamientos sucesivos de placa de lisis producidas en células BHK-21 a partir del aislado viral de cerdo C Santa Pau Sp/70 (Santa Pau, Girona 1970). Este aislado es representativo del subtipo europeo (C1) del serotipo C de VFA (Sobrino et al., 1983).

El virus se creció en células BHK-21 (Domingo et al., 1980, Sobrino et al., 1983). Brevemente, se emplearon monocapas de células confluentes que fueron inoculadas con la cantidad de virus correspondiente a la multiplicidad de infección (m.d.i) deseada. Tras la aplicación del inóculo, las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera con 7% de CO₂ durante 1 h. Posteriormente, se retiró el inóculo y se añadió medio DMEM suplementado con SFB al 5%. Las monocapas celulares se incubaron hasta la aparición de ECP, momento en el que se recogió el medio sobrenadante (virus extracelular), o, alternativamente, las placas se sometieron a tres ciclos de congelación/descongelación para obtener tanto el virus extracelular como el intracelular (extracto total).

M.2.1 Transfección de ARN de VFA y estimación de su capacidad para producir virus infeccioso

Para determinar la infectividad de los diferentes ARNs de VFA producidos a partir del clon infeccioso pMT28, se empleó 1µg de ARN+ obtenido por transcripción *in vitro* (M.12) que fue transfectado en placas de 35 mm de diámetro (M.13.2). Las células transfectadas se cultivaron hasta la aparición de ECP completo, momento en el que se obtuvo el extracto celular total (células lisadas junto con el medio de transfección mediante tres ciclos de congelación/descongelación de las placas) que se almacenó a -70°C. En los casos en que no se apreció ECP completo, el cultivo se mantuvo hasta las 72 h post transfección (h.p.t) momento en el que se obtuvo el extracto total, ya que a tiempos posteriores el envejecimiento celular provoca alteraciones difíciles de distinguir del ECP. Se emplearon 200µl del extracto total obtenido en las distintas transfecciones, para infectar nuevas monocapas (primer pase seriado) que se incubaron hasta la aparición de ECP completo o, en su defecto, hasta las 72 h post infección (h.p.i), tiempos en los que los extractos totales se recogieron y emplearon para dar pases sucesivos.

M.3 Clones infecciosos

Se emplearon los siguientes clones infecciosos:

pMT28: Derivado del plásmido pGEM-1 que porta bajo el control del promotor SP6 el ADNc del genoma completo del VFA C-S8c1 (NºGenbank AJ133357). La secuencia del poli-C de la región RNC 5' contiene 35 residuos de citidina (el ARN+ de aislados naturales de VFA suele tener entre 100 y 420 residuos de citidina (Carrillo et al., 2005)) y la secuencia del poli-A de la región RNC 3', 25 adenosinas (García-Arriaza et al., 2004). En este plásmido, la secuencia correspondiente al VFA se encuentra flanqueada en los extremos 5' y 3' por los promotores de las ARN polimerasas SP6 y T7, respectivamente, así como por otras secuencias que son dianas únicas para los enzimas de restricción Nde I y Nhe I, empleados para la linealización del plásmido. Esta construcción permite la síntesis *in vitro* tanto de ARN+ mediante el uso del enzima ARN polimerasa SP6 (a partir del ADN linealizado con el enzima de restricción Nde I), como de ARN- con el enzima ARN polimerasa T7 (a partir del ADN linealizado con Nhe I). Este clon fue amablemente cedido por la Dra. Cristina Escarmís (CBMSO) (Figura M.1.A).

pMT28-∇G3A-□G, pMT28-∇G3A. Estos plásmidos son derivados de pMT28 (Postigo, 2009) que portan en los extremos de la secuencia correspondiente a la proteína 3A las mutaciones indicadas en la figura M.1.B

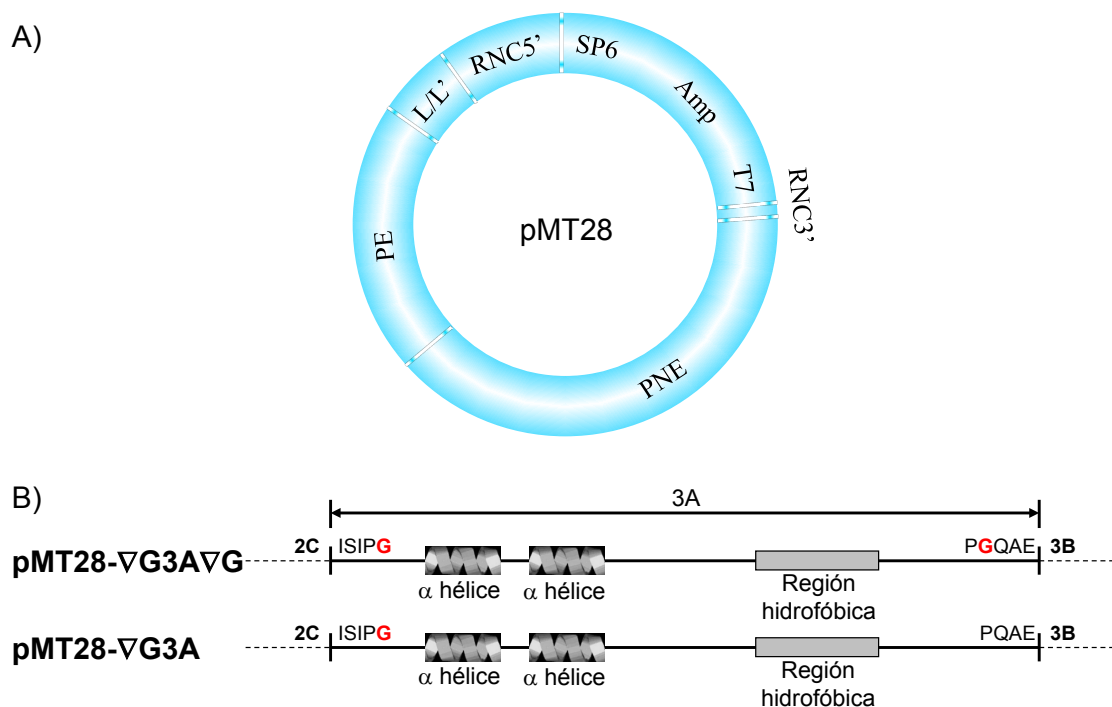


Figura M.1. Esquema del clon infeccioso pMT28 y de los mutantes pMT28-∇G3A-□G y pMT28-∇G3A. A) Representación esquemática del clon infeccioso pMT28 en donde se señalan los promotores de las ARN polimerasas SP6 y T7, y el gen que confiere resistencia a ampicilina. B) En el esquema se muestran las Gly (en rojo) introducidas en la secuencia aminoacídica de la proteína 3A y se señalan los residuos propuestos como parte de la secuencia de reconocimiento de la proteasa viral 3C para el procesamiento de 3A. Se indican, también, la localización de las estructuras secundarias en α -hélice y de la región hidrofóbica que se predice en esta proteína.

M.4 Cuantificación de la producción de partículas virales

M.4.1 Titulación

La determinación de la cantidad de VFA infeccioso se llevó a cabo mediante la estimación de las unidades formadoras de placa (UFP)/ml. Para ello se infectaron células BHK-21 (70-90% confluentes), crecidas en placas de 35 mm de diámetro ($\sim 1 \times 10^6$ células), a las que se retiró el medio sobrenadante, añadiéndose 200 μ l de las diluciones seriadas apropiadas de la muestra problema. Tras su incubación a 37°C durante 1 h, se retiró el inóculo y se añadió medio semisólido (agar al 0,5 % en DMEM, suplementado con un 1-4 % de SFB y DEAE-dextrano al 0,05%). Las células se incubaron hasta la aparición de placas de lisis (24 h). Las células se fijaron empleando una solución de formaldehído al 2% durante 1 h, se tiñeron con una mezcla de cristal violeta al 2% en formaldehído al 2% durante al menos 2 h y se cuantificaron.

M.4.2 Infectividad específica de los ARNs

La infectividad específica del ARN de VFA (UFP/ μ g ARN) se determinó transfectando monocapas de células BHK-21 (crecidas en placas de cultivo de 35 mm de diámetro al 50% de confluencia, según lo descrito en el apartado M.13.2) con diferentes cantidades de ARN+ viral sintetizado *in vitro* a partir de pMT28 o de sus derivados mutagenizados (M.12). Tras 4 h de incubación, se retiró el sobrenadante y las monocapas se procesaron para cuantificar las UFP producidas, como se describe en M.4.1.

M.5 Estimación de la concentración de ácidos nucleicos

La concentración de ácidos nucleicos se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) y/o por electroforesis en gel de agarosa en presencia de bromuro de etidio, mediante comparación de la intensidad de fluorescencia a la luz U.V., de las bandas problema con las de patrones de concentración y tamaño conocidos.

M.6 Producción y aislamiento de ADN plasmídico

Para obtener ADN plasmídico se cultivaron bacterias de *E. coli* DH5 α transformadas con el plásmido de interés en medio LB líquido suplementado con ampicilina (50 μ g/ml), durante toda la noche a 37°C. Las bacterias empleadas se obtuvieron a partir de colonias aisladas previamente en placas de agar suplementado con ampicilina, siguiendo la metodología convencional (Sambrook, 2001).

Para el aislamiento de bajas cantidades de ADN plasmídico se emplearon volúmenes de cultivo bacteriano de aproximadamente 1 ml. El ADN plasmídico se extrajo utilizando el kit miniprep (Promega), y se almacenó a 4°C hasta su uso. Para la obtención de cantidades mayores de ADN se partió de volúmenes cultivo bacteriano de hasta 500 ml y se utilizó el kit maxiprep (Promega). La concentración de ADN se determinó como se describe en M.5, almacenándose a -20°C.

M.7 Aislamiento de ARN

El ARN total, tanto de cultivos celulares como de tejidos de animales infectados, se extrajo empleando el reactivo Tri-Reagent (Sigma). Para ello, a 1 ml de reactivo se añadió 0,1 ml de sobrenadante celular o de macerado de tejido encefálico y muscular de ratón (ver M.22), procesándose las muestras conforme a las indicaciones del fabricante. El ARN extraído se resuspendió en 20 μ l de agua tratada con dietil pirocarbonato al 0,1% (H₂O-DEPC) y su

concentración se determinó como se describe en M.5, almacenándose en alícuotas de 2µl a -70°C.

M.8 Amplificación de ácidos nucleicos

M.8.1 RT-PCR

El ARN⁺ viral se amplificó por RT-PCR. Primeramente se sintetizó ADN_c a partir de ARN total, obtenido como se indica en M.7. Para ello, a la mezcla de reacción, conteniendo unos 500ng de ARN, se le añadieron 2,5 U de la retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina de Moloney (Applied Biosystems) y 20 U de RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega), incluyéndose un paso inicial de incubación a 48°C durante 30 min.

La amplificación por PCR se llevó a cabo empleando dos ADN polimerasas, BioTaq (Bioline) (1,25 U) y Pfu (Biotools) (0.15 U), junto con 100ng de ADN molde por ensayo, en un volumen final de 50 µl del tampón suministrado por el proveedor, suplementado con MgCl₂ 2mM, dNTPs (0,2mM cada uno) y los cebadores (Invitrogen) específicos para cada caso y referidos en la Tabla M.1, cada uno a una concentración final de 0,8 µM. Se emplearon las siguientes condiciones de amplificación: 2 min a 94°C, 40 ciclos (compuestos por los pasos siguientes: 30 s a 94°C, 1 min a la temperatura de hibridación estimada para cada par de cebadores, 30 s a 72°C) y, finalmente, 5 min a 72°C. Los fragmentos de ADN amplificados se purificaron eliminando los cebadores no incorporados durante la reacción, utilizando el sistema Gel and PCR Clean Up System (Promega).

M.8.2 PCR cuantitativa (QPCR)

El número de copias de ARN⁺ presentes en una muestra se determinó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Herrera et al., 2008, Rodríguez Pulido et al., 2009). Una vez extraído el ARN intracelular total (M.7) y estimada su concentración (M.5), se emplearon 500 ng de ARN total para obtener el ADN_c correspondiente al ARN⁺, empleando el kit Transcriptor RT (Roche) y 200 ng del cebador A (ver Tabla M.1), en un volumen final de 13 µl. La reacción se desarrolló a 55°C durante 30 min. Seguidamente, sobre 2 µl de la mezcla anterior se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real, utilizando el equipo “LightCycler” (Roche) y el kit LightCycler® FastStart ADN Master SYBER Green I (Roche), según las recomendaciones del fabricante. Para amplificar el ARN⁺ se emplearon 5 ng de cada cebador A y B en un volumen final de 10 µl del tampón proporcionado en el *kit*. El programa de PCR empleado fue: 95°C durante 10 min, 55 ciclos de amplificación (95°C durante 10 s; 55°C durante 5 s; 72°C durante 5 s), y un paso final de calentamiento a 65°C durante 15 s y de

desnaturalización a 95°C durante 10 min. Los cebadores A y B (Tabla M.1), hibridan con secuencias conservadas entre serotipos de la polimerasa viral 3D (Saiz et al., 2003).

La cuantificación del número de moléculas de ARN+ se realizó interpolando los valores de fluorescencia emitida durante la amplificación sobre una curva estándar, realizada en paralelo empleando diluciones seriadas de ARN+ obtenido por transcripción *in vitro* con el enzima SP6 a partir del plásmido pMT28 linealizado con Nde I (M.12). Las concentraciones de los transcritos de ARN+ empleadas en las curvas estándar estuvieron en el rango de 2×10^3 – 2×10^8 moléculas de ARN+/μl.

M.8.4 Cebadores

Tabla M.1: Oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de PCR, RT-PCR y QPCR.

Denominación	Secuencia ^a	Polaridad ^b	Posición ^c
3A-1 ^d	5' - gcgaagctttctagaatgatctcaataccttcc - 3'	S	5299
3A-2 ^d	5' - tatagttctggtaccttattcagcttgcggttg - 3'	A	5757
3AB-3 ^d	5' - tctagaagtaccttactcagtgacaatcaa - 3'	A	5970
3C2 ^e	5' - tctaggtaccttactcgtggtgcggttcagg - 3'	A	6609
3D2 ^e	5' - tctaggtaccttactcgtgcccgcacacggc - 3'	A	8019
3AF ^f	5' - tataagatctccgactcgtctccag - 3'	S	4197
3AR ^f	5' - tatacggaccg gcgtaagggtccc - 3'	A	5846
3A29dF	5' - ctgtgaggcgcgactacacgactcc - 3'	S	5373
3A29dR	5' - ggagtcgtgtactcgcctcctcaag - 3'	A	5397
3A29rF	5' - ctgtgaggcgcgactacacgactcc - 3'	S	5373
3A29rR	5' - ggagtcgtgtactcgcctcctcaag - 3'	A	5397
3A42dF	5' - ctccggcccctcgaccaacaacttc - 3'	S	5410
3A42dR	5' - gaagtttgtgtcggagggccggag - 3'	A	5435
3A42rF	5' - ctccggcccctcgaccaacaacttc - 3'	S	5410
3A42rR	5' - gaagtttgtgtcggagggccggag - 3'	A	5435
A ^g	5' - cacacggcgttcacca(a/t)cgc - 3'	A	7678
B ^g	5' - gacaaaggtttgttctgtg - 3'	S	7400

a) Los nucleótidos que se muestran subrayados corresponden a la secuencia del aislado de VFA C-S8c1 (ver c). Las secuencias diana de los enzimas de restricción se muestran en colores: Hind III (azul), Kpn I (verde), Bgl II (naranja), Rsr II (rosa). En rojo se indican los codones de iniciación (atg) y complementario inverso de terminación (tta) y en negrita las secuencias mutadas.

b) La secuencia correspondiente tiene la misma polaridad (S) o la inversa complementaria (A) que las secuencias del genoma a amplificar (ver c) y que las dianas de los enzimas de restricción.

c) La numeración se corresponde a la secuencia del VFA C-S8c1 (Nº Genbank AJ133357) e indica la posición del primer nucleótido del cebador desde el extremo 5' en la secuencia referida.

d) (García-Briones et al., 2006)

e) (Sánchez-Aparicio, 2010)

f) (Postigo, 2009)

g) (Saiz et al., 2003)

M.9 Aislamiento de fragmentos de ADN

El aislamiento de fragmentos específicos de ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Sambrook, 2001). Para la extracción del fragmento con el tamaño deseado del agar se utilizó el sistema Gel and PCR Clean Up System (Promega).

M.10 Clonajes moleculares

M.10.1 Mutaciones puntuales

Los distintos clones infecciosos mutantes en la secuencia de proteínas de la región P3 del VFA producidos para esta Tesis Doctoral se generaron empleando las técnicas de *overlap extensión* (Sambrook, 2001) o de sustitución. La ligación se llevó a cabo utilizando la ligasa del fago T4 y la solución tampón proporcionada por el fabricante (Promega) siguiendo protocolos estándares (Sambrook, 2001). Se utilizaron bacterias *E. coli* DH5 α [F-, RecA1, hsdR17, (rK-, mK-), LacZY, argF, U169, supE44, thil, gyrA96, relA1] (Hanahan, 1983), que fueron transfectadas siguiendo las indicaciones del Servicio de Fermentación del CBMSO.

M.10.1.1 Mutaciones introducidas por *overlap extensión*

Para obtener mutantes puntuales mediante esta técnica se diseñaron los cebadores denominados 3AF, 3AR, 1 y 2 (ver Figura M.2) que variaron según la mutación elegida, como se indica más adelante y en la Tabla M.1. La técnica se inició con dos amplificaciones del ADN mediante PCR, según el protocolo descrito en el apartado M.8.1. Una PCR (PCR 1) se realizó con los cebadores 3AF y 1 y la otra (PCR 2) con los cebadores 3AR y 2. Los cebadores 3AF y 3AR hibridan con una secuencia contenida en la región donde se realiza la mutación que presenta una diana de restricción aprovechable para el clonaje, Bgl II y Rsr II, respectivamente. Los cebadores 1 y 2, que hibridan entre si en la mayor parte de su secuencia, comparten también el nucleótido o los nucleótidos a sustituir, generadores de la mutación a introducir en cada caso (Figura M.2). De esta manera se amplificó la secuencia comprendida entre las dianas de restricción Bgl II y Rsr II en pMT28 y los nucleótidos implicados en la mutación puntual (Figura M.2). La integridad del ADN amplificado se comprobó mediante la separación de los distintos fragmentos por electroforesis en gel de agarosa y la concentración se determinó como se describe en M.5. A continuación se mezclaron cantidades equimoleculares (~50 ng) de cada uno de los fragmentos amplificados en la etapa previa, que sirvieron de molde para una tercera PCR, realizada con los cebadores 3AF y 3AR según lo descrito en el apartado M.8.1, en la que se generó el fragmento completo con la mutación introducida (Figura M.2). Este fragmento, previamente digerido con los mismos enzimas Bgl II y Rsr II, fue empleado para remplazar a su homólogo en el plásmido pMT28. Con esta estrategia se generaron los mutantes que se muestran la Tabla M.2 en la que también se indica los cebadores y moldes utilizados.

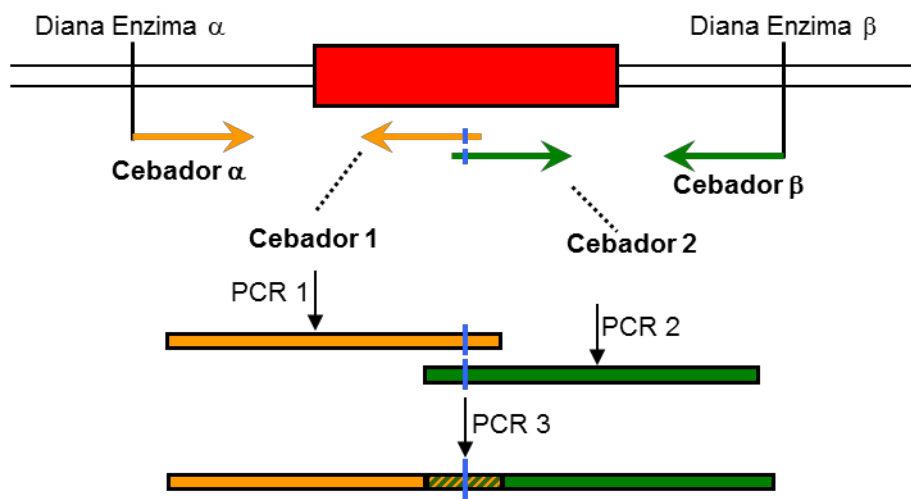


Figura M.2. Esquema de introducción de mutaciones puntuales en la secuencia de proteínas de la región P3. En la parte superior de la figura se representa la región del plásmido pMT28 que codifica la proteína donde se introducirá la mutación (segmento en rojo). Mediante las flechas naranjas y verdes se indican los cebadores empleados. Los rectángulos naranja y verde simbolizan la secuencia amplificada en cada PCR. En azul se indica la mutación introducida en cada caso.

Tabla M.2 Mutantes generados en la proteína 3A

Mutante	Posición	Aminoácido y triplete originales	Aminoácido y triplete mutados	Cebador ¹ 1	Cebador 2
pMT28-3A-M29D	29	Met (atg)	Asp (gac)	3A29dR	3A29dF
pMT28-3A-M29R	29	Met (atg)	Arg (cga)	3A29rR	3A29rF
pMT28-3A-I42D	42	Ile (atc)	Asp (gac)	3A42dR	3A42dF
pMT28-3A-I42R	42	Ile (atc)	Arg (cga)	3A42rR	3A42rF

¹Los cebadores se indican en la Tabla M.1

M.10.1.2 Mutaciones introducidas mediante sustitución

pMT28-3C-L151F. Construcción en la que el codón *ctc* que codifica Leu en la posición 151 de la proteína 3C del VFA se sustituyó por el codón *ttc* que codifica Phe. Se realizó por sustitución en pMT28 del fragmento resultante de los cortes con Rsr II y Cla I, por el fragmento homólogo obtenido a partir del plásmido pRSV/P3-3C-L151F, producido al clonar la secuencia correspondiente al precursor P3 en el vector pRSV como se indica en M.10.2 y R.3.1.

pMT28-3C-H181Y. Construcción en la que el codón *cac* que codifica His en la posición 181 de la proteína 3C se sustituyó por el codón *tac* que codifica Tyr. Se realizó por sustitución en pMT28 del fragmento resultante de los cortes con Rsr II y Bsr DI, por el fragmento homólogo obtenido a partir del plásmido pRSV/3ABC-3C-H181Y, producido al clonar la secuencia correspondiente al precursor 3ABC en el vector pRSV como se indica en M.10.2 y R.3.1.

pMT28-3C-S182F. Construcción en la que el codón *tct* que codifica Ser en la posición 151 de la proteína 3C se sustituyó por el codón *ttt* que codifica Phe. Se realizó por

sustitución en pMT28 del fragmento resultante de los cortes con Rsr II y Bsr DI, por el fragmento homólogo obtenido a partir del plásmido pRSV/3ABC-3C-S182F, producido como se indica en el párrafo anterior.

pMT28-3A-∇G. Construcción en la que se eliminó el codón de Gly que codifica la posición 5 de la proteína 3A de pMT28-∇G-3A-∇G, mediante sustitución del fragmento resultante de los cortes con Bgl II y Eco RI, por el fragmento homólogo obtenido a partir de pMT28.

M.10.2 Construcción de plásmidos derivados de pRSV portando proteínas de la región P3 del VFA

Se empleó el vector pRSV/L, que porta el gen de la luciferasa (L) bajo el control del promotor LTR del virus del sarcoma de rous (VSR), para el clonaje y la expresión individual de proteínas *wt* y mutadas de la región P3 (Tabla M.3). Para ello, las secuencias correspondientes fueron amplificadas por PCR a partir de pMT28 o sus versiones mutadas (pMT28-3A-M29D, pMT28-3A-M29R, pMT28-3A-I42D y pMT28-3A-I42R), como se describe en M.8.1, para lo que se emplearon los cebadores mostrados en la Tabla M.1 que introducen en el fragmento amplificado una diana Hind III en el extremo 5' y otra diana Kpn I en el extremo 3'. La secuencia amplificada fue primero introducida en el plásmido pGEMT-Easy del sistema clonaje intermedio pGEMT-Easy (Promega) y el fragmento deseado se rescató del plásmido pGEMT-Easy tras la digestión parcial con los enzimas Hind III y Kpn I. Una vez aislado el fragmento fue introducido en el vector pRSV, previamente digerido con estos mismos enzimas (Figura M.3). De esta manera se obtuvieron los plásmidos: pRSV/3A-M29D, pRSV/3A-M29R, pRSV/3A-I42D, pRSV/3A-I42R, pRSV/3ABC-3C-H181Y, pRSV/3ABC-3C-S182F y pRSV/P3-3C-L151F.

Tabla M.3: Clonajes realizados en pRSV

Proteína	Cebador ¹ con diana Hind III	Cebador con diana Kpn I
3A	3A-1	3A-2
3ABC	3A-1	3C2
P3	3A-1	3D2

¹ Los cebadores se indican en la Tabla M.1

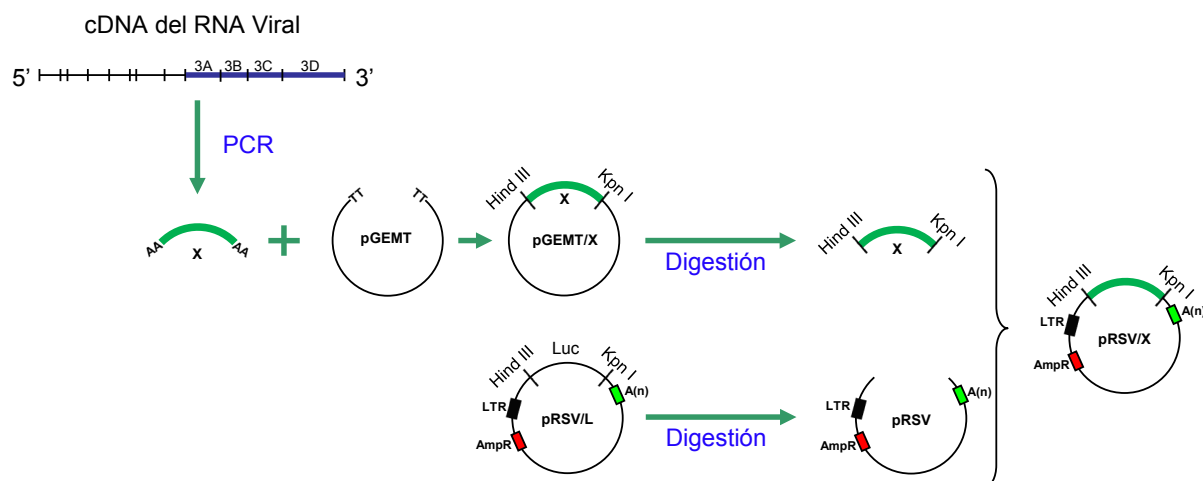


Figura M.3. Esquema del sistema de clonaje en pRSV. El plásmido pRSV/L (de Wet et al., 1987) porta la secuencia del gen de la luciferasa (L). Se señalan los sitios de restricción Hind III y Kpn I que permitieron la sustitución del gen de la luciferasa por las secuencias de interés. Se indican la situación de la señal de poliadenilación, A(n), derivada del virus SV40 y del gen de resistencia a ampicilina (AmpR).

M.11 Secuenciación

Las secuencias nucleotídicas se determinaron en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid, utilizando un secuenciador multi-capilar ABI Prism 3100, 3700, o 3730 (Applied Biosystems). Los ADNs a secuenciar fueron aislados como se detalla en M.6; los ARNs se aislaron y retrotranscribieron como se describe en M.7 y M.8.1, respectivamente. Los cebadores utilizados fueron los empleados en los respectivos clonajes, que flanquean los fragmentos clonados, así como cebadores que hibridan en el interior de estos fragmentos (Tablas M.1 y M.4). Para la secuenciación completa del genoma se utilizaron, además, los cebadores citados en la Tabla M.4. Las secuencias obtenidas fueron procesadas empleando el programa Chromas Pro (<http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>).

Tabla M.4: Oligonucleótidos empleados en secuenciación.

Nombre	Secuencia ^a	Polaridad ^b	Posición ^c
RSV-1	5' - <i>ttgtatttaagtgcctagct</i> - 3'	S	2643
RSV-2	5' - <i>taaatctctgtaggtagttt</i> - 3'	A	4522
SP6	5' - <i>tatttaggtgacaciatagaatac</i> - 3'	A	159
T7	5' - <i>taatacgcactcactataggg</i> - 3'	S	2999
SB1 ^d	5' - <i>ttgaaagggcgctagggtctcac</i> - 3'	S	1
SB2 ^d	5' - <i>tgaagggcggttcgggtgac</i> - 3'	A	367
SB3 ^d	5' - <i>taagttttaccgtctgtcccac</i> - 3'	S	368
NCR	5' - <i>gaaaggtgccgacctccggtcacc</i> - 3'	A	1020
SB5 ^d	5' - <i>acctctacacacacaaccaacacc</i> - 3'	S	1804
SB4 ^d	5' - <i>gttcatacccgaatgtgactcc</i> - 3'	A	2009
VP3-HSR ^e	5' - <i>ctagcgtccacaggtagccggagc</i> - 3'	A	3200
SB6 ^d	5' - <i>ctccacatctccagccaacttgagca</i> - 3'	A	3870
2BCF	5' - <i>gcgaagctttctagaatgcccttcttctctgac</i> - 3'	S	3883
2BD1 ^d	5' - <i>caaactgctctccagaatctc</i> - 3'	A	4189
2BCR	5' - <i>taggtaccctattgcttaaaaattgggtggcttgac</i> - 3'	A	5298
3C-I	5' - <i>gtactgctcatgcgtgtccaggtcc</i> - 3'	S	6537
3D-I	5' - <i>caggatccactcagcattcgggtgg</i> - 3'	A	7434

- a) Los nucleótidos que se muestran corresponden a la secuencia del aislado de VFA C-S8c1 (subrayados), de pRSV (en negrita y cursiva) o de pGEMT-Easy (en cursiva) (ver c). Las secuencias diana de los enzimas de restricción se muestran en colores: Hind III (azul), Kpn I (verde). En rojo los codones de iniciación (atg) y complementario inverso de terminación (tta).
- b) La secuencia tiene la misma polaridad (S) o la inversa complementaria (A) que las secuencias del genoma a amplificar (ver c) y que las dianas de los enzimas de restricción.
- c) La numeración se corresponde a la secuencia del VFA C-S8c1 (N° Genbank AJ133357), de pGEMT-EASY (Promega) o de pRSV/L (de Wet et al., 1987) e indica la posición del primer nucleótido del cebador desde el extremo 5', en la secuencia referida.
- d) (Rodríguez Pulido, 2009)
- e) (Martín-Acebes, 2009)

M.12 Transcripción *in vitro*

El ADN del plásmido pMT28 y de cualquiera de los mutantes o replicones derivados de él, fue linealizado mediante digestión con el enzima Nde I, que corta en el nucleótido posterior al último de la secuencia genómica de VFA (García-Arriaza et al., 2004). En el caso del replicón pT7Rep y las quimeras de él derivadas, el ADN fue linealizado empleando el enzima Hpa I que corta en el nucleótido posterior al último que corresponde a la secuencia genómica del VFA (McInerney et al., 2000). La transcripción se llevó a cabo en la siguiente mezcla de reacción: rNTPs (2,5 mM cada uno), DTT 5 mM, 80 U de RNAsin (Promega), 80 U de polimerasa SP6 (NEB) y 1 µg de ADN molde linealizado, en un volumen final de 120 µl del tampón recomendado para la polimerasa, suplementado con 10mM de MgCl₂. En todo momento, se utilizó H₂O-DEPC (Sambrook, 2001). La incubación se realizó a 37°C durante 3h, transcurridas las cuales se añadió a cada muestra 10U DNAsa RQ1 (Promega) incrementando el volumen final hasta 240 µl con el mismo tampón de la polimerasa. Las muestras se incubaron a 37°C durante 1 h 30 min, tras lo que el ARN se precipitó en etanol en presencia de acetato sódico 3M y se resuspendió en H₂O-DEPC. La integridad del ARN sintetizado se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa, estimándose el tamaño del ARN por comparación con patrones de ARN de tamaño conocido (Invitrogen). La estimación de la cantidad del ARN se realizó como se describe en M.5.

M.13 Transfección de cultivos celulares

M.13.1 Transfección con ADN

Se utilizaron células BHK-21 o VERO (70-80 % de confluencia) sembradas el día previo en placas de 35, 60 o 100 mm de diámetro, que se transfectaron con 1, 2 o 4 µg del plásmido de interés, respectivamente. Para ello se empleó Lipofectamina Plus Reagent (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Tras 3h de incubación a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 7%, el medio transfectante fue reemplazado por DMEM suplementado

con 5% de SFB. Las células se incubaron como anteriormente durante el tiempo indicado en cada caso.

M.13.2 Transfección con ARN

Se emplearon diferentes cantidades de ARN+ transcrito *in vitro* a partir de pMT28 y sus derivados para transfectar células BHK-21 (\approx 50% de confluencia) sembradas el día previo en placas de 35 mm de diámetro. Como vehículo de la transfección se utilizó lipofectina (Invitrogen), siguiéndose las indicaciones del fabricante. Tras 4 h de incubación a 37°C en una atmósfera con 7% CO₂, se retiró el medio de transfección, se lavaron dos veces las monocapas celulares con medio DMEM y se añadió medio suplementado con SFB al 5%. Las células se mantuvieron en las mismas condiciones el tiempo indicado en cada caso.

M.14 Traducción *in vitro*

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ l, incluyendo 7 μ l de lisado de reticulocitos de conejo (Promega), 1 μ g de ARN+ molde sintetizado *in vitro* a partir de cada plásmido de interés, 1 μ l de la mezcla de aminoácidos sin Met y 14,3 μ Ci, en 1 μ l, de una mezcla de Met y Cys marcadas con ³⁵S (Amersham). Cada reacción se incubó durante 1 h a 30°C y posteriormente se trató con 1 μ l de ARNasa A (50 mg/ml) durante 15 min a temperatura ambiente para eliminar el molde de ARN+.

M.15 Preparación de extractos celulares

M.15.1 Células eucariotas

Se emplearon monocapas de células BHK-21 o VERO a las que se les retiró el medio de cultivo, se lavaron 2 veces con PBS (K₂HPO₄ 1,5mM, Na₂HPO₄ 8,1mM, NaCl 137mM, KCl 2,7mM) y se lisaron por incubación durante 20 min en hielo con tampón de lisis (Hepes pH 7,4 20mM, EDTA 10 mM, MgCl₂ 2,5 mM, NP40 1%), suplementado con la cantidad indicada por el suministrador de un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche) y fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 1mM. La suspensión celular se sonicó durante 5 min, almacenándose a -20°C. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

M.15.2 Bacterias

Se crecieron bacterias *E. coli* DH5 α portadoras del plásmido de interés en medio LB líquido con ampicilina (50 μ g/ml) a 37°C durante toda la noche con agitación. El cultivo bacteriano se recogió y centrifugó (14000 \times g) durante 15 min a 4°C. El precipitado de bacterias obtenido se resuspendió en tampón TM (0,02M Tris pH 7,2, 0,1M MgCl₂) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche), y se sonicó a 50 W durante 15 min en ciclos de 0,5 s. El homogenado se almacenó a -20°C. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

M.16 Fraccionamiento celular

La separación de la fracción celular enriquecida en proteínas citoplasmáticas solubles de aquella enriquecida en componentes nucleares y membranas asociadas al núcleo se realizó como se ha descrito (García-Briones et al., 2006). Para ello se emplearon células BHK-21 crecidas al 70-80% de confluencia en placas de 60 mm de diámetro, que habían sido previamente infectadas o transfectadas. Las células se lavaron con PBS y, sobre hielo, se despegaron de la placa con raspadores de silicona, resuspendiéndose en 1ml de PBS. La suspensión celular se centrifugó (110 \times g) durante 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 500 μ l de 0,25 M Sacarosa en tampón A (50mM Tris pH 7,5, 5mM EDTA, 1mM MgCl₂, 0,5% Tritón X-100), suplementado en el momento de uso con 1mM PMSF y con la concentración indicada por el proveedor de un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche). La suspensión se homogenizó pasándose 30 veces a través de una aguja 20G y se desagregó durante 5 min en un sonicador de inmersión. La suspensión resultante (homogenizado total) se centrifugó (440 \times g) durante 20 min a 4°C. El sobrenadante (conteniendo la fracción citoplasmática), y el precipitado conteniendo mayoritariamente la fracción nuclear (que se lavó cuatro veces para eliminar los restos citoplasmáticos con 0,25 M sacarosa en tampón A y se resuspendió en tampón A), se almacenaron a -20°C. La concentración de proteína en las diferentes fracciones se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

M.17 Análisis electroforético de las proteínas

Las muestras a analizar se llevaron a SDS 2%, glicerol 11,6%, DTT 0,1 M, Tris-HCl pH 6,8 160mM y azul de bromofenol 0,033% (tampón Laemli), se calentaron a 99°C durante 5 min y se cargaron en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) a la concentración de poliacrilamida indicada en cada ensayo (Sambrook, 2001). Para ello se empleó el sistema

MiniProtean 3 (Bio-Rad). Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron con coomasie blue (0,025%), metanol (40%) y ácido acético (7%)(Sambrook, 2001) y se secaron a 80°C en vacío durante 1 h para determinar proteínas totales por tinción, o para analizar la radiactividad incorporada a las mismas. Alternativamente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa para su análisis en ensayos de *western blot* (*wb*) (M.18.1).

M.18 Inmunoensayos

En los diferentes inmunoensayos llevados a cabo en este trabajo se emplearon los anticuerpos que se indican en la Tabla M.5.

Tabla M.5: Anticuerpos empleados.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Especie</i>	<i>Tipo^a</i>	<i>Referencia/Proveedor</i>
SD6	VP1	Ratón	Amc	(Mateu et al., 1987)
1C8 ^b	2C	Ratón	Amc	(Garcia-Briones et al., 2006)
2C2 ^b	3A	Ratón	Amc	(De Diego et al., 1997)
163	3A	Conejo	Apc	(R. Armas Portela, sin publicar)
1F8 ^b	3B	Ratón	Amc	(Garcia-Briones et al., 2006)
2D2 ^b	3C	Ratón	Amc	(Garcia-Briones et al., 2006)
E56	3D	Conejo	Apc	(Strebel et al., 1986)
4B12 ^b	3D	Ratón	Amc	(Garcia-Briones et al., 2006)
α -Tubulina	β II Tubulina	Conejo	Apc	(Armas-Portela et al., 1999)

a) Amc: anticuerpo monoclonal; Apc: anticuerpo policlonal; Suero: suero hiperinmune de un cerdo infectado con VFA de serotipo C y reinfestado con VFA de serotipo O. Excepto α Tubulina, todos los anticuerpos reconocen proteína/s de VFA

b) Cedidos amablemente por E. Brocchi (IZSLE, Brescia, Italia)

Como anticuerpos secundarios se utilizaron sueros anti-inmunoglobulinas de ratón o de conejo acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) (Amersham); en el caso del suero hiperinmune de cerdo se empleó proteína A acoplada a HRP (Invitrogen). Los anticuerpos secundarios anti-anticuerpo de ratón o de conejo acoplados a los fluorocromos Alexa fluor 488 o 594 empleados fueron adquiridos a Molecular Probes (Invitrogen). Para disminuir reacciones inespecíficas, algunos anticuerpos se pre-incubaron durante 1 h con un extracto de células BHK-21 (M.15.1) a temperatura ambiente en agitación o con células BHK-21 crecidas sobre un cubreobjetos (M.18.2) a una dilución inferior a la dilución final empleada.

M.18.1 *Western-Blot* (*wb*)

La identificación de las proteínas separadas en geles de SDS-PAGE se realizó mediante la técnica de *wb*. Una vez finalizada la electroforesis (M.17), las proteínas del gel se transfieren en medio líquido a una membrana de nitrocelulosa (Protran Whatman) durante 35 min a 60 V en el sistema MiniProtean 3. Tras comprobar la correcta transferencia de las proteínas por tinción con rojo Ponceau, las membranas se trataron para bloquear la reactividad inespecífica con leche en polvo desnatada (Nestlé) al 3% en PBS durante 1 h a temperatura

ambiente y con agitación. A continuación se añadió el anticuerpo primario correspondiente (dilución 1/200 a 1/1000, dependiendo del anticuerpo) en leche en polvo desnatada al 3% en PBS, incubándose la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente o 16 h a 4°C. Transcurrido ese tiempo, las membranas se lavaron tres veces con PBS-tween 20 0,05%, se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (dilución 1/2500) y volvieron a ser lavadas como en el paso anterior. La presencia de proteína reactiva frente al anticuerpo primario se detectó mediante la quimioluminiscencia producida por la peroxidasa sobre un sustrato específico, para lo que la membrana se trató con los reactivos del kit ECL (Perkin Elmer) siguiendo las indicaciones del fabricante, exponiéndose a películas de revelado Curix RP2 (AGFA). El análisis por densitometría de las señales detectadas se realizó mediante el empleo del programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) previa digitalización de las películas con un escáner GS-800.

M.18.2 Inmunofluorescencia

Las células se crecieron sobre cubreobjetos de vidrio colocados en la base de placas de cultivo (M.1). Tras retirar el medio de cultivo, las monocapas se lavaron tres veces con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS y se permeabilizaron por tratamiento con BPTG (1% BSA, 0,1% Triton-X 100, 1 M glicina en PBS) durante 15 min. Las células permeabilizadas se incubaron con el anticuerpo primario diluido en 1% BSA en PBS durante 1h a temperatura ambiente en cámara húmeda. A continuación, se lavaron tres veces con PBS, se incubaron 30 min con el anticuerpo secundario diluido en PBS-1% BSA, volviendo a lavarse. Los núcleos se tiñeron con una dilución 1/500 de To-Pro3 (Molecular Probes, Invitrogen), o con 1µg/ml de DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindol, Molecular Probes, Invitrogen). La preparación obtenida se lavó 3 veces con PBS y se montó en portaobjetos (Menzel-Glässer, Thermo Scientific) con Fluoromont-G (Southern Biotechnology Assoc.), almacenándose a 4°C en oscuridad hasta su observación al microscopio.

M.19 Microscopía

M.19.1 Microscopía de fluorescencia convencional

Las muestras preparadas como se indica en M.18.2 se observaron en un microscopio de epifluorescencia BX61 (Olympus) (objetivos 60×/AN 1.25, 100×/AN 1.3) equipado con los filtros de excitación adecuados y acoplado a una cámara digital DP70 (Olympus). El software utilizado para adquirir las imágenes fue el DPController 1.1.1.65 (Olympus). Alternativamente, se utilizó un microscopio Axioskop (Zeiss) equipado con un objetivo Plan-Neofluar 63× (AN

1.25) acoplado a una cámara digital Coolsnap FX monocroma (Roper Scientific), empleando el programa RS Image 1.9.2 (Roper Scientific). En ambos casos, las imágenes fueron procesadas utilizando los programas Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc.) o Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

M.19.2 Microscopía de fluorescencia confocal

En este caso, las células se analizaron con un sistema confocal de barrido láser LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) (objetivo Plan-Apochromat 63×/AN 1.4). Las imágenes fueron adquiridas con el software Zeiss LSM510 4.2 Sp2 (Zeiss). Para el procesamiento de las imágenes, se utilizaron los programas Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc.) y LSM Image Browser 4.2.0.121 (Zeiss).

M.20 Estimación de radioactividad incorporada

M.20.1 Autorradiografía de SDS-PAGE

Las proteínas presentes en las alícuotas de las reacciones de traducción *in vitro* (M.14), se separaron mediante SDS-PAGE al 10-15%, que se llevó a cabo con voltaje constante (100V). El gel se trató con Amplify (Amersham) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación para incrementar la detección de la marca radiactiva y se secó a 80°C en vacío durante 1 h. El gel seco se expuso a películas de revelado Curix RP2 (AGFA).

M.21 Tratamientos y mediciones enzimáticas

M.21.1 Medición del nivel de expresión del gen CAT

Para la estimación del nivel de expresión del gen CAT se empleó un ensayo de su actividad enzimática (Martinez-Salas et al., 1993). Para ello, células BHK-21 crecidas hasta semiconfluencia en placas de 35mm de diámetro de diámetro se transfectaron con la cantidad adecuada de ARN+ transcrito *in vitro* (M.12) del replicón a ensayar. Tras retirar el medio de cultivo, y sobre hielo, las monocapas se lavaron los veces con PBS y se levantaron con ayuda de un raspador de goma en 100µl/ pocillo de buffer de resuspensión (NP40 0,5%, NaCl 120mM y Tris-HCl pH 7,8 50mM). El extracto celular obtenido se centrifugó a 12.900g durante 5 min y se recogió el sobrenadante, que fue en el que se midió la actividad CAT. Se ensayaron las diluciones apropiadas de extracto para que los valores obtenidos estuviesen en el rango lineal del ensayo. A una alícuota de 1 µl de la dilución escogida se le añadieron 50 µl de la mezcla de reacción (5 µl de Tris-HCl pH 7,8 1M, 0,5 µl de AcetilCoa 1mM, 1 µl de Cloranfenicol 50mM

en etanol, 0,1 µl de H³-AcetilCoA y 43,4 µl de agua). Las mezclas se incubaron 2 h a 37°C y la reacción se frenó añadiendo 200 µl de borato sódico pH 9 0,1M. Tras añadir 1ml de líquido de centelleo (Ecosin) y agitar 15 min en vórtex la radiactividad se determinó (c.p.m.) en un contador de centelleo modelo 1209 Wackbeta (Wallac).

M.22 Ensayo de letalidad en ratón lactante

Los ensayos de letalidad en ratón lactante se realizaron en el animalario de nivel de bioseguridad 3 (BSL3) del Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), con el asesoramiento y apoyo de los Dres. Miguel Rodríguez-Pulido, Belén Borrego y Margarita Saiz. Para el ensayo, se utilizaron ratones Swiss de 7 a 9 días de edad. Los ratones se inocularon intraperitonealmente con la cantidad elegida de cada ARN⁺ en un volumen final de 100 µl de PBS, que contenía 20 µl de lipofectina. Durante 7 días se llevó a cabo un seguimiento diario del estado de los animales, evaluando la aparición de síntomas de la enfermedad, muertes o desapariciones. Se consideran signos indicadores de la aparición de la enfermedad la incapacidad motora parcial o parálisis total de las extremidades inferiores y la presencia de temblores e incapacidad para incorporarse. Aquellos ratones que desarrollaron signos clínicos severos fueron sacrificados mediante dislocación cervical, para evitar su sufrimiento y se guardaron congelados a -70°C. Para analizar la presencia del ARN^v se obtuvo un macerado de tejidos encefálico y muscular, previamente congelados en nitrógeno líquido, en 0,6 ml de PBS. El macerado se pasó a través de un filtro de 0,45 micras, extrayéndose el ARN como se describe en M.7. Con el ARN obtenido se realizó una RT-PCR para detectar la presencia de ARN⁺ con los cebadores A y B, descritos en la Tabla M.1, que permiten el diagnóstico de VFA con alta sensibilidad (Saiz et al., 2003).

M.23 Construcción de replicones del VFA de serotipo C

M.23.1 Replicones RepMTS/L y RepMTC/L

Preparación del vector.

Para la construcción de los replicones RepMTS/L y RepMTC/L se linealizó el clon infeccioso pMT28 mediante digestión completa con la enzima de restricción Avr II y el aislamiento de la banda de ADN linealizado (M.9). El ADN recuperado se sometió a digestión parcial con la enzima Ase I, aislándose del gel de agarosa la banda de peso molecular que correspondía al ADN del pMT28 sin el fragmento comprendido entre el sitio Ase I del final de RNC 5' (a 6 nucleótidos del final del mismo) y el sitio Avr II presente en la secuencia codificante del extremo C-ter de VP1 (a 78 nucleótidos del final del mismo). En el vector así

digerido se insertó mediante ligación estándar (M.10.1) con fragmentos que contenían el gen CAT completo (replicón RepMTS/L) o la secuencia de la proteína L completa seguida del gen CAT carente de la secuencia codificante de sus primeros cuatro aminoácidos (replicón RepMTC/L). La obtención de estos fragmentos se detalla en los siguientes párrafos.

Preparación del fragmento conteniendo el gen CAT.

Mediante PCR (M.8.1) se amplificó el gen CAT, tomando como molde el ADN del pBIC (Martinez-Salas et al., 1993), para lo que se emplearon los cebadores RepSL7 y RepSL8 (Tabla M.6) que contienen las secuencias dianas de las enzimas Ase I y Avr II, respectivamente. El fragmento obtenido fue digerido con las enzimas Ase I y Avr II y ligado al vector obtenido a partir del pMT28 tratado con Ase I y Avr II como se indicó arriba, para formar el RepMTS/L en el que la secuencia del gen CAT (salvo su codón stop como se explica en R.4.2) reemplaza a la de las proteínas L, VP4, VP2, VP3 y al extremo C-ter de VP1.

Preparación del fragmento conteniendo la secuencia de la proteína L y el gen CAT.

Mediante PCR se amplificó primero la secuencia codificante de la proteína L a partir de ADN de pMT28, empleando los cebadores RepL1 y RepL2 (Tabla M.6), que contienen las secuencias dianas de las enzimas Ase I y Pvu I, respectivamente, dianas que están ausentes en el fragmento L-CAT. El fragmento amplificado con estos cebadores contiene la secuencia codificante completa de la proteína L, seguida de los 9 nucleótidos iniciales de VP4 y a continuación de la secuencia diana para Pvu I. Por otra parte, se amplificó por PCR, tomando como molde el ADN del pBIC (Martinez-Salas et al., 1993), la secuencia del gen CAT con los cebadores RepL5 y RepSL8 (Tabla M.6+), que contienen las secuencias diana de las enzimas Pvu I y Avr II, respectivamente. El fragmento amplificado con estos cebadores contiene los 9 nucleótidos iniciales de VP4 seguidos del gen CAT incompleto, al que faltan los 12 primeros nucleótidos y el codón de stop (ver R.4.2).

Los dos fragmentos anteriores fueron digeridos con PvuI, purificados, ligados y el ADN no ligado eliminado usando columnas de exclusión (Centricón). El fragmento resultante (conteniendo las secuencias L-CAT) fue amplificado con los cebadores, ya mencionados, RepL2 y RepSL8. El nuevo fragmento obtenido fue digerido con las enzimas Ase I y Avr II, y ligado al vector obtenido a partir del pMT28 tratado con Ase I y Avr II como se indicó anteriormente, para obtener el RepMTC/L.

M.23.2 Replicones RepMTS/L-3D-D388A y RepMTC/L-3D-D388A

Los replicones RepMTS/L-3D-D388A y RepMTC/L-3D-D388A se obtuvieron por sustitución del fragmento menor obtenido por digestión con las enzimas de restricción Cla I y Nde I (Sambrook, 2001) de los replicones RepMTS/L y RepMTC/L, por el fragmento análogo obtenido por digestión con las enzimas Cla I y Nde I del clon infeccioso pMT28d3 que porta la mutación 3D-D388A que provoca que sea defectivo en replicación (Arias et al., 2005).

Tabla M.6: Oligonucleótidos empleados en la construcción de replicones de VFA de serotipo C.

Nombre	Secuencia ^a	Polaridad ^b	Posición ^c
RepL1	5' - <u>gcac</u> tttcctttaca <u>atta</u> tgacc - 3'	S	1011
RepL2	5' - ccttg <u>cgatcg</u> cccagctcccttgagc - 3'	A	1650
RepL5	5' - ccttg <u>cgatcg</u> atcaactggatatacc - 3'	S	-
RepSL7	5' - ttaca <u>atta</u> tgaccct <u>atg</u> gagaaaaaate - 3'	S	1022
RepSL8	5' - <u>atcg</u> gcctaggcgccccgccctgccaactc - 3'	A	3767

a) Los nucleótidos que se muestran subrayados corresponden a la secuencia del serotipo C-S8 del VFA (ver c). Las secuencias diana de los enzimas de restricción se indican en colores: Ase I (azul), Pvu I (verde), Avr II (naranja). En rojo se indican los codones de iniciación (atg) y en negrita las secuencias pertenecientes al gen CAT.

b) La secuencia tiene la misma polaridad (S) o la inversa complementaria (A) que las secuencias del genoma a amplificar (ver c) y que las dianas de los enzimas de restricción.

c) La numeración corresponde a la secuencia de VFA (Nº Genbank AJ133357) e indica la posición del primer nucleótido del cebador desde el extremo 5' en dicha secuencia.

M.24. Alineamiento de secuencias.

Se empleó el programa Jalview, para alinear todas las secuencias aminoacídicas disponibles en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) para la proteína 3A del VFA y calcular el porcentaje de conservación de sus residuos.

M.25 Métodos estadísticos y tratamiento de datos

Los valores representados en las gráficas corresponden a la media de al menos dos determinaciones independientes \pm el valor de la desviación típica. Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza realizando un contraste de medias basado en la t de Student. Para ello, se empleó el programa informático SPSS (versión 20).

Resultados

R.1 Estudio de mutantes en la interfaz de dimerización de la proteína 3A

La proteína 3A es capaz de interactuar con otras proteínas tanto virales como celulares y tiene la capacidad de formar dímeros intermoleculares y antiparalelos cuya función biológica se desconoce (I.3.1.1). Por homología con proteínas 3A de otros picornavirus se predice la existencia de 2 α -hélices, localizadas entre los residuos 25-33 y 37-44 de la secuencia aminoacídica de 3A, que formarían una interfaz de dimerización. En este modelo, las interacciones hidrofóbicas establecidas entre los residuos M29-L41, M29-I42 y L38-L38 contribuyen de manera importante a la estabilidad del dímero.

Como se comenta en la Introducción (I.3.1.1), trabajos llevados a cabo en el laboratorio simultáneamente a la realización de esta Tesis Doctoral indicaban que: i) los reemplazamientos L38E y L41E disminuían la capacidad de la proteína 3A expresada transitoriamente para formar dímeros detectables en PAGE, y ii) las substituciones L38E, L41E y, en mayor medida, la doble mutación L38EL41E reducían la interacción intermolecular (señal de dimerización) de la proteína en un ensayo de ligación por proximidad. Así mismo, los virus recuperados a partir de ARNs virales con los reemplazamientos L41E y L38E contenían mutaciones que restauraban el carácter hidrofóbico de estas posiciones (E38V y E41A) (Gonzalez-Magaldi et al., 2012). En esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo experimentos encaminados a la caracterización funcional de los residuos M29 e I42 de la proteína 3A que, como se comenta en la Introducción (I.3.1.1.1), se predecía que estaban también implicados en las interacciones hidrofóbicas que median su dimerización. El residuo M29 se encuentra altamente conservado (99%) entre distintas secuencias de VFA (M. 24). Asimismo, el residuo de la posición 42 mantiene su carácter hidrofóbico en todas las secuencias de 3A publicadas, siendo en un 84% de los casos una Ile.

Se decidió pues, construir y estudiar virus y plásmidos que expresaran versiones de la proteína 3A con diferentes sustituciones en los residuos M29 e I42. Para ello se aplicó un abordaje similar al previamente utilizado (Gonzalez-Magaldi et al., 2012), sustituyendo cada uno de estos residuos apolares por otros que presentaran carga neta positiva o negativa.

R.1.1 Clones infecciosos con mutaciones en las regiones de α -hélice implicadas en la interfaz de dimerización de 3A

El ARN transcrito a partir del clon infeccioso pMT28 (ARN *wt*), que contiene la secuencia completa del aislado de VFA C-S8c1, es infeccioso en cultivos celulares susceptibles a VFA (García-Arriaza et al., 2004, Postigo, 2009, Martín-Acebes et al., 2010). Aprovechando

esta característica, se construyeron los plásmidos pMT28-3A-M29D, pMT28-3A-M29R, pMT28-3A-I42D y pMT28-3A-I42R (Figura R.1.1) mediante mutagénesis dirigida a partir de pMT28, (M.10.1.1). El análisis de la secuencia nucleotídica de la región codificante de 3A de los plásmidos mutantes construidos (ver M.11), confirmó la presencia de las sustituciones esperadas.

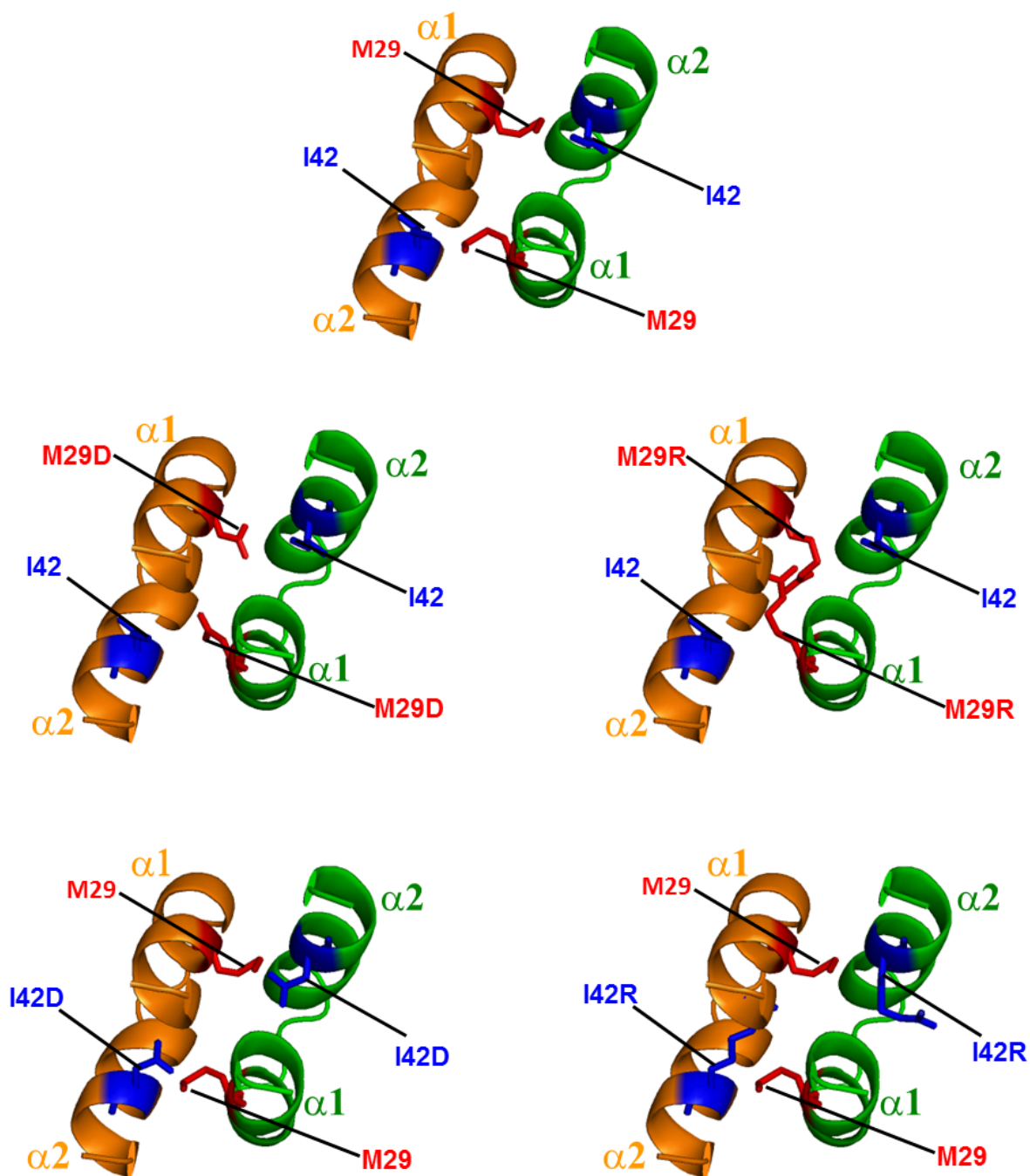


Figura R.1.1. Localización de las diferentes mutaciones introducidas en la proteína 3A de pMT28. En la parte superior se muestra el modelo del dímero antiparalelo formado por la interfaz hidrofóbica de dos moléculas de 3A de VFA C-S8c1 (indicadas en naranja y verde, respectivamente), destacándose los residuos M29 (rojo) e I42 (azul), así como los elementos de

estructura $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Los modelos correspondientes a los 4 mutantes construidos se muestran más abajo. Extraído y adaptado de (Gonzalez-Magalaldi et al., 2012).

Para comprobar la capacidad de los diferentes ARNs obtenidos por transcripción *in vitro* (M.12) de sintetizar proteínas virales se llevaron a cabo experimentos de traducción *in vitro* en lisados de reticulocitos (ver M.14).

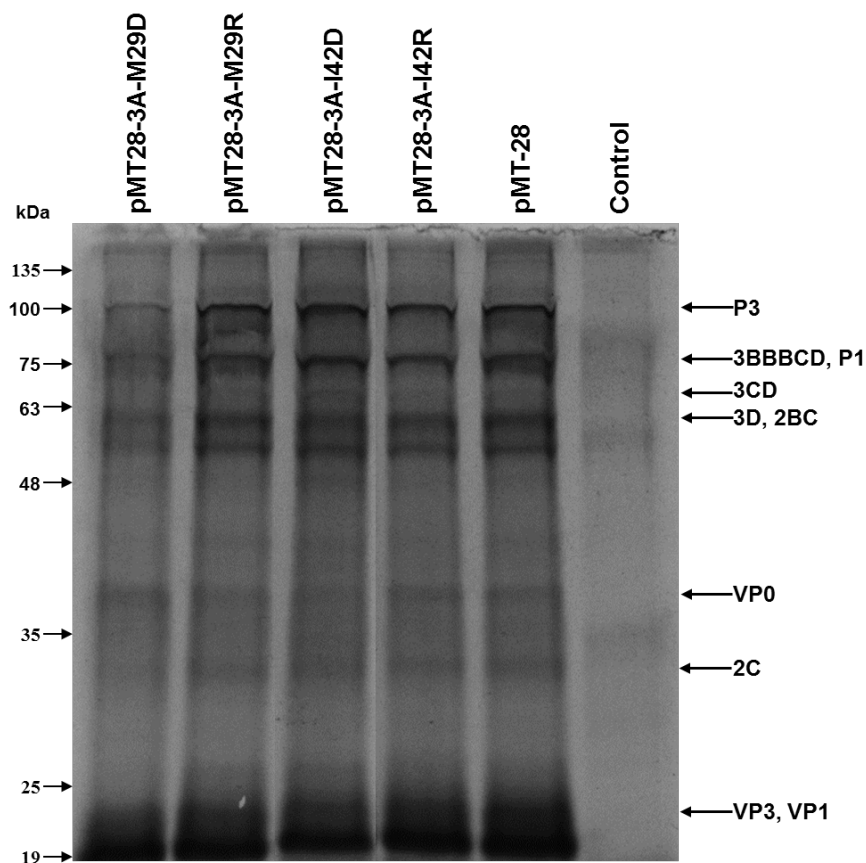


Figura R.1.2. Proteínas del VFA sintetizadas *in vitro* a partir del ARN de pMT28, pMT28-3A-M29D, pMT28-3A-M29R, pMT28-3A-I42D y pMT28-3A-I42R. Autorradiografía de SDS-PAGE (10%) de muestras de proteínas marcadas con ^{35}S obtenidas por traducción en un lisado de reticulocitos (M.14) de transcritos obtenidos *in vitro* a partir de las construcciones indicadas. En cada caso se cargaron 1,1 μCi por pocillo. La migración de los marcadores proteicos (en KDa) se indica mediante flechas en el lado izquierdo. Las flechas del lado derecho indican las bandas cuya migración se corresponde con la esperada para las proteínas virales indicadas.

Los resultados obtenidos (Figura R.1.2) mostraron que el perfil de migración electroforética de las proteínas traducidas a partir de cada ARN mutado era semejante al del ARN *wt*, lo que indica que las sustituciones de aminoácido introducidas no alteraban de manera significativa ni la capacidad de traducción del ARN *in vitro* ni el procesamiento de las proteínas virales producidas, respecto del ARN *wt* control transcrito a partir de pMT28.

R.1.2 Infectividad del ARN de mutantes en M29 e I42 de 3A en células BHK-21

El ARN del VFA, tanto el purificado a partir de viriones como el obtenido por transcripción *in vitro* a partir de clones infecciosos, es capaz producir daño celular y partículas virales infectivas cuando se transfecta en células BHK-21 (Belsham and Bostock, 1988, Zibert et al., 1990). En primer lugar se analizó la viabilidad de los ARNs transcritos *in vitro* a partir de los plásmidos pMT28-3A-M29D, pMT28-3A-M29R, pMT28-3A-I42D y pMT28-3A-I42R y la patogenicidad de los virus recuperados (mutantes M29D, M29R, I42D e I42R, respectivamente). Para ello, los transcritos fueron transfectados en células BHK-21 (M.13.2), determinándose su capacidad para producir ECP, su infectividad específica así como el título viral producido en estas células tanto durante la transfección como tras los distintos pases seriados dados al extracto total recuperado de ésta (M.2).

R.1.2.1 Citopatogenicidad y producción viral de los ARNs conteniendo mutaciones en la interfaz de dimerización de 3A

La aparición y, en su caso, la evolución del ECP en las monocapas celulares transfectadas con los transcritos virales estudiados fueron estimadas hasta las 72 h p.t, ya que a tiempos posteriores el envejecimiento celular provocaba alteraciones difíciles de distinguir del ECP. Los extractos totales de células transfectadas, recogidos en el momento de máxima producción de ECP o en su defecto a las 72 h.p.t, fueron empleados para llevar a cabo dos infecciones seriadas en células BHK-21, considerándose que si tras el segundo pase seriado no se observaba ECP, la mutación era deletérea.

La citopatogenicidad de los diferentes ARNs fue determinada en, al menos, dos ensayos de transfección independientes. Mientras que las células transfectadas con el ARN *wt*, incluidas como control en cada una de las transfecciones realizadas, mostraron ECP a las 24 h.p.t, los ARNs de los mutantes M29D e I42D no produjeron ECP ni fue posible detectar virus infeccioso en ninguno de los dos ensayos independientes, ni en los extractos totales de las células transfectadas, ni durante los dos pases seriados dados a partir de estos extractos, por lo que se consideró que estas mutaciones producían un ARN no citopatogénico (Tabla R.1).

Tabla R.1. ECP producido en células BHK-21 transfectadas con ARNs de VFA con mutaciones en residuos de la interfaz de dimerización de 3A.

RNA \ hpt/i	Transfección			Primer pase			Segundo pase			Tercer pase		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
pMT28 ^a	++++ ^b	-	-	++++	-	-	++++	-	-	++++	-	-
pMT28-3A-M29D ^c												
pMT28-3A-M29R (1 ^o E) ^d			+			+ ^e			+ ^f			+
pMT28-3A-M29R (2 ^o E)												
pMT28-3A-M29R (3 ^o E)												
pMT28-3A-I42D ^c												
pMT28-3A-I42R (1 ^o E)												
pMT28-3A-I42R (2 ^o E)			+ ^g	++	+++	++++	++	++++	-			
pMT28-3A-I42R (3 ^o E)												

a) En los tres ensayos realizados se obtuvieron resultados similares.

b) Estimación, mediante observación al microscopio óptico, del ECP producido por el ARN transcrito a partir del mutante indicado en la monocapa celular (placa de 35 mm de diámetro) a los tiempos indicados. (+) ECP en el 25% de la superficie de la monocapa celular; (++) ECP en el 50% de la superficie de la monocapa celular; (+++) ECP en el 75% de la superficie de la monocapa celular; (++++) ECP en el 100% de la superficie; (-) ECP completo en el tiempo previo.

c) En los dos ensayos realizados se obtuvieron resultados similares.

d) E indica el número asignado al ensayo mostrado.

e) La secuencia del ARN del virus recuperado mantuvo la mutación introducida seleccionándose la sustitución I42L (A5422C).

f) La secuencia del ARN del virus recuperado mantuvo las mutaciones del pase anterior, observándose la imposición de la sustitución S140F (C5717T).

g) La secuencia del ARN del virus recuperado mostró la imposición de la sustitución R42L (G5423T) en lugar de la sustitución I42R (ATC5422-24CGA).

De los tres experimentos de transfección con el ARN correspondiente al mutante M29R (pMT28-3A-M29R), solo se observó ECP parcial a las 72 h.p.t (en aproximadamente el 25% de las células) en el primero de ellos (Tabla R.1). En este experimento el título viral en el extracto total correspondiente al primer pase dado a las células transfectadas fue de $1,8 \times 10^1$ UFP/ml. Este valor fue significativamente inferior ($p \leq 0,01$) al obtenido con el virus *wt* ($7,1 \times 10^5$ UFP/ml) (Tabla R.1 y Figura R.1.3). Aunque significativa, ésta diferencia fue disminuyendo en los pases sucesivos (Tabla R.1 y Figura R.1.3), siendo los títulos tras el tercer pase de $2,7 \times 10^4$ UFP/ml para el mutante 3A-M29R y de $5,7 \times 10^5$ UFP/ml para el virus *wt* control.

La secuenciación de la región correspondiente a las proteínas 2BC3ABB del ARN de la población viral recuperada tras los pases sucesivos mostró el mantenimiento del reemplazamiento M29R y la imposición de las sustituciones I42L a partir del primer pase, y S140F a partir del segundo pase. Estas sustituciones seleccionadas se mantuvieron presentes en la población viral durante el siguiente pase realizado (3° pase). El virus resultante que portaba las sustituciones M29R-I42L-S140F se denominó M29R*.

Por otro lado, de los tres experimentos realizados con el ARN correspondiente al mutante 3A-I42R, solo en uno de ellos se observó ECP parcial (en aproximadamente el 25% de las células) a las 72 h.p.t (Tabla R.1 y Figura R.1.3), siendo el título viral recuperado tras la transfección, $1,9 \times 10^4$ UFP/ml, significativamente inferior ($p \leq 0,05$) al obtenido con ARN *wt* transcrito a partir de pMT28 ($5,2 \times 10^6$ UFP/ml). Aunque significativa, ésta diferencia fue disminuyendo en los pases sucesivos (Tabla R.1 y Figura R.1.3), siendo los títulos tras el segundo pase de $5,8 \times 10^6$ UFP/ml para el mutante 3A-I42R y de $6,4 \times 10^7$ UFP/ml para el control. Esta evolución de los títulos virales se asoció a la imposición del reemplazamiento R42L que restituía el carácter hidrofóbico del residuo 42, cambio que se mantuvo en los dos pases seriados dados al extracto total de transfección. El virus recuperado de este experimento, que contiene la sustitución R42L se denominó I42R*.

En conjunto, estos resultados indican que las mutaciones que modifican el carácter hidrofóbico de los residuos M29 e I42 son deletéreas para el virus, que solo puede sobrevivir en aquellas transfecciones en las que se seleccionan mutaciones compensatorias, lo que en el caso del mutante I42R y su revertiente R42L implica la restauración del carácter hidrofóbico del residuo mutado.

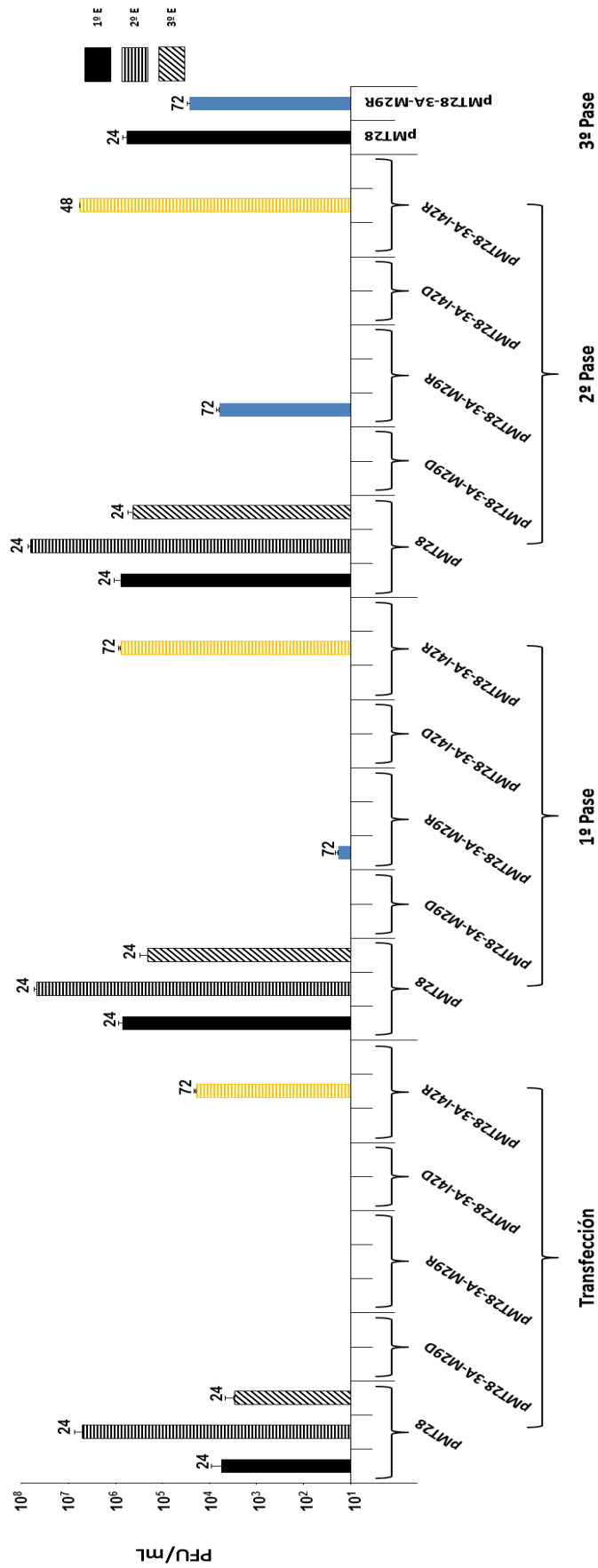


Figura R.1.3. Producción viral en células BHK-21. Título viral obtenido a los tiempos (h.p.i o h.p.i) en que se observó máximo ECP, indicados con los números en la parte superior de cada barra (ver R.1.2.1). Para ello se emplearon monocapas crecidas en placas de 35 mm de diámetro que se transfectaron con 1 µg de ARN viral (ver R.1.2.1, M.2 y M.4.1). Las titulaciones se realizaron por triplicado, indicándose la desviación estándar de los valores obtenidos

R.1.2.2 Infectividad específica del ARN

Con el fin de continuar caracterizando la capacidad de los ARNs correspondientes a los diferentes mutantes analizados para producir virus infeccioso, se determinó su infectividad específica. Para ello, distintas cantidades de los ARNs transcritos *in vitro* (M.12), a partir de los plásmidos pMT28-3A-M29D, pMT28-3A-M29R, pMT28-3A-I42D y pMT28-3A-I42R, así como del control pMT28 fueron transfectadas en células BHK-21 crecidas en presencia de agar, determinándose la producción de UFP/ μg de ARN a las 24 h.p.t, como se indica en M.4.2.

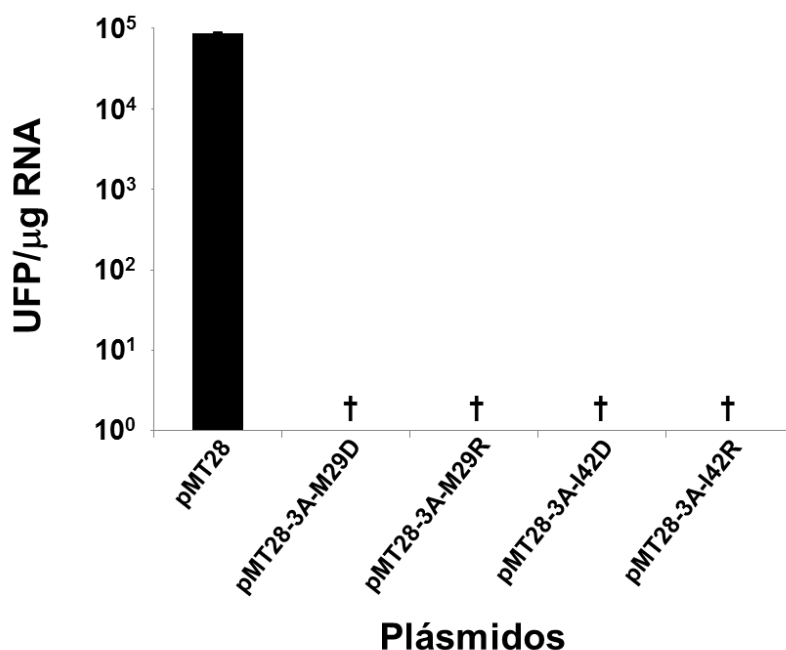


Figura R.1.4. Infectividad específica del ARN de los mutantes 3A-M29D, 3A-M29R, 3A-I42D y 3A-I42R. Producción de UFP en células BHK-21 (crecidas en placas de 35 mm de diámetro) transfectadas con 1 ng de ARN viral de pMT28 y con 1 μg de los ARNs obtenidos a partir de los plásmidos con las mutaciones de 3A indicadas. Las células, crecidas en placas de 35 mm de diámetro, se incubaron en medio semisólido según se detalla en M.4.2. Se muestran los resultados de tres determinaciones independientes para cada ARN. †, se transfectaron con 1 μg del ARN indicado, no recuperándose, en ningún caso, UFP

Como se muestra en la Figura R.1.4 la infectividad específica del ARN *wt* transcrito a partir de pMT28 fue de 9×10^4 UFP/ μg , valor similar a los previamente descritos para ARNs transcritos *in vitro* del VFA serotipo C (Postigo, 2009, Garcia-Arriaza et al., 2004). Por otro lado, los ARNs correspondientes a los mutantes candidatos a afectar a la dimerización de 3A, M29D, M29R, I42D e I42R no produjeron placas de lisis, ni siquiera cuando la transfección se realizó empleando 1 μg de ARN. Esto se podría deber a la ausencia de producción viral en las condiciones del ensayo, o a una producción viral al menos 10^5 veces inferior a la del ARN control. Estos resultados son similares a los descritos previamente para ARNs con las

mutaciones L38E, L41E y Q44D, localizadas en la interfaz de dimerización de 3A (Postigo, 2009).

Los resultados obtenidos son consistentes con lo descrito en el apartado anterior, ya que si bien en el caso de los mutantes M29R e I42R se observó ECP, esto ocurrió sólo después de la imposición de nuevas mutaciones en la población viral, lo que tuvo lugar a tiempos posteriores a los transcurridos en el ensayo de infectividad específica (24 h.p.t), ensayo en el que, además, la difusión viral se ve limitada por realizarse en un medio semisólido.

R.1.3 Replicación del ARN de mutantes en la interfaz de dimerización de 3A.

El retraso o ausencia de producción viral en las transfecciones con ARN de los mutantes de 3A M29D, M29R, I42D e I42R, podría deberse a defectos en alguno de los procesos necesarios para la multiplicación viral. Con la intención de esclarecer si las mutaciones introducidas en el experimento anterior afectaban la síntesis de ARN viral se cuantificó, mediante QPCR (M.8.2), la acumulación de ARN⁺ en células BHK-21 transfectadas con el ARN sintetizado *in vitro* de cada mutante y el ARN *wt* transcrito a partir de pMT28. Este estudio se llevó a cabo con muestras correspondientes a 18 h.p.t para el ARN *wt* y a 72 h.p.t para los ARNs de los mutantes analizados (Figura R.1.5).

El nivel de ARN⁺ detectado en células transfectadas con el ARN *wt* fue del orden de 10⁹ moléculas/500ng de ARN total. Los niveles de ARN⁺ detectados en los extractos celulares transfectados con los transcritos virales correspondientes a los mutantes 3A-M29D y 3A-I42D (en las dos transfecciones analizadas) y 3A-M29R y 3A-I42R (en los dos ensayos en que no se obtuvo ECP ni se recuperó virus infectivo) fueron al menos cinco órdenes de magnitud inferiores. Por otra parte, el nivel de ARN⁺ correspondiente al mutante 3A-M29R, en el ensayo en el que si hubo producción viral, fue de dos logaritmos inferior al del ARN *wt* y el del mutante I42R, en el segundo ensayo, en el que también produjo virus infectivo, fue del mismo orden de magnitud que el del ARN *wt* control (Figura R.1.5).

Los niveles de ARN⁺ observados en los mutantes pMT28-3A-M29D y pMT28-3A-I42D, así como en los ensayos de los mutantes pMT28-3A-M29R y pMT28-3A-I42R que no fueron capaces de producir ECP, corresponderían al ARN transfectante residual (input).

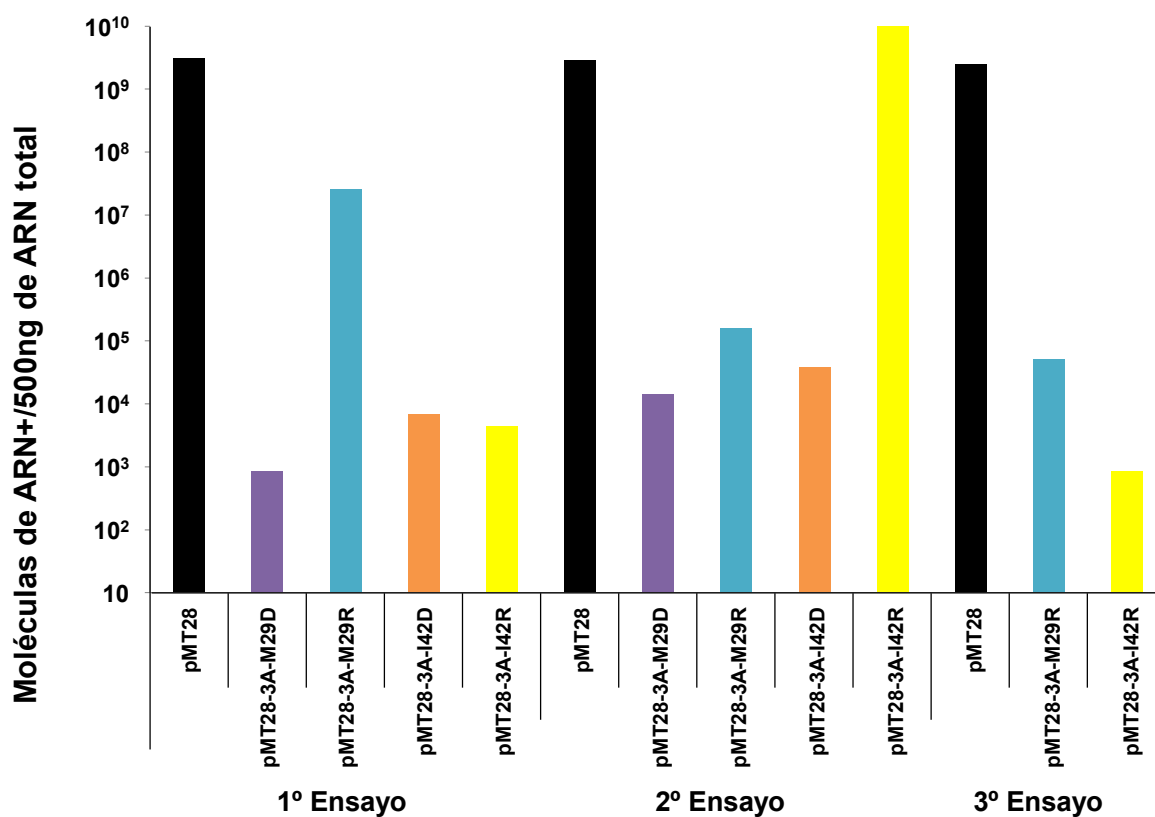


Figura R.1.5. Cuantificación de ARN+ viral en células transfectadas con ARN de los mutantes en M29 e I42 de 3A. Se indica el número de moléculas de ARN+ determinado en extractos (500ng de ARN total) de células BHK-21 (crecidas en placas de 35 mm de diámetro), transfectadas con 1µg del ARN indicado, e incubadas a 37°C hasta las 18 h.p.t en el caso del ARN de pMT28 (ARN *w.t.*) y hasta las 72 h.p.t para los ARNs de los mutantes, observándose E.C.P solo las transfecciones con ARN *w.t.*, en el 1º ensayo del mutante 3A-M29R y en el 2º ensayo del mutante 3A-I42R. La cuantificación del ARN+ se llevó a cabo por QPCR, como se describe en M.8.2.

En el caso del ARN del mutante 3A-M29R, solo se observan niveles por encima del basal en el primer ensayo, que fue el único de los tres realizados acabó permitiendo recuperar virus infectivo. No obstante el nivel de ARN+ encontrado para 3A-M29R fue menor que el observado para pMT28 y el mutante 3A-I42R. Esta baja producción de ARN+ del mutante 3A-M29R en el primer ensayo se podría deber a que en la transfección aún no se han producido las mutaciones adicionales que permite la producción de virus detectable.

En el caso del virus mutante 3A-I42R, la mutación que restituye el carácter hidrofóbico del residuo 42 (R→I), y que permite la producción de virus detectable, ya se haya presente en la transfección, esto podría explicar que la producción de ARN+ sea del mismo orden de magnitud que el control.

R.1.4 Expresión de proteínas virales de los mutantes en los residuos M29 e I42 de 3A

R.1.4.1 Análisis mediante *western-blot*

Como parte del estudio del efecto de las sustituciones en 3A M29D, M29R, I42D e I42R, se llevó a cabo un análisis de la expresión de las proteínas virales de la región 3AB en células BHK-21 transfectadas con los transcritos de ARN correspondientes. Para ello, se analizaron extractos de células transfectadas con estos ARNs (M.17 y M.18.1), mediante *wb* empleando un Amc frente a la proteína 3A. Como era de esperar, en los extractos de los ensayos en los que no se encontró producción viral, no se detectaron proteínas de VFA (datos no mostrados). Tras la transfección, se pudo detectar proteínas virales en las células transfectadas con el ARN I42R cuya señal se incrementó en los extractos de las células correspondientes al segundo pase seriado (Figura R.1.6). En el caso del ARN M29R, las proteínas virales solo fueron detectables, con baja intensidad, en el tercer pase seriado. Para ambos mutantes el patrón de procesamiento de las proteínas de la región 3AB fue similar al del virus recuperado del ARN *wt*.

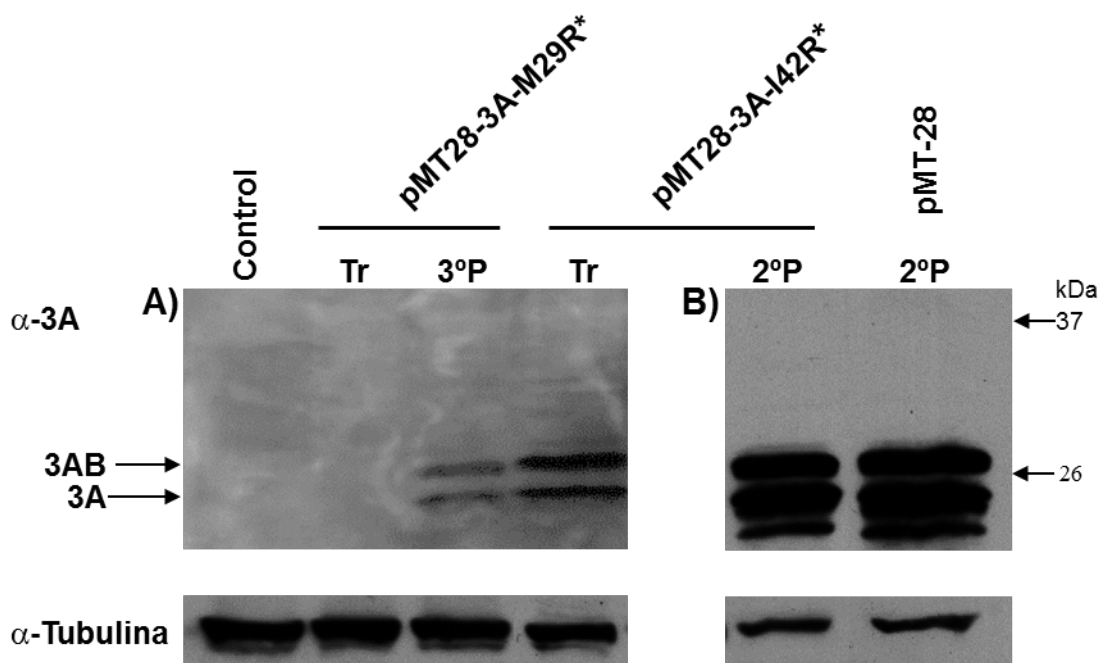


Figura R.1.6. Análisis del nivel de expresión y el comportamiento electroforético de proteínas de los mutantes 3A-M29R y 3A-I42R. *Wb* de SDS-PAGE (12%) de extractos de células BHK-21 transfectadas con 1μg de ARN de los mutantes 3A-M29R o 3A-I42R (Tr), o infectadas con 200μl del extracto celular total del pase previo al indicado (i.e. 2°P en el caso de 3°P). Tras la transfección/infección, las células fueron incubadas a 37°C hasta la aparición de ECP, durante 72 h.p.t o 72 h.p.i (ver Tabla R.1). Como control positivo se empleó virus correspondiente al 2° pase dado al extracto total de células transfectadas con ARN *wt* transcrito a partir de pMT28. Las proteínas se detectaron empleando el Amc 2C2 (anti 3A). Como control de carga de proteína total se empleó Apc α-βII-Tubulina (α-Tubulina). Se cargaron mayores cantidades de proteína total en el panel A (108μg) que en el panel B (27 μg). La migración de los marcadores proteicos (en KDa) se indica mediante flechas en el lado

derecho. Las flechas del lado izquierdo indican las bandas cuya migración se corresponde con la esperada para las proteínas virales indicadas

Este resultado es consistente con que la capacidad de los mutantes para traducir sus proteínas se asocia a la imposición de la mutación R42L en el caso del mutante 3A-I42R y de las mutaciones I42L y S140F en el caso del mutante 3A-M29R. Dada la falta de efecto de las mutaciones I42R y M29R sobre la traducción *in vitro* de la poliproteína viral (R.1.1.), estos resultados sugieren su implicación en la disminución de la síntesis de ARN viral.

R.1.4.2 Análisis por inmunofluorescencia

Como parte del análisis de las proteínas sintetizadas por los mutantes viables 3A-I42R* y 3A-M29R*, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en los que se emplearon virus procedentes del pase seriado más elevado dado a cada uno de ellos. Como el título viral para el mutante 3A-M29R* fue siempre bajo (incluso en un tercer pase) y para que los ensayos de inmunofluorescencia fueran comparables, la m.d.i utilizada fue de 0,01virus/célula. Los resultados obtenidos mostraron que las proteínas de la región 3AB de los virus 3A-M29R* y 3A-I42R*, reconocidas por el anticuerpo empleado, se expresaron con intensidades y una distribución por el citoplasma celular similares a las del virus *wt* (Figura R.1.7). En estos experimentos la distribución celular de la proteína VP1 fue similar entre los virus analizados, indicando que las mutaciones presentes en los virus mutantes 3A-M29R* y 3A-I42R* no producen alteraciones relevantes en la distribución de otras proteínas del virus.

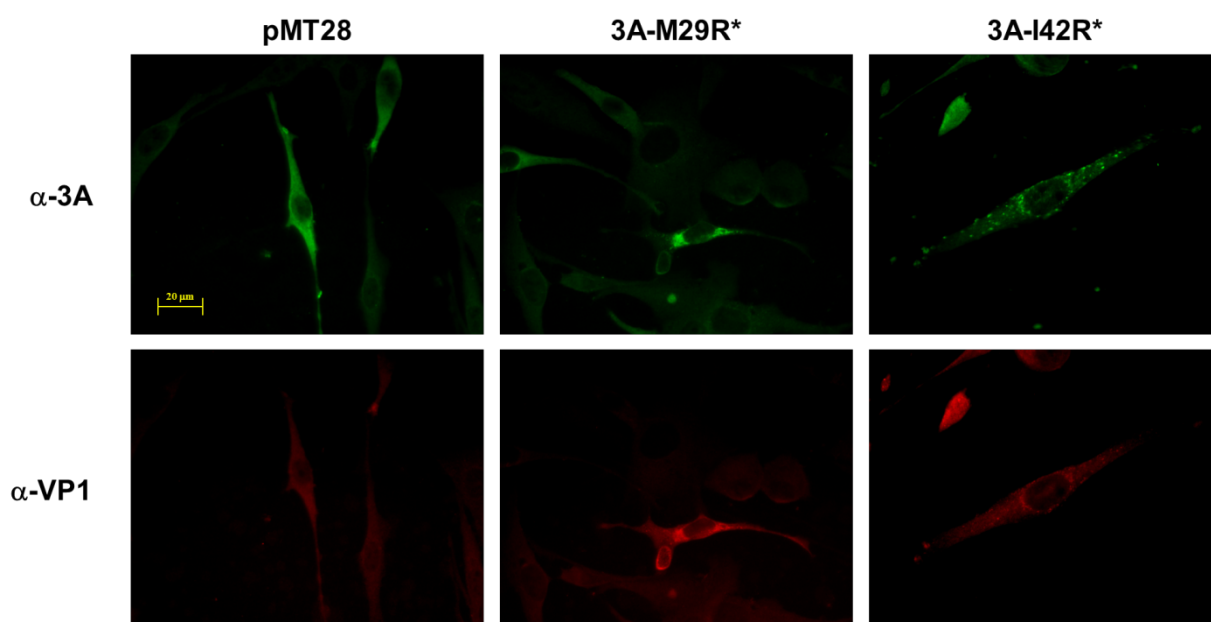


Figura R.1.7. Inmunofluorescencia de las proteínas 3A y VP1 en células infectadas con los virus 3A-M29R* o 3A-I42R*. Se infectaron monocapas de células BHK-21 (m.d.i de 0,01 UFP/célula) con los virus 3A-M29R* y

3A- I42R* que, como se indica en R.1.2.1, corresponden al tercer pase del primer ensayo realizado con el ARN transcrito a partir de pMT28-3A-M29R y al segundo pase del segundo ensayo realizado con el ARN del mutante pMT28-3A-I42R, respectivamente. Las células se fijaron a las 72 h.p.t. La detección de la proteína 3A se realizó con el Apc 163, y la de VP1 con el Amc SD6. Las imágenes son representativas de dos ensayos independientes.

R.1.5 Estudio de la expresión transitoria de la proteína 3A con sustituciones en M29 e I42

Como se describe en el apartado R.1.4, los mutantes 3A-M29D y 3A-I42D fueron incapaces de expresar niveles detectables de la proteína 3A y de producir virus infeccioso. Por otro lado, los mutantes 3A-M29R e 3A-I42R fueron capaces de producir virus infeccioso en un proceso asociado a la selección de sustituciones adicionales en 3A. Con el fin de estudiar el efecto independiente de cada una de las sustituciones inicialmente introducidas en el virus *wt* sobre la expresión de la proteína 3A, las secuencias correspondientes a las proteínas que portaban dichas mutaciones fueron clonadas en el vector de expresión eucariótico pRSV (ver M.10.1).

R.1.5.1 Análisis por inmunofluorescencia

Los estudios de inmunofluorescencia (M.19.1) de las células BHK-21 transfectadas con las construcciones pRSV/3A, pRSV/3A-M29D, pRSV/3A-M29R, pRSV/3A-I42D y pRSV/3A-I42R, mostraron que la proteína 3A *wt* y las proteínas mutadas 3A-M29R y 3A-I42R presentaron un patrón difuso con una distribución citoplasmática uniforme. Las células que expresaban las proteínas 3A-M29D y 3A-I42D presentaron una distribución también uniforme, con un patrón de inmunofluorescencia algo más punteado con formación de agregados, aunque sin que ello representara diferencias relevantes respecto a la proteína 3A *wt*.

La ausencia de diferencias importantes en los niveles de expresión y en la distribución de la proteína 3A con las sustituciones M29R, I42R, M29D e I42D sugiere que estas mutaciones no afectan la localización celular de la proteína 3A expresada en un contexto no infeccioso.

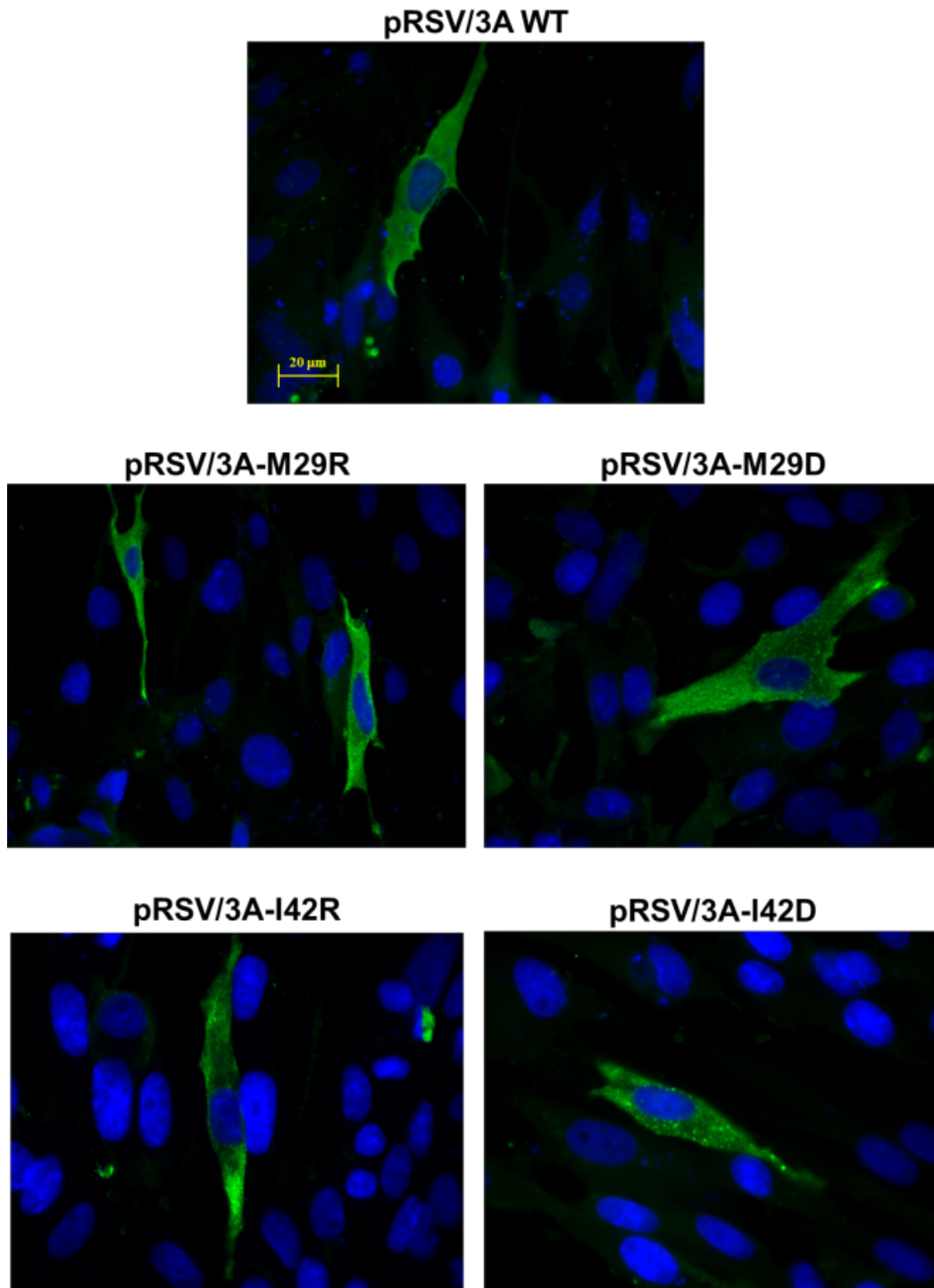


Figura R.1.8. Distribución celular de la proteína 3A y sus versiones mutadas M29R, M29D, I42R, e I42D expresadas transitoriamente. Se muestran imágenes de monocapas de células BHK-21 (crecidas en placas de 35 mm de diámetro), transfectadas con 1µg de cada uno de los plásmidos indicados. La detección de la proteína 3A se realizó con el Apc 163. Se utilizó DAPI como marcador del núcleo celular.

R.1.5.2 Análisis mediante *western-blot*

Estos ensayos se llevaron a cabo para determinar el efecto de las mutaciones introducidas sobre la detección de dímeros de 3A en células que expresaban transitoriamente

las diferentes versiones mutadas de 3A, ya que se había visto que la introducción de sustituciones de aminoácido en residuos de la interfaz hidrofóbica de 3A disminuían su detección en ensayos de wb (González-Magaldi, 2012, Postigo, 2009). Las proteínas M29D, M29R, I42D e I42R, se expresaron a partir de los derivados correspondientes de pRSV en células BHK-21 a niveles similares o levemente inferiores a los de la 3A *wt*, apreciándose también un pequeño cambio de movilidad de las formas mutadas respecto a 3A *wt* (Figura R.1.9). No se observaron cambios importantes en la intensidad y movilidad de las bandas correspondientes a la forma dimérica de 3A, excepto en el caso de 3A-M29D para la que se apreció un desdoblamiento de la banda correspondiente al dímero. Asimismo, se encontró un nivel de expresión menor de la banda satélite inferior de 3A en los mutantes 3A-M29D y 3A-M29R, junto con la desaparición de la banda satélite superior a 3A en los mutantes 3A-M29D y 3A-I42D. La naturaleza de estas bandas satélites, descritas también por otros autores (Pacheco et al., 2003, Pacheco et al., 2010), está por determinar.

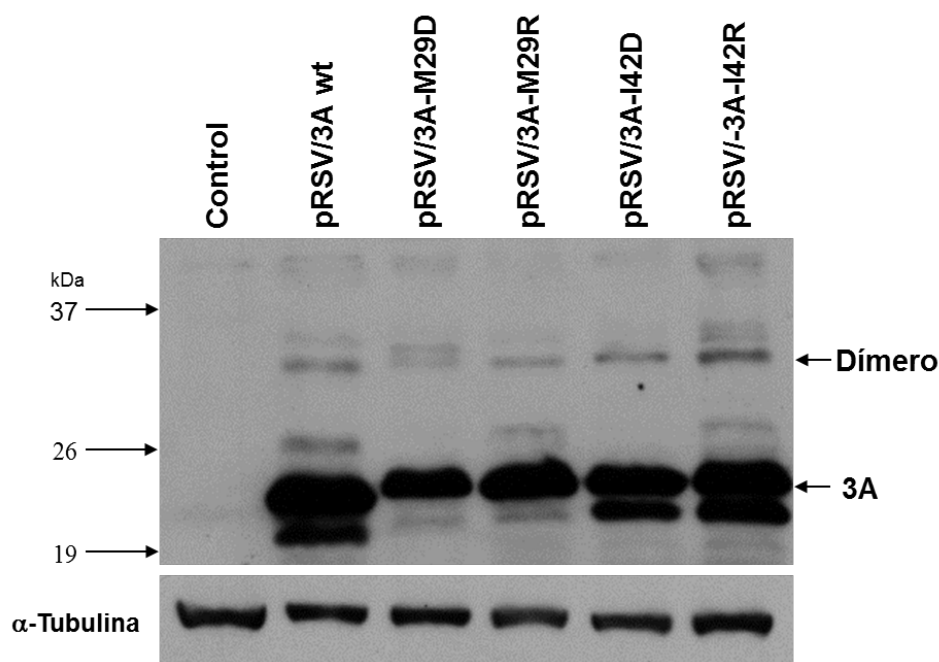


Figura R.1.9. Expresión transitoria de la proteína 3A y sus versiones mutadas M29D, M29R, I42D e I42R. Análisis por *wb* de SDS-PAGE (10%) de extractos de BHK-21 (crecidas en placas de 35 mm de diámetro) transfectadas con 1 μ g de los plásmidos indicados. Las proteínas se detectaron con el Amc 2C2 (anti 3A). Como control de carga de proteína total se empleó Apc α -Tubulina (anti β II-Tubulina). La migración de los marcadores proteicos (en KDa) así como las bandas correspondientes a 3A y al dímero de 3A se indican mediante flechas.

Esto parece indicar que las mutaciones 3A-M29D, 3A-M29R, 3A-I42D y 3A-I42R, no impiden el establecimiento de las interacciones que hacen posible la detección de dímeros de 3A en células BHK-21.

R.2. Análisis funcional de la relevancia del procesamiento de la proteína 3A

La proteína 3A del VFA es esencial para la viabilidad viral (Postigo, 2009) estando, tanto en su forma madura como en la de sus precursores 3ABs, implicada en diferentes interacciones a lo largo del ciclo viral (ver I.3.1.1). Como parte de los estudios previos realizados para esclarecer distintos aspectos de la funcionalidad de 3A se habían construido derivados del plásmido pMT28 que portaban: i) una Gly insertada en el residuo 5 de la proteína 3A dentro de la secuencia (ISIP) predicha como diana de la escisión 2C/3A por parte de la proteasa viral 3C (Ryan M.D., 2004) (pMT28-∇G-3A), o ii) la inserción de la Gly antes descrita en combinación con la inserción de otra Gly adicional en el residuo 151, correspondiente a la secuencia equivalente predicha para la escisión 3A/3B1 (pMT28-∇G-3A-∇G) (ver Figura R.2.1). Ambos ARNs resultaron inviables, no permitiendo recuperar virus infeccioso (Postigo, 2009). Estos resultados indicaban que la integridad de la secuencia diana para 3C presente en el extremo N-ter de 3A era esencial para la funcionalidad de esta proteína, quedando por determinar si el mantenimiento de esta secuencia en el sitio de escisión 3A/3B1 es también esencial para la infectividad del virus.

R.2.1 Construcción del clon infeccioso para la obtención de VFA con la mutación 3A-∇G

Para determinar el efecto de la inserción de una única Gly en la posición 151 de 3A se construyó un derivado del clon infeccioso pMT28, a partir del mutante pMT28-∇G-3A-∇G, que solo contenía esta mutación, y que fue denominado pMT28-3A-∇G (Figura R.2.1). La presencia de la inserción fue confirmada por secuenciación del ADN del plásmido obtenido. La transcripción *in vitro* a partir pMT28-3A-∇G permitió obtener ARN que portaba la mutación ∇G151.

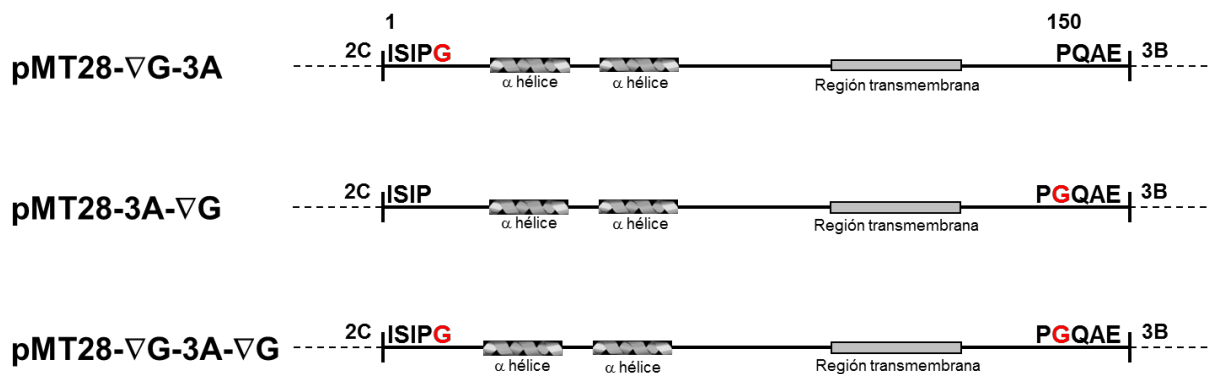


Figura R.2.1. Localización de las mutaciones introducidas en la secuencia de procesamiento de la proteína 3A por la proteasa 3C. Se muestra un esquema de la secuencia aminoacídica de la proteína 3A codificada en pMT28, indicándose en

rojo, para cada mutante, las inserciones introducidas. La construcción pMT28-3A-∇G, que contiene una G insertada en la posición 151, se realizó a partir del pMT28-∇G-3A-∇G como se describe en M.10.1.2.

R.2.2 Traducción *in vitro* de la poliproteína viral codificada por el mutante 3A-∇G

Primeramente, se determinó el efecto de la inserción ∇G151 en la traducción y procesamiento *in vitro* de la poliproteína del VFA, para lo que se empeló ARN transcrito a partir de pMT28-3A-∇G (ARN 3A-∇G). Como se observa en la Figura R.2.2, el ARN 3A-∇G se tradujo con niveles similares a los del ARN *wt*. Asimismo, el patrón de bandas de proteínas marcadas encontradas para ambos ARNs fue similar, con la excepción de la aparición en el caso del mutante 3A-∇G de una proteína con una migración que, asumiendo la identidad de bandas publicada (Vakharia et al., 1987), correspondería a 3BBC, y cuya aparición es compatible con la falta de procesamiento 3A/B1. Por otra parte, se observó un ligero aumento en la intensidad de la banda de movilidad compatible con el precursor 3CD.

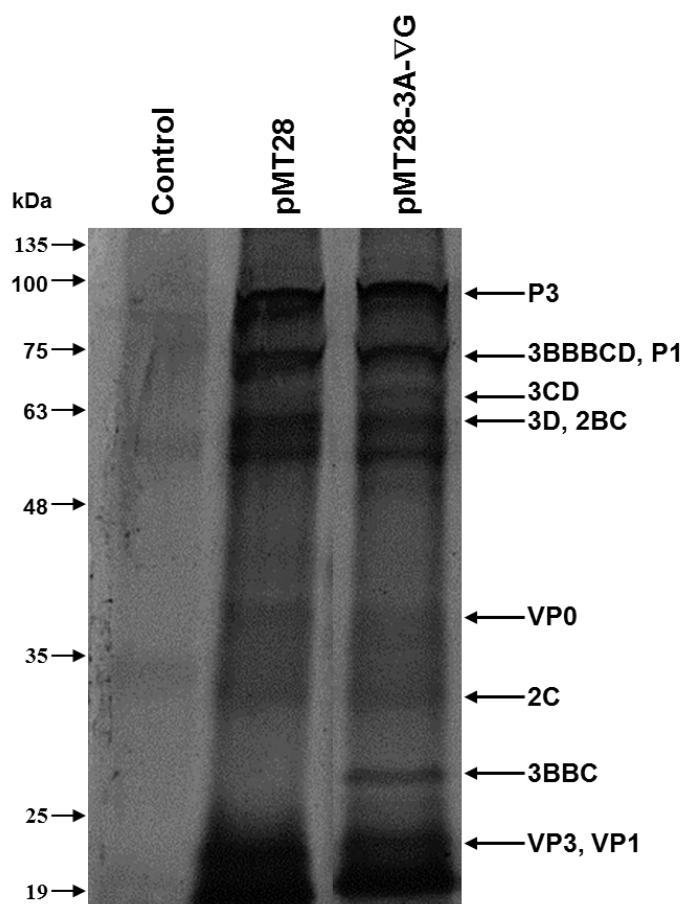


Figura R.2.2. Proteínas del VFA sintetizadas *in vitro* a partir del ARN de pMT28 y de pMT28-3A-∇G. Autorradiografía de SDS-PAGE (10%) de muestras de proteínas marcadas con ^{35}S obtenidas por traducción en un lisado de reticulocitos (M.14) de transcritos obtenidos *in vitro* a partir de pMT28 y pMT28-3A-∇G. En cada caso se cargaron 1,1 μCi por pocillo. La migración de los marcadores proteicos (en KDa) se indica mediante flechas en el lado izquierdo. Las flechas del lado derecho indican las bandas cuya migración se corresponde con la esperada para las proteínas virales indicadas.

R.2.3 Infectividad del ARN de VFA con la mutación 3A-∇G en células BHK-21

Con la intención de esclarecer si la mutación 3A-∇G mantenía o alteraba la infectividad del ARN viral, se determinó el grado de ECP, la infectividad específica y la producción viral tras la transfección de células BHK-21 con el ARN 3A-∇G y tras cada uno de los pases adicionales dados al virus recuperado de ésta transfección.

R.2.3.1 Citopatogenicidad del ARN 3A-∇G

A diferencia de la incapacidad de los ARNs derivados de pMT28-∇G-3A y pMT28-∇G-3A-∇G de producir efecto citopático y virus infeccioso (Postigo, 2009), el ARN transcrito a partir de pMT28-3A-∇G dio lugar a ECP cuando se transfectó en células BHK-21 (M.13.2). En los dos experimentos independientes realizados se observó la aparición de ECP a las 24 h.p.t, siendo este efecto total a las 48 h.p.t, lo que supuso un retraso de 24 h respecto al ECP inducido por el ARN *wt* transcrito a partir de pMT28 (ver Tabla R.2.1). Este retraso en la aparición de ECP se mantuvo durante el primer pase dado al virus recuperado de la transfección (extracto total de células), disminuyendo en los siguientes pases y no observándose en el quinto pase seriado (Tabla R.2.1). Por tanto, la inserción 3A-∇G151 retrasa la citopatogenicidad del ARN del virus parental, revirtiendo este fenotipo durante los pases sucesivos dados al virus.

Tabla R.2.1 VI. ECP producido en células BHK-21 transfectadas con ARN de pMT28-3A-∇G.

ARN \ hpt/i	Transfección			Primer pase			Segundo pase			Quinto pase
	24	32	48	24	32	48	24	32	48	24
pMT28 ^a	++++ ^b	-	-	++++	-	-	++++	-	-	++++
pMT28-3A-∇G ^a	+	+++	++++	++	+++	++++	++	++++	-	++++

a) En los dos ensayos realizados se obtuvieron resultados similares.

b) Estimación, mediante observación al microscopio óptico, del ECP producido por el ARN transcrito *in vitro* a partir del mutante indicado, en monocapas celulares (crecidas en placas de 35 mm de diámetro) a los tiempos indicados. (+) ECP en el 25% de la superficie de la monocapa celular; (++) ECP en el 50% de la superficie de la monocapa celular; (+++) ECP en el 75% de la superficie de la monocapa celular; (++++) ECP en el 100% de la superficie; (-) ECP completo en el tiempo previo.

R.2.3.2 Cuantificación de la producción viral del mutante 3A-∇G

El ECP observado en células BHK-21 transfectadas con ARN 3A-∇G correlacionó con la producción de virus infectivo. La Figura R.2.3, muestra los títulos virales encontrados en el extracto total procedente de la transfección y en muestras de cada uno de los pases seriados (media de dos experimentos de transfección realizados), obtenidos tras la transfección con ARN 3A-∇G y con ARN *wt*. Las muestras se recogieron cuando el ECP fue completo. El título viral obtenido en los extracto totales tras la transfección con el ARN *wt* fue de $5,5 \times 10^3$ UFP/ml a las 24 h.p.t, incrementándose tras los pases seriados: $7,1 \times 10^5$ UFP/ml en el primer pase, de $7,9 \times 10^5$ UFP/ml en el segundo pase y se manteniéndose en valores de en torno a 5×10^5 - 1×10^6 UFP/ml en los pases sucesivos. El título en el sobrenadante de la transfección con el ARN 3A-∇G fue de $2,6 \times 10^2$ UFP/ml, incrementándose durante los pases seriados hasta alcanzar valores similares a los del virus recuperado del ARN *wt* tras el quinto pase (4×10^5 UFP/ml) (Figura R.2.3). Estas diferencias solo fueron significativas en los dos primeros pases ($p \leq 0,05$).

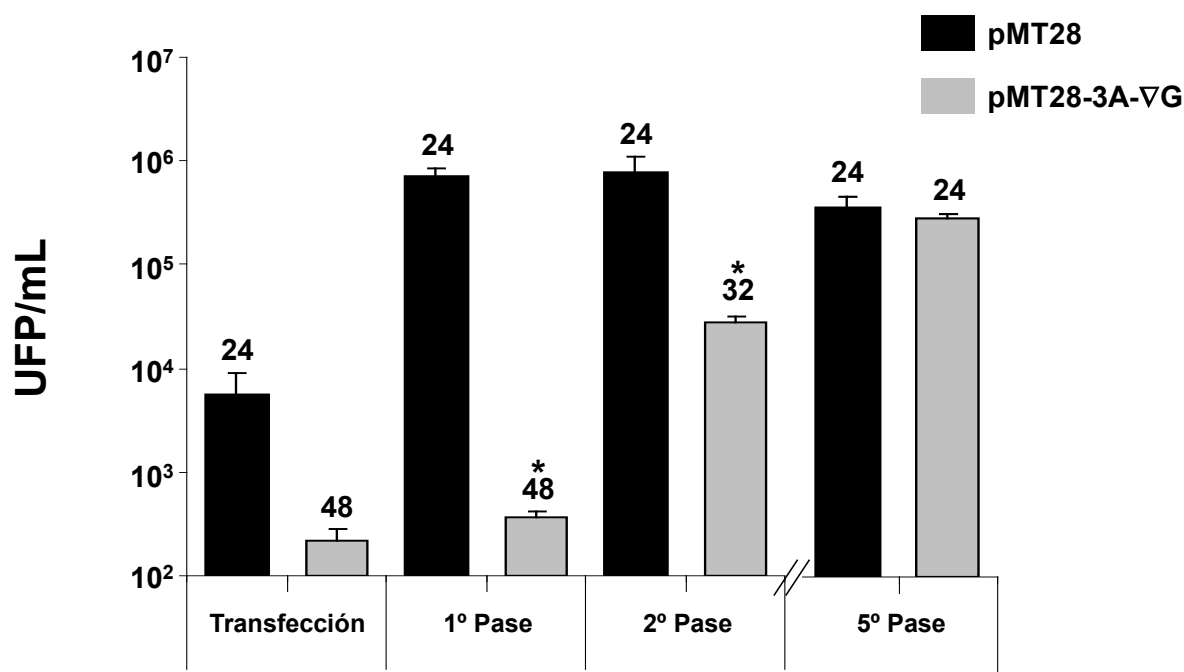


Figura R.2.3. Producción viral en células transfectadas con ARN de pMT28-3A-∇G. Título viral obtenido a los tiempos (h.p.t o h.p.i) en que se observó máximo ECP, indicados con los números en la parte superior de cada barra (ver R.2.3.1). Para ello se emplearon monocapas de células BHK-21 (crecidas en placas de 35 mm de diámetro) que se transfectaron con $1 \mu\text{g}$ de ARN viral obtenido a partir del plásmido indicado en cada caso (ver R.2.3.1, M.2 y M.4.1). Los resultados representan la media de dos experimentos independientes, con titulaciones realizadas por triplicado en cada uno de ellos y las desviaciones estándar entre estos dos experimentos. * Diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) respecto al valor obtenido con el ARN *wt* transcrito a partir de pMT28.

El análisis de la secuencia consenso de la región del ARN viral correspondiente a la proteína 3A (ver M.11) reveló que la Gly insertada en el extremo C-ter de dicha proteína del mutante 3A-∇G se mantuvo presente en las poblaciones virales derivadas de la transfección con ARN 3A-∇G, así como durante los pases seriados estudiados. Cuando se determinó la secuencia completa del virus recuperado del quinto pase seriado, no se encontraron mutaciones adicionales (sinónimas o no sinónimas) a la inserción 3A-∇G151.

En conjunto estos datos indican que los virus derivados del ARN 3A-∇G son viables. Estos virus presentan inicialmente un retraso en su capacidad de producir ECP y una menor producción de virus infeccioso respecto al virus parental, diferencias que desaparecen tras la propagación de las poblaciones en pases sucesivos, sin la reversión de la mutación.

R.2.3.3 Infectividad específica del ARN del mutante 3A-∇G

La capacidad infectiva del ARN 3A-∇G transcrito a partir de pMT28-3A-∇G se determinó, también, empleando el ensayo de infectividad específica del ARN (M.4.2). En este experimento se observó que las células transfectadas con ARN 3A-∇G desarrollaron UFPs aunque con un valor de infectividad específica (6×10^2 UFP/ μg), menor ($p \leq 0,005$) que el encontrado para el ARN *wt* (9×10^4 UFP/ μg) (Figura R.2.4). Esta diferencia es consistente con el retraso del ARN de pMT28-3A-∇G para producir ECP tras su transfección en medio líquido. Por otro lado, como estaba descrito (Postigo, 2009), los ARNs de los mutantes de inserción transcritos a partir de los plásmidos pMT28-∇G-3A y pMT28-∇G-3A-∇G no produjeron placas de lisis en este ensayo.

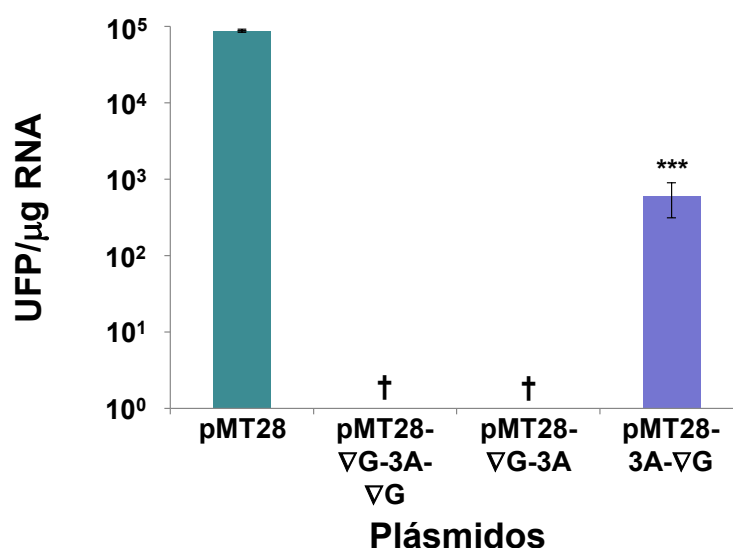


Figura R.2.4. Infectividad específica del ARN de los mutantes en las secuencias diana para 3C de los extremos de la proteína 3A. Producción de UFP/ μg de ARN transfectado en células BHK-21 transfectadas con ARN *wt* transcrito a partir de

pMT28 y de plásmidos con las mutaciones de 3A indicadas. Las células, crecidas en placas de 35 mm de diámetro y transfectadas, se incubaron en medio semisólido según se detalla en M.4.2. † Las células fueron transfectadas con hasta 1 µg del ARN indicado, no recuperándose, en ningún caso, UFPs. Los resultados representan la media de dos experimentos independientes para cada ARN, con titulaciones realizadas por triplicado en cada uno de ellos y las desviaciones estándar entre estos dos experimentos. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas (***) = p-valor ≤ 0.005).

R.2.3.4 Análisis de la producción de ARN del mutante 3A-∇G

Las proteínas 3A y 3ABs de VFA al igual que las de diferentes picornavirus están involucradas en los procesos de replicación del ARNv (Mason et al., 2003, Pacheco et al., 2003). Para estudiar la posibilidad de que la mutación 3A-∇G afectase la replicación del ARN de VFA se determinó la capacidad del ARN transcrito a partir de pMT28-3A-∇G para replicarse en células BHK-21. Para ello se cuantificó el ARN⁺ viral presente a distintos tiempos tras la transfección, mediante QPCR (M.8.2). Como se muestra en la Figura R.2.5 los niveles de ARN⁺, tanto para el ARN 3A-∇G como para el wt, comenzaron a incrementarse respecto a los valores de tiempos anteriores a partir de las 16 h.p.t. En el caso del ARN wt el máximo nivel de ARN⁺ se encontró a las 18 h.p.t, observándose ECP total a las 24 h.p.t. Con el ARN 3A-∇G los valores máximos se encontraron a las 48 h.p.t.

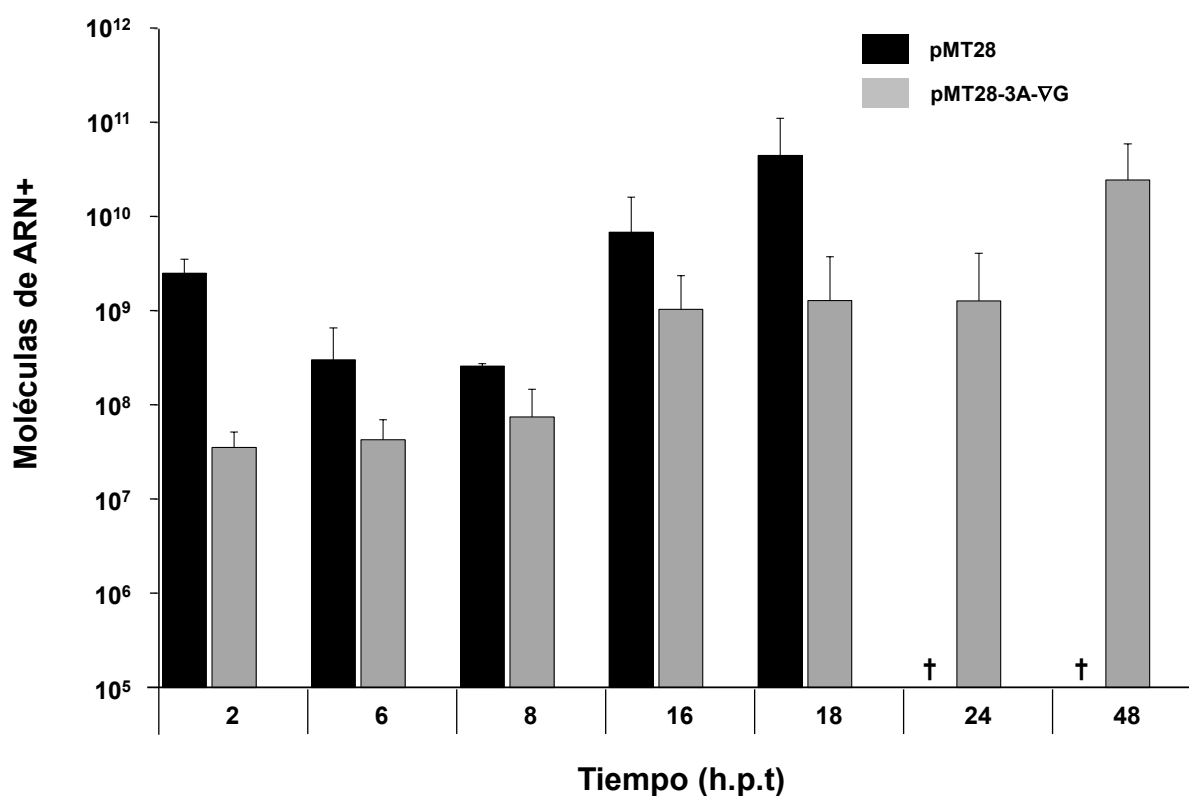


Figura R.2.5. Cuantificación de ARN⁺ viral en células transfectadas con ARN de pMT28-3A-∇G y de pMT28. Representación del número de moléculas de ARN⁺ determinado en extractos de células BHK-21 transfectadas con 1 µg del

ARN indicado, e incubadas a 37°C durante 48 h.p.t. La cuantificación del ARN+ se llevó a cabo por QPCR, como se describe en M.8.2. † No fue posible obtener células (extracto celular) debido al ECP generalizado.

El retardo en la síntesis de ARN+ observado para el mutante 3A-∇G, es consistente con los menores títulos virales recuperados tras la transfección del ARN 3A-∇G y con su menor infectividad específica. Por tanto, la alteración del procesamiento en la región 3AB de la proteína viral podría estar influyendo en la capacidad replicativa inicial del ARN 3A-∇G, fenómeno que deja de observarse en el virus recuperado tras los pases seriados.

R.2.3.5 Expresión de proteínas virales del mutante 3A-∇G en cultivos celulares

R.2.3.5.1 Análisis mediante *western-blot*

Para estudiar el efecto de la inserción G151 sobre la expresión de proteínas virales a partir del ARN 3A-∇G, se emplearon muestras de extractos celulares correspondientes a tiempos post-transfección cercanos al máximo de producción viral: 24 h.p.t para el ARN *wt* y 48 h.p.t para el ARN 3A-∇G. El análisis por *wb* de estas muestras, empleando Amc anti las proteínas 3A y 3B, mostró que mientras que en células transfectadas con el ARN *wt* se detectaron todos los precursores de la región 3AB esperados (3AB, 3ABB y 3ABBB) así como la proteína 3A procesada, en las células transfectadas con el ARN 3A-∇G se detectaban preferentemente los precursores, observándose solo trazas de la proteína 3A procesada (Figura R.2.6). La migración de las bandas correspondiente a 3A y 3AB fue confirmada en células que expresaban transitoriamente estas proteínas, y la identidad de las mismas fue consistente con su reactividad diferencial con los anticuerpos empleados. Este resultado confirmó que la inserción introducida, una Gly en la posición 151 de 3A, afecta drásticamente el reconocimiento del sitio de corte 3A/3B.

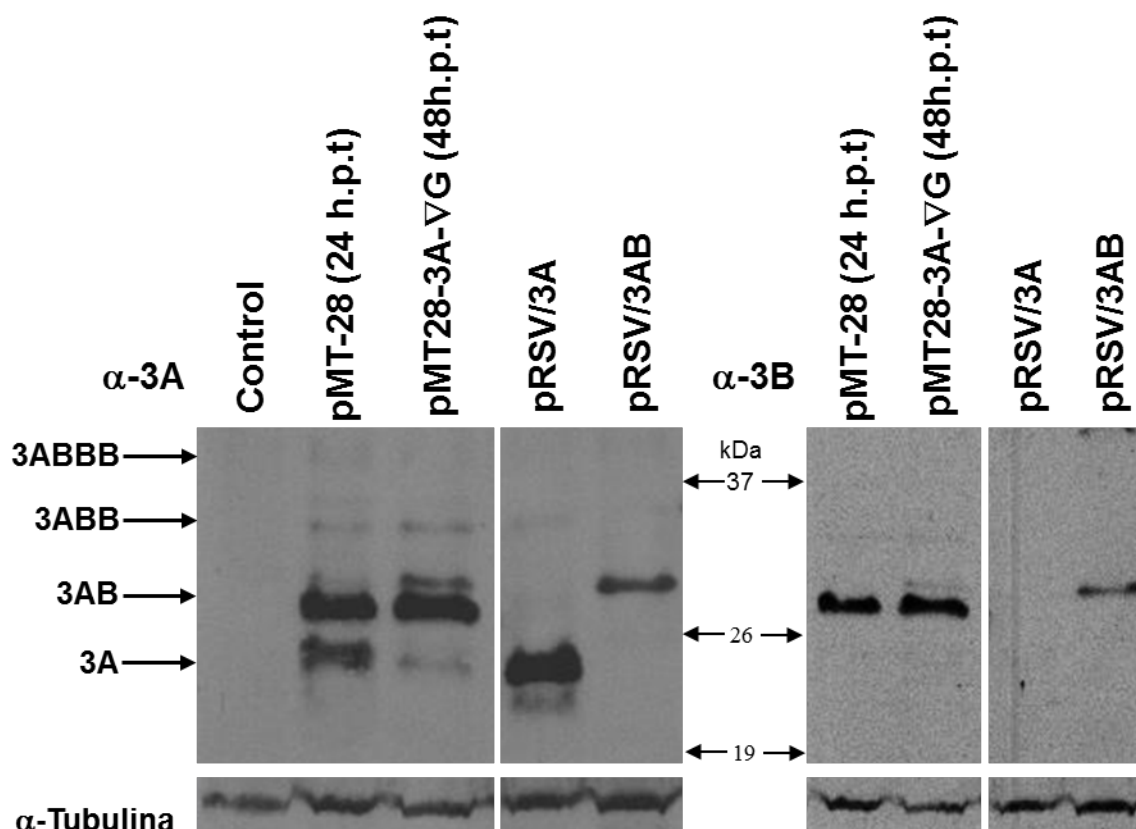


Figura R.2.6. Análisis mediante wb del nivel de expresión y el comportamiento electroforético de proteínas de la región 3AB expresadas en células BHK-21 Análisis por *wb* de SDS-PAGE (12%) de extractos de monocapas celulares transfectadas con 1 μ g de ARN de pMT28 o de pMT28-3A-VG (M.17 y M.18.1) e incubadas a 37°C hasta ECP total (a las h.p.t indicadas) o transfectadas con plásmidos que expresan transitoriamente 3A (pRSV/3A) o 3AB (pRSV/3AB) e incubadas a 37°C hasta las 24 h.p.t. Las proteínas se detectaron con el Amc 2C2 (anti 3A) y con el Amc 1F8 (anti 3B). Como control de carga de proteína total se empleó un Apc α -Tubulina (anti β II-Tubulina). La migración de los marcadores proteicos (en KDa) se indica mediante flechas. Las flechas del lado izquierdo indican las bandas cuya migración se corresponde con la esperada para las proteínas virales indicadas.

R.2.3.5.2 Análisis por inmunofluorescencia

Como parte del análisis de las proteínas sintetizadas por el mutante 3A-VG, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para determinar la localización y nivel de expresión de las proteínas virales 3A y VP1 en células individuales. Los resultados obtenidos (Figura R.2.7) mostraron que a las 27 h.p.t las proteínas 3A y VP1 del mutante se expresaron con una intensidad y una distribución celular diseminada a lo largo del citoplasma, similares a las observadas a las 12 h.p.t en células transfectadas con el ARN *wt*.

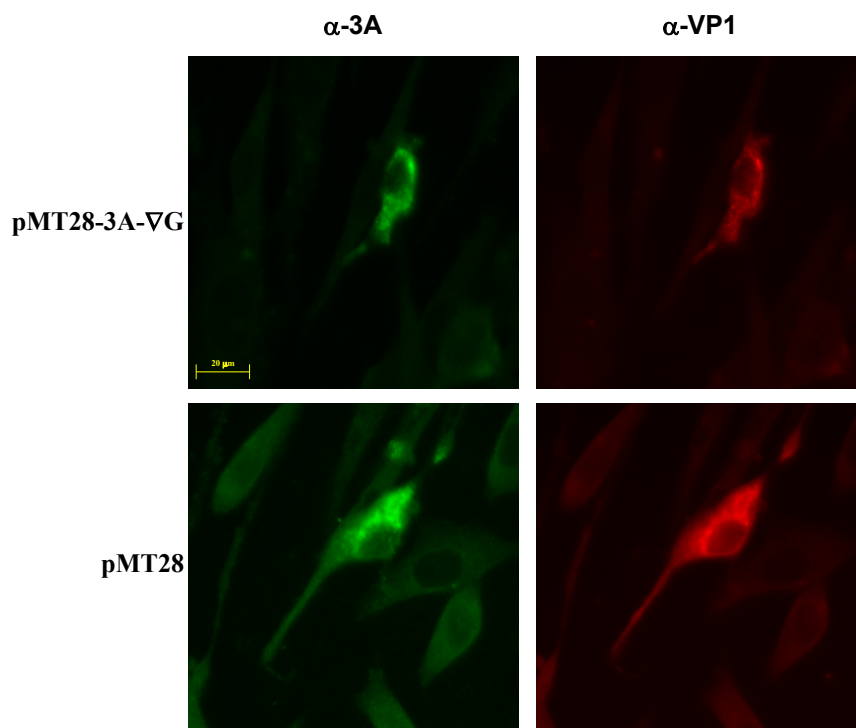


Figura R.2.7. Inmunofluorescencia de las proteínas 3A y VP1 en células transfectadas con ARN *wt* y ARN 3A-∇G. Se transfectaron monocapas de células BHK-21 con 1 μ g de ARN transcrito a partir de la construcción pMT28 (ARN *wt*) y pMT28-3A-∇G (ARN 3A-∇G). Las células se fijaron (M.19.3 y M.20.1) cuando el ECP fue incipiente (12 h.p.t para pMT28 y 27 h.p.t para pMT28-3A-∇G). La detección de la proteína 3A se realizó con el Apc 163, y la de VP1 con el Amc SD6.

Estos resultados ponen en evidencia la capacidad del ARN del mutante 3A-∇G de expresar las proteínas virales que, aunque a tiempos más tardíos, muestran una distribución celular semejante a las del ARN *wt*.

R.2.4 Cinética de crecimiento del virus mutante 3A-∇G

Los resultados previos indicaban que el virus 3A-∇G151, obtenido tras cinco pases seriados a partir del virus recuperado de la transfección, era capaz de alcanzar títulos similares a los del virus *wt* tras el mismo número de pases seriados. Para comparar la capacidad de multiplicación de estos dos virus se realizó un experimento de cinética de producción viral (*single step growth curve*) (Figura R.2.8). Para este experimento se emplearon preparados de los virus 3A-∇G151 y *wt* obtenidos por amplificación en células BHK-21 del virus recuperado tras el quinto pase seriado (sexto pase) y una m.d.i de 1 UFP/célula.

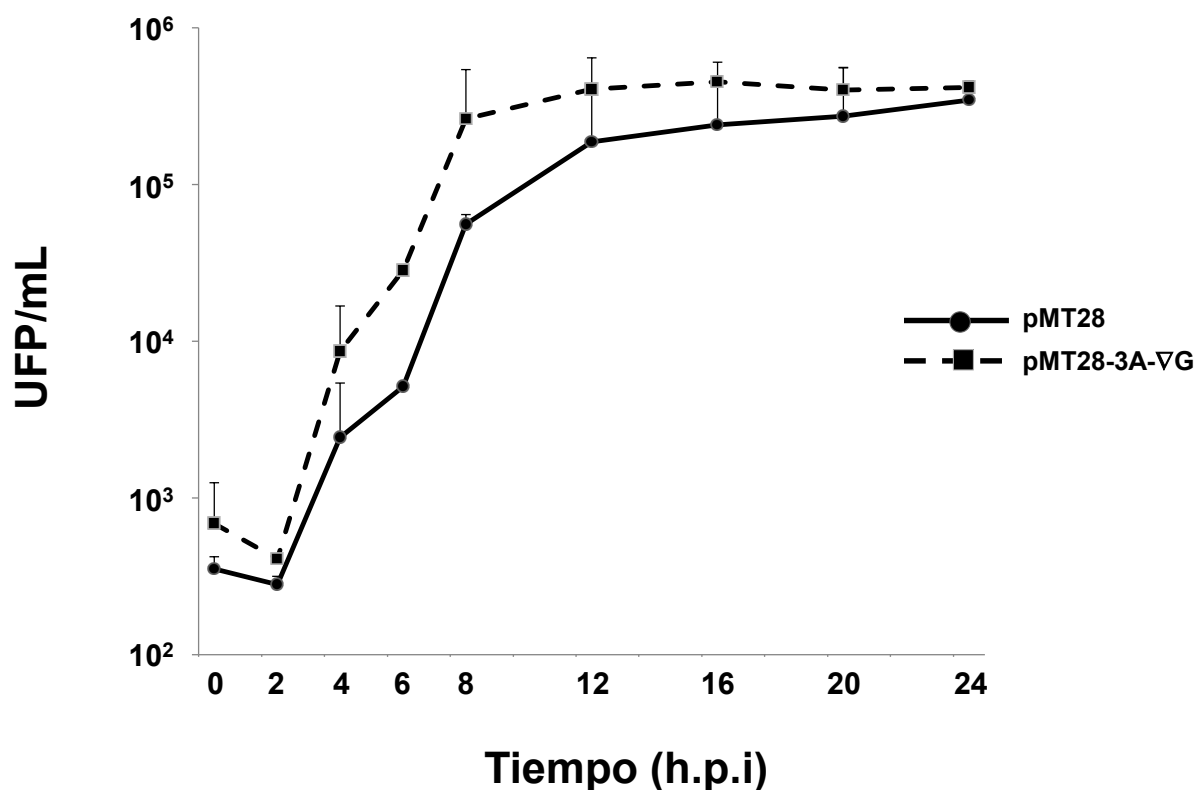


Figura R.2.8. Cinética de crecimiento de los virus 3A-∇G151 y *wt*. Título viral obtenido, como se indica en M.4.1, a las h.p.i indicadas en células BHK-21 infectadas (m.d.i de 1 UFP/célula) con los virus 3A-∇G151 (sexto pase) y *wt* (sexto pase). Los resultados representan la media de dos experimentos independientes, con titulaciones realizadas por triplicado en cada uno de ellos y las desviaciones estándar entre estos dos experimentos.

Como se observa en la Figura R.2.8, la cinética de producción viral del mutante 3A-∇G fue similar a la del virus *wt*, no observándose diferencias estadísticamente significativas a ninguno de los tiempos post-infección analizados.

Estos resultados indican que la inserción 3A-∇G no produce una bajada importante en la capacidad de multiplicación del VFA.

Paralelamente, se realizó un análisis por *wb* de las proteínas de la región 3AB expresadas por el virus *wt* y el mutante 3A-∇G151 en muestras tomadas a distintos tiempos tras la infección. Como se aprecia en la Figura R.2.9, a las 2 h.p.i se empezaron a distinguir bandas de tamaño correspondiente a los precursores 3ABBB y 3ABB en los extractos de células infectadas con cualquiera de los virus, así como una banda correspondiente al precursor 3AB en las células infectadas con el *wt* (Falk et al., 1992). La banda de tamaño correspondiente a la proteína 3A madura apareció a partir de las 4 h.p.i en células infectadas con el virus *wt*, no siendo observada a ninguno de los tiempos analizados en las células infectadas con el virus 3A-∇G, lo que confirma que la escisión de 3A está severamente afectada en el mutante 3A-∇G.

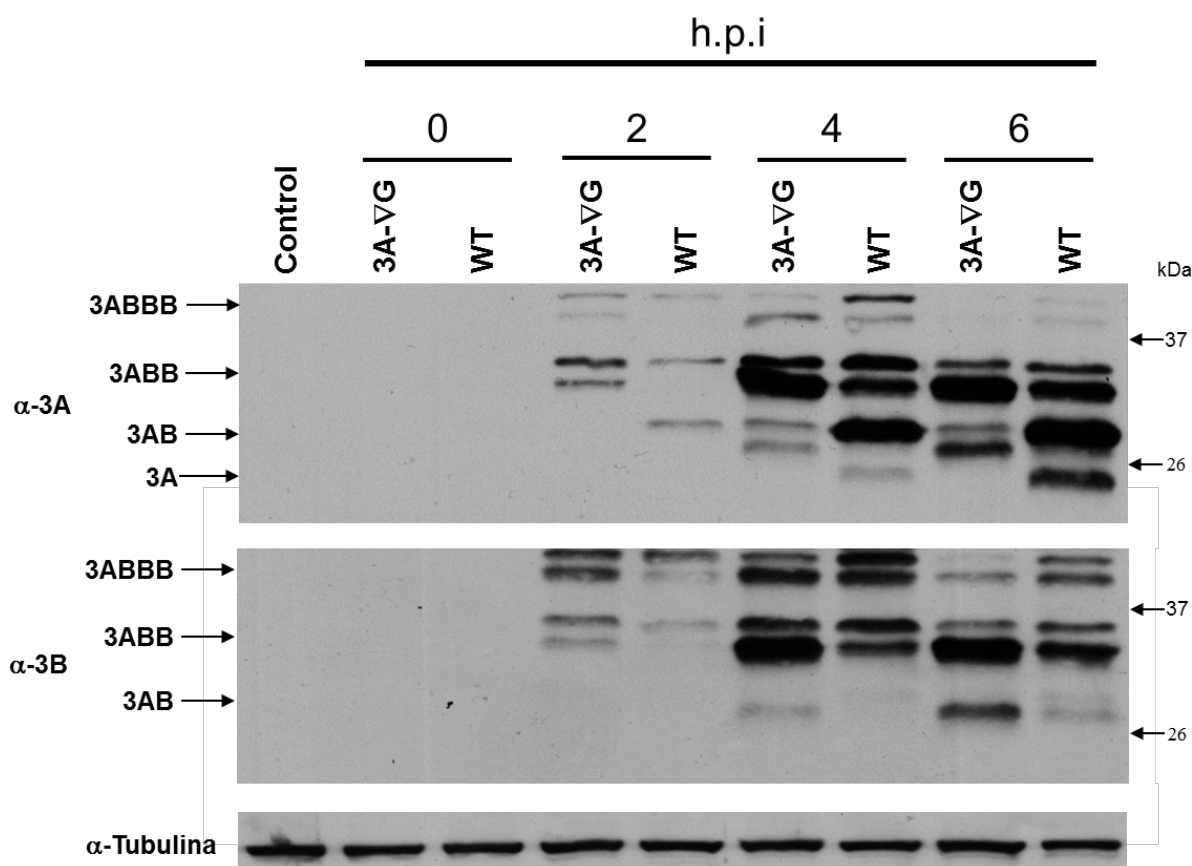


Figura R.2.9. Expresión de proteínas de la región 3AB durante la infección del virus mutante 3A- Δ G. Análisis por *wb* de SDS-PAGE al 12%, de extractos de monocapas de células BHK-21 infectadas (m.d.i de 1 UFP/célula) con los virus indicados: pMT28 (WT) y pMT28-3A- Δ G (3A- Δ G). Las proteínas se detectaron con los Amc 2C2 (anti 3A) y 1F8 (anti 3B). Como control de carga de proteína total se empleó un Apc α -Tubulina (anti β II-Tubulina). La migración de los marcadores proteicos (en KDa) se indica mediante flechas en el lado derecho. Las flechas del lado izquierdo indican las bandas cuya migración se corresponde con la esperada para las proteínas virales indicadas.

R.2.5 Patogenicidad de los ARNs del mutante pMT28-3A- Δ G en ratón lactante

Para evaluar las consecuencias que la mutación 3A- Δ G pudiera tener en la capacidad del virus para replicar y multiplicarse *in vivo* en condiciones más cercanas a las naturales, se evaluó su potencial para producir letalidad en ratones Swiss lactantes. Los resultados mostraron que el ARN *wt* de pMT28 fue patogénico, produciendo la muerte de los 10 ratones inoculados con dosis de 0,1 o 1 μ g de ARN (Tabla R.2.2), valores similares a los obtenidos previamente (Postigo, 2009, González-Magaldi, 2012). Por su parte, de los 15 ratones inoculados con ARN del mutante 3A- Δ G sólo uno de ellos, que recibió 400 μ g del ARN, resultó muerto. Esta muerte no se pudo correlacionar con la replicación del virus 3A- Δ G, ya que no fue posible amplificar por RT-PCR (M.22) secuencias específicas en muestras de ARN total aislado de un macerado

de músculo y cerebro del ratón muerto, amplificación que si fue posible en las muestras tomadas a dos de los ratones muertos que habían sido inoculados con el ARN *wt*.

Tabla R.2.2. Ensayo de letalidad en ratón lactante del ARN mutante 3A-∇G.

ARN	Dosis ARN (µg) ^a	Animales muertos/inoculados ^b
pMT28	0,1	5/5
	1	5/5
pMT28-3A-∇G	0,1	0/5
	1	0/5
	400	1/5

(a) Se inocularon ratones Swiss de 7 a 9 días de edad con la cantidad indicada de cada ARN en un volumen de 80 µl de PBS a los que se añadieron 20 µl de lipofectina.

(b) Número de bajas / total de animales inoculados, producidas durante los 7 días posteriores a la inoculación.

En su conjunto, los resultados obtenidos indican que la inserción de una Gly en la posición 151 disminuye drásticamente el procesamiento 3A/B. Este defecto en el procesamiento no es deletéreo para el VFA en cultivos celulares, ya que es posible recuperar virus infeccioso cuya capacidad de crecimiento aumenta durante los pases sucesivos hasta mostrar una cinética similar a la del virus *wt* tras el sexto pase seriado dado al virus recuperado de la transfección, manteniendo la mutación. No obstante, el efecto de la inserción es letal para la infectividad del ARN 3A-∇G en ratón lactante.

R.3 Expresión transitoria de los precursores 3ABC y P3

La expresión transitoria de las diferentes proteínas virales necesarias para la replicación es una estrategia ampliamente empleada para estudiar los requerimientos de la misma en diferentes modelos virales (Huang et al., 1990). En los picornavirus, existe controversia sobre la capacidad de sus PNE para ser funcionales en la replicación viral cuando se expresan en *trans* (Liu et al., 2007, Towner et al., 1998, Cao et al., 1995, Teterina et al., 1995, van Kuppeveld et al., 2002). Resultaba, por tanto, interesante poder estudiar las PNE del VFA y la implicación de éstas en la replicación y traducción del ARN_v, en un contexto en el que no se expresan las proteínas estructurales del virus y por tanto en condiciones que no permiten la producción de partículas virales infectivas.

Con estos antecedentes se decidió explorar la viabilidad de la reconstrucción de un entorno celular en el que se expresaran transitoriamente diferentes proteínas no estructurales del VFA para lo que se utilizaron como modelo los precursores virales 3ABC y P3 (3ABCD) que contienen la proteasa 3C, y que pueden, por tanto, ser procesados y producir proteínas maduras.

R.3.1 Aparición de mutaciones espontáneas en 3C de 3ABC y P3

Los experimentos de clonaje de las secuencias correspondientes a los precursores 3ABC y P3 en el plásmido pRSV dieron como resultado, en los diferentes intentos realizados, que se recuperasen tras las transformaciones de *E. coli* plásmidos en los que las secuencias de 3ABC o P3 insertadas presentaban alteraciones. Estos cambios implicaban reorganizaciones de la secuencia de 3C, o un número variable de mutaciones no sinónimas respecto a la secuencia parental de pMT28 utilizada en las ligaciones. Solo los plásmidos recuperados de tres de los clones obtenidos presentaron secuencias de 3C que portaban, cada una de ellas, una única mutación puntual que además era no sinónima. Estas sustituciones únicas (L151F, S182F y H181Y) y los clones en las que fueron encontradas se representan en la Figura R.3.1.

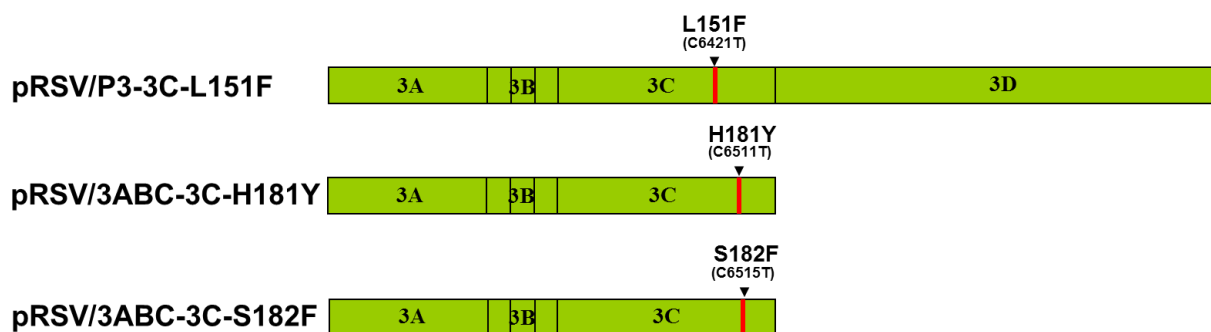


Figura R.3.1. Mutaciones espontáneas en la secuencia correspondiente a la proteína 3C encontradas durante el clonaje en *E. coli* de las PNE 3ABC y P3. Representación esquemática de las proteínas de las regiones 3ABC y P3 incluidas en cada plásmido recuperado tras el clonaje en *E. coli*. En cada caso se indica el reemplazamiento de aminoácido en 3C encontrado y, entre paréntesis, la sustitución de nucleótido responsable del mismo.

Al examinar las estructuras tridimensionales publicadas para la proteína 3C de VFA (Birtley et al., 2005, Grubman et al., 1995, Sweeney et al., 2007) (Figura I.6) se observó que las mutaciones encontradas afectaban posiciones implicadas en la actividad proteasa de 3C: i) el residuo polar S182 que estabiliza el sitio activo del enzima, ii) el residuo H181 que afecta al proceso de unión de sustrato por parte del enzima y, iii) el residuo L151 que afecta a la actividad proteasa al alterar la estabilización de una horquilla- β que interviene el proceso de reconocimiento de sustrato.

El análisis de las proteínas expresadas en células BHK-21 transfectadas con los plásmidos recuperados, reconocidas por un anticuerpo reactivo frente a 3A, reveló la presencia de bandas de tamaño correspondientes al precursor sin procesar (P3 o 3ABC) así como a los precursores 3ABC y/o 3ABBB (Figura R.3.2), lo que indicaba que la proteasa 3C mantenía un cierto nivel de capacidad de corte en las tres proteínas mutantes analizadas. Para comparar las eficacias de procesamiento proteolítico entre estos tres mutantes se determinó la intensidad de las bandas mostradas en la Figura R.3.2 correspondientes al precursor completo (P3 o 3ABC) y del producto de procesamiento (3ABBB) mediante densitometría del film con el que se expuso el *wb*. Asumiendo como 3ABBB las bandas que migran con una movilidad electroforética similar a la indicada para dicha proteína en el caso de P3-3C-L151F, los resultados indicaron una mayor capacidad de corte para P3-3C-L151F (67,6%), siendo los valores similares y menores para 3ABC-3C-H181Y (22,6%), y 3ABC-3C-S182F (22,4%).

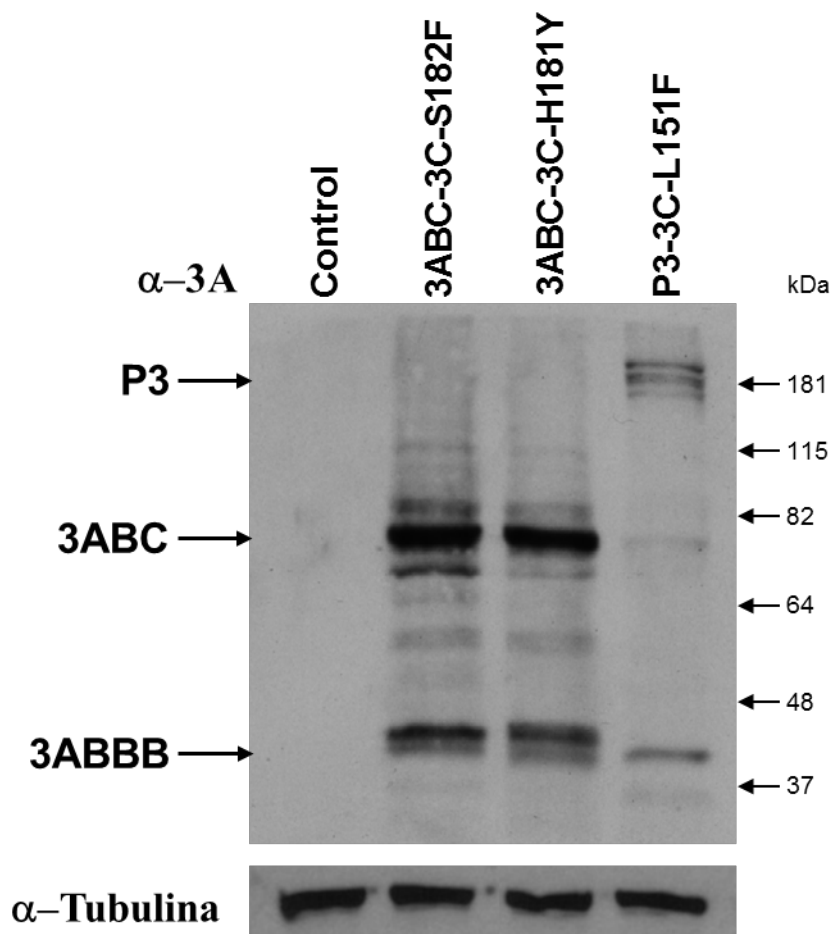


Figura R.3.2. Expresión transitoria de mutantes de las proteínas 3ABC y P3. Análisis por *wb* de SDS-PAGE 10% de extractos de monocapas de células BHK-21 transfectadas con 1 μ g de los plásmidos que expresan las proteínas indicadas (M.13.1). Las proteínas se detectaron con el Amc 2C2 (anti 3A). Como control de carga de proteína total se Apc α -Tubulina (anti β II-Tubulina). La migración de los marcadores proteicos (en KDa) se indica mediante flechas en el lado derecho. Las flechas del lado izquierdo indican las bandas cuya migración se corresponde con la esperada para las proteínas virales indicadas

Por otra parte, el análisis mediante *wb* de las proteínas de los extractos de bacterias utilizadas en el clonaje reveló que el promotor fuerte LTR del VSR, que controla la expresión de las secuencias clonadas en pRSV en células eucariotas, puede permitir la expresión de cantidades detectables de 3ABC y P3 (Figura R.3.3) en estas bacterias. Sin embargo, esta expresión no se observó en bacterias transformadas con pGEMT-Easy/3ABC o pGEMT-Easy/P3 (Figura R.3.3). Cabe destacar que las secuencias de 3ABC o P3 contenidas en el ADN de los pGEMT-Easy derivados no presentaron mutaciones y que estos plásmidos, utilizados como herramientas intermedias en el proceso de clonaje, carecen de promotores para la transcripción de las secuencias exógenas clonadas.

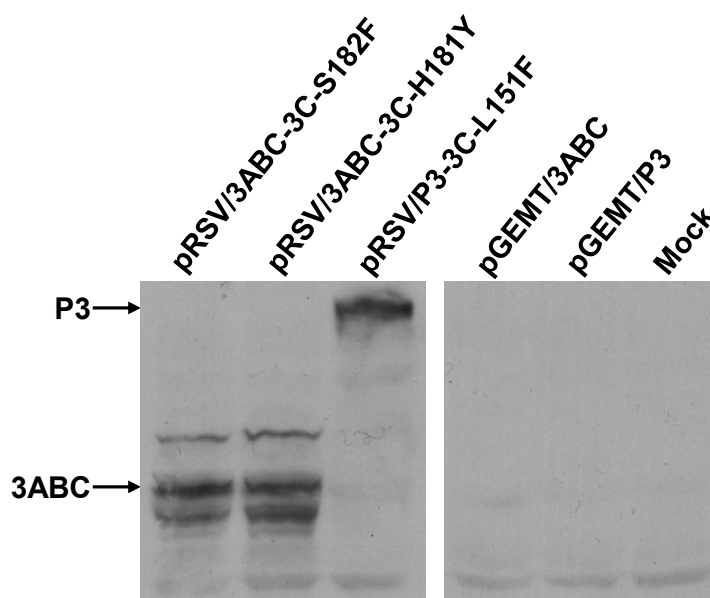


Figura R.3.3. Expresión de 3ABC y P3 en bacterias. *Western-blot* de los lisados de bacterias *E. coli* DH5- α (M.15.2) transformadas con ADN de los vectores derivados del pRSV o pGEM-T-Easy que portan la secuencia nucleotídica de las PNE 3ABC o P3 indicadas. Las proteínas se analizan por SDS-PAGE 10% y se detectan con el Amc 2C2. Como control células mock.

En conjunto, estos resultados sugieren que la expresión de la proteasa 3C de VFA durante la amplificación de los derivados de pRSV en *E. coli* es deletérea para la bacteria, seleccionándose mutaciones que disminuyen, aunque no eliminan, la actividad proteasa de 3C.

R.3.2 Toxicidad de los mutantes espontáneos en 3C de 3ABC y P3 en células BHK-21

La introducción de sustituciones de aminoácido en residuos del sitio activo de 3C de VFA ha sido utilizada como una estrategia para disminuir los efectos tóxicos asociados a su expresión en células eucarióticas (Grubman et al., 1995). Así pues, se analizó la toxicidad celular de los precursores 3ABC-3C-H181Y, 3ABC-3C-S182F y P3-3C-L151F en células que los expresaban transitoriamente (M.1.1). Como se muestra en la Figura R.3.4 y respecto al plásmido control pRSV/L, el porcentaje de supervivencia celular fue del 39%, 30% y 22% para las células transfectadas con los plásmidos pRSV/3ABC-3C-S182F, pRSV/3ABC-3C-H181Y y pRSV/P3-3C-L151F, respectivamente. Teniendo en cuenta que la mayor toxicidad (22% de supervivencia) se encontró en células que expresaban la mutación que menos afecta la actividad proteasa de 3C, L151F, los resultados son consistentes con que la disminución de la actividad proteasa de 3C se asocia con su menor toxicidad en cultivos celulares.

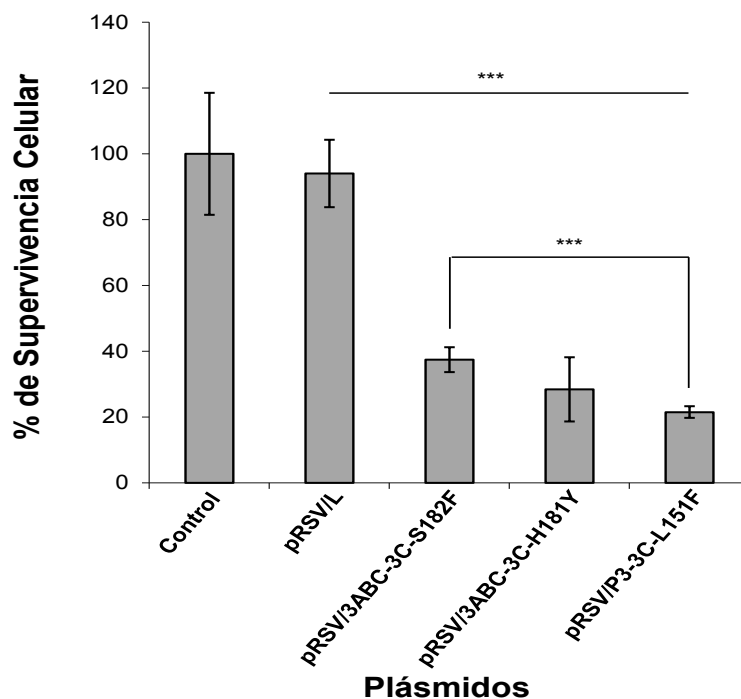


Figura R.3.4. Supervivencia celular tras la expresión transitoria de mutantes de las proteínas 3ABC y P3. Se transfectaron monocapas de células BHK-21 con 1 μ g de ADN del plásmido pRSV/L o de sus derivados indicados. A las 24 h.p.t, las células supervivientes fueron contadas en una cámara de Neubauer previa tinción con azul tripan. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas (***) = p-valor \leq 0.005), con el control (pRSV) y entre las 2 transfecciones indicadas.

R.3.3 Localización subcelular de los mutantes espontáneos en 3C de 3ABC y P3

Las proteínas 3CD y 3D expresadas transitoriamente a partir de pRSV/3D y pRSV/3CD son detectadas tanto en el citoplasma como, en menor medida, en el núcleo celular (García-Briones et al., 2006, Sánchez-Aparicio, 2010). Asimismo, se ha propuesto que la capacidad de 3A de unirse a membranas le permitía actuar como anclaje del precursor 3ABC a la cara externa del núcleo celular, lo que podría contribuir a la internalización nuclear de la proteasa 3C que proteoliza la histona H3 durante la infección viral (Capozzo et al., 2002). Con estos antecedentes, se llevó a cabo un análisis de la localización subcelular de los precursores 3ABC y P3 conteniendo las mutaciones que limitaban su procesamiento descritas anteriormente.

R.3.3.1 Detección por inmunofluorescencia de la expresión y distribución celular de las proteínas 3ABC y P3 mutadas en 3C

Se emplearon células BHK-21 transfectadas con los plásmidos pRSV/3ABC-3C-H181Y, pRSV/3ABC-3C-S182F y pRSV/P3-3C-L151F que fueron fijadas a las 24 h.p.t para su

análisis por microscopía confocal (M.19.2) para lo que se utilizaron Amc frente a las proteínas 3A y 3D. El porcentaje aproximado de células en las que se observó fluorescencia por encima del fondo fue del 5%. Como se muestra en la Figura R.3.5, en la gran mayoría de las células que expresaban P3-3C-L151F, la fluorescencia correspondiente a 3A y 3D se distribuyó con un patrón similar por toda la célula, incluyendo el núcleo y exceptuando los nucléolos (Figura R.3.5). Por otra parte la fluorescencia correspondiente a la proteína 3A expresada a partir de los precursores 3ABC-3C-H181Y y 3ABC-3C-S182F se localizó en el citoplasma, no detectándose de manera evidente en el núcleo celular. Por otra parte, no se observaron diferencias apreciables en el patrón granulado observado en el citoplasma de las células para las distintas construcciones analizadas.

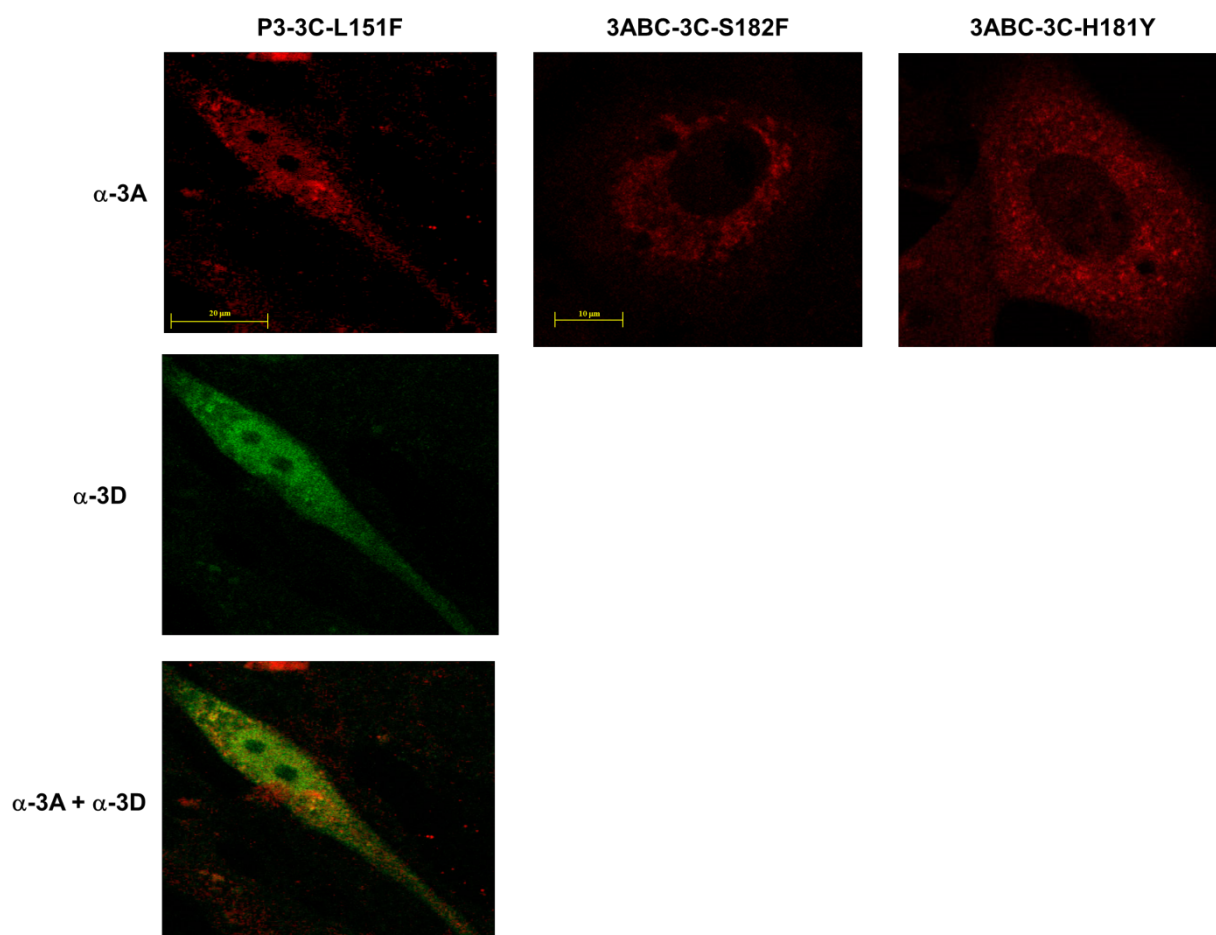


Figura R.3.5. Análisis mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal de la localización celular de 3ABC y P3. Se transfearon monocapas de células BHK-21 con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas (M.13.1). A las 24 h.p.t, la expresión de las proteínas virales fue analizada usando Apc anti 3A (163) y el Amc anti 3D (3B5). Las imágenes confocales muestran las IF simples con cada anticuerpo utilizado o la superposición de las obtenidas con cada uno, el color amarillo indica co-localización de 3A y 3D.

R.3.3.2 Distribución de las proteínas 3ABC y P3 en ensayos de fraccionamiento celular

Como parte del estudio de las interacciones celulares de los precursores 3ABC y P3 portando mutaciones espontaneas en 3C, se estudió su distribución tras el fraccionamiento de las células BHK-21 que los expresaban transitoriamente. En este ensayo se separaron dos fracciones, una enriquecida en componentes nucleares con los que cofraccionan también membranas asociadas al núcleo como las del RE (*Fn*), y otra correspondiente a proteínas citoplasmáticas solubles (*Fc*). Dichas fracciones fueron obtenidas por centrifugación diferencial de los extractos de células transfectadas con el ADN de los plásmidos pRSV/3ABC-3C-H181Y, pRSV/3ABC-3C-S182F y pRSV/P3-3C-L151F (M.16) y analizadas por *wb* (M.18.1), empleando anticuerpos frente a diferentes PNE virales. En este estudio se incluyeron también células que expresaban transitoriamente las proteínas 3D y 3A, para lo que se emplearon los plásmidos pRSV/3D y pRSV/3A (Garcia-Briones et al., 2006).

Los resultados obtenidos mostraron la presencia de bandas de proteínas de la movilidad esperada para P3-3C-L151F y para las proteínas resultantes de su procesamiento 3D, 3ABC y 3ABs, tanto en la *Fc* como en la *Fn* (Figura R.3.6, fracciones C y N). Las formas que más destacaron en la *Fn* fueron P3 y lo que parecen ser 3ABBB y 3A, observándose solo trazas de 3ABC y 3D (Figura R.3.6). En las células transfectadas con el plásmido pRSV/3A se observó la presencia de 3A en la *Fn*, aunque con una intensidad inferior a la observada en la *Fc* (Figura R.3.6). Igualmente, tanto 3ABC como las proteínas que de ella se derivan por proteólisis, 3A, 3AB, 3ABB y 3ABBB, obtenidas a partir de la expresión de los clones 3ABC-3C-H181Y y 3ABC-3C-S182F, se detectaron no solo en la *Fc*, sino que también en la fracción enriquecida con componentes nucleares (Figura R.3.6). Los resultados obtenidos con el anticuerpo frente a la proteína 3B, fueron en todos los casos semejantes a los observados con el anticuerpo frente a la proteína 3A, apreciándose una mayor intensidad de las bandas correspondientes a las proteínas 3ABBB y 3ABB.

Como se comentó antes, no fue posible recuperar clones de pRSV que expresasen proteínas 3C que no hubiesen incorporado mutaciones que afectaban su eficiencia catalítica. Con objeto de determinar la distribución subcelular de las proteínas de la región P3 de VFA procesadas por una proteína 3C *wt*, se llevó a cabo un análisis similar empleando células BHK-21 infectadas con el virus *wt* C-S8c1, que mostró un patrón de fraccionamiento, en líneas generales, comparable al obtenido con las expresiones transitorias de los precursores 3ABC-3C-H181Y, 3ABC-3C-S182F y P3-3C-L151F (Figuras R.3.6 y R.3.7) El análisis mediante *wb* de las *Fc* y *Fn* de las células BHK-21 infectadas (Figura R.3.7), confirmó la presencia en ambas fracciones del precursor P3, así como de las proteínas que de él se derivan, 3CD, 3D,

3ABC, 3BC, 3C y 3ABs. No obstante, la intensidad de algunas bandas fue menor en la *Fc*, como es el caso de las correspondientes a 3ABBB, 3ABB, 3A, 3ABC, 3BC y P3.

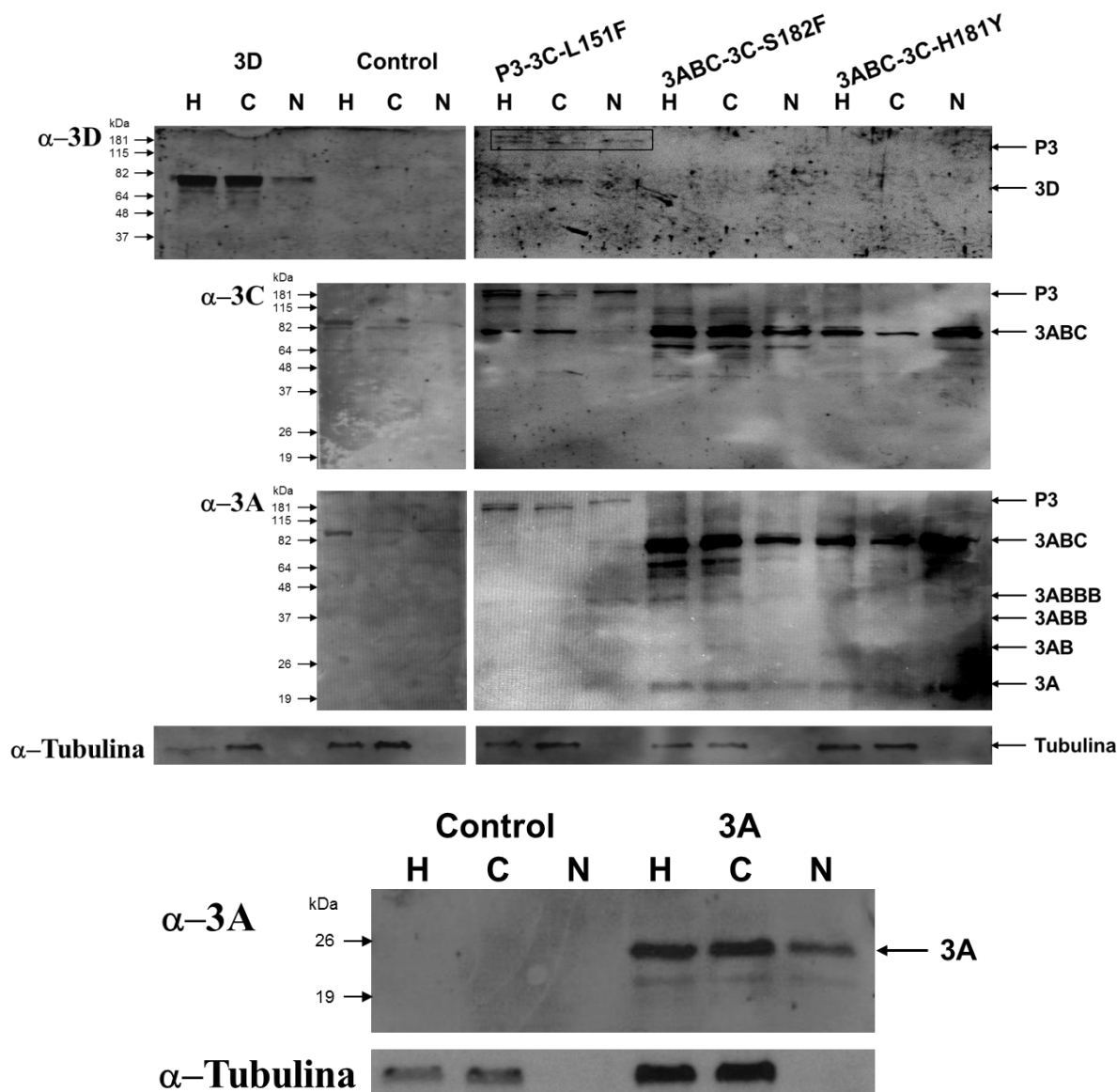


Figura R.3.6. Distribución de 3A y las proteínas derivadas de 3ABC y P3 en distintas fracciones celulares. Se analizaron células BHK-21 transfectadas con los plásmidos derivados de pRSV que expresan las proteínas indicadas, incluyendo pRSV como control. Las células se homogenizaron (H), separándose por centrifugación diferencial la fracción enriquecida en proteínas citoplasmáticas solubles (C) y la fracción enriquecida en componentes nucleares (N) que incluía membranas asociadas al núcleo, como las del RE. La presencia de proteínas de proteínas de VFA en estas fracciones se analizó empleando un Apc frente a 3D (E56) y Amc frente a 3C (2D2) y 3A (2C2). Como control de una proteína citoplasmática soluble se empleó un Apc α -Tubulina (anti β II-Tubulina), que fue también empleado como control de carga de proteína total. La migración de los marcadores proteicos (en KDa) se indica mediante flechas en el lado derecho. Las flechas del lado izquierdo indican las bandas cuya migración se corresponde con la esperada para las proteínas virales indicadas

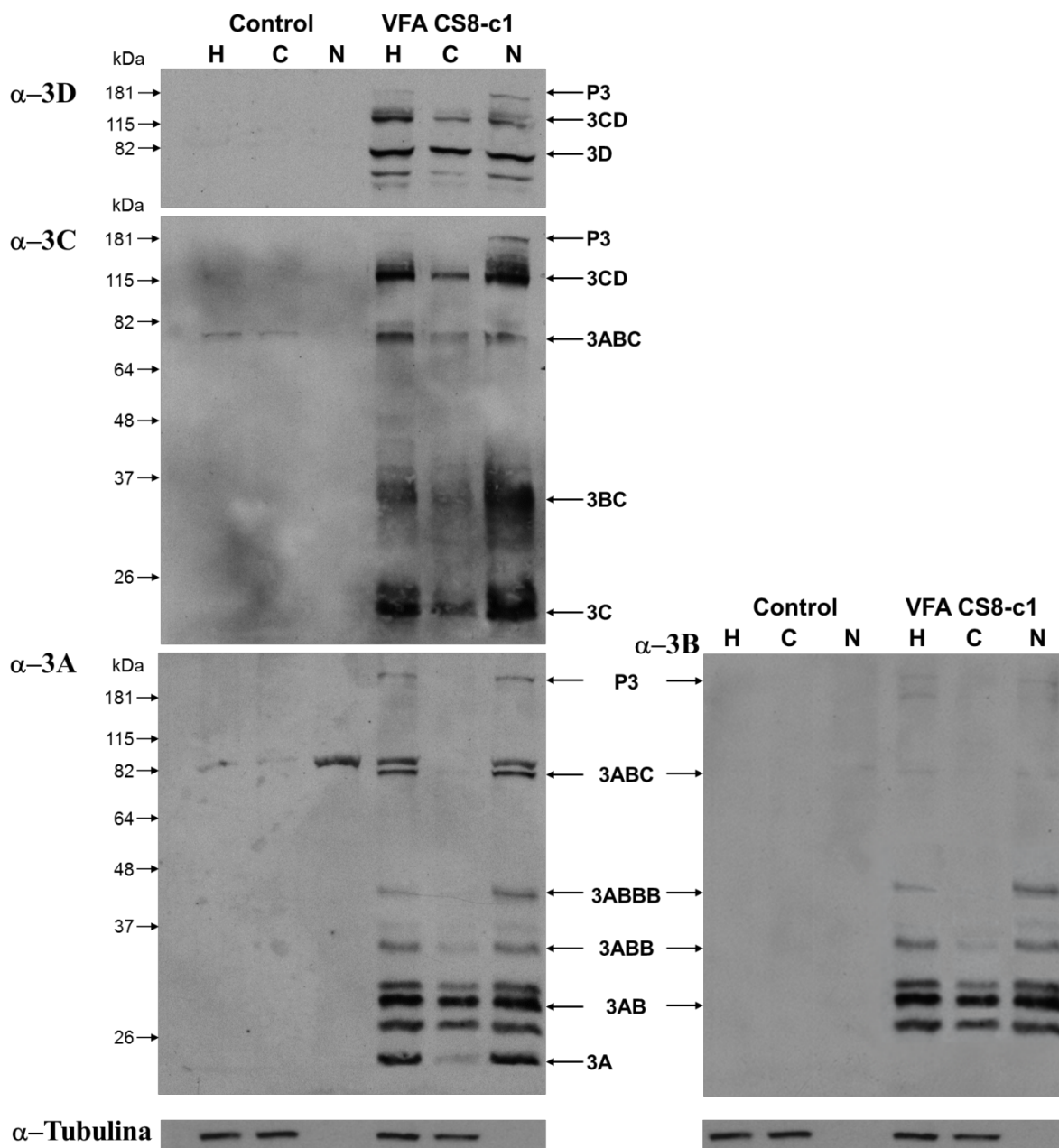


Figura R.3.7. Fraccionamiento de las proteínas de la región P3 de VFA en células infectadas. Se analizaron células BHK-21 infectadas con el preparado viral C-S8c1 (ver M.2) a una m.d.i de 1 UFP/célula. A las 2 h.p.i las células se homogenizaron (H), separándose por centrifugación diferencial la fracción enriquecida en proteínas citoplasmáticas solubles (C) y la fracción enriquecida en componentes nucleares (N) que incluía membranas asociadas al núcleo, como las del RE. La presencia de proteínas del VFA en estas fracciones se analizó empleando el Apc frente a 3D (E56) y Amc frente a 3C (2D2) y 3A (2C2). Como control de una proteína citoplasmática soluble se empleó un Apc α -Tubulina (anti β II-Tubulina), que fue empleado también como control de carga de proteína total. La migración de los marcadores proteicos (en KDa) se indica mediante flechas en el lado derecho. Las flechas del lado izquierdo indican las bandas cuya migración se corresponde con la esperada para las proteínas virales indicadas.

En resumen se puede decir que la proteína P3, y las proteínas que se derivan de ella, se hayan presentes en la *Fn* en las células infectadas con VFA de manera similar a como lo

hacen en las células transfectadas con los plásmidos (pRSV) que expresan las proteínas 3C mutadas 3ABC-3C-H181Y, 3ABC-3C-S182F y P3-3C-L151F (R.3.3.2).

R.3.4 Efecto de las mutaciones seleccionadas en 3C en la infectividad del VFA

Para determinar el efecto sobre la viabilidad viral de las mutaciones seleccionadas espontáneamente en *E. coli* durante el proceso de clonaje en pRSV de las secuencias correspondientes a P3 y 3ABC, éstas se introdujeron en el clon infeccioso pMT28, analizándose la infectividad de los ARNs transcritos a partir de estos plásmidos.

R.3.4.1 Clones infecciosos pMT28 con 3C mutadas

Para obtener ARNs de VFA que portasen las mutaciones puntuales 3C-L151F, 3C-H181Y y 3C-S182F, se construyeron a partir de pMT28 los plásmidos pMT28-3C-L151F, pMT28-3C-H181Y y pMT28-3C-S182F (ver M.10.1.2). El análisis de la secuencia nucleotídica de la región codificante de 3C de estos plásmidos mutantes (ver M.11), confirmó la presencia de las sustituciones introducidas.

R.3.4.2 Infectividad en cultivos celulares del ARN con las mutaciones L151F, S182F y H181Y en 3C

Para evaluar el efecto de las mutaciones introducidas en 3C sobre el ciclo viral, se analizó la capacidad de los diferentes ARNs mutados para producir ECP y virus infectivos, así como su infectividad específica en cultivos celulares.

La capacidad de los ARNs de VFA transcritos *in vitro* mutados en 3C para producir ECP se determinó transfectando 1µg de los ARNs obtenidos por transcripción *in vitro* en células BHK-21 (M.2.1). Como se indica en la Tabla R.3 los ARNs con las mutaciones 3C-L151F, 3C-H181Y o 3C-S182F no produjeron ECP, en ninguno de los ensayos de transfección realizados, durante las 72 horas posteriores a su transfección, ni tras los dos pases seriados dados a los extractos totales de las células transfectadas. Por ello se consideraron sus ARNs como no infectivos.

Resultados

Tabla R.3. ECP producido en células BHK-21 transfectadas con ARNs de VFA con mutaciones en 3C.

	hpt/i	Transfección			Primer pase			Segundo pase		
		24	48	72	24	48	72	24	48	72
RNA										
pMT28 ^a		++++ ^b	-	-	++++	-	-	++++	-	-
pMT28-3C-L151F ^a										
pMT28-3C-H181Y ^a										
pMT28-3C-S182F ^a										

a) En los 2 ensayos realizados se obtuvieron resultados similares

b) Estimación mediante observación al microscopio óptico, del ECP producido por el ARN transcrito a partir del mutante indicado en monocapas celulares (crecidas en placas de 35 mm de diámetro a los tiempos indicados. (++++ ECP en el 100% de la superficie; (x) ECP completo en el tiempo previo.

Por otro lado, mientras que el ARN control pMT28, presentó una infectividad específica de 9×10^4 UFP/ μg , los ARNs 3C-L151F, 3C-H181Y y 3C-S182F, no produjeron placas de lisis, ni siquiera al ser transfectados con 1 μg de ARN (Figura R.3.8). Estos resultados fueron consistentes con la falta de detección de virus infeccioso tanto en el extracto total de las células transfectadas con los ARNs de los diferentes mutantes, como en los correspondientes a las células empleadas en los dos pases seriados realizados (datos no mostrados).

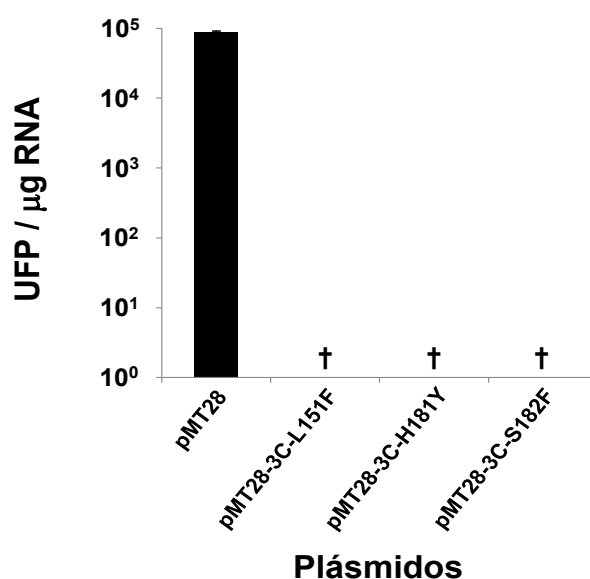


Figura R.3.8. Infectividad específica del ARN de los mutantes 3C-L151F, 3C-H181Y y 3C-S182F. Producción de UFP en células BHK-21 transfectadas con 1 ng de ARN viral de pMT28 y con hasta 1 μg de los ARNs obtenidos a partir de los

Resultados

plásmidos con las mutaciones de 3C indicadas. Las células, crecidas en placas de 35 mm de diámetro, se incubaron en medio semisólido según se detalla en M.4.2. † Células transfectadas con 1 µg del ARN indicado, en las que en ningún caso se recuperaron UFPs. Los resultados corresponden a tres determinaciones independientes para cada ARN; en el caso de pMT28 se muestra la media de estas determinaciones.

En conjunto, los resultados muestran que las mutaciones 3C-L151F, 3C-H181Y y 3C-S182F son letales para la replicación viral. Este efecto letal está posiblemente asociado a la limitada capacidad de procesamiento proteolítico de los polipéptidos precursores virales (R.3.4.1), el cual es necesario para la producción de las proteínas virales maduras.

R.4 Replicones de VFA

Como se comentó en la Introducción (I.4), una alternativa a la expresión transitoria de PNE virales para reproducir las interacciones entre éstas y la célula hospedadora en ausencia de infección es el empleo de replicones virales. Por ello, resultaba atrayente disponer de un replicón con homología de secuencia con la del clon infeccioso pMT28 utilizado en el laboratorio y a lo largo de esta Tesis Doctoral. Sin embargo, antes de abordar la construcción de este replicón se realizó un estudio preliminar empleando el único replicón de VFA cuya construcción se había publicado (pT7Rep) (McInerney et al., 2000) y cuya secuencia corresponde aun aislado del VFA de serotipo O (O₁K). En el plásmido que contiene este replicón, las secuencias correspondientes a las proteínas VP4, VP2 y parcialmente L y VP3 están deletadas, siendo reemplazadas por el gen CAT que actúa como *reporter* o testigo (Figura R.4.1) (McInerney et al., 2000). Este plásmido fue amablemente cedido por la Dra. Encarnación Martínez-Salas.

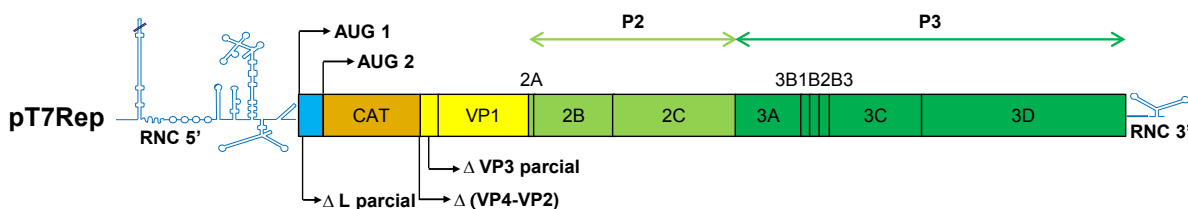


Figura R.4.1 Esquema del replicón pT7Rep. Los rectángulos representan la región codificante formada por la proteína L (azul) y proteínas de la región P1 (amarillo), P2 (verde claro), P3 (verde oscuro) y CAT (naranja), flanqueadas por las regiones no codificantes. Las secuencias de VFA corresponden a las del aislado O₁K (McInerney et al., 2000).

R.4.1 Caracterización del replicón de VFA de serotipo O: pT7Rep

En primer lugar se determinó la capacidad de pT7Rep para expresar PNE de VFA mediante ensayos de *wb* en extractos de células BHK-21 transfectadas con ARN transcrito *in vitro* del replicón pT7Rep (M.12 y M.13.2). En células transfectadas con 10 µg de ARN de pT7Rep los mayores niveles de proteína 3D y de las proteínas de la región 3ABBB (datos no mostrados) fueron detectados entre las 7 y las 18 h.p.t (Figura R.4.2.A). Por otro lado, se observó una disminución de los niveles de las proteínas de la región 3ABBB detectadas cuando la transfección se realizó a las 16 h.p.t con 1 µg de ARN de pT7Rep (Figura R.4.2.B).

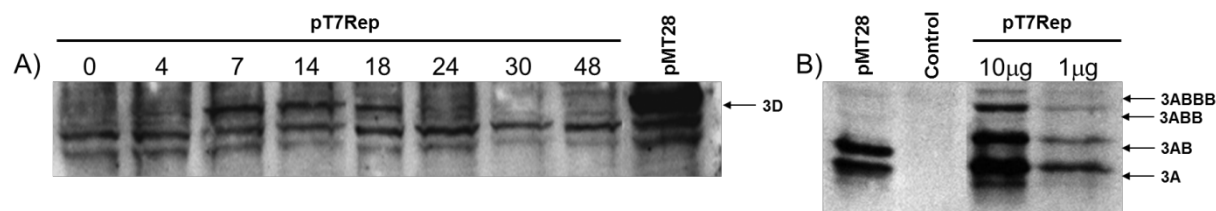


Figura R.4.2. Caracterización de la capacidad del replicón pT7Rep para traducir su ARN. Análisis por *wb* de SDS-PAGE al 12% de extractos de monocapas de células BHK-21 (crecidas en placas de 35 mm de diámetro), transfectadas con: A) 10 µg de ARN del replicón pT7Rep o 1 µg de ARN de pMT28; las células se lisaron y recogieron a las h.p.t indicadas, o B) 1 µg de ARN de pMT28 o las cantidades indicadas de ARN del replicón pT7Rep; las células se lisaron y recogieron a las 16 h.p.t (M.17 y M.18.1). Las proteínas se detectaron con Apc E56 (anti 3D) (A) y con el Amc 2C2 (anti 3A) (B).

Una vez comprobada la capacidad del ARN transcrito a partir de pT7Rep para sintetizar PNEs del virus y establecidas condiciones que permitían producir niveles detectables de dichas proteínas, se decidió emplear este replicón para construir una versión del mismo que contuviese secuencias de serotipo C. Para ello (en colaboración con Adriana Sanz García en el transcurso de su proyecto de fin de carrera), se construyó, primeramente, el replicón quimérico denominado pT7RepQ (Figura R.4.3). Este replicón se obtuvo sustituyendo el fragmento de ADN que codifica desde el extremo C-ter de la secuencia de 2B hasta el extremo N-ter de la secuencia de 3D (comprendido entre las dianas de restricción Bgl II y Bln I) por el homólogo correspondiente en la secuencia del VFA C-S8c1 de pMT28. La determinación de la secuencia correspondiente a las PNEs del replicón pT7RepQ obtenido (ver M.11) confirmó su correcta construcción

De forma análoga, se construyó a partir de pT7Rep el replicón pT7RepQΔ3A, utilizando el fragmento comprendido entre las dianas Bgl II y Bln I del clon infeccioso mutante pMT28-Δ3A (Figura R.4.3). El plásmido pT7RepQΔ3A resultante, al igual que su progenitor pMT28-Δ3A, tiene delecionada la casi totalidad de la secuencia de la proteína 3A, conservando sólo los cuatro aminoácidos de los extremos N-ter y C-ter, necesarios para su escisión de las proteínas flanqueantes por acción de la proteasa viral 3C (Postigo, 2009).

Resultados

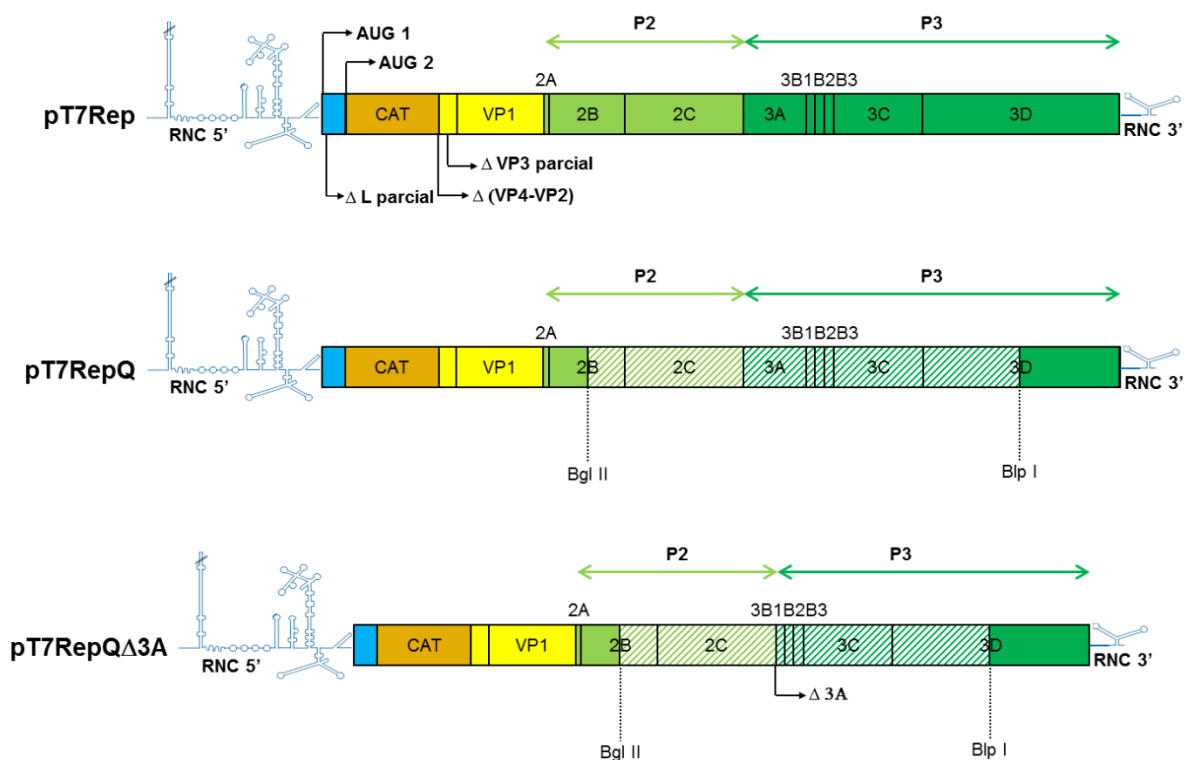


Figura R.4.3 Esquema de los replicones desarrollados a partir de pT7Rep. Los rectángulos representan la región codificante formada por la proteína L (azul) y proteínas de la región P1 (amarillo), P2 (verde claro), P3 (verde oscuro) y CAT (naranja), flanqueadas por las regiones no codificantes. El color sólido indica las secuencias correspondientes a VFA O₁K y el rayado las correspondientes a VFA C-S8c1.

Los replicones pT7RepQ y pT7RepQΔ3A fueron empleados para determinar mediante *wb* e inmunofluorescencia, su capacidad de expresar PNE de la región 3ABC. Los resultados mostraron que era posible detectar fluorescencia específica de las proteínas 3A y 3C en células transfectadas con pT7RepQ, pero no en aquellas transfectadas con pT7RepQΔ3A (Fig. R.4.4.A). Por otra parte, a diferencia de lo observado con pT7Rep, fue posible detectar 3A, pero no sus precursores en células transfectadas con el replicón pT7RepQ (Figura R.4.4.B y datos no mostrados), lo que sugiere posibles diferencias en el procesamiento de las proteínas de la región 3ABBB entre estas construcciones.

Por otra parte, el ensayo de *wb* confirmó que la delección de 3A en pT7RepQΔ3A elimina la capacidad de síntesis de 3A y sus precursores, resultado que es consistente con que la presencia de la proteína 3A es esencial para la infectividad del VFA (Postigo, 2009) y que corrobora el potencial de estos replicones como herramienta para estudiar la función e implicación de PNEs del VFA en la replicación y expresión de proteínas virales.

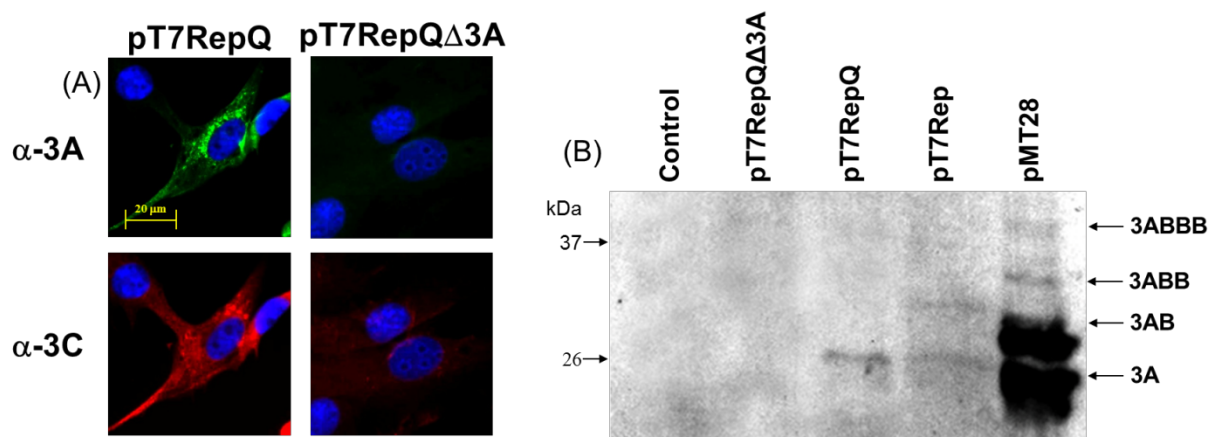


Figura R.4.4. Análisis mediante *wb* e IF de la expresión de las proteínas 3A, 3ABs y 3C de los replicones de VFA quiméricos. A) *Wb* de SDS-PAGE al 12% de extractos de monocapas de células BHK-21 (placas de 35 mm de diámetro), transfectadas con 1 μ g de ARN de pMT28 o con 10 μ g de ARN de los replicones indicados. Tras la transfección las células fueron incubadas a 37°C durante 16 h. Las proteínas se detectaron por *wb* con el Amc 2C2 (anti 3A). B) Se transfectaron monocapas de células BHK-21 con 10 μ g de ARN derivado de la construcción indicada. Las células se fijaron a las 16 h.p.t (M.18.2 y M.19.1). La detección de la proteína 3A se realizó con el Apc 163, y la de 3C con el Amc 2D2.

R.4.2 Construcción de replicones de VFA de serotipo C

Dado el interés en utilizar replicones correspondientes a la secuencia de VFA C-S8c1, se decidió emplear como plásmido de partida para su construcción el clon infeccioso pMT28. Empleando este plásmido se construyeron los replicones descritos a continuación.

El replicón RepMTS/L se diseñó para incluir la delección completa de las secuencias correspondientes a las proteínas L, VP4, VP2 y VP3 y la parcial de VP1, ya que mantiene la secuencia codificante de los 26 aminoácidos finales (78 nucleótidos) para poder escindirse de 2A (Ryan M.D., 2004). Entre la RNC 5' y la secuencia codificante del final de VP1 esta construcción porta como testigo el gen CAT completo, a falta del codón de terminación (M.23) que fue eliminado para evitar la interrupción de la traducción de la poliproteína viral. Sin embargo, el AUG inicial del gen CAT se mantuvo, ya que se delecionó la secuencia que codifica la proteína L, que contiene el codón de iniciación para el genoma viral (Figura R.4.5A).

Se construyó también el plásmido RepMTS/L-3D-D388A que es una versión modificada del RepMTS/L que porta la mutación D388A que inhibe la función polimerasa de 3D, y por tanto la replicación del ARNv (Arias et al., 2005). Este plásmido se sintetizó para disponer de un ARN control de RepMTS/L defectivo en replicación.

Por otra parte se construyó el replicón RepMTC/L también derivado del pMT28 en el que se mantuvo la secuencia codificante de la proteína L y los primeros tres aminoácidos de VP4, necesarios para la escisión L/VP4 (Ryan M.D., 2004). Este plásmido tiene delecionadas

las secuencias de VP2 y VP3 que están sustituidas por el gen CAT incompleto. Al que faltan los codones AUG de inicio, ya que la traducción se inicia en los codones AUG de la proteína L, y los tres siguientes, codificantes de los aminoácidos EKK y que están reemplazados por los tres primeros residuos de VP4 y dos aminoácidos más que codifican Arg (CGA) y Ser (TCG) para generar un sitio de corte Pvu I, necesario para el clonaje. De esta manera, los primeros aminoácidos en expresarse del gen CAT, ITGY, son los descritos como los esenciales en su extremo N-ter (Percy et al., 1992). También se eliminó, por la misma razón que en RepMTS/L, el codón de terminación, por lo que al gen CAT le siguen los veintiséis aminoácidos finales de VP1 para permitir su escisión de 2A (Figura R.4.5B).

El replicón RepMTC/L-3D-D388A, diseñado como control defectivo en replicación del ARN de RepMTC/L, portó la mutación D388A de la polimerasa 3D, descrita anteriormente.

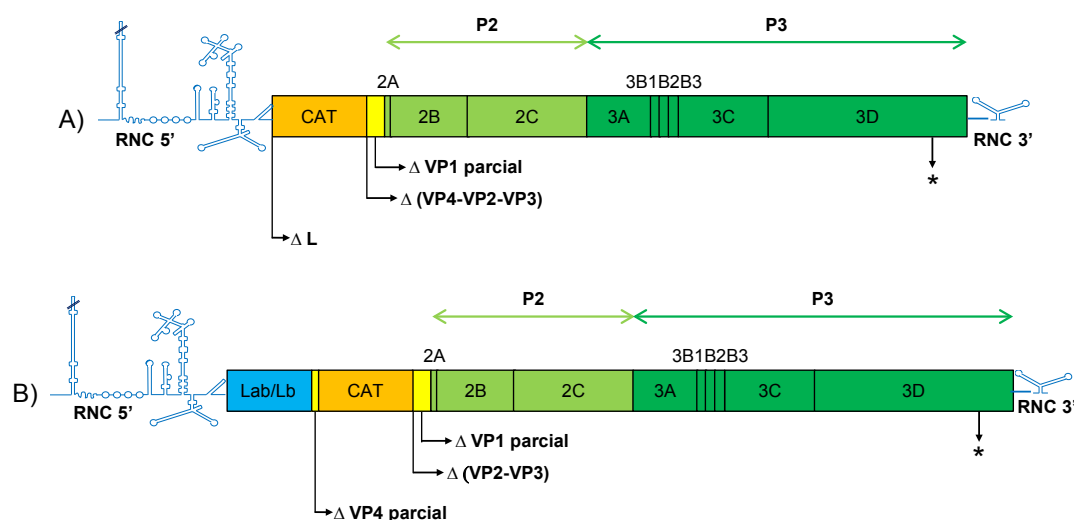


Figura R.4.5. Esquema de los replicones sin L RepMTS/L (A) y con L RepMTC/L (B). Se representa el genoma del VFA C-S8c1 incluyendo la secuencia del gen CAT. Los rectángulos representan la región codificante formada por la proteína L (azul) y proteínas de la región P1 (amarillo), P2 (verde claro), P3 (verde oscuro) y CAT (naranja), flanqueadas por las regiones no codificantes. * Los replicones control RepMTS/L-3D-D388A y RepMTC/L-3D-D388A contuvieron la sustitución D388A en 3D.

R.4.3 Caracterización de replicones de VFA de serotipo C

La funcionalidad de los replicones construidos se estudió, primeramente, mediante ensayos de *wb*. El replicón RepMTS/L fue capaz de expresar cantidades detectables de distintas proteínas no estructurales presentes en su secuencia, tales como 2C, 3A, 3AB y 3D pero no la proteína VP1, al haberse delecionado parte de su secuencia junto al resto de la poliproteína P1 (Figura R.4.6). Como era de esperar al carecer de una polimerasa activa, no se detectó ninguna

proteína viral en células transfectadas con RepMTS/L-3D-D388A, lo que indica que esta construcción no expresó niveles suficientes de ARNv que permitiesen su detección.

En el caso de RepMTC/L, los niveles de proteínas de VFA producidos estuvieron en el límite de detección del ensayo de *wb* empleado (R.4.6.B).

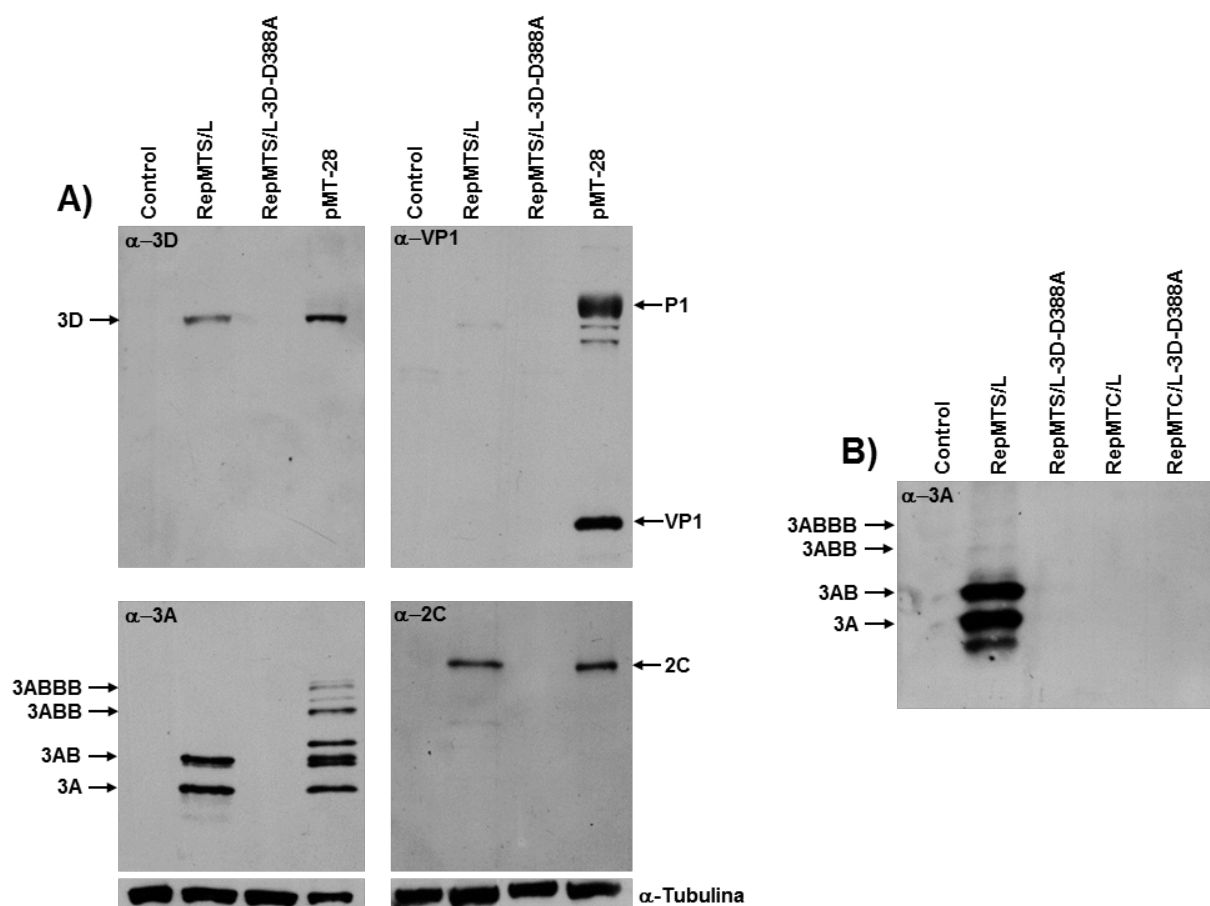


Figura R.4.6. Expresión de proteínas de VFA en células transfectadas con los replicones RepMTS/L y RepMTC/L. A) Análisis por *wb* de SDS-PAGE al 10% de extractos de monocapas de células BHK-21, transfectadas con 1 μ g de ARN de pMT28 o 10 μ g de ARN de los replicones RepMTS/L o RepMTS/L-3D-D388A. Tras la transfección, las células fueron incubadas a 37°C durante 16h. Las proteínas se detectaron por *wb* con los Amc 4B12 (anti 3D), SD6 (anti VP1), 2C2 (anti 3A) y 1C8 (anti 2C). Como control de carga de proteína total se empleó un Apc α -Tubulina (anti β II-Tubulina). B) Análisis por *wb* de SDS-PAGE al 12% de extractos de monocapas de células BHK-21, transfectadas con 10 μ g de ARN de los replicones RepMTS/L, RepMTS/L-3D-D388A, RepMTC/L o RepMTC/L-3D-D388A. Tras la transfección, las células fueron incubadas a 37°C durante 16h. Las proteínas se detectaron por *wb* con el Amc 2C2.

Los extractos de células BHK-21 transfectadas con ARN de las construcciones RepMTS/L y RepMTS/L-3D-D388A fueron empleados para determinar su capacidad de expresión mediante la determinación de la actividad CAT, para lo que se empleó como control positivo el plásmido pBIC (Martinez-Salas et al., 1993) cuya actividad se consideró el 100%. La actividad determinada para el ARN del replicón RepMTS/L fue del 123% en tanto que el

replicón control de actividad basal RepMTS/L-3D-D388A indujo valores similares a los de las células control transfectadas únicamente con lipofectina (Figura R.4.7).

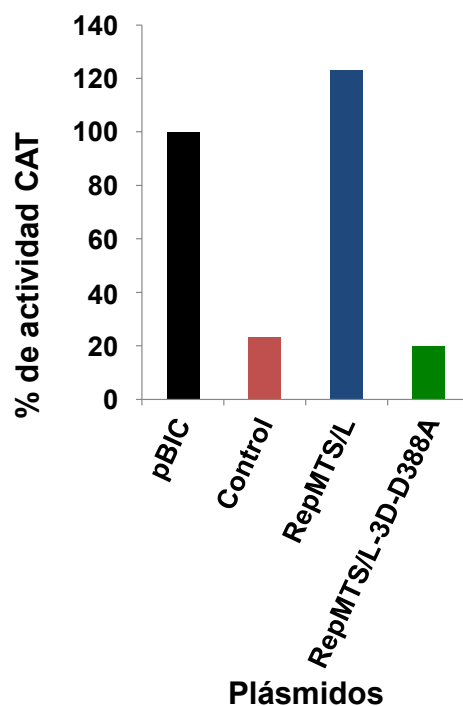


Figura R.4.7. Actividad de CAT en células transfectadas con replicones de VFA de serotipo C. Porcentaje de los valores de la actividad enzimática de CAT de células BHK-21 transfectadas con los replicones indicados, respecto a la de células transfectadas con el plásmido control pBIC, cuya actividad (c.p.m.) se tomó como 100% (M.21.1).

Los datos presentados indican que el ARN del replicón RepMTS/L es capaz de replicar y producir las proteínas virales cuya secuencia contiene. Por tanto, éste replicón se podría emplear en futuros estudios de las PNE del VFA y su implicación en la replicación y traducción del ARN viral. Sin embargo, los niveles de expresión obtenidos con el replicón RepMTC/L, no permitieron una detección clara de las proteínas virales.

Discusión

D.1 Estudio de mutantes en la interfaz de dimerización de la proteína 3A

En estudios previos realizados en el laboratorio se había determinado que la sustitución por un residuo cargado negativamente como el Glu de los residuos hidrofóbicos L38 y L41 de 3A, desestabilizaba la homodimerización de la proteína 3A y producía un retraso en la producción de ECP y de virus infeccioso respecto al virus *wt*, que se asociaba a la selección de virus en los que se restauraba el carácter hidrofóbico de estos residuos (Gonzalez-Magaldi et al., 2012, Postigo, 2009). Este resultado era análogo al obtenido con la proteína 3A de CVB3 al mutar los residuos L25 y L26 a Ala, lo que sugería que la preservación de un grupo de interacciones hidrofóbicas en esta región es esencial para la estabilidad del dímero de 3A (Wessels et al., 2006b). En la presente Tesis Doctoral se han estudiado la implicación de los residuos hidrofóbicos M29 e I42 en la infectividad del virus, la traducción de la poliproteína viral y en la estabilidad del dímero de 3A. Según el modelado informático empleado (I.3.1.1) los residuos M29 e I42 se encuentran situados en las regiones α -hélices que interaccionan de manera antiparalela en el dímero de 3A, el cual se estabiliza intermolecularmente mediante interacciones hidrofóbicas. Para llevar a cabo este estudio se construyeron mutantes en los residuos M29 e I42 que introducían cargas electrostáticas negativas mediante su sustitución por Asp, o cargas electrostáticas positivas mediante la sustitución por Arg. Para ello se generaron las construcciones mutantes pMT28-3A-M29D, pMT28-3A-M29R, pMT28-3A-I42D y pMT28-3A-I42R.

La introducción de cargas electrostáticas, tanto negativas como positivas, no afectó al procesamiento de la poliproteína viral en ensayos de traducción *in vitro*, ni a la movilidad electroforética de los productos del procesamiento (Figura R.1.2). Sin embargo, los ARNs transcritos a partir de las construcciones pMT28-3A-M29D y pMT28-3A-I42D, que introducían cargas negativas, no fueron capaces de producir ECP y ni de generar proteínas en cultivos celulares, no recuperándose virus ni tras 2 pases seriados en 2 ensayos independientes. Por su parte, los ARNs derivados de las construcciones pMT28-3A-M29R y pMT28-3A-I42R, aunque capaces de generar virus infectivos, de producir ECP y de dirigir la síntesis de proteínas, presentaron una cinética más lenta que la del ARN *wt*, en solo uno de los tres ensayos independientes realizados, ya que en los otros dos fueron letales. Así, la introducción de cargas electrostáticas en estos residuos es letal o altamente deletérea (Figura R.1.3 y Tabla R.1).

En línea con lo observado anteriormente (González-Magaldi et al., 2012), en aquellas transfecciones en que fue posible recuperar virus infeccioso, sus poblaciones mostraron

sustituciones de aminoácido cuya imposición se asociaba con la capacidad del virus para multiplicarse. De esta manera, en el ensayo con el transcrito 3A-I42R en el que se pudo recuperar virus infectivo se observó, a tiempos tardíos de la transfección, la imposición de una única sustitución, R42L, que restauraba el carácter hidrofóbico de este residuo. Este cambio se mantuvo en los siguientes pases seriados al tiempo que los tiempos de aparición de ECP y los títulos virales se acercaban a los correspondientes a la transfección con el ARN *wt* control.

Por otra parte, en el ARN recuperado tras la transfección con el transcrito 3A-M29R si bien se mantuvo la sustitución M29R introducida, mostró a tiempos tardíos del primer pase seriado la imposición del reemplazamiento I42L y, a partir del segundo pase seriado, la de una sustitución adicional S140F en el extremo C-ter de la proteína, sustitución que se observa también en aislados de otros serotipos del VFA (M.24). De manera concomitante a la imposición de estas sustituciones, los títulos virales fueron incrementándose con los pases hasta alcanzar en el tercero valores cercanos a los del virus *wt* recuperado de la transfección con RNA *wt*, aunque mantuvo el retraso en la aparición de ECP. La selección de la sustitución I42L en el primer pase del mutante 3A-M29R en que se pudo recuperar virus infectivo, puede estar relacionada con la interacción que se predice se establece entre los residuos M29 e I42 de 3A (ver I.3.1.1.1). Aunque no existen grandes diferencias electrostáticas ni estéricas entre Ile y Leu, la presencia de una Leu en la posición 42 podría permitir un mejor acomodamiento del extremo polar del residuo de Arg a través de su interacción con la cadena lateral de este aminoácido cargado. Por otra parte, el reemplazamiento S140F afecta al extremo opuesto de la molécula y queda por entender cómo puede contribuir a la viabilidad del virus. Esta misma mutación (S140F), aparece en aislados naturales del VFA y se ha observado que se selecciona tras pases del virus recuperado de una transfección con ARN que portaba una mutación de Tyr a Phe en el residuo 11 de 3A, resultando en un aumento notable del título viral (datos no mostrados).

La mutación seleccionada en el virus recuperado tras la transfección con el ARN I42R consistió en una única transversión (cga→cta). Dado que la reversión directa de la mutación inicial (I42R) implica un mínimo de dos sustituciones (transversiones), la imposición del reemplazamiento R42L puede explicarse como la selección de una solución más probable que restaura el carácter hidrofóbico del residuo. La reversión directa de la mutación M29R necesita tres sustituciones de nucleótido (1 transición y 2 transversiones). En este caso, el virus recuperado tras la transfección no seleccionó cambios que restaurasen la hidrofobicidad del residuo, observándose, primero la imposición de la mutación I42L (atc→ctc) y posteriormente de la sustitución S140F (tct→ttt).

Como era de esperar, solo en los ensayos en los que los ARNs con las mutaciones M29R e I42R fueron capaces de generar ECP y virus infeccioso, se pudo detectar síntesis de ARN+ viral en valores similares a los del *wt* (Figura R.1.5).

Las sustituciones M29R y I42R no afectaron ni a los niveles de traducción del ARN viral, ni al patrón de procesamiento de las proteínas virales en lisados de reticulocitos. Aunque la traducción de la poliproteína viral en éste sistema puede presentar diferencias respecto a la que ocurre en células infectadas, estos resultados apuntan a que los menores niveles de expresión de las proteínas de la región 3AB en la transfección y primeros pases seriados de los mutantes 3A-M29R y 3A-I42R no son debidos a un efecto directo de éstas mutaciones sobre la traducción del ARN viral.

El análisis de la distribución celular por IF llevado a cabo empleando los virus recuperados tras los distintos pases seriados que contenían las mutaciones seleccionadas 3A-M29R* (I42L y S140F) y 3A-I42R* (R42L) mostraron que la proteína 3A presenta en general un patrón, distribución e intensidades similares al *wt* (Figura R.1.7).

Dada la imposibilidad de recuperar virus con las mutaciones introducidas inicialmente en la proteína 3A mutadas, se decidió llevar a cabo un estudio de la interacción de estas proteínas con la célula hospedadora mediante su expresión transitoria en células BHK-21. La distribución celular de las proteínas 3A mutantes M29D, M29R, I42D e I42R no presentó tampoco diferencias significativas respecto a la proteína 3A *wt* cuando se expresaron transitoriamente en células BHK-21 a partir de derivados del vector pRSV (Figura R.1.8). En todos los casos se observó un patrón difuso con una distribución citoplasmática uniforme (Figura R.1.8) que sugiere que la modificación del carácter hidrofóbico de la interfaz de dimerización de la proteína 3A no altera de manera clara su distribución celular.

Por otra parte, cuando se analizaron las proteínas 3A procedentes de extractos de células BHK-21 que expresaban transitoriamente las proteínas mutantes M29D, M29R, I42D e I42R, no se observaron cambios importantes en la intensidad de las bandas correspondiente al dímero de 3A de los mutantes con respecto a la proteína 3A *wt* (Figura R.1.9). Este resultado contrasta con la disminución observada de la banda dimérica de 3A en ensayos análogos llevados a cabo con los mutantes de 3A L38E y L41E, para los que su capacidad de interferir en la formación de dímeros de 3A en condiciones más cercanas a las fisiológicas fue confirmada empleando ensayos de ligación *in situ* (Gonzalez-Magaldi et al., 2012) empleando células que las expresaban transitoriamente. Queda por determinar si las sustituciones M29D, M29R, I42D e I42R pueden afectar a la dimerización de 3A empleando esta técnica de ligación *in situ*.

En conjunto, el mantenimiento del carácter hidrofóbico de los aminoácidos en las posiciones 29 y 42 de la proteína 3A parece ser importante para viabilidad del virus, ya que su alteración resulta deletérea y dificulta notablemente la selección de variantes virales que permitan el progreso de infección (Tabla R.1). La recuperación de virus infeccioso se asocia a la selección de mutaciones revertientes o compensatorias, habiendo sido necesario pases adicionales al virus recuperado de la transfección para obtener título similares a los recuperados a partir del ARN *wt*.

La relevancia funcional de las α -hélices hidrofóbicas implicadas en la dimerización de 3A hace posible explorar estrategias antivirales basadas en su desestabilización, como el empleo de péptidos correspondientes a la secuencia de estas regiones que podrían modificar la estabilidad del dímero.

D.2 Análisis funcional de la relevancia del procesamiento de la proteína 3A

En otros picornavirus la proteína 3A y sus precursores están implicados en procesos de replicación y crecimiento viral. Se ha descrito para PV y VHA que algunas de las funciones en el ciclo viral inicialmente atribuidas a 3A son en realidad desarrolladas por precursores de mayor peso molecular como 3AB o 3ABC (Lama et al., 1995, Paul et al., 1994, Kusov and Gauss-Muller, 1999, Mason et al., 2003). Además, la correcta liberación de cada uno de los precursores y de la proteína 3A madura, a partir de la poliproteína viral parece ser esencial para el crecimiento del VHA, pues alteraciones cuantitativas y temporales en la liberación por la proteasa 3C de la proteína 3A a partir del precursor P3, pueden afectar en distinto grado la capacidad de mantener una replicación productiva a partir de ARN derivado de clones infecciosos (Kusov and Gauss-Muller, 1999). En el caso concreto del VFA, los resultados obtenidos con mutantes que portan la inserción de un residuo de Gly en las secuencias diana de la proteasa 3C en los extremos N-ter y C-ter de la proteína 3A (en las posiciones 5 y 151) o solo en el extremo N-ter de 3A, sugieren que estas mutaciones producen un bloqueo de la replicación del ARN viral (Postigo, 2009) de acuerdo a lo publicado para mutaciones análogas en el VHA (Kusov and Gauss-Muller, 1999).

La construcción y el estudio del mutante 3A- ∇ G realizado en esta Tesis Doctoral han permitido determinar que la correcta escisión de 3A/3B no es esencial para la replicación viral. El efecto de la inserción introducida sobre el procesamiento de 3A se confirmó en experimentos

de traducción *in vitro*, en los que se observó que el patrón de procesamiento de la poliproteína viral para el mutante de inserción 3A-∇G presenta una acumulación de una proteína cuyo tamaño coincide con el esperado para el precursor 3BBC y cuya aparición es consistente con la falta de procesamiento del corte 3A/3B1 por la proteasa 3C, así como un ligero aumento de la banda correspondiente al precursor 3CD (Figura R.2.2).

A diferencia del efecto deletéreo de la inserción de una Gly en la diana de la proteasa 3C existente entre 2C/3A y de la doble inserción 2C/3A y 3A/3B1 que producen ARNs inviábiles, el ARN 3A-∇G que presenta alterado el corte 3A/3B1 (secuencia PQAE), si produjo virus viable, aunque la producción viral mostró una cinética retrasada respecto a la del ARN *wt*, tanto en la aparición de ECP como en la síntesis *de novo* de ARN+ (Tabla R.2.1 y Figuras R.2.3 y R.2.5). Los virus producidos mantuvieron la inserción de Gly hasta el sexto pase seriado, sin introducir mutaciones compensatorias adicionales en el resto del genoma (R.2.3.2). En este pase, el virus *wt* y el 3A-∇G mostraron una cinética de producción viral similar (Figura R.2.8) en condiciones en las que la producción/liberación de la proteína 3A aislada continuaba estando muy disminuida (Figura R.2.9). De esta manera, en presencia de solo trazas o incluso en ausencia de 3A (pero en presencia de 3AB), el virus 3A-∇G puede multiplicarse con niveles cercanos a los del *wt*.

La merma en la capacidad del mutante 3A-∇G para liberar proteína 3A madura podría explicar la disminución inicial de la infectividad y capacidad de replicar del ARN transfectante, ya que se postula, que los picornavirus deben mantener un cierto balance en la proporción de los niveles de los precursores de 3A y la propia proteína madura. En este sentido, se ha demostrado que variaciones en la concentración de diversos precursores de proteólisis debidos al procesamiento alterado del precursor P3, pueden afectar el proceso de replicación del ARN viral (precursor 3AB), y los procesos de encapsidación viral (precursor 3ABC), al alterar el procesamiento proteolítico de las proteínas estructurales de la región P1 (Kusov and Gauss-Muller, 1999).

No obstante, el mutante 3A-∇G es capaz de optimizar su capacidad de replicación, hasta niveles similares a los del virus *wt*, en ausencia de la selección en su secuencia consenso de nuevas mutaciones detectables con la técnica de secuenciación empleada, que no permite caracterizar la longitud de los tramos homopoliméricos del ARN viral (poli C y poli A). El ARN derivado de clones infecciosos presenta un segmento de poli-C, situado entre el fragmento S y los pseudonudos (Figura I.1), de menor longitud que el del genoma de aislados naturales del virus, incrementándose su tamaño a lo largo de los pases sucesivos en cultivos

celulares de los virus derivados del ARN producido a partir del clon infeccioso (Mason et al., 2003, Rieder et al., 1993). Se sabe que la longitud del poli-C afecta a la patogenicidad del virus, siendo necesaria una longitud mínima para recuperar virus vivo a partir de transcritos de clones infecciosos (Zibert et al., 1990, Mason et al., 2003). En concreto el clon infeccioso pMT28, utilizado en este trabajo, presenta un poli-C de 35 residuos, notablemente inferior al de aislados naturales del virus (entre 80 y 400 nucleótidos) (García-Arriaza et al., 2004).

La proteína 3A de los picornavirus interviene en la replicación del ARN viral (Pacheco et al., 2003), sin embargo, al menos en el caso del VFA, no lo hace interaccionando directamente ni con PCBP2 ni el poli-C (Lawrence and Rieder, 2009). No obstante, en PV se ha descrito que el precursor 3AB puede funcionar como una chaperona de ARN (DeStefano and Titilope, 2006, Gangaramani et al., 2010) implicada en la apertura de la horquilla del *Cre*, permitiendo así el acceso de la polimerasa viral y favoreciendo la uridilación de VPg, entre otras funciones. Así mismo, se ha descrito que mutaciones en los últimos 7 aminoácidos de 3A abrogan o reducen en distinto grado esta actividad chaperona (DeStefano and Titilope, 2006, Gangaramani et al., 2010). Asumiendo la homología funcional de la región 3AB1 en VFA y la implicación de esta putativa actividad chaperona de RNA en la elongación del poli-C, la inserción de una Gly en el extremo C-ter de 3A de VFA, podría contribuir a una menor eficiencia en la elongación del tramo de poli-C del ARN 3A-∇G, limitación que dejaría de ser relevante una vez alcanzada, durante los pases sucesivos, una longitud del poli-C optimizada.

Por otra parte, las proporciones en células infectadas entre los distintos precursores 3ABs y las propias proteínas 3A y 3B maduras del mutante 3A-∇G están alteradas, tanto en la traducción (*in vitro*) en lisados de reticulocitos como en células BHK-21, respecto a las del virus *wt*. Sin embargo, este diferente procesamiento no parece ser determinante para la replicación del virus ya que el virus del sexto pase, que presenta una capacidad de crecimiento similar a la del virus *wt*, mantiene este patrón de procesamiento.

Los resultados de infectividad en el modelo de ratón lactante muestran que, contrariamente a lo observado en cultivos celulares, el mutante 3A-∇G, no fue capaz de producir letalidad (Tabla R.2.2), lo que puede deberse a que las desventajas asociadas a la mutación 3A-∇G, resulten una barrera infranqueable para su multiplicación *in vivo* en el contexto de un organismo completo. Por otra parte, se ha descrito que cambios en el extremo C-ter de 3A afectan al rango de hospedador del VFA (Pacheco et al., 2013, Pacheco et al., 2003, Knowles et al., 2001a), por lo que la ausencia de letalidad en ratones lactantes podría deberse a

que el mutante 3A-∇G no fuese capaz de progresar en los tejidos del modelo animal empleado (ratón swiss).

Aun teniendo severamente limitado el procesamiento 3A/3B el virus es viable, lo que sugiere que los precursores 3ABs pueden llevar a cabo las funciones esenciales que requieren de la proteína 3A o que las trazas de 3A libre producidas por el mutante 3A-∇G son suficientes para realizar estas funciones.

D.3 Expresión transitoria de los precursores 3ABC y P3

Resultaba interesante poder estudiar la distribución de las PNE del VFA y su implicación en la replicación y traducción del ARNv, en un contexto en el que no es posible la producción de partículas virales infectivas, lo que además de su interés básico presenta considerables ventajas logísticas derivadas de la no manipulación de virus infeccioso. No obstante, existían publicaciones discrepantes sobre la capacidad de las PNEs de diferentes picornavirus para ser funcionales para la replicación viral cuando se expresan en *trans* (Liu et al., 2007, Towner et al., 1998, Cao et al., 1995, Teterina et al., 1995, van Kuppeveld et al., 2002)

Para explorar la viabilidad de este tipo de abordajes con el VFA, se decidió clonar diferentes PNEs de la región P3 en el vector pRSV para su expresión transitoria en células BHK-21. En el proceso de clonaje de 3ABC y 3ABCD (P3), solo se pudieron recuperar derivados de pRSV que presentaban mutaciones, en general múltiples, en la secuencia correspondiente a la proteasa viral 3C. Este fenómeno podría deberse a la transcripción críptica de 3C en *E. coli* a partir del promotor de RSV presente en pRSV que indujera la selección de variantes de la proteasa 3C menos tóxicas. De hecho, se ha descrito la toxicidad de la proteasa 3C para células eucarióticas (Martinez-Salas and Domingo, 1995, Sariya et al., 2011, Sweeney et al., 2007) En este sentido, se habían descrito diferentes estrategias para clonar y expresar 3C aislada como la de conseguir bajos niveles de expresión de 3C, empleando para ello sistemas inducibles (Rombaut and Jore, 1997, Martinez-Salas and Domingo, 1995) o a la de expresar 3C modificadas de tal modo que su capacidad proteolítica estuviera disminuida (Grubman et al., 1995).

Entre los numerosos mutantes obtenidos en este estudio, solo tres, dos para 3ABC (3ABC-3C-H181Y y 3ABC-3C-S182F) y una para P3 (P3-3C-L151F), presentaban una única

mutación puntual, que implicaba un cambio de aminoácido en residuos de la proteína 3C asociados a su actividad catalítica (Figuras R.3.1 y R.3.2), por lo que resultaba de interés su caracterización. Ninguna de las tres mutaciones encontradas eliminó completamente la capacidad de procesamiento de 3C, observándose bandas de proteína de tamaños correspondientes al precursor sin procesar (P3 o 3ABC) así como a los productos procesados 3ABC y/o 3ABBB (Figura R.3.2) y 3A/3ABs (Figura R.3.6) en las células BHK-21 transfectadas. Las eficacias de procesamiento proteolítico de 3C entre estos mutantes, estimadas mediante la comparación de la intensidad de las bandas de proteína observadas para la banda asignada como 3ABBB respecto a los correspondientes precursores completos (P3 o 3ABC) (Figura R.3.2), fueron de: P3-3C-L151F (67,6%), 3ABC-3C-H181Y (22,6%), y 3ABC-3C-S182F (22,4%). Estos valores correlacionaron con los de toxicidad de clones obtenidos al transfectarse en células BHK-21 (Figura R.3.4), indicando que la construcción que retenía mayor capacidad de procesamiento proteolítico, P3-3C-L151F, era la que causaba mayor daño celular y, por tanto, menor supervivencia.

Del análisis de los datos publicados sobre la estructura tridimensional de la proteína 3C de VFA (Birtley et al., 2005, Grubman et al., 1995, Sweeney et al., 2007) (Figura D.3.1) se pudo inferir que: i) en la sustitución S182F la introducción de un residuo apolar (Phe) puede alterar la estabilización ejercida por el residuo de polar de Ser sobre el sitio activo del enzima, ii) la mutación H181Y afecta al proceso de unión de sustrato por parte del enzima. Estos cambios se predice pueden tener un efecto severo sobre la actividad proteasa de 3C. Por otra parte, el cambio L151F altera la estabilización de una horquilla- β que interviene el proceso de reconocimiento de sustrato, siendo esperable que su efecto sobre la actividad proteasa sea menos drástico.

Por otro lado, los estudios de IF confocal de células BHK-21 mostraron la presencia de las proteínas 3A y 3D, procedentes de la expresión transitoria de P3-3C-L151F por toda la célula, incluyendo el núcleo, pero no los nucléolos. Estos resultados son consistentes con los datos previos obtenidos del laboratorio, en los que se había demostrado la existencia de una SLN en la proteína 3D que puede dirigir al núcleo celular tanto 3D como 3CD (Sánchez-Aparicio, 2010, Garcia-Briones et al., 2006). Asimismo, los resultados indican que 3A se puede localizar, también, en el núcleo de las células transfectadas lo que indica que el precursor P3 es transportado al núcleo (Fig. R.3.5). Contrariamente, la proteína 3A expresadas transitoriamente a partir de 3ABC-3C-H181Y y pRSV/3ABC-3C-S182F se distribuyó por toda la célula exceptuando los núcleos, sugiriendo que el precursor 3ABC no tiene, per se, capacidad de ser transportado al núcleo celular.

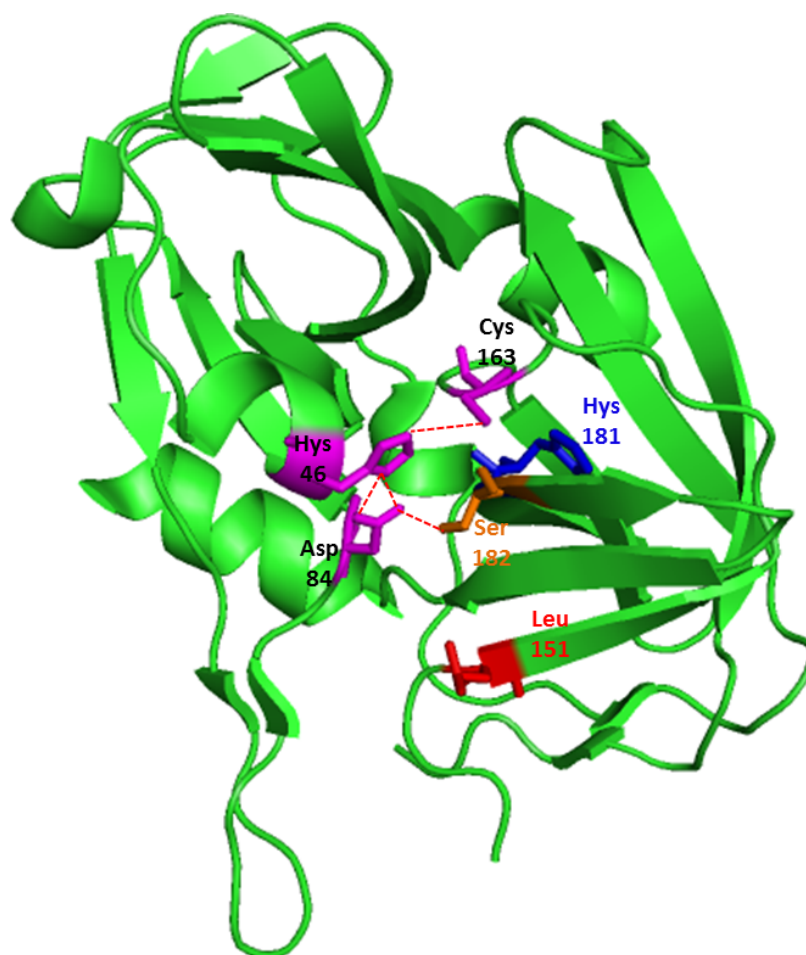


Figura D.3.1. Localización del centro activo y de los diferentes residuos mutados en la proteasa 3C de VFA. Estructura tridimensional de 3C de VFA A10, destacándose los residuos H46, D84 y C163 (violeta) que forman el centro activo del enzima (Birtley et al., 2005). Se indican también los residuos L151 (rojo), H181 (azul) y S182 (naranja).

Por otra parte, tanto los precursores 3ABC y P3, como las proteínas que de ellos se derivan se hallaron en las fracciones citoplasmáticas y nucleares, procedentes de fraccionamientos de cultivos de células BHK-21 que expresaban transitoriamente P3-3C-L151F, 3ABC-3C-H181Y y 3ABC-3C-S182F, (Figura R.3.6). Además, cuando se expresó 3A aislada también se halló en la *Fn* (Figura R.3.6). La proteína 3A de los picornavirus interacciona con las membranas intracelulares (Fujita et al., 2007, O'Donnell et al., 2001, Weber et al., 1996) y en el fraccionamiento empleado la *Fn* arrastra membranas asociadas al núcleo como el RE. Dado que se ha descrito la interacción de 3A con el RE (Gonzalez-Magaldi et al., 2014, Midgley et al., 2013), la distribución en las distintas fracciones celulares de esta proteína en las células que expresan transitoriamente P3-3C-L151F, 3ABC-3C-H181Y y 3ABC-3C-S182F, puede deberse en parte a la interacción de la región transmembrana de la proteína 3A con la membranas asociadas al núcleo, favoreciendo la presencia en la *Fn* de las

proteínas de las que forma parte. Se necesitan experimentos de fraccionamiento nucleares adicionales para comprobar esta posibilidad

Por otra parte, los patrones de fraccionamiento de las proteínas de la región P3 son similares a los observados en el fraccionamiento de células infectadas con VFA C-S8c1 (Figura R.3.7). Así, las mutaciones presentes en 3C, no parecen alterar la distribución normal de estas proteínas.

Dado que la disminución de la actividad proteasa de 3C no era total en los mutantes obtenidos, y que uno de ellos (P3-L151F) conservaba hasta un 60% de actividad, se decidió estudiar el efecto de estas mutaciones en la infectividad del virus. Para ello, las tres mutaciones se introdujeron en el clon infeccioso pMT28, resultando en todos los casos letales para el ARN viral (Tabla R.3). Los resultados obtenidos con la sustitución 3C-H181Y (seleccionada espontáneamente al expresar el precursor 3ABC) son consistentes con los encontrados por otros autores al introducir esta misma mutación en el ARN del VFA de serotipo A12, donde junto a su efecto letal sobre la capacidad de replicar del virus, también se inhibía su capacidad para procesar las poliproteínas P1 y P2, así como la escisión entre las proteínas 2C y 3A (Grubman et al., 1995).

Una posible explicación para la letalidad de estas mutaciones, en especial 3C-L151F que conserva la mayor capacidad proteolítica, es la generación de desequilibrios en la concentración de las distintas proteínas virales debido a la variación de la actividad proteasa, que, a su vez, podrían originar alteraciones en la replicación del ARN viral y en los procesos de encapsidación viral (Kusov and Gauss-Muller, 1999). Otra posible explicación sería que alguna otra función de la proteína 3C relevante para la replicación del virus, diferente de la actividad proteasa, se viese alterada por dichas mutaciones. En este sentido se sabe que 3C actúa como cofactor en los procesos de uridilación de la proteína 3B y la replicación del ARN viral (Nayak et al., 2006).

En resumen, los resultados sugieren que la expresión de la proteasa 3C de VFA durante la amplificación de los derivados de pRSV en *E. coli* es deletérea para la bacteria, seleccionándose mutaciones que disminuyen, aunque no eliminan, la actividad proteasa de 3C. No obstante, estas mutaciones no permiten recuperar ARN infeccioso. Esta dificultad para expresar precursores de PNEs de VFA con versiones *wt* de la proteasa 3C complica el empleo de la co-expresión de proteínas virales como sistema para estudiar sus interacciones celulares. El uso de sistemas de expresión inducibles o de plásmidos de expresión/estirpes bacterianas menos susceptibles puede constituir una alternativa para permitir niveles de expresión de 3C que induzcan menor toxicidad celular.

D.4 Replicones de VFA

El estudio de las PNE del VFA y la implicación de éstas en su replicación y traducción del ARN_v se puede abordar mediante el empleo de replicones, ARN⁺ subgenómicos que tienen la capacidad de auto-replicarse pero que no pueden infectar otras células. Esto los transforma en agentes inocuos para trabajar que, a la vez, permiten diseccionar el ciclo de multiplicación viral. Otros autores habían construido, anteriormente, un replicón correspondiente a un aislado del VFA de serotipo O (McInerney et al., 2000), pT7Rep que expresa todas las PNEs del virus excepto la proteasa L (Fig. R.4.1), que estaba disponible en el laboratorio. Como una primera aproximación al trabajo con replicones, se construyó a partir de pT7Rep una versión en la que buena parte de las secuencias codificantes de NSP se habían reemplazado por las correspondientes al aislado de serotipo C, C-S8. Esta construcción fue capaz de replicar y expresar las PNE codificadas (R.4.1) en ausencia de producción de virus infectivos y permitió optimizar las condiciones de experimentales del posterior trabajo con replicones de serotipo C. Asimismo, fue posible reproducir el fenotipo asociado a la delección de la proteína 3A empleando el replicón pT7RepQΔ3A, lo que también confirmó que en el ensayo empleado es necesario la replicación del ARN del replicón para poder detectar las PNEs virales.

Con la idea de disponer de replicones con total homología de secuencia con el clon infeccioso pMT28 (VFA C-S8c1), en esta Tesis Doctoral se han construido dos versiones de un replicón con secuencia homogénea de serotipo C que contenían (RepMTC/L), o no (RepMTS/L), la secuencia de la proteasa viral L, así como sus versiones defectivas en replicación que incluyen el reemplazamiento D388A en 3D (Arias et al., 2005) (R.4.2).

Solo con el replicón sin la proteasa L, RepMTS/L, se pudo detectar claramente, en las condiciones empleadas, la expresión de las PNE virales (Figura R.4.6). La falta de detección de PNEs en células transfectadas con los replicones control RepMTS/L-3D-D388A y RepMTC/L-3D-D388A confirmó que es necesario que estos ARNs se repliquen para alcanzar niveles de síntesis de proteínas virales detectables en estos ensayos. Así mismo, el replicón RepMTS/L, pero no el mutante RepMTS/L-3D-D388A, usado como control negativo de replicación, expresó el gen testigo CAT (Figura R.4.7), siendo la actividad CAT de RepMTS/L mayor que la del plásmido control pBIC.

Cabe recordar que los replicones son ARN subgenómicos de un solo ciclo, por lo que al no existir reinfecciones de células la ventana que permite detectar la expresión de proteínas virales es considerablemente más estrecha que la existente para los virus infectivos. Asimismo,

es esperable que tras la lisis de las células transfectadas con los replicones éstas sean reemplazadas por otras no transfectadas, lo que hace difícilmente detectable el ECP.

La proteasa viral L es capaz de degradar el factor eIF4G que interviene en la traducción de ARN cap-dependiente, la proteína Gemin5 que inhibe la traducción dependiente de IRES, así como otras proteínas que intervienen en la inducción de interferón, como NF- κ B, contribuyendo al shut-off celular inducido por el virus (Devaney et al., 1988, Zhu et al., 2010, de Los Santos et al., 2007, Pineiro et al., 2012). Su expresión como parte del replicón RepMTC/L, en un contexto diferente al de una infección viral, podría producir niveles de toxicidad que dificultasen la expresión y detección de las PNEs. De hecho, el replicón existente en el momento de la realización de estos experimentos no contenía la proteasa L activa (McInerney et al., 2000). No obstante, se ha descrito recientemente la construcción de un replicón de VFA que sí contiene la proteína L, en donde las deleciones de la región P1 se han sustituido por GFP (Tulloch et al., 2014). En este trabajo describen que la ausencia de L produce mayores niveles de expresión de GFP aunque con una cinética más lenta, lo que es posiblemente debido a la proteólisis de GFP por L en la versión que la contiene.

En resumen, se han desarrollado replicones basados en secuencias de VFA de serotipo C que son capaces de sintetizar el gen testigo incluido, así como diferentes PNEs. Aunque es necesario optimizar sus condiciones de uso, estos replicones pueden contribuir al estudio del papel de diferentes PNEs en la replicación del VFA y a entender los requerimientos de este proceso.

Conclusiones

1- El mantenimiento del carácter hidrofóbico de los residuos 29 y 42 de la proteína 3A es esencial para la multiplicación del VFA. El virus recuperado de la transfección con ARN del mutante 3A-I42R selecciona la sustitución R42L que restaura el carácter hidrofóbico del residuo. Por otra parte, el virus recuperado tras la transfección con ARN del mutante 3A-M29R selecciona la sustitución I42L en un residuo que se predice interacciona con M29, y en un pase posterior una sustitución adicional en el extremo C-ter de la proteína, S140F. Estos resultados apoyan la relevancia funcional de la interfaz hidrofóbica identificada entre los residuos 25-33 y 37-44 de la proteína 3A.

2- Las mutaciones M29D, M29R, I42D e I42R no afectan de forma importante a la traducción del ARN viral y al procesamiento de la poliproteína viral en ensayos de traducción *in vitro*, ni alteran de manera apreciable la distribución de la proteína 3A expresada transitoriamente.

3- La inserción de una Gly en el sitio de procesamiento proteolítico 3A/3B situado en el extremo carboxilo terminal de la proteína 3A (3A-∇G) disminuye el procesamiento de 3A, tanto en ensayos de traducción *in vitro*, como durante la traducción del ARN viral en células BHK-21.

4- A pesar de la alteración en el procesamiento de la poliproteína viral producida por la inserción 3A-∇G, es posible recuperar virus viable en células en cultivo. Los títulos virales recuperados tras la transfección, inicialmente bajos, aumentan durante los pases seriados hasta igualarse a los del virus *wt* sin observarse selección de mutaciones detectables en la secuencia consenso del virus.

5- El clonaje y amplificación en *E. coli* de derivados del plásmido pRSV que contienen los precursores del VFA 3ABC y P3 selecciona mutaciones en la secuencia de la proteasa viral 3C.

6- Las tres mutaciones puntuales seleccionadas en los derivados del plásmido pRSV: P3-3C-L151F, 3ABC-3C-H181Y y 3ABC-3C-S182F, afectan aunque no eliminan, la capacidad de procesamiento de los precursores 3ABC y P3 expresados transitoriamente.

7- Las sustituciones L151F, H181Y y S182F en la proteasa 3C son deletéreas para la infectividad del ARN viral en células en cultivo.

8- Se han desarrollado replicones basados en secuencias de VFA de serotipo C que permiten la expresión de PNEs en un contexto no infeccioso. Estos replicones constituyen herramientas interesantes para el estudio de la funcionalidad de las proteínas del virus.

Bibliografía

- ACHARYA, R., FRY, E., STUART, D., FOX, G., ROWLANDS, D. & BROWN, F. (1989) The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature*, 337, 709-16.
- ALEXANDERSEN, S., QUAN, M., MURPHY, C., KNIGHT, J. & ZHANG, Z. (2003) Studies of quantitative parameters of virus excretion and transmission in pigs and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus. *J Comp Pathol*, 129, 268-82.
- AMBROS, V., PETTERSSON, R. F. & BALTIMORE, D. (1978) An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirion RNA and the 5' terminal protein. *Cell*, 15, 1439-46.
- ANDINO, R., RIECKHOF, G. E., ACHACOSO, P. L. & BALTIMORE, D. (1993) Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J*, 12, 3587-98.
- ARIAS, A., AGUDO, R., FERRER-ORTA, C., PEREZ-LUQUE, R., AIRAKSINEN, A., BROCCHI, E., DOMINGO, E., VERDAGUER, N. & ESCARMIS, C. (2005) Mutant viral polymerase in the transition of virus to error catastrophe identifies a critical site for RNA binding. *J Mol Biol*, 353, 1021-32.
- ARIAS, A., ISABEL DE AVILA, A., SANZ-RAMOS, M., AGUDO, R., ESCARMIS, C. & DOMINGO, E. (2013) Molecular dissection of a viral quasispecies under mutagenic treatment: positive correlation between fitness loss and mutational load. *J Gen Virol*, 94, 817-30.
- ARIAS, A., PERALES, C., ESCARMIS, C. & DOMINGO, E. (2010) Deletion mutants of VPg reveal new cytopathology determinants in a picornavirus. *PLoS One*, 5, e10735.
- ARITA, M., KOJIMA, H., NAGANO, T., OKABE, T., WAKITA, T. & SHIMIZU, H. (2011) Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is a target of enviroxime-like compounds for antipoliovirus activity. *J Virol*, 85, 2364-72.
- ARITA, M., WAKITA, T. & SHIMIZU, H. (2009) Cellular kinase inhibitors that suppress enterovirus replication have a conserved target in viral protein 3A similar to that of enviroxime. *J Gen Virol*, 90, 1869-79.
- 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, 372-80.
- BABLANIAN, G. M. & GRUBMAN, M. J. (1993) Characterization of the foot-and-mouth disease virus 3C protease expressed in Escherichia coli. *Virology*, 197, 320-7.
- BALTIMORE, D., EGGERS, H. J., FRANKLIN, R. M. & TAMM, I. (1963) Poliovirus-induced RNA polymerase and the effects of virus-specific inhibitors on its production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 49, 843-9.
- BARCO, A. & CARRASCO, L. (1995) A human virus protein, poliovirus protein 2BC, induces membrane proliferation and blocks the exocytic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 14, 3349-64.
- BARTELING, S. J. & VREESWIJK, J. (1991) Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, 9, 75-88.
- BARTON, D. J. & FLANEGAN, J. B. (1997) Synchronous replication of poliovirus RNA: initiation of negative-strand RNA synthesis requires the guanidine-inhibited activity of protein 2C. *J Virol*, 71, 8482-9.
- BEARD, C. W. & MASON, P. W. (2000) Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 74, 987-91.
- 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, 558-67.

- BELOV, G. A. & EHRENFELD, E. (2007) Involvement of cellular membrane traffic proteins in poliovirus replication. *Cell Cycle*, 6, 36-8.
- BELOV, G. A., FENG, Q., NIKOVICS, K., JACKSON, C. L. & EHRENFELD, E. (2008) A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication. *PLoS Pathog*, 4, e1000216.
- BELSHAM, G. J., ABRAMS, C. C., KING, A. M., ROOSIEN, J. & VLAK, J. M. (1991) Myristoylation of foot-and-mouth disease virus capsid protein precursors is independent of other viral proteins and occurs in both mammalian and insect cells. *J Gen Virol*, 72 (Pt 3), 747-51.
- BELSHAM, G. J. & BOSTOCK, C. J. (1988) Studies on the infectivity of foot-and-mouth disease virus RNA using microinjection. *J Gen Virol*, 69 (Pt 2), 265-74.
- BELSHAM, G. J., MCINERNEY, G. M. & ROSS-SMITH, N. (2000) Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *J Virol*, 74, 272-80.
- BELSHAM, G. J. A. M.-S., E. (2004) Genome organization, translation and replication of foot-and-mouth disease virus. IN SOBRINO, F. D., E. (Ed.) *Foot and mouth disease : current perspectives*. Wymondham, Norfolk, England, Horizon Bioscience.
- BERRYMAN, S., BROOKS, E., BURMAN, A., HAWES, P., ROBERTS, R., NETHERTON, C., MONAGHAN, P., WHEL BAND, M., COTTAM, E., ELAZAR, Z., JACKSON, T. & WILEMAN, T. (2012) Foot-and-mouth disease virus induces autophagosomes during cell entry via a class III phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway. *J Virol*, 86, 12940-53.
- BERRYMAN, S., CLARK, S., MONAGHAN, P. & JACKSON, T. (2005) Early events in integrin alphavbeta6-mediated cell entry of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 79, 8519-34.
- 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, 220-6.
- BIRTLEY, J. R., KNOX, S. R., JAULENT, A. M., BRICK, P., LEATHERBARROW, R. J. & CURRY, S. (2005) Crystal structure of foot-and-mouth disease virus 3C protease. New insights into catalytic mechanism and cleavage specificity. *J Biol Chem*, 280, 11520-7.
- 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, 8578-85.
- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BROWN, F. (1992) New approaches to vaccination against foot-and-mouth disease. *Vaccine*, 10, 1022-6.
- BROWN, F., NEWMAN, J., STOTT, J., PORTER, A., FRISBY, D., NEWTON, C., CAREY, N. & FELLNER, P. (1974) Poly(C) in animal viral RNAs. *Nature*, 251, 342-4.
- CAO, X., BERGMANN, I. E., FULLKRUG, R. & BECK, E. (1995) Functional analysis of the two alternative translation initiation sites of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 69, 560-3.
- 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, 91-9.

- 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, 6487-504.
- CELIS, J. E. (1994) *Cell biology : a laboratory handbook*, San Diego, Academic Press.
- CLARKE, B. E., BROWN, A. L., CURREY, K. M., NEWTON, S. E., ROWLANDS, D. J. & CARROLL, A. R. (1987) Potential secondary and tertiary structure in the genomic RNA of foot and mouth disease virus. *Nucleic Acids Res*, 15, 7067-79.
- CLARKE, B. E. & SANGAR, D. V. (1988) Processing and assembly of foot-and-mouth disease virus proteins using subgenomic RNA. *J Gen Virol*, 69 (Pt 9), 2313-25.
- CLARKE, B. E., SANGAR, D. V., BURROUGHS, J. N., NEWTON, S. E., CARROLL, A. R. & ROWLANDS, D. J. (1985) Two initiation sites for foot-and-mouth disease virus polyprotein in vivo. *J Gen Virol*, 66 (Pt 12), 2615-26.
- CORNELL, C. T., KIOSSES, W. B., HARKINS, S. & WHITTON, J. L. (2007) Coxsackievirus B3 proteins directionally complement each other to downregulate surface major histocompatibility complex class I. *J Virol*, 81, 6785-97.
- CURRY, S., ABRAMS, C. C., FRY, E., CROWTHER, J. C., BELSHAM, G. J., STUART, D. I. & KING, A. M. (1995) Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *J Virol*, 69, 430-8.
- CHATTERJEE, N. K., BACHRACH, H. L. & POLATNICK, J. (1976) Foot-and-mouth disease virus RNA. Presence of 3'-terminal polyriboadenylic acid and absence of amino acid binding ability. *Virology*, 69, 369-77.
- CHOE, S. S., DODD, D. A. & KIRKEGAARD, K. (2005) Inhibition of cellular protein secretion by picornaviral 3A proteins. *Virology*, 337, 18-29.
- 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, 2021-33.
- DE FELIPE, P., HUGHES, L. E., RYAN, M. D. & BROWN, J. D. (2003) Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *J Biol Chem*, 278, 11441-8.
- DE LA HIGUERA, I., CARIDI, F., SÁNCHEZ-APARICIO, M. T., DOMINGO, E. & SOBRINO, F. (2011) Señal de localización nuclear implicada en reconocimiento de nucleótidos: Multifuncionalidad de un dominio de una polimerasa vírica. *Sociedad Española de Virología*. Granada, XI Congreso Nacional de Virología.
- DE LA TORRE, J. C., MARTINEZ-SALAS, E., DIEZ, J., VILLAVARDE, A., GEBAUER, F., ROCHA, E., DAVILA, M. & DOMINGO, E. (1988) Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol*, 62, 2050-8.
- DE LOS SANTOS, T., DIAZ-SAN SEGUNDO, F. & GRUBMAN, M. J. (2007) Degradation of nuclear factor kappa B during foot-and-mouth disease virus infection. *J Virol*, 81, 12803-15.
- 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, 725-37.
- 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, 13790-5.
- DESTEFANO, J. J. & TITIOPE, O. (2006) Poliovirus protein 3AB displays nucleic acid chaperone and helix-destabilizing activities. *J Virol*, 80, 1662-71.

- DEVANEY, M. A., VAKHARIA, V. N., LLOYD, R. E., EHRENFELD, E. & 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. *J Virol*, 62, 4407-9.
- DIEZ, J., HOFNER, M., DOMINGO, E. & DONALDSON, A. I. (1990) Foot-and-mouth disease virus strains isolated from persistently infected cell cultures are attenuated for mice and cattle. *Virus Res*, 18, 3-7.
- DOEDENS, J. R., GIDDINGS, T. H., JR. & KIRKEGAARD, K. (1997) Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *J Virol*, 71, 9054-64.
- DOEDENS, J. R. & KIRKEGAARD, K. (1995) Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *Embo J*, 14, 894-907.
- DOEL, T. R. (1999) Optimisation of the immune response to foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, 17, 1767-71.
- DOEL, T. R., WILLIAMS, L. & BARNETT, P. V. (1994) Emergency vaccination against foot-and-mouth disease: rate of development of immunity and its implications for the carrier state. *Vaccine*, 12, 592-600.
- DOMINGO, E., DAVILA, M. & ORTIN, J. (1980) Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene*, 11, 333-46.
- DOMINGO, E., MARTIN, V., PERALES, C., GRANDE-PEREZ, A., GARCIA-ARRIAZA, J. & ARIAS, A. (2006) Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol*, 299, 51-82.
- 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. & ET AL. (1985) The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review. *Gene*, 40, 1-8.
- DONALDSON, A. (2004) Clinical signs of foot-and-mouth disease. IN SOBRINO, F. D., E. (Ed.) *Foot and mouth disease : current perspectives*. Wymondham, Norfolk, England, Horizon Bioscience.
- DONNELLY, M. L., LUKE, G., MEHROTRA, A., LI, X., HUGHES, L. E., GANI, D. & RYAN, M. D. (2001) Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. *J Gen Virol*, 82, 1013-25.
- DOTZAUER, A. & KRAEMER, L. (2012) Innate and adaptive immune responses against picornaviruses and their counteractions: An overview. *World J Virol*, 1, 91-107.
- DUNN, C. S. & DONALDSON, A. I. (1997) Natural adaption to pigs of a Taiwanese isolate of foot-and-mouth disease virus. *Vet Rec*, 141, 174-5.
- ELLARD, F. M., DREW, J., BLAKEMORE, W. E., STUART, D. I. & KING, A. M. (1999) Evidence for the role of His-142 of protein 1C in the acid-induced disassembly of foot-and-mouth disease virus capsids. *J Gen Virol*, 80 (Pt 8), 1911-8.
- ESCARMIS, C., TOJA, M., MEDINA, M. & DOMINGO, E. (1992) Modifications of the 5' untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. *Virus Res*, 26, 113-25.
- FALK, M. M., GRIGERA, P. R., BERGMANN, I. E., ZIBERT, A., MULTHAUP, G. & BECK, E. (1990) Foot-and-mouth disease virus protease 3C induces specific proteolytic cleavage of host cell histone H3. *J Virol*, 64, 748-56.
- 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, 2251-60.
- FERRER-ORTA, C., ARIAS, A., AGUDO, R., PEREZ-LUQUE, R., ESCARMIS, C., DOMINGO, E. & VERDAGUER, N. (2006) The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *EMBO J*, 25, 880-8.

- FERRER-ORTA, C., ARIAS, A., PEREZ-LUQUE, R., ESCARMIS, C., DOMINGO, E. & VERDAGUER, N. (2004) Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J Biol Chem*, 279, 47212-21.
- FORSS, S. & SCHALLER, H. (1982) A tandem repeat gene in a picornavirus. *Nucleic Acids Res*, 10, 6441-50.
- FUJITA, K., KRISHNAKUMAR, S. S., FRANCO, D., PAUL, A. V., LONDON, E. & 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, 5185-99.
- GAMARNIK, A. V. & ANDINO, R. (1998) Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev*, 12, 2293-304.
- GANGARAMANI, D. R., EDEN, E. L., SHAH, M. & DESTEFANO, J. J. (2010) The twenty-nine amino acid C-terminal cytoplasmic domain of poliovirus 3AB is critical for nucleic acid chaperone activity. *RNA Biol*, 7, 820-9.
- GARCIA-ARRIAZA, J., MANRUBIA, S. C., TOJA, M., DOMINGO, E. & ESCARMIS, C. (2004) Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation. *J Virol*, 78, 11678-85.
- GARCIA-BRIONES, M., ROSAS, M. F., GONZALEZ-MAGALDI, M., MARTIN-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, 409-21.
- GERBER, K., WIMMER, E. & PAUL, A. V. (2001) Biochemical and genetic studies of the initiation of human rhinovirus 2 RNA replication: purification and enzymatic analysis of the RNA-dependent RNA polymerase 3D(pol). *J Virol*, 75, 10969-78.
- GHILDYAL, R., JORDAN, B., LI, D., DAGHER, H., BARDIN, P. G., GERN, J. E. & JANS, D. A. (2009) Rhinovirus 3C protease can localize in the nucleus and alter active and passive nucleocytoplasmic transport. *J Virol*, 83, 7349-52.
- GIACHETTI, C., HWANG, S. S. & SEMLER, B. L. (1992) cis-acting lesions targeted to the hydrophobic domain of a poliovirus membrane protein involved in RNA replication. *J Virol*, 66, 6045-57.
- GIRAUDO, A. T., BECK, E., STREBEL, K., DE MELLO, P. A., LA TORRE, J. L., SCODELLER, E. A. & BERGMANN, I. E. (1990) Identification of a nucleotide deletion in parts of polypeptide 3A in two independent attenuated aphthovirus strains. *Virology*, 177, 780-3.
- GLADUE, D. P., O'DONNELL, V., BAKER-BRANSTETTER, R., HOLINKA, L. G., PACHECO, J. M., FERNANDEZ SAINZ, I., LU, Z., BROCCHI, E., BAXT, B., PICONNE, M. E., RODRIGUEZ, L. & BORCA, M. V. (2012) Foot and Mouth Disease Virus non structural protein 2C interacts with Beclin1 modulating virus replication. *J Virol*.
- GOLINI, F., SEMLER, B. L., DORNER, A. J. & WIMMER, E. (1980) Protein-linked RNA of poliovirus is competent to form an initiation complex of translation in vitro. *Nature*, 287, 600-3.
- GONZÁLEZ-MAGALDI, M. (2012) Caracterización de la proteína 3A del Virus de la Fiebre Aftosa. Estudio de su dimerización, capacidad de unión a membranas y dinámica celular. *Departamento de Biología Molecular*. Madrid, Departamento de Biología Molecular

- GONZALEZ-MAGALDI, M., MARTIN-ACEBES, M. A., KREMER, L. & SOBRINO, F. (2014) Membrane topology and cellular dynamics of foot-and-mouth disease virus 3A protein. *PLoS One*, 9, e106685.
- GONZALEZ-MAGALDI, M., POSTIGO, R., DE LA TORRE, B. G., VIEIRA, Y. A., RODRIGUEZ-PULIDO, M., LOPEZ-VINAS, E., GOMEZ-PUERTAS, P., ANDREU, D., KREMER, L., ROSAS, M. F. & SOBRINO, F. (2012) Mutations that hamper dimerization of foot-and-mouth disease virus 3A protein are detrimental for infectivity. *J Virol*, 86, 11013-23.
- GOODFELLOW, I. (2011) The genome-linked protein VPg of vertebrate viruses - a multifaceted protein. *Curr Opin Virol*, 1, 355-62.
- GORBALENYA, A. E., DONCHENKO, A. P., BLINOV, V. M. & KOONIN, E. V. (1989) Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases. A distinct protein superfamily with a common structural fold. *FEBS Lett*, 243, 103-14.
- GRENINGER, A. L., KNUDSEN, G. M., BETEGON, M., BURLINGAME, A. L. & DERISI, J. L. (2012) The 3A protein from multiple picornaviruses utilizes the golgi adaptor protein ACBD3 to recruit PI4KIIIbeta. *J Virol*, 86, 3605-16.
- GRUBMAN, M. J. & BAXT, B. (2004) Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev*, 17, 465-93.
- GRUBMAN, M. J., ROBERTSON, B. H., MORGAN, D. O., MOORE, D. M. & DOWBENKO, D. (1984) Biochemical map of polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 50, 579-86.
- GRUBMAN, M. J., ZELLNER, M., BABLANIAN, G., MASON, P. W. & PICCONE, M. E. (1995) Identification of the active-site residues of the 3C proteinase of foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 213, 581-9.
- GUEX, N., DIEMAND, A. & PEITSCH, M. C. (1999) Protein modelling for all. *Trends Biochem Sci*, 24, 364-7.
- GULEVICH, A. Y., YUSUPOVA, R. A. & DRYGIN, Y. F. (2002) VPg unlinkase, the phosphodiesterase that hydrolyzes the bond between VPg and picornavirus RNA: a minimal nucleic moiety of the substrate. *Biochemistry (Mosc)*, 67, 615-21.
- HALL, D. J. & PALMENBERG, A. C. (1996) Cleavage site mutations in the encephalomyocarditis virus P3 region lethally abrogate the normal processing cascade. *J Virol*, 70, 5954-61.
- HANAHAN, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-80.
- HARRIS, K. S., XIANG, W., ALEXANDER, L., LANE, W. S., PAUL, A. V. & WIMMER, E. (1994) Interaction of poliovirus polypeptide 3CDpro with the 5' and 3' termini of the poliovirus genome. Identification of viral and cellular cofactors needed for efficient binding. *J Biol Chem*, 269, 27004-14.
- HARRIS, T. J. & BROWN, F. (1977) Biochemical analysis of a virulent and an avirulent strain of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*, 34, 87-105.
- HEINZ, B. A. & VANCE, L. M. (1995) The antiviral compound enviroxime targets the 3A coding region of rhinovirus and poliovirus. *J Virol*, 69, 4189-97.
- HEROLD, J. & ANDINO, R. (2000) Poliovirus requires a precise 5' end for efficient positive-strand RNA synthesis. *J Virol*, 74, 6394-400.
- HEROLD, J. & ANDINO, R. (2001) Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell*, 7, 581-91.
- HERRERA, M., GRANDE-PEREZ, A., PERALES, C. & DOMINGO, E. (2008) Persistence of foot-and-mouth disease virus in cell culture revisited: implications for contingency in evolution. *J Gen Virol*, 89, 232-44.

- HOLLISTER, J. R., VAGNOZZI, A., KNOWLES, N. J. & 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, 411-25.
- 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. & ALTAN-BONNET, N. (2010) Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell*, 141, 799-811.
- HUANG, C. C., JONG, M. H. & LIN, S. Y. (2000) Characteristics of foot and mouth disease virus in Taiwan. *J Vet Med Sci*, 62, 677-9.
- HUANG, T. S., PALESE, P. & KRYSTAL, M. (1990) Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J Virol*, 64, 5669-73.
- JACKSON, T., CLARK, S., BERRYMAN, S., BURMAN, A., CAMBIER, S., MU, D., NISHIMURA, S. & 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. *J Virol*, 78, 4533-40.
- JACKSON, T., MOULD, A. P., SHEPPARD, D. & KING, A. M. (2002) Integrin alphavbeta1 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 76, 935-41.
- 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, 4949-56.
- JOHANSEN, L. K. & MORROW, C. D. (2000) The RNA encompassing the internal ribosome entry site in the poliovirus 5' nontranslated region enhances the encapsidation of genomic RNA. *Virology*, 273, 391-9.
- KANDA, T., GAUSS-MULLER, V., CORDES, S., TAMURA, R., OKITSU, K., SHUANG, W., NAKAMOTO, S., FUJIWARA, K., IMAZEKI, F. & YOKOSUKA, O. (2010) Hepatitis A virus (HAV) proteinase 3C inhibits HAV IRES-dependent translation and cleaves the polypyrimidine tract-binding protein. *J Viral Hepat*, 17, 618-23.
- KAPLAN, G. & RACANIELLO, V. R. (1988) Construction and characterization of poliovirus subgenomic replicons. *J Virol*, 62, 1687-96.
- KITCHING, R. P. (1998) A recent history of foot-and-mouth disease. *J Comp Pathol*, 118, 89-108.
- KNOWLES, N. J., DAVIES, P. R., HENRY, T., O'DONNELL, V., PACHECO, J. M. & MASON, P. W. (2001a) Emergence in Asia of foot-and-mouth disease viruses with altered host range: characterization of alterations in the 3A protein. *J Virol*, 75, 1551-6.
- KNOWLES, N. J., SAMUEL, A. R., DAVIES, P. R., KITCHING, R. P. & DONALDSON, A. I. (2001b) Outbreak of foot-and-mouth disease virus serotype O in the UK caused by a pandemic strain. *Vet Rec*, 148, 258-9.
- KOBAYASHI, M., ARIAS, C., GARABEDIAN, A., PALMENBERG, A. C. & MOHR, I. (2012) Site-Specific Cleavage Of The Host Poly A Binding Protein By The EMCV 3C Proteinase Stimulates Viral Replication. *J Virol*.
- KUHN, R., LUZ, N. & BECK, E. (1990) Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 64, 4625-31.
- KUSOV, Y. & GAUSS-MULLER, V. (1999) Improving proteolytic cleavage at the 3A/3B site of the hepatitis A virus polyprotein impairs processing and particle formation, and the impairment can be complemented in trans by 3AB and 3ABC. *J Virol*, 73, 9867-78.
- 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, 66-70.

- LAMA, J., SANZ, M. A. & CARRASCO, L. (1998) Genetic analysis of poliovirus protein 3A: characterization of a non-cytopathic mutant virus defective in killing Vero cells. *J Gen Virol*, 79 (Pt 8), 1911-21.
- LAMA, J., SANZ, M. A. & RODRIGUEZ, P. L. (1995) A role for 3AB protein in poliovirus genome replication. *J Biol Chem*, 270, 14430-8.
- LAWRENCE, P. & RIEDER, E. (2009) Identification of RNA helicase A as a new host factor in the replication cycle of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 83, 11356-66.
- LAWRENCE, P., SCHAFER, E. A. & RIEDER, E. (2012) The nuclear protein Sam68 is cleaved by the FMDV 3C protease redistributing Sam68 to the cytoplasm during FMDV infection of host cells. *Virology*, 425, 40-52.
- LEA, S., HERNANDEZ, J., BLAKEMORE, W., BROCCHI, E., CURRY, S., DOMINGO, E., FRY, E., ABU-GHAZALEH, R., KING, A., NEWMAN, J. & ET AL. (1994) The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure*, 2, 123-39.
- LI, F., BROWNING, G. F., STUDDERT, M. J. & CRABB, B. S. (1996) Equine rhinovirus 1 is more closely related to foot-and-mouth disease virus than to other picornaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 990-5.
- LI, P., BAI, X., CAO, Y., HAN, C., LU, Z., SUN, P., YIN, H. & LIU, Z. (2012) Expression and Stability of Foreign Epitopes Introduced into 3A Nonstructural Protein of Foot-and-Mouth Disease Virus. *PLoS One*, 7, e41486.
- LI, S. H., LI, X. F., ZHAO, H., DENG, Y. Q., YU, X. D., ZHU, S. Y., JIANG, T., YE, Q., QIN, E. D. & QIN, C. F. (2013) Development and characterization of the replicon system of Japanese encephalitis live vaccine virus SA14-14-2. *Virol J*, 10, 64.
- LIU, J., WEI, T. & KWANG, J. (2004) Membrane-association properties of avian encephalomyelitis virus protein 3A. *Virology*, 321, 297-306.
- LIU, Y., FRANCO, D., PAUL, A. V. & WIMMER, E. (2007) Tyrosine 3 of poliovirus terminal peptide VPg(3B) has an essential function in RNA replication in the context of its precursor protein, 3AB. *J Virol*, 81, 5669-84.
- LIU, Y., WANG, C., MUELLER, S., PAUL, A. V., WIMMER, E. & 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.
- MARTIN-ACEBES, M. A. (2009) Mecanismos de entrada y de organización del complejo de replicación del virus de la fiebre aftosa: estudio comparativo con el virus de la enfermedad vesicular del cerdo y el virus de la estomatitis vesicular. *Departamento de Biología Molecular*. Madrid, Universidad Autónoma de Madrid.
- MARTIN-ACEBES, M. A., GONZALEZ-MAGALDI, M., SANDVIG, K., SOBRINO, F. & 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, 105-18.
- MARTIN-ACEBES, M. A., RINCON, V., ARMAS-PORTELA, R., MATEU, M. G. & 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, 2902-12.
- MARTINEZ-SALAS, E. & DOMINGO, E. (1995) Effect of expression of the aphthovirus protease 3C on viral infection and gene expression. *Virology*, 212, 111-20.
- MARTINEZ-SALAS, E. & FERNANDEZ-MIRAGALL, O. (2004) Picornavirus IRES: structure function relationship. *Curr Pharm Des*, 10, 3757-67.
- MARTINEZ-SALAS, E., LOPEZ DE QUINTO, S., RAMOS, R. & FERNANDEZ-MIRAGALL, O. (2002) IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochimie*, 84, 755-63.

- MARTINEZ-SALAS, E., PACHECO, A., SERRANO, P. & FERNANDEZ, N. (2008) New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *J Gen Virol*, 89, 611-26.
- MARTINEZ-SALAS, E., RAMOS, R., LAFUENTE, E. & LOPEZ DE QUINTO, S. (2001) Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *J Gen Virol*, 82, 973-84.
- MARTINEZ-SALAS, E., SAIZ, J. C., DAVILA, M., BELSHAM, G. J. & DOMINGO, E. (1993) A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus leads to enhanced cap-independent translation in vivo. *J Virol*, 67, 3748-55.
- MASON, P. W., GRUBMAN, M. J. & BAXT, B. (2003) Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res*, 91, 9-32.
- 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, 261-74.
- MCINERNEY, G. M., KING, A. M., ROSS-SMITH, N. & BELSHAM, G. J. (2000) Replication-competent foot-and-mouth disease virus RNAs lacking capsid coding sequences. *J Gen Virol*, 81, 1699-702.
- MCKNIGHT, K. L. & LEMON, S. M. (1998) The rhinovirus type 14 genome contains an internally located RNA structure that is required for viral replication. *RNA*, 4, 1569-84.
- MIDGLEY, R., MOFFAT, K., BERRYMAN, S., HAWES, P., SIMPSON, J., FULLEN, D., STEPHENS, D. J., BURMAN, A. & JACKSON, T. (2013) A role for endoplasmic reticulum exit sites in foot-and-mouth disease virus infection. *J Gen Virol*, 94, 2636-46.
- 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, 4382-95.
- MOFFAT, K., KNOX, C., HOWELL, G., CLARK, S. J., YANG, H., BELSHAM, G. J., RYAN, M. & 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. *J Virol*, 81, 1129-39.
- MOLLA, A., HARRIS, K. S., PAUL, A. V., SHIN, S. H., MUGAVERO, J. & WIMMER, E. (1994) Stimulation of poliovirus proteinase 3Cpro-related proteolysis by the genome-linked protein VPg and its precursor 3AB. *J Biol Chem*, 269, 27015-20.
- 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, 933-46.
- MUKHERJEE, A., MOROSKY, S. A., DELORME-AXFORD, E., DYBDAHL-SISSOKO, N., OBERSTE, M. S., WANG, T. & COYNE, C. B. (2011) The coxsackievirus B 3C protease cleaves MAVS and TRIF to attenuate host type I interferon and apoptotic signaling. *PLoS Pathog*, 7, e1001311.
- MURRAY, K. E. & BARTON, D. J. (2003) Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J Virol*, 77, 4739-50.
- NAGASHIMA, S., SASAKI, J. & TANIGUCHI, K. (2008) Interaction between polypeptide 3ABC and the 5'-terminal structural elements of the genome of Aichi virus: implication for negative-strand RNA synthesis. *J Virol*, 82, 6161-71.

- 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, 7698-706.
- NAYAK, A., GOODFELLOW, I. G., WOOLAWAY, K. E., BIRTLEY, J., CURRY, S. & BELSHAM, G. J. (2006) Role of RNA structure and RNA binding activity of foot-and-mouth disease virus 3C protein in VPg uridylylation and virus replication. *J Virol*, 80, 9865-75.
- NEFF, S., SA-CARVALHO, D., RIEDER, E., MASON, P. W., BLYSTONE, S. D., BROWN, E. J. & BAXT, B. (1998) Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin alpha(v)beta3 as its receptor. *J Virol*, 72, 3587-94.
- 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, 497-507.
- NOMOTO, A., DETJEN, B., POZZATTI, R. & WIMMER, E. (1977) The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature*, 268, 208-13.
- NUÑEZ, 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, 3977-83.
- O'DONNELL, V., LAROCCO, M. & BAXT, B. (2008) Heparan sulfate-binding foot-and-mouth disease virus enters cells via caveola-mediated endocytosis. *J Virol*, 82, 9075-85.
- O'DONNELL, V., LAROCCO, M., DUQUE, H. & BAXT, B. (2005) Analysis of foot-and-mouth disease virus internalization events in cultured cells. *J Virol*, 79, 8506-18.
- O'DONNELL, V., PACHECO, J. M., LAROCCO, M., BURRAGE, T., JACKSON, W., RODRIGUEZ, L. L., BORCA, M. V. & BAXT, B. (2011) Foot-and-mouth disease virus utilizes an autophagic pathway during viral replication. *Virology*, 410, 142-50.
- 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, 151-62.
- PACHECO, J. M., GLADUE, D. P., HOLINKA, L. G., ARZT, J., BISHOP, E., SMOLIGA, G., PAUSZEK, S. J., BRACHT, A. J., O'DONNELL, V., FERNANDEZ-SAINZ, I., FLETCHER, P., PICCONE, M. E., RODRIGUEZ, L. L. & BORCA, M. V. (2013) A partial deletion in non-structural protein 3A can attenuate foot-and-mouth disease virus in cattle. *Virology*, 446, 260-7.
- 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, 13017-27.
- PACHECO, J. M., PICCONE, M. E., RIEDER, E., PAUSZEK, S. J., BORCA, M. V. & RODRIGUEZ, L. L. (2010) Domain disruptions of individual 3B proteins of foot-and-mouth disease virus do not alter growth in cell culture or virulence in cattle. *Virology*, 405, 149-56.
- PALMENBERG, A. C. (1990) Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. *Annu Rev Microbiol*, 44, 603-23.
- PARSLEY, T. B., TOWNER, J. S., BLYN, L. B., EHRENFELD, E. & SEMLER, B. L. (1997) Poly (rC) binding protein 2 forms a ternary complex with the 5'-terminal sequences of poliovirus RNA and the viral 3CD proteinase. *RNA*, 3, 1124-34.
- PATHAK, H. B., ARNOLD, J. J., WIEGAND, P. N., HARGITTAI, M. R. & CAMERON, C. E. (2007) Picornavirus genome replication: assembly and organization of the VPg uridylylation ribonucleoprotein (initiation) complex. *J Biol Chem*, 282, 16202-13.

- PAUL, A. V., CAO, X., HARRIS, K. S., LAMA, J. & WIMMER, E. (1994) Studies with poliovirus polymerase 3Dpol. Stimulation of poly(U) synthesis in vitro by purified poliovirus protein 3AB. *J Biol Chem*, 269, 29173-81.
- PAUL, A. V., RIEDER, E., KIM, D. W., VAN BOOM, J. H. & WIMMER, E. (2000) Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol*, 74, 10359-70.
- PAUL, A. V., VAN BOOM, J. H., FILIPPOV, D. & WIMMER, E. (1998) Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature*, 393, 280-4.
- PAUL, A. V., YIN, J., MUGAVERO, J., RIEDER, E., LIU, Y. & WIMMER, E. (2003) A "slide-back" mechanism for the initiation of protein-primed RNA synthesis by the RNA polymerase of poliovirus. *J Biol Chem*, 278, 43951-60.
- PEITSCH, M. C. (1996) ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem Soc Trans*, 24, 274-9.
- PERCY, N., BARCLAY, W. S., SULLIVAN, M. & ALMOND, J. W. (1992) A poliovirus replicon containing the chloramphenicol acetyltransferase gene can be used to study the replication and encapsidation of poliovirus RNA. *J Virol*, 66, 5040-6.
- PEREIRA, H. G. (1976) Subtyping of foot-and-mouth disease virus. *Dev Biol Stand*, 35, 167-74.
- PEREIRA, H. G. (1981) Foot-and-mouth disease. IN GIBBS, E. P. J. (Ed.) *Virus diseases of food animals : a world geography of epidemiology and control*. London ; New York, Academic Press.
- PERERA, R., DAIJOGO, S., WALTER, B. L., NGUYEN, J. H. & SEMLER, B. L. (2007) Cellular protein modification by poliovirus: the two faces of poly(rC)-binding protein. *J Virol*, 81, 8919-32.
- PETTERSSON, R. F., AMBROS, V. & BALTIMORE, D. (1978) Identification of a protein linked to nascent poliovirus RNA and to the polyuridylic acid of negative-strand RNA. *J Virol*, 27, 357-65.
- PFISTER, T. & WIMMER, E. (1999) Characterization of the nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J Biol Chem*, 274, 6992-7001.
- PINEIRO, D., RAMAJO, J., BRADRICK, S. S. & MARTINEZ-SALAS, E. (2012) Gemin5 proteolysis reveals a novel motif to identify L protease targets. *Nucleic Acids Res*, 40, 4942-53.
- PLUIMERS, F. H., AKKERMAN, A. M., VAN DER WAL, P., DEKKER, A. & BIANCHI, A. (2002) Lessons from the foot and mouth disease outbreak in The Netherlands in 2001. *Rev Sci Tech*, 21, 711-21.
- POSTIGO, R. (2009) Análisis funcional de la proteína 3A del virus de la fiebre aftosa. *Departamento de Biología Molecular*. Madrid, Universidad Autónoma de Madrid.
- QU, L., FENG, Z., YAMANE, D., LIANG, Y., LANFORD, R. E., LI, K. & LEMON, S. M. (2011) Disruption of TLR3 signaling due to cleavage of TRIF by the hepatitis A virus protease-polymerase processing intermediate, 3CD. *PLoS Pathog*, 7, e1002169.
- QUINER, C. A. & JACKSON, W. T. (2010) Fragmentation of the Golgi apparatus provides replication membranes for human rhinovirus 1A. *Virology*, 407, 185-95.
- RAMOS, R. & MARTINEZ-SALAS, E. (1999) Long-range RNA interactions between structural domains of the aphthovirus internal ribosome entry site (IRES). *RNA*, 5, 1374-83.
- RIEDER, E., BUNCH, T., BROWN, F. & MASON, P. W. (1993) Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly(C) tracts of two nucleotides are virulent in mice. *J Virol*, 67, 5139-45.

- RIEDER, E., PAUL, A. V., KIM, D. W., VAN BOOM, J. H. & WIMMER, E. (2000) Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J Virol*, 74, 10371-80.
- ROBERTSON, B. H., GRUBMAN, M. J., WEDDELL, G. N., MOORE, D. M., WELSH, J. D., FISCHER, T., DOWBENKO, D. J., YANSURA, D. G., SMALL, B. & KLEID, D. G. (1985) Nucleotide and amino acid sequence coding for polypeptides of foot-and-mouth disease virus type A12. *J Virol*, 54, 651-60.
- ROBERTSON, B. H., MOORE, D. M., GRUBMAN, M. J. & KLEID, D. G. (1983) Identification of an exposed region of the immunogenic capsid polypeptide VP1 on foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 46, 311-6.
- RODRIGUEZ PULIDO, M. (2009) Estructura y función de la región 3' no codificante del virus de la fiebre aftosa. Aplicación a nuevas estrategias vacunales basadas en RNA. *Departamento de Biología Molecular*. Madrid, Universidad Autónoma de Madrid.
- RODRIGUEZ PULIDO, M., SOBRINO, F., BORREGO, B. & SAIZ, M. (2009) Attenuated foot-and-mouth disease virus RNA carrying a deletion in the 3' noncoding region can elicit immunity in swine. *J Virol*, 83, 3475-85.
- ROMBAUT, B. & JORE, J. P. (1997) Immunogenic, non-infectious polio subviral particles synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Virol*, 78 (Pt 8), 1829-32.
- ROSAS, M. F., VIEIRA, Y. A., POSTIGO, R., MARTIN-ACEBES, M. A., ARMAS-PORTELA, R., MARTINEZ-SALAS, E. & SOBRINO, F. (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.
- ROZOVICS, J. M., VIRGEN-SLANE, R. & SEMLER, B. L. (2011) Engineered picornavirus VPg-RNA substrates: analysis of a tyrosyl-RNA phosphodiesterase activity. *PLoS One*, 6, e16559.
- RUECKERT, R. R. & WIMMER, E. (1984) Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *J Virol*, 50, 957-9.
- RYAN M.D., M. L. L. D., M. FLINT, V.M. COWTON, G. LUKE, L.E. HUGHES, C. KNOX AND P. DE FELIPE (2004) Foot-and-mouth disease virus proteinases. IN SOBRINO, F. D., E. (Ed.) *Foot-and-mouth disease: current perspectives*. Wymondham, Norfolk, England, Horizon Bioscience.
- RYAN, M. D., BELSHAM, G. J. & KING, A. M. (1989) Specificity of enzyme-substrate interactions in foot-and-mouth disease virus polyprotein processing. *Virology*, 173, 35-45.
- RYAN, M. D. & FLINT, M. (1997) Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. *J Gen Virol*, 78 (Pt 4), 699-723.
- RYAN, M. D., KING, A. M. & THOMAS, G. P. (1991) Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J Gen Virol*, 72 (Pt 11), 2727-32.
- SA-CARVALHO, D., RIEDER, E., BAXT, B., RODARTE, R., TANURI, A. & MASON, P. W. (1997) Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J Virol*, 71, 5115-23.
- SAGEDAHL, A., GIRAUDO, A. T., DE MELLO, P. A., BERGMANN, I. E., LA TORRE, J. L. & SCODELLER, E. A. (1987) Biochemical characterization of an aphthovirus type C3 strain Resende attenuated for cattle by serial passages in chicken embryos. *Virology*, 157, 366-74.
- SAIZ, M., DE LA MORENA, D. B., BLANCO, E., NUÑEZ, J. I., FERNANDEZ, R. & SANCHEZ-VIZCAINO, J. M. (2003) Detection of foot-and-mouth disease virus from culture and clinical samples by reverse transcription-PCR coupled to restriction enzyme and sequence analysis. *Vet Res*, 34, 105-17.

- 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.
- SAMBROOK, J. (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SÁNCHEZ-APARICIO, M. T. (2010) Estudio de proteínas no estructurales del virus de la fiebre aftosa: análisis funcionales y aplicación al diagnóstico viral. *Departamento de Biología Molecular*. Madrid, Universidad Autónoma de Madrid.
- SANCHEZ-APARICIO, M. T., ROSAS, M. F. & SOBRINO, F. (2013) Characterization of a nuclear localization signal in the foot-and-mouth disease virus polymerase. *Virology*, 444, 203-10.
- SANGAR, D. V., ROWLANDS, D. J., HARRIS, T. J. & BROWN, F. (1977) Protein covalently linked to foot-and-mouth disease virus RNA. *Nature*, 268, 648-50.
- 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), 433-6.
- SARIYA, L., THANGTHUMNIYOM, N., WAJJWALKU, W., CHUMSING, W., RAMASOOTA, P. & LEKCHAROENSUK, P. (2011) Expression of foot and mouth disease virus nonstructural polyprotein 3ABC with inactive 3C(pro) in Escherichia coli. *Protein Expr Purif*, 80, 17-21.
- SASAKI, J., ISHIKAWA, K., ARITA, M. & TANIGUCHI, K. (2012a) ACBD3-mediated recruitment of PI4KB to picornavirus RNA replication sites. *EMBO J*, 31, 754-66.
- SASAKI, J., ISHIKAWA, K. & TANIGUCHI, K. (2012b) 3CD, but not 3C, cleaves the VP1/2A site efficiently during Aichi virus polyprotein processing through interaction with 2A. *Virus Res*, 163, 592-8.
- SASAKI, J. & TANIGUCHI, K. (2003) The 5'-end sequence of the genome of Aichi virus, a picornavirus, contains an element critical for viral RNA encapsidation. *J Virol*, 77, 3542-8.
- SAUNDERS, K. & KING, A. M. (1982) Guanidine-resistant mutants of aphthovirus induce the synthesis of an altered nonstructural polypeptide, P34. *J Virol*, 42, 389-94.
- SCHLEGEL, A., GIDDINGS, T. H., JR., LADINSKY, M. S. & KIRKEGAARD, K. (1996) Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol*, 70, 6576-88.
- SCHWEDE, T., KOPP, J., GUEX, N. & PEITSCH, M. C. (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*, 31, 3381-5.
- SEMLER, B. L., ANDERSON, C. W., HANECAK, R., DORNER, L. F. & WIMMER, E. (1982) A membrane-associated precursor to poliovirus VPg identified by immunoprecipitation with antibodies directed against a synthetic heptapeptide. *Cell*, 28, 405-12.
- SERRANO, P., PULIDO, M. R., SAIZ, M. & 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. *J Gen Virol*, 87, 3013-22.
- SIERRA, M., AIRAKSINEN, A., GONZALEZ-LOPEZ, C., AGUDO, R., ARIAS, A. & DOMINGO, E. (2007) Foot-and-mouth disease virus mutant with decreased sensitivity to ribavirin: implications for error catastrophe. *J Virol*, 81, 2012-24.
- 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, 310-8.

- SOBRINO F., B. B. A. S. M. (2012) El control de la glosopeda o fiebre aftosa. IN NÁJERA, R. (Ed.) *Erradicación y control de las enfermedades producidas por virus*. Madrid, Madrid, España, Fundación Ramón Areces.
- STEIL, B. P., KEMPF, B. J. & BARTON, D. J. (2010) Poly(A) at the 3' end of positive-strand RNA and VPg-linked poly(U) at the 5' end of negative-strand RNA are reciprocal templates during replication of poliovirus RNA. *J Virol*, 84, 2843-58.
- STOKER, M. & MACPHERSON, I. (1964) Syrian Hamster Fibroblast Cell Line Bhk21 and Its Derivatives. *Nature*, 203, 1355-7.
- STRAUSS, D. M., GLUSTROM, L. W. & WUTTKE, D. S. (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, 225-34.
- STREBEL, K. & BECK, E. (1986) A second protease of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 58, 893-9.
- 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, 983-91.
- SUTMOLLER, P., BARTELING, S. S., OLASCOAGA, R. C. & SUMPTION, K. J. (2003) Control and eradication of foot-and-mouth disease. *Virus Res*, 91, 101-44.
- SWEENEY, T. R., CISNETTO, V., BOSE, D., BAILEY, M., WILSON, J. R., ZHANG, X., BELSHAM, G. J. & CURRY, S. (2010) Foot-and-mouth disease virus 2C is a hexameric AAA+ protein with a coordinated ATP hydrolysis mechanism. *J Biol Chem*, 285, 24347-59.
- SWEENEY, T. R., ROQUE-ROSELL, N., BIRTLEY, J. R., LEATHERBARROW, R. J. & CURRY, S. (2007) Structural and mutagenic analysis of foot-and-mouth disease virus 3C protease reveals the role of the beta-ribbon in proteolysis. *J Virol*, 81, 115-24.
- TETERINA, N. L., EGGER, D., BIENZ, K., BROWN, D. M., SEMLER, B. L. & EHRENFELD, E. (2001) Requirements for assembly of poliovirus replication complexes and negative-strand RNA synthesis. *J Virol*, 75, 3841-50.
- TETERINA, N. L., GORBALENYA, A. E., EGGER, D., BIENZ, K. & EHRENFELD, E. (1997) Poliovirus 2C protein determinants of membrane binding and rearrangements in mammalian cells. *J Virol*, 71, 8962-72.
- TETERINA, N. L., RINAUDO, M. S. & EHRENFELD, E. (2003) Strand-specific RNA synthesis defects in a poliovirus with a mutation in protein 3A. *J Virol*, 77, 12679-91.
- TETERINA, N. L., ZHOU, W. D., CHO, M. W. & EHRENFELD, E. (1995) Inefficient complementation activity of poliovirus 2C and 3D proteins for rescue of lethal mutations. *J Virol*, 69, 4245-54.
- THOMSON, G. R., VOSLOO, W. & BASTOS, A. D. (2003) Foot and mouth disease in wildlife. *Virus Res*, 91, 145-61.
- TOWNER, J. S., MAZANET, M. M. & SEMLER, B. L. (1998) Rescue of defective poliovirus RNA replication by 3AB-containing precursor polyproteins. *J Virol*, 72, 7191-200.
- TULLOCH, F., PATHANIA, U., LUKE, G. A., NICHOLSON, J., STONEHOUSE, N. J., ROWLANDS, D. J., JACKSON, T., TUTHILL, T., HAAS, J., LAMOND, A. I. & RYAN, M. D. (2014) FMDV replicons encoding green fluorescent protein are replication competent. *J Virol Methods*, 209, 35-40.
- VAKHARIA, V. N., DEVANEY, M. A., MOORE, D. M., DUNN, J. J. & GRUBMAN, M. J. (1987) Proteolytic processing of foot-and-mouth disease virus polyproteins expressed in a cell-free system from clone-derived transcripts. *J Virol*, 61, 3199-207.
- VAN DER SCHAAR, H. M., VAN DER LINDEN, L., LANKE, K. H., STRATING, J. R., PURSTINGER, G., DE VRIES, E., DE HAAN, C. A., NEYTS, J. & VAN KUPPEVELD, F. J. (2012) Coxsackievirus mutants that can bypass host factor

- PI4KIIIbeta and the need for high levels of PI4P lipids for replication. *Cell Res*, 22, 1576-92.
- VAN KUPPEVELD, F. J., MELCHERS, W. J., KIRKEGAARD, K. & DOEDENS, J. R. (1997) Structure-function analysis of coxsackie B3 virus protein 2B. *Virology*, 227, 111-8.
- VAN KUPPEVELD, F. J., VAN DEN HURK, P. J., SCHRAMA, I. W., GALAMA, J. M. & MELCHERS, W. J. (2002) Trans-complementation of a genetic defect in the coxsackie B3 virus 2B protein. *J Gen Virol*, 83, 341-50.
- VAN VLIJMEN, H. W., CURRY, S., SCHAEFER, M. & KARPLUS, M. (1998) Titration calculations of foot-and-mouth disease virus capsids and their stabilities as a function of pH. *J Mol Biol*, 275, 295-308.
- VASQUEZ, C., DENOYA, C. D., LA TORRE, J. L. & PALMA, E. L. (1979) Structure of foot-and-mouth disease virus capsid. *Virology*, 97, 195-200.
- VIRGEN-SLANE, R., ROZOVICS, J. M., FITZGERALD, K. D., NGO, T., CHOU, W., VAN DER HEDEN VAN NOORT, G. J., FILIPPOV, D. V., GERSHON, P. D. & SEMLER, B. L. (2012) An RNA virus hijacks an incognito function of a DNA repair enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 14634-9.
- WANG, D., FANG, L., LI, K., ZHONG, H., FAN, J., OUYANG, C., ZHANG, H., DUAN, E., LUO, R., ZHANG, Z., LIU, X., CHEN, H. & XIAO, S. (2012) Foot-and-mouth disease virus 3C protease cleaves NEMO to impair innate immune signaling. *J Virol*, 86, 9311-22.
- WEBER, S., GRANZOW, H., WEILAND, F. & MARQUARDT, O. (1996) Intracellular membrane proliferation in *E. coli* induced by foot-and-mouth disease virus 3A gene products. *Virus Genes*, 12, 5-14.
- WESSELS, E., DUIJSINGS, D., LANKE, K. H., MELCHERS, W. J., JACKSON, C. L. & VAN KUPPEVELD, F. J. (2007) Molecular determinants of the interaction between coxsackievirus protein 3A and guanine nucleotide exchange factor GBF1. *J Virol*, 81, 5238-45.
- 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, 11852-60.
- WESSELS, E., NOTEBAART, R. A., DUIJSINGS, D., LANKE, K., VERGEER, B., MELCHERS, W. J. & VAN KUPPEVELD, F. J. (2006b) Structure-function analysis of the coxsackievirus protein 3A: identification of residues important for dimerization, viral rna replication, and transport inhibition. *J Biol Chem*, 281, 28232-43.
- WILD, T. F., BURROUGHS, J. N. & BROWN, F. (1969) Surface structure of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*, 4, 313-20.
- 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, 6732-41.
- XIANG, W., CUCONATI, A., PAUL, A. V., CAO, X. & WIMMER, E. (1995a) Molecular dissection of the multifunctional poliovirus RNA-binding protein 3AB. *RNA*, 1, 892-904.
- XIANG, W., HARRIS, K. S., ALEXANDER, L. & WIMMER, E. (1995b) Interaction between the 5'-terminal cloverleaf and 3AB/3CDpro of poliovirus is essential for RNA replication. *J Virol*, 69, 3658-67.
- YANG, Y., LIANG, Y., QU, L., CHEN, Z., YI, M., LI, K. & LEMON, S. M. (2007) Disruption of innate immunity due to mitochondrial targeting of a picornaviral protease precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 7253-8.

- YOUNG, J. M., CHEADLE, C., FOULKE, J. S., JR., DROHAN, W. N. & SARVER, N. (1988) Utilization of an Epstein-Barr virus replicon as a eukaryotic expression vector. *Gene*, 62, 171-85.
- YPMA-WONG, M. F., DEWALT, P. G., JOHNSON, V. H., LAMB, J. G. & SEMLER, B. L. (1988) Protein 3CD is the major poliovirus proteinase responsible for cleavage of the P1 capsid precursor. *Virology*, 166, 265-70.
- ZHOU, X., BERGLUND, P., RHODES, G., PARKER, S. E., JONDAL, M. & LILJESTROM, P. (1994) Self-replicating Semliki Forest virus RNA as recombinant vaccine. *Vaccine*, 12, 1510-4.
- ZHOU, Z., MOGENSEN, M. M., POWELL, P. P., CURRY, S. & WILEMAN, T. (2013) Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces fragmentation of the Golgi compartment and blocks intra-Golgi transport. *J Virol*, 87, 11721-9.
- ZHU, J., WEISS, M., GRUBMAN, M. J. & DE LOS SANTOS, T. (2010) Differential gene expression in bovine cells infected with wild type and leaderless foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 404, 32-40.
- ZIBERT, A., MAASS, G., STREBEL, K., FALK, M. M. & BECK, E. (1990) Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a cloned full-length cDNA. *J Virol*, 64, 2467-73.

Anexo

