



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares**

**Estrategias de evasión de la  
respuesta al interferón desarrollados  
por el virus de la lengua azul y el  
virus de la peste de los pequeños  
rumiantes**

**Tesis Doctoral**

**José Miguel Avia Sánchez**

Madrid, 2018

**A mi abuela, mi hermana, mi padre y Gloria.**

**A Sergio.**

# **Agradecimientos**

Por fin ha llegado el momento de tener que escribir en unas pocas líneas a todas las personas, que de alguna forma u otra, han contribuido y me han ayudado a llevar a cabo este trabajo de tesis Doctoral. Todos ellos, han permitido que este largo periodo de tiempo haya sido una de las experiencias más positiva y gratificante de mi vida.

En primer lugar quisiera sinceramente agradecer a mis directoras de tesis, Noemí y Verónica, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su laboratorio. Gracias a Noemí por confiar en mí, por sus consejos, por su orientación científica y por exigir que sacara lo mejor de mí y a Verónica por su paciencia infinita, por su claridad y sinceridad a la hora de dar consejos, por amenizar los días duros y por los ánimos cuando más los necesitaba.

Al doctor Adolfo García-Sastre por aceptarme y acogerme tan bien en su laboratorio durante mi estancia en Nueva York. A todos esos amigos que me llevo de una de las mejores experiencias de mi vida, Charles, Raquel, Danae, Vinod, Tere y Maite gracias por acogerme tan bien en la gran Nueva York. Destacar a Lisa, por ayudarme y enseñarme tanto en tan solo cuatro meses, por esos fines de semana de trabajo y esos días sin final, por las conversaciones infinitas por “skype”, por tu dedicación absoluta, gracias de corazón.

También es imposible no acordarse de todos los compañeros del laboratorio que durante este tiempo me han acompañado. Agradecer a José, por enseñarme tantas cosas, por ayudarme a la hora del diseño y realización de los experimentos, por sorprenderme con esos conocimientos, por tus ganas de investigar, por esa pasión que tienes por la ciencia, gracias por todo, eres un ejemplo a seguir. A Elena por ser la primera en acompañarme en este trabajo de tesis y por enseñarme desde cero, nunca olvidaré esas risas en el laboratorio y esos consejos que me has dado. A mi compañero de laboratorio, Dani, que alegría has dado al L-5, esas risas y charlas, gracias por todos esos momentos que me llevo contigo y desearte toda la suerte del mundo para que acabes la tesis y seas un fantástico Doctor.

Dar las gracias a mis compañeros del CISA, principalmente a mis chicas del L-2, Sandra por ser mi compañera de caminata, mi vecina divertida, por saber escucharme y comprenderme, una de las mejores amistades que me llevo y a Elena por su dulzura y por toda las veces que me ha ayudado con los *Western blot*. Nunca me olvidaré de nuestros viajes en coche y esos momentos de risas. No me puedo olvidar del grupo de peces, Irene, Esther, Lucía, Itziar, Patricia y Aitor por todas las cosas que os pedido y por el buen rollo de vuestro laboratorio, del mismo modo, agradecer al laboratorio

hermano el L-3 y a sus tres chicas (Giselle, Bea y Yoli) por todas las cosas que me han prestado y me han ayudado. También a Ana por esas horas de microscopio confocal.

Agradecer a mis “biomodernas” de Murcia, Lury, Alba, Clara, Julia y Marina, que a pesar de vernos poco y la distancia, seguimos siendo una piña, que bien me han venido esas quedadas en las que la palabra tesis estaba prohibida. A mis “murcianicos”, Alejandro, Alvarito, Silvia, Galiana, por estar siempre ahí, a mis compañeras de piso de Tenerife, Eli y Rebeca por esos viajes de reencuentro y esas visitas. A mis compañeras del Máster de Virología por seguir ahí, Elena, Bea, Namibia y Clevi. A Perla, por ser parte de mi familia madrileña y por quererme tanto, gracias por todo.

Una mención especial es para mi abuela, la mujer más importante de mi vida, mi madre, mi profesora de la vida, gracias por todo, por confiar en mí desde el principio y porque sé lo orgullosa que estás de mí, por eso, esta tesis está dedicada a ti. A mi hermana por esa admiración que me tiene y a mi padre y Gloria por apostar por mí y por los consejos que me han dado.

Y, por último, a Sergio, mi compañero de viaje y vida, GRACIAS por escucharme y estar siempre a mi lado y hacer que todo parezca diferente. Este reto no lo habría conseguido sin ti.

**GRACIAS** a todos!

# Índice

# Índice

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Summary</b> .....	5
<b>Abreviaturas</b> .....	9
<b>Introducción</b> .....	15
1. Respuesta inmune antiviral .....	17
1.1. El Interferón .....	17
1.1.1. Tipos de interferón .....	17
1.1.2. Sistema del interferón .....	18
1.1.3. Inducción del IFN tipo I .....	19
1.1.3.1. Ruta de inducción a través de los receptores TLR .....	19
1.1.3.2. Ruta de inducción a través de los receptores RLR y cGAS .....	20
1.1.4. Ruta de señalización del IFN .....	21
1.1.5. ISGs.....	22
1.2. Estrategias virales de evasión de la respuesta al IFN .....	23
1.2.1. Estrategias virales de evasión frente a la ruta de inducción del IFN .....	23
1.2.2. Estrategias virales de evasión frente a la ruta de señalización del IFN .....	24
1.2.3. Sistema ubiquitinación .....	25
2. Peste de los pequeños rumiantes .....	26
2.1. Virus de la peste de los pequeños rumiantes .....	28
2.1.1. Clasificación taxonómica y morfología .....	28
2.1.2. Composición y organización genómica .....	28
2.1.3. Ciclo viral .....	29
2.1.4. Proteínas estructurales de PPRV .....	29
2.1.5. Proteínas no estructurales de PPRV .....	30
2.1.6. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por PPRV .....	31
3. La lengua azul.....	32
3.1. Virus de la lengua azul .....	33

3.1.1.	Clasificación taxonómica.....	33
3.1.2.	Composición y organización genómica .....	34
3.1.3.	Ciclo viral .....	34
3.1.4.	Proteínas estructurales de BTV.....	35
3.1.5.	Proteínas no estructurales de BTV.....	35
3.1.6.	Modulación de la respuesta inmune por BTV .....	37
	<b>Objetivos</b> .....	39
	<b>Materiales y Métodos</b> .....	43
1.	Animales .....	45
2.	Células eucariotas.....	45
2.1.	Congelación de células .....	46
2.2.	Descongelación de células.....	46
3.	Células procariotas .....	46
3.1.	Preparación de bacterias competentes .....	47
3.2.	Transformación bacteriana.....	47
4.	Virus.....	47
5.	Plásmidos .....	48
6.	Anticuerpos .....	51
7.	Amplificación y titulación de virus .....	52
7.1.	PPRV .....	52
7.2.	BTV.....	53
7.3.	Purificación de virus PPRV por colchón de sacarosa .....	53
7.4.	SeV .....	53
8.	Manipulación y análisis de ácidos nucleicos.....	54
8.1.	Ácido ribonucleico (ARN) .....	54
8.1.1.	Extracción de ARN.....	54
8.1.2.	Retrotranscripción del ARN.....	54
8.1.3.	RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR).....	54
8.2.	Acido desoxirribonucleico (ADN).....	55



8.2.1.	Amplificación de fragmentos por PCR.....	55
8.2.2.	Reacciones de restricción enzimática .....	57
8.2.3.	Reacciones de ligación de fragmentos de ADN .....	57
8.2.4.	Purificación de ADN.....	57
8.2.5.	Transfección de ADN.....	58
8.3.	Generación de plásmidos .....	58
8.3.1.	Plásmidos pIRES-cOFP- (genes de las proteínas C/P/V/W PPRV).....	58
8.3.2.	Plásmidos pIRES-cOFP- (genes de las proteínas VP6, VP7, NS1, NS2, NS3 y NS4 de BTV) .....	58
8.3.3.	Plásmidos pEF4-(JAK1 o TYK2).....	59
8.3.4.	Mutagénesis dirigida.....	59
8.3.5.	Secuenciación de ADN.....	59
9.	Manipulación y Análisis de Proteínas .....	59
9.1.	Extracción de proteínas totales a partir de cultivos celulares.....	59
9.2.	Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	60
9.3.	Inmunodetección de proteínas mediante <i>Western blot</i> .....	60
9.4.	Ensayo de inmunoprecipitación.....	61
9.5.	Determinación de la concentración de proteínas y análisis densitométricos .....	61
10.	Inmunofluorescencia y Microscopía confocal.....	62
11.	Ensayos de detección de actividad de la luciferasa .....	62
11.1.	Detección de la actividad luciferasa inducida por IFN tipo I en células infectadas con PPRV y BTV .....	63
11.2.	Detección de la actividad luciferasa inducida por IFN tipo II en células infectadas con PPRV y BTV .....	63
11.3.	Detección de la actividad luciferasa inducida por SeV en células infectadas con PPRV y BTV .....	63
11.4.	Detección de la actividad luciferasa inducida por IFN en células transfectadas con las proteínas de PPRV o BTV.....	64
12.	Citometría de flujo.....	65

13.	Tratamiento con inhibidores.....	65
14.	Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).....	66
15.	Herramientas bioinformáticas .....	66
16.	Análisis estadísticos .....	66

## **Resultados**..... 67

### **Capítulo 1. Mecanismo de inhibición de la respuesta al IFN por PPRV**..... 69

1.1.	PPRV interfiere con la inducción del IFN tipo I y con la respuesta de los IFNs tipo I y II .....	71
1.2.	PPRV inhibe la inducción de IFN y de ISGs en células de mamífero y en PBMCs de oveja .....	74
1.3.	Expresión de ISGs en PBMCs de ovejas infectadas con PPRV.....	78
1.4.	PPRV inhibe la expresión de las formas fosforiladas de STAT1 y STAT2 y bloquea su traslocación al núcleo.....	81
1.5.	Obtención y caracterización de las proteínas C, P, V y W de las cepas ICV'89 y Nigeria/75 de PPRV .....	84
1.6.	Las proteínas C y V de PPRV inhiben la ruta de inducción del IFN .....	85
1.7.	Las proteínas P, V y W de PPRV inhiben la señalización del IFN tipo I y II .....	87
1.8.	Las proteínas P, V y W de PPRV afectan los niveles de pSTAT1 y pSTAT2 y su traslocación al núcleo .....	89
1.9.	Interacción de las proteínas P, V y W de PPRV con STAT1 y STAT2 .....	92
1.10.	PPRV induce una disminución en los niveles de expresión de pJAK1 y pTYK2 .....	93
1.11.	Efecto de las proteínas P, V y W de PPRV en la expresión de pJAK1 y pTYK2 y su interacción con estas quinasas .....	94

### **Discusión Capítulo 1**..... 97

### **Capítulo 2. Mecanismo de inhibición de la respuesta al IFN por BTV**..... 107

2.1.	BTB interfiere con la inducción del IFN y la respuesta al IFN tipo I y II .....	109
2.2.	BTB inhibe la expresión de ISGs inducidos por el tratamiento con IFN .....	112

2.3. Efecto de BTV en los niveles de expresión STAT1 y STAT2 y sus formas fosforiladas.....	113
2.4. Obtención y caracterización de las proteínas VP6, VP7, NS1, NS2, NS3 y NS4 de BTV .....	117
2.5. Las proteínas NS3 y NS4 de BTV bloquean la inducción del IFN y la señalización del IFN tipo I y II .....	118
2.6. La proteína NS3 de BTV degrada STAT2 y reduce los niveles de expresión de pSTAT1.....	122
2.7. La proteína NS3 de BTV interacciona con STAT2.....	126
2.8. La proteína NS3 de BTV está ubiquitinada.....	127
2.9. La proteína NS3 de BTV se ubiquitina en las lisina 13 y 15 y recluta una E3 ligasa para degradar STAT2.....	130
2.10. La proteína NS3 de BTV degrada STAT2 por la vía lisosomal .....	132
<b>Discusión Capítulo 2</b> .....	137
<b>Conclusiones</b> .....	145
<b>Bibliografía</b> .....	149

# **Resumen**

**“Haz las cosas lo más simple que puedas, pero no te limites a lo simple”**

*Albert Einstein (1879-1955)*

La primera línea de defensa del organismo en respuesta a las infecciones virales es la activación de la cascada de señalización que finaliza con la inducción del interferón (IFN), generando un estado antiviral. Los virus, para poder replicarse y propagarse a nuevos hospedadores han desarrollado numerosas estrategias para evadir la respuesta al IFN. En esta Tesis Doctoral se ha estudiado los mecanismos de modulación de la respuesta al IFN de dos virus que infectan rumiantes. Estos dos virus tienen gran relevancia en Sanidad Animal ya que son los causantes de dos enfermedades de notificación obligatoria según normas internacionales de la Organización mundial de Sanidad Animal (OIE): el virus de la peste de los pequeños rumiantes (PPRV), agente causal de una enfermedad fronteriza, perteneciente al género *Morbillivirus*, y el virus de la lengua azul (BTV), agente que causa una enfermedad emergente, perteneciente al género *Orbivirus*.

PPRV es un pobre inductor y BTV es un fuerte inductor del IFN, pero ambos virus codifican proteínas que inhiben la ruta de inducción del IFN. Las proteínas C y V de PPRV y las proteínas NS3 y NS4 de BTV están involucradas en el bloqueo de la ruta de inducción del IFN. Por otro lado, se ha demostrado que ambos virus bloquean la señalización del IFN tipo I y II, presentando como diana común los factores de transcripción STAT1 y STAT2. STAT1 es un factor crítico para la activación transcripcional de genes antivirales estimulados por IFN tipo I y II. Nuestros datos muestran que PPRV y BTV reducen los niveles de expresión de STAT1 fosforilado (pSTAT1) y afectan a su distribución celular. Las proteínas P, V y W de PPRV interactúan con STAT1, lo que sugiere que estas proteínas participan en el bloqueo de las rutas de señalización. Asimismo, demostramos que la proteína V interactúa con las quinasas JAK1 y TYK2, reduciendo los niveles de expresión de su fosforilados, y en consecuencia impiden la activación de STAT1. En el caso de BTV se ha identificado la proteína NS3 como responsable de la disminución de los niveles de expresión de pSTAT1, a pesar de no detectar una interacción directa con este factor.

BTV induce la degradación de STAT2, otra de las dianas de ambos virus, mientras que PPRV no afecta a los niveles de STAT2 pero evita su traslocación al núcleo, bloqueando la activación del promotor ISRE. La proteína V de PPRV se une a STAT2, lo que indica que esta interacción afecta a la función de este factor, alterando su distribución celular. La proteína NS3 de BTV une y degrada STAT2 a través del lisosoma mediado por ubiquitinación, lo que supone un nuevo mecanismo de evasión de la respuesta al IFN no descrito anteriormente para ningún virus.



# **Summary**

In viral infections, the first defense line of the organism in response to the virus is the induction of the interferon (IFN) signaling cascade resulting in IFN production, which acts over neighboring cells to create an antiviral state. Viruses, in order to replicate and spread to new hosts, have developed several strategies to evade the IFN response. In this Doctoral Thesis the mechanisms used by two relevant viruses in Animal Health in counteracting the IFN have been studied. These viruses cause two notifiable diseases according to international standards of the World Organization of Animal Health (OIE): *Peste des petits ruminants virus* (PPRV), a causal agent of a border disease, belonging to the genus *Morbillivirus*, and the *Bluetongue virus* (BTV), an agent that causes an emerging disease, belonging to the genus *Orbivirus*.

PPRV is a poor inducer of IFN and BTV is a strong inducer of IFN, but both viruses encode proteins that inhibit the IFN induction pathway. PPRV C and V proteins and BTV NS3 and NS4 proteins are involved in blocking the IFN induction pathway. Moreover both viruses block IFN type I and II signaling by targeting the transcription factors STAT1 and STAT2. STAT1 is a critical factor for the transcriptional activation of antiviral genes stimulated by IFN type I and II. Our data show that PPRV and BTV inhibit the phosphorylation of STAT1 and affect its cellular distribution. PPRV P, V and W proteins interact with STAT1, indicating that these proteins participate in the blockade of these signaling pathways. Likewise, we demonstrate that the V protein interacts with the JAK1 and TYK2 kinases, inhibiting their phosphorylation and thereby further impairing STAT1 activation. In BTV, the NS3 protein has been identified as responsible for the inhibition of STAT1 phosphorylation, despite not having a direct interaction with this factor.

Both viruses also target STAT2. BTV induces STAT2 degradation, while PPRV does not affect STAT2 levels but prevents its translocation to the nucleus thus blocking the activation of the ISRE promoter. The protein V from PPRV binds to STAT2, and this interaction alters STAT2 distribution thus affecting the function of this transcription factor. BTV NS3 protein binds and degrades STAT2 through the lysosome mediated by ubiquitination, which represents a new viral mechanism of evasion of the IFN response.

# **Abreviaturas**

**“Cuanto más original es un descubrimiento, más obvio parece  
después”**

*Arthur Koestler (1905-1983)*



<b>aa:</b> aminoácido	<b>IL:</b> interluquina
<b>AANE:</b> aminoácidos no esenciales	<b>IP:</b> inmunoprecipitación
<b>ADN:</b> ácido desoxirribonucleico	<b>kDa:</b> kilodalton
<b>ARN:</b> Ácido ribonucleico	<b>LB:</b> medio de cultivo Luria-Bertani
<b>ARNcd:</b> ARN de cadena doble	<b>LPS:</b> lipopolisacárido
<b>ARNcs:</b> ARN de cadena sencilla	<b>miARN:</b> micro ARN
<b>ARNm:</b> ARN mensajero	<b>min:</b> minutos
<b>CEEA:</b> Comité Ético de Experimentación Animal	<b>MOI:</b> multiplicidad de infección
<b>C-terminal:</b> carboxi-terminal	<b>mono-Ub:</b> monoubiquitinación
<b>D.O.:</b> densidad óptica	<b>nt:</b> nucleótido
<b>dNTPs:</b> desoxinucleótidos trifosfato	<b>N-terminal:</b> amino-terminal
<b>DMSO:</b> dimetil sulfóxido	<b>PFA:</b> paraformaldehído
<b>DTT:</b> ditioneitol	<b>PFU:</b> Unidad Formadora de Placa
<b>DUBs:</b> deubiquitininas	<b>pi:</b> post-infección
<b>EDTA:</b> etilén diamino tetraacetato	<b>poli-Ub:</b> poliubiquitinación
<b>g:</b> guanina	<b>RNP:</b> ribonucleoproteína
<b>GADPH:</b> gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	<b>rpm:</b> revoluciones por minuto
<b>h:</b> hora	<b>RT:</b> Retrotranscriptasa
<b>hpe:</b> horas post-estimulación	<b>s:</b> segundo
<b>hpi:</b> horas post-infección	<b>DS:</b> desviación estándar
<b>hpt:</b> horas post-transfección	<b>SDS:</b> Dodecilsulfato sódico
<b>IB:</b> inmunoblot	<b>SFB:</b> Suero Fetal Bovino
<b>IF:</b> inmunofluorescencia	<b>T<sup>a</sup>:</b> temperatura
<b>IFN:</b> Interferón	<b>Ub:</b> ubiquitina
	<b>URL:</b> unidades relativas de luciferasa

En la presente Tesis Doctoral se han utilizado los siguientes términos, acrónimos o abreviaturas de la terminología científica inglesa:

- ATCC:** (American Type Culture Collection). Colección americana de cultivos tipo
- BHK:** (Baby Hamster Kidney). Riñón de hámster recién nacido
- BSA:** (Bovine Serum Albumin). Albumina de suero bovino
- BSL3:** (Biological Safety Level 3). Laboratorio de bioseguridad nivel 3
- BT:** (Bluetongue). Enfermedad de la lengua azul
- BTV:** (*Bluetongue virus*). Virus de la lengua azul

- cGAS:** cyclic GMP–AMP synthase
- cGAMP:** 2'3'-cyclic-GMP–AMP
- CMV:** (*Cytomegalovirus*). Citomegalovirus
- cOFP:** (Orange Fluorescent Protein). Proteína naranja fluorescente
- CSFV:** (*Classical swine fever virus*). Virus de la peste porcina clásica
- DAPI:** (4', 6-diamidino-2-phenylindole). 4'-6'-diamidino-2-fenilindol
- DBD:** DNA-binding domain
- DenV:** (*Dengue virus*). Virus del Dengue
- DMEM:** (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco.
- DMEMc:** DMEM completo
- ECMV:** (*Encephalomyocarditis virus*). Virus de la encefalomiocarditis
- F:** Flow cytometry
- FAO:** (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
- FMDV:** (*Foot-and-mouth disease virus*). Virus de la Fiebre Aftosa.
- GAF:** Gamma-interferon activation factor
- GAS:** Gamma activated sequence
- GFP:** (Green Fluorescent Protein). Proteína verde fluorescente
- HCV:** (*Hepatitis C virus*). Virus de la Hepatitis C.
- HEK-293T:** Human embrionic kidney 293T
- HSV:** (*Herpes simplex virus*). Virus herpes simple
- IFNG:** Interferon- $\gamma$  receptor
- IFNR:** Interferon- $\alpha/\beta$  receptor
- IFNL:** Interferon- $\lambda$  receptor
- IKK $\epsilon$ :** Inhibitor of nuclear fraction kappa *B kinase subunit epsilon*
- IRFs:** Interferon-regulatory factor
- IRF-1:** Interferon regulatory factor 1
- IP-10:** Interferon gamma-induced protein 10
- IRES:** Internal ribosome entry site
- ISGs:** Interferon stimulate genes
- ISGF3:** IFN stimulated gene factor 3
- ISG15:** Interferon Stimulated Gene 15
- ISG54:** Interferon Stimulated Gene 54
- ISRE:** Interferon-sensitive response element
- SV40:** (*Simian virus 40*). Virus del simio 40
- JAK:** Janus kinase

**LGP2:** Laboratory of genetics and physiology 2

**MAVS:** Mitochondrial antiviral signalling protein

**MDA5:** Melanoma differentiation-associated protein 5

**MeV:** (*Measles virus*). Virus del sarampión

**Mock:** células no infectadas/no tratadas

**MVB:** (Multiple vesicular body). Cuerpos multivesiculares

**MxA:** Myxovirus resistance gene A

**MyD88:** myeloid differentiation factor 88

**NEDD4:** Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4

**NiV:** (*Nipah virus*). Virus Nipah

**OAS:** 2'-5' oligoadenylate synthetase

**OIE:** (World Organisation for Animal Health). Organización Mundial de Sanidad Animal

**ORF:** (Open reading frame). Marco de lectura abierto

**PAGE:** (Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Electroforesis en geles de poliacrilamida

**PAMPs:** (Pathogen-associated molecular patterns). Patrones moleculares asociados a patógenos

**PBMC:** (Peripheral blood mononuclear cell). Célula mononuclear de sangre periférica

**PBS:** (Phosphate Buffered Saline). Solución salina tamponada con fosfato

**PCR:** (Polymerase Chain Reaction). Reacción en cadena de la polimerasa

**pJAK1:** phosphorylated JAK1

**PKR:** Protein kinase R

**PPR:** (Peste des petits ruminants). Enfermedad de la peste de los pequeños rumiantes

**PPRV:** (*Peste des petits ruminants virus*). Virus de la peste de los pequeños rumiantes

**PRRs:** (Pattern recognition receptors). Receptores de reconocimiento de patrones

**PRRSV:** (*Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*). Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

**pSTAT:** phosphorylated STATs

**pTYK2:** phosphorylated TYK2

**qRT-PCR:** Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR

**RdRP:** (RNA-dependent RNA polymerase). RNA polimerasa dependiente de RNA

**RIG-I:** Retinoic acid inducible gene-I

**RLR:** RIG-I-like receptor

**RPV:** (*Rinderpest virus*). Virus de la peste bovina

**RT-PCR:** (Retrotranscriptase-PCR). Reacción de transcripción inversa seguida de amplificación por PCR

**SDS:** (Sodium Dodecyl Sulfate). Dodecil sulfato sódico

**SDS-PAGE:** electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida con SDS

- SEM:** (Standar error of the mean). Error estándar del promedio
- SeV:** (*Sendai virus*). Virus Sendai
- SOCS:** (Suppressor of cytokine signaling). Supresores de la señalización de citosinas
- SSC:** Spleen sheep cell
- STATs:** Signal transducer and activator of transcription
- STING:** Stimulator of interferón genes
- TBK1:** TANK-binding kinase 1
- TBS:** (Tris-buffered saline). Solución salina tamponada con Tris
- TLRs:** Toll-like receptors
- TRIF:** TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$
- Tsg101:** (Tumor susceptibility gene 101). Gen 101 de susceptibilidad tumoral
- TYK2:** Tyrosine kinase 2
- VDS:** Vero Dog SLAM cell
- VSV:** (*Vesicular stomatitis virus*). Virus de la estomatitis vesicular
- WCE:** (Whole cell extract). Extracto celular total
- Western-Blot (WB):** Técnica inmunoenzimática para la detección de proteínas
- WNV:** (*West Nile virus*). Virus del Nilo Occidental
- wt:** (wild-type). Tipo salvaje.
- ZIKV:** (*Zika virus*). Virus del Zika

\*Durante la presente Tesis Doctoral se utilizan las abreviaturas en inglés para los virus descritos siguiendo las normas del organismo oficial de clasificación de virus (ICTV).

# **Introducción**

**“En la vida no existe nada que temer, solo cosas que comprender”**

*Marie Curie (1867-1934)*

## 1. Respuesta inmune antiviral

La respuesta inmune frente a virus incluye mecanismos inespecíficos y específicos con características y efectividad particulares que dependen de la naturaleza de cada virus. Los mecanismos inespecíficos constituyen la respuesta innata que desempeña un papel crítico en las etapas iniciales de la infección viral, mientras que los mecanismos específicos constituyen la respuesta adaptativa. Ambas respuestas son indispensables para eliminar una infección y aunque están interrelacionadas, cada una adquiere un papel decisivo en un momento determinado durante el curso de una infección.

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa de la célula contra el virus, responde de forma temprana para controlar la infección, replicación y diseminación del virus, estimulando y moldeando la respuesta inmune adaptativa. Esta respuesta comienza cuando patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), por ejemplo lipopolisacáridos (LPS), ácidos nucleicos, motivos de secuencias de ADN ricas en citosina y guanina no metiladas (CpG-ADN), proteínas virales específicas, etc..., son detectados por moléculas especializadas como son los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) [1]. Cuando uno de estos receptores interacciona con su ligando, se inicia una cascada de señales intracelulares que terminan con la internalización del patógeno, la secreción de citoquinas u otras reacciones encaminadas a eliminar dicho patógeno. A estas cascadas de señalización se unen otros mecanismos efectores, entre los que se encuentran los mediados a través del complemento y del IFN [2].

### 1.1. El Interferón

Los IFNs, que fueron descubiertos hace medio siglo, son un grupo de citoquinas secretadas que desempeñan un papel clave en la respuesta innata contra una infección vírica [3]. Entre las principales funciones de los IFNs cabe destacar su capacidad de inducir actividad antiviral a través de la estimulación de la transcripción de más de 300 genes (ISGs), de estimular células T citotóxicas, de modular la respuesta inmune y su actividad antiproliferativa [3].

#### 1.1.1. Tipos de interferón

Los IFNs se pueden clasificar en tres tipos (tipo I, II y III) dependiendo del receptor a través del cual señalizan (Tabla I). Los IFNs tipo I se expresan en la mayoría de las células y componen la familia más grande de IFNs. En cambio el IFN- $\gamma$  es el único miembro de los IFNs tipo II, codificado por un locus cromosómico diferente que los del tipo I [4]. El IFN- $\gamma$  está producido principalmente por células inmunitarias y, a pesar de que tiene actividad antiviral directa, su principal papel está relacionado con la respuesta

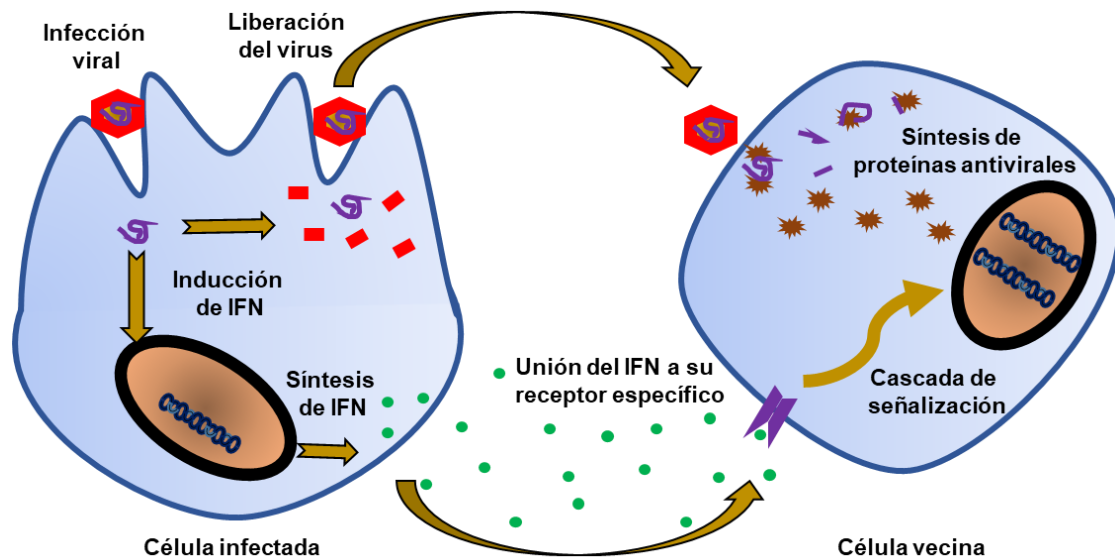
inmune adaptativa. Los IFNs tipo III se descubrieron recientemente y aunque tienen un receptor único comparten la misma ruta de señalización que los IFNs tipo I [5-7]. Los receptores de los IFNs tipo III se expresan específicamente en las células epiteliales [8].

**Tabla I. Clasificación de IFNs y sus receptores [9].**

Tipo	Subtipo	Receptor
Tipo I	IFN- $\alpha$ (13 subtipos) IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\omega$ IFN- $\delta$ (cerdo), IFN- $\tau$ (rumiantes), IFN- $\zeta$ (ratón)	IFNAR1 IFNAR2
Tipo II	IFN- $\gamma$	IFNGR1 IFNGR2
Tipo III	IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2, IFN- $\lambda$ 3, IFN- $\lambda$ 4	IFNLRI IFNLR2

### 1.1.2. Sistema del interferón

Los antígenos virales o PAMPs son reconocidos por las células a través de receptores celulares o PRRs. Este reconocimiento induce la activación de una serie de factores transcripcionales que se unen en la región promotora del gen del IFN para inducir su expresión. El IFN sintetizado es secretado al medio extracelular donde se une a su receptor específico en células adyacentes activando una cascada de señalización que finalmente induce la expresión de genes implicados en bloquear la replicación viral, creando de esta forma un estado antiviral que protege a la célula de posibles nuevas infecciones (Figura 1).



**Figura 1. Esquema representativo del mecanismo de acción del IFN.** El virus es reconocido por la célula infectada activando la inducción del IFN. El IFN es liberado al medio extracelular donde se une a sus receptores específicos activando una cascada de señalización que induce la transcripción de distintos genes creando un estado antiviral en la célula.

### 1.1.3. Inducción del IFN tipo I

Los IFNs son inducidos por la activación de los PRRs, que se pueden dividir en dos grandes grupos. El primer grupo está formado por miembros de los receptores Toll (TLR). Estas proteínas se encuentran asociadas a membranas, bien en la superficie celular, bien en compartimentos intracelulares, donde reconocen ácidos nucleicos y glicoproteínas (PAMPs). El segundo grupo está formado por sensores citoplasmáticos, entre los que se encuentran los receptores de la familia de helicasas RIG-I (*Retinoic acid Inducible gene-1*) (RLR) y cGAS (*cyclic GMP-AMP synthase*), que del mismo modo reconocen material genético foráneo [10-12].

#### 1.1.3.1. Ruta de inducción a través de los receptores TLR

Los TLRs involucrados en el reconocimiento de material genético viral son: TLR-3 que reconoce ARN de cadena doble (ARNdc), los TLR-7 y 8 que detectan ARN de cadena sencilla (ARNcs) y el TLR-9 que reconoce secuencias virales CpG-ADN [13]. Los TLR-3, 7, 8 y 9 están localizados en las superficies celulares y en compartimentos intracelulares como lisosomas, endosomas y retículo endoplasmático. Los TLRs detectan genomas virales de partículas virales lisadas, iniciando una cascada de señalización que conduce a la producción del IFN y otras moléculas pro-inflamatorias [14]. Los TLRs al reconocer los PAMPs, interactúan con moléculas adaptadoras como TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$* ) en el caso de TLR-3, o MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) en el de TLR-7, 8 y 9. Todo ello desencadena la

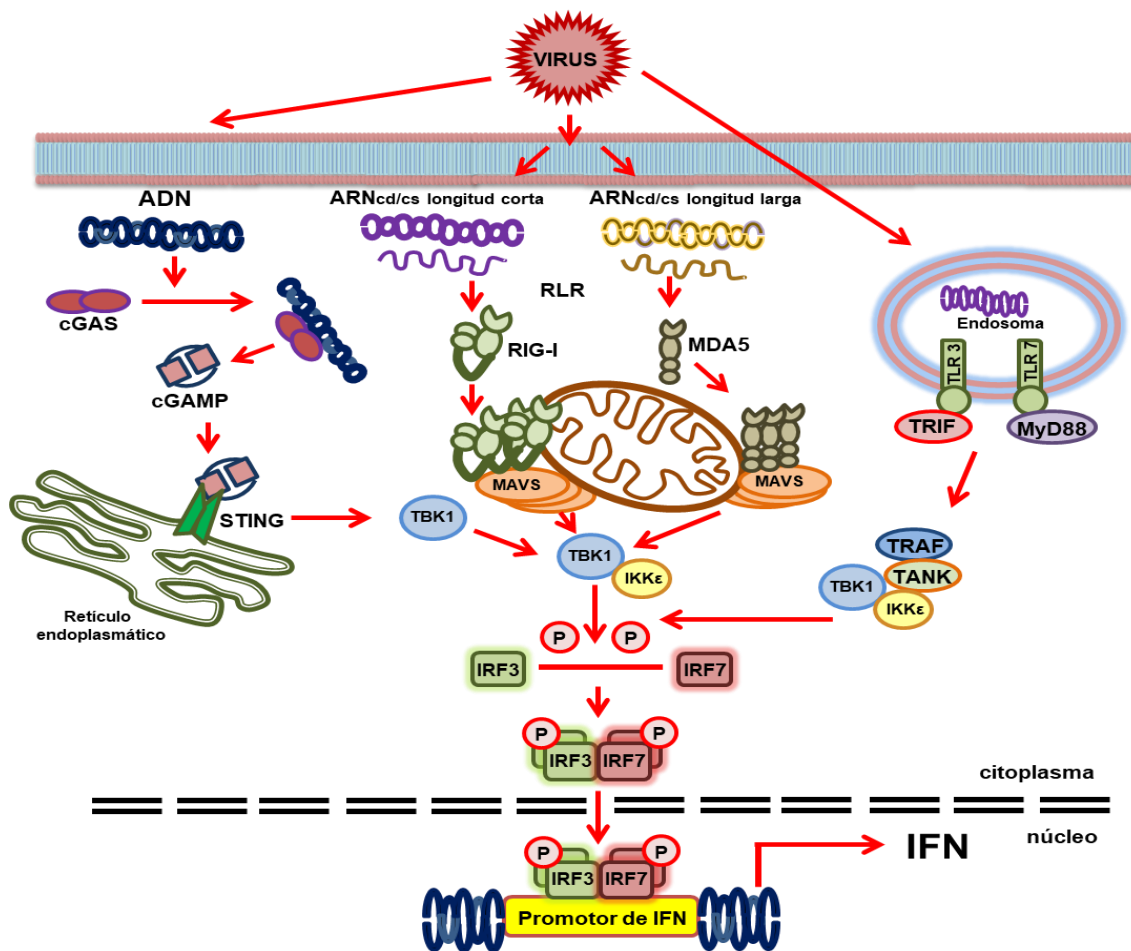


transducción de la señal, activando una serie de factores de transcripción como TRAF, TANK, IRF-3 e IRF-7, finalizando con la producción del IFN y citoquinas proinflamatorias [15] (Figura 2).

### 1.1.3.2. Ruta de inducción a través de los receptores RLR y cGAS

La familia de receptores RLR está formada por tres componentes; RIG-I, MDA5 (*Melanoma Differentiation-Associated protein 5*) y LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*) [16]. Los RLRs son proteínas citoplasmáticas que detectan genoma viral en el citoplasma [17]. RIG-I se activa mediante moléculas de ARNcd de longitud corta y ARNcs que presentan extremos 5' trifosfatos y difosfatos producidos por las polimerasas virales, mientras que MDA5 reconoce ARNcd de una longitud mayor y ARNcs, tanto de polaridad negativa como positiva. LGP2 es una proteína estructuralmente relacionada con RIG-I y MDA5, que actúa como sensor de detección de ARN viral aunque su mecanismo no está completamente definido. RIG-I y MDA5 presentan dos dominios CARD en su extremo amino-terminal (N-terminal), un dominio helicasa DEX (D/H) y un dominio de unión a ARN en su extremo carboxi-terminal (C-terminal). LGP2 presenta los mismos dominios, a excepción de los dominios CARD. Tras la activación de los RLRs mediante la unión a su ligando, éstos se multimerizan y sus dominios CARD interactúan con el dominio CARD de la molécula adaptadora mitocondrial MAVS (*mitochondrial antiviral signaling protein*), anclada en la mitocondria [18]. Esto conduce al reclutamiento de las quinasas TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) e IKK $\epsilon$  (*inhibitor of nuclear fraction kappa B kinase subunit epsilon*). Estas dos quinasas son las responsables de la fosforilación de los factores de transcripción IRF3/7, dando lugar a su dimerización y translocación al núcleo, dónde se unen a la región promotora de genes del IFN tipo I, permitiendo su expresión [19] (Figura 2).

La presencia del ADN citoplasmático asociado a la infección de los virus cuyo material genético es ADN, es el desencadenante de la inducción del IFN. Específicamente, el sensor celular cGAS se une al ADN citoplasmático, se activa y genera un dinucleótido, cGAMP (*2'3'-cyclic-GMP-AMP*), que se une al receptor del retículo endoplasmático STING (*Stimulator of interferón genes*) estimulando la cascada inductora del IFN [12] (Figura 2).



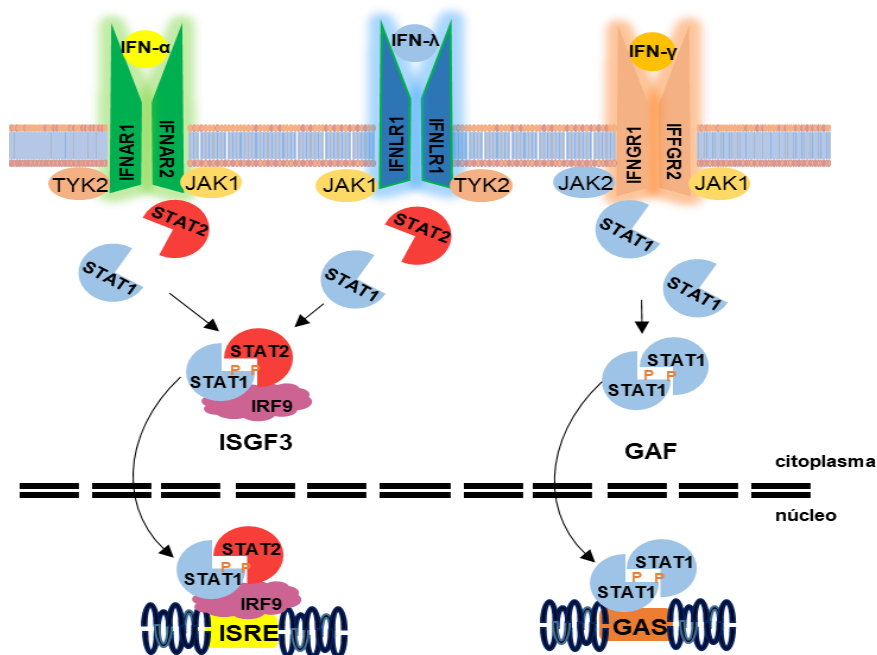
**Figura 2. Esquema de la ruta de inducción del IFN tipo I.** Los receptores celulares de la familia TLR o los sensores citoplasmáticos como RIG-I, MDA5 y cGAS reconocen el genoma viral. Ambas vías convergen en la activación de los factores de transcripción IRF3/IRF7 que se unen a la región promotora del IFN induciendo su expresión.

### 1.1.4. Ruta de señalización del IFN

La cascada de señalización del IFN (tipo I y III) se inicia con la unión del IFN a su receptor heterodimérico específico que se encuentra en la superficie celular. El IFN tipo I se une al heterodímero formado por las subunidades IFNAR1 e IFNAR2 y el IFN tipo III se une al heterodímero formado por las subunidades IFNLR1 e IFNLR2. Ambos IFNs comparten la cascada de señalización, que se inicia con la unión a sus receptores específicos originando un cambio conformacional y la dimerización del receptor, provocando el reclutamiento de las tirosinas quinasas JAK1 (*Janus kinase*) y TYK2 (*tyrosine kinase 2*). Ambas fosforilan y activan a los factores de transcripción STAT1 y STAT2 (*signal transducer and activator of transcription*), formando entre ellos heterodímeros, que al unirse a IRF-9 forman un complejo denominado ISGF3 (*IFN stimulated gene factor 3*). Este complejo se transloca al núcleo y se une a secuencias específicas llamadas elementos de respuesta estimulados por interferón (ISREs),

situados en la región promotora de los genes activados por interferón (ISGs). El estado antiviral en la célula se produce por la transcripción de los ISGs.

El IFN- $\gamma$  se une a un receptor distinto, formado también por dos subunidades, IFNGR1 e IFNGR2. Esta unión induce la fosforilación de STAT1 por activación de las JAKs (JAK1 y 2), formando un homodímero de STAT1, este complejo conocido como GAF (*gamma-interferon activation factor*) se transloca al núcleo, y se une a secuencias promotoras de genes activados por IFN- $\gamma$ , denominadas GAS (*gamma activated sequence*) (Figura 3).



**Figura 3. Ruta de señalización a través de los IFN tipo I, II y III.** Los IFNs se unen a receptores llamados IFNAR (para IFN Tipo I), IFNGR (para IFN tipo II) e IFNLR (para IFN tipo III), iniciando así la cascada de señalización de la JAK/STAT, permitiendo la activación de la ruta transcripcional mediante la unión de factores de transcripción a las secuencias específicas ISRE/GAS, desencadenando la expresión de varios genes (ISGs) que producirán un estado antiviral en la célula.

### 1.1.5. ISGs

La ruta de señalización del IFN tiene como resultado la transcripción de ISGs que producen un gran número de proteínas que bloquean la replicación viral, afectan al metabolismo celular o facilitan la apoptosis, creando un estado antiviral en la célula [20]. Entre los ISGs producidos en células estimuladas por IFN tipo I destacan las proteínas PKR (*Protein kinase R*), OAS (*2'-5' Oligoadenylate Synthetase*), MxA (*Myxovirus resistance gene A*), ISG15 (*Interferon Stimulated Gene 15*) e ISG54 (*Interferon Stimulated Gene 54*), entre otros. PKR y OAS se unen a ARNcd, donde la proteína PKR

bloquea la síntesis de las proteínas virales y del hospedador y la proteína OAS activa una ARNasa intracelular (ARNasaL) que degrada tanto el ARN viral como el del hospedador, llegando en los dos casos a la muerte celular por apoptosis [21]. MxA es una proteína con actividad GTPasa, que provoca la inhibición de la replicación viral [22]. La proteína ISG15 es un modificador similar a la ubiquitina (Ub) que desempeña un papel importante durante la respuesta del huésped a las infecciones virales [23]. La proteína ISG54 interactúa con el factor de iniciación de la traducción eIF-3, inhibiendo la traducción y la síntesis de proteínas [24].

Los ISGs producidos en células estimuladas con IFN tipo II codifican proteínas como IRF-1 (*Interferon regulatory factor 1*) e IP-10 (*Interferon gamma-induced protein 10*). IRF-1 es un factor de transcripción capaz de unirse a regiones promotoras ISRE y promover la expresión del IFN- $\beta$ . Este factor está regulado positivamente por NF- $\kappa$ B [25]. La quimioquina IP-10 es un quimioatrayente de células T activadas y repelente de neutrófilos [26].

## 1.2. Estrategias virales de evasión de la respuesta al IFN

Los IFNs son la primera línea de defensa del hospedador contra una gran variedad de infecciones virales y los virus han desarrollado diferentes estrategias para contrarrestarla. Estas estrategias se pueden dividir en dos categorías, estrategias de evasión de la ruta de inducción del IFN y estrategias de evasión de la ruta de señalización.

### 1.2.1. Estrategias virales de evasión frente a la ruta de inducción del IFN

Los virus sintetizan proteínas virales que pueden interactuar directamente con factores que intervienen en la ruta de inducción del IFN, inhibiendo sus funciones y bloqueando la activación de dicha ruta en distintos puntos. Por ejemplo, la proteína no estructural NS1 del virus Influenza A interacciona directamente con el sensor citoplasmático RIG-I, formando un complejo insoluble (RIG-I/MAVs/NS1) que produce el bloqueo de la ruta de inducción del IFN [27]. Otros ejemplos de unión directa son la unión de la proteína V de los paramixovirus a MDA5 [28], la unión de la proteína  $\gamma$ <sub>134.5</sub> del virus herpes simple (HSV) a TBK1 impidiendo la activación de IRF3 [29] y la unión de la proteína VP35 del virus Ébola con IKK $\epsilon$  y TBK1 [30].

Otras estrategias de evasión consisten en la degradación de algunos factores como por ejemplo, la degradación de RIG-I mediante la proteasa 3C del virus de la encefalomiocarditis (ECMV) [31] o la degradación vía proteasoma de IRF3 mediante la proteasa Npro del virus de la peste porcina clásica (CSFV) [32]. IRF3 es el factor clave de la ruta de inducción del IFN, por lo que es la diana de muchas proteínas virales con

el objeto de inhibir su fosforilación, inactivándolo e impidiendo así la inducción del IFN. Por ejemplo, la proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C (HCV) [33] y la proteína nsp1 $\beta$  del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) [34] son capaces de inhibir la fosforilación de IRF3.

Otras estrategias de evasión de la ruta de inducción del IFN son las que presentan algunas proteínas virales que actúan como deubiquitininas (DUBs) inhibiendo la activación dependiente de ubiquitinación, necesaria para la activación de la ruta de inducción del IFN [35, 36] o bien otras que actúan como moléculas homólogas a las que activan las rutas de señalización a través de TLR y RLR de la célula huésped, impidiendo la activación de la ruta de inducción del IFN [37, 38].

## 1.2.2. Estrategias virales de evasión frente a la ruta de señalización del IFN

Los virus han desarrollado diferentes estrategias con las que antagonizar la vía de señalización JAK/STAT influyendo en la virulencia y patogénesis viral. La unión de los IFNs a sus receptores es el primer paso de activación de la ruta JAK/STAT, siendo diana de muchos virus como el virus Vaccinia que codifica la proteína B18R que actúa como una molécula de unión a IFN, impidiendo la señalización a través de sus receptores [39]. Las proteínas C y V del virus del sarampión forman un complejo junto con el receptor IFNAR1 bloqueando la ruta de señalización [40] y la proteína NS1 del virus Influenza A reduce la expresión del receptor IFNAR1 a nivel transcripcional [41].

Otra estrategia de evasión de la ruta de señalización, muy común en muchos virus, consiste en la reducción de los niveles de expresión de moléculas implicadas en la cascada de señalización, por ejemplo el virus del citomegalovirus humano (HCMV) reduce los niveles de JAK1 [42] o la proteína E1A del adenovirus humano tipo 5 reduce los niveles de STAT1 e IRF9 [43]. En otros casos, los virus codifican proteínas que interaccionan directamente con factores de la ruta JAK/STAT para degradarlos, inhibir su fosforilación o bloquearlos, como por ejemplo la proteína E6 del HPV18 que se une a TYK2 e inhibe la expresión de su forma fosforilada (pTYK2) [44], la proteína V del virus del sarampión (MeV) que se une a JAK1 bloqueando la cascada de señalización [45], las proteínas P, V y W de algunos paramixovirus interaccionan con las moléculas STATs bloqueando la ruta de señalización [46], la proteína V de algunos virus de los géneros *Respirovirus* y *Rubulavirus* interaccionan con STAT1 y STAT2 para degradarlas [46-50], todos los flavivirus pueden inhibir la expresión de JAK1 fosforilado (pJAK1) [51-54], además la proteína NS5 de flavivirus como el virus del Dengue (DenV) y el virus Zika

(ZIKV) degradan STAT2 [9, 55, 56], o la proteína NSP1 de rotavirus que degrada IRF9 [57].

La translocación al núcleo del complejo ISGF3 se considera otra diana para los virus, como es el caso del virus de la rabia que codifica la proteína P que interacciona con STAT1 sin afectar a su fosforilación, pero impidiendo su translocación al núcleo [58]. Otros virus codifican proteínas que actúan sobre la importina KPNA1, responsable de la translocación al núcleo de pSTAT1, como es el caso de la proteína VP24 del virus Ébola que interacciona directamente con ella [59, 60] o de la proteína nsp1 $\beta$  de PRRSV y la proteína 3Cpro del virus de la fiebre aftosa (FMDV) que inducen la degradación mediada por ubiquitina de KPNA1 sin una interacción directa [61, 62]. Por otro lado, la oncoproteína E7 del papilomavirus se une a IRF9 bloqueando la formación del complejo ISGF3 [63].

La activación de la transcripción de los ISGs por el complejo ISGF3 es el último paso de la cascada de señalización del IFN, en el cual están implicados diversos cofactores de transcripción o coactivadores. Algunos virus antagonizan este paso de la ruta, como por ejemplo el bocavirus porcino que codifica la proteína NP1 que impide que el complejo ISGF3 se una al ADN, ya que la proteína NS1 interacciona con el dominio de unión al ADN (DBD) de IRF9 [64] o el HCV, que inhibe la unión de ISGF3 a la región ISRE mediante la proteína Core [65].

Otras estrategias de evasión están basadas en la regulación de proteínas involucradas en la cascada JAK/STAT por micro ARN (miARN), como es el caso del aumento del miR-30c durante la infección por PRRSV que provoca una disminución de la expresión de JAK1, resultando en una mayor efectividad de la infección [66] o el aumento del miARN-373 en infecciones con HCV, que suprime la expresión de JAK1 e IRF9 [67]. Algunos virus han desarrollado mecanismos para inducir la expresión de proteínas del hospedador conocidas como supresores de la señalización de citoquinas (SOCS) para promover la supervivencia del virus. Las proteínas SOCS inhiben las vías protectoras de señalización antiviral, permitiendo que los virus evadan la respuesta inmune del huésped [68]. Virus como el HCV o el virus influenza A que inducen una sobreexpresión de SOCS3 en células infectadas, utilizan dicha estrategia [69, 70].

### 1.2.3. Sistema ubiquitinación

Una de las estrategias más frecuentes de los virus para evadir el sistema del IFN es utilizar el propio sistema endógeno de ubiquitinación de la célula hospedadora para degradar proteínas involucradas en las rutas del IFN. La ubiquitinación es un proceso enzimático post-traducciona l de las células eucariotas que consiste en la unión

covalente de la Ub (proteína de 76 aa muy conservada en los eucariotas) a otra proteína, señalándola como objeto de degradación [71]. Existen dos caminos para la degradación de las proteínas: la vía vesicular mediada por los lisosomas y la vía citosólica mediada por el proteasoma. La ubiquitinación presenta al menos tres variantes: a) mono-Ub, b) multi-Ub y c) poli-Ub, y consta de una serie de pasos. En primer lugar, la activación de una molécula de Ub a través de la enzima E1 (de activación), seguido de la transferencia de la ubiquitina de E1 a la enzima E2 (de conjugación) y, finalmente la ligación mediante un enlace isopeptídico entre la glicina del carbono terminal de la Ub con la lisina de la proteína diana gracias a la acción de las enzimas E3 (de ligación). Una vez que la Ub se ha unido a la proteína, se empiezan a agregar más moléculas de Ub, dando como resultado la formación de una cadena poli-Ub que permite la degradación de la proteína. El proceso de ubiquitinación es reversible, y está mediado por enzimas DUBs, las cuales interactúan con el complejo E3-sustrato eliminando las moléculas de Ub [72]. La Ub posee en su estructura 7 residuos de lisina importantes para la poli-Ub (posiciones 6, 11, 27, 29, 33, 48 y 63) y modificados en función del residuo sobre el cual se unen las nuevas unidades de Ub.

Este mecanismo es utilizado por muchos virus para degradar factores diana, como es el caso de los STATs, que es degradado vía proteasoma por la proteína NS5 de DenV y ZIKV [55, 56]. Por otro lado, algunos virus codifican proteínas virales que actúan como DUBs, como es el caso de la proteína L del virus de la fiebre hemorrágica de Crimea Congo, que escinde cadenas poli-Ub e inhibe las rutas antivirales dependientes de ISG15 y Ub [73].

## 2. Peste de los pequeños rumiantes

La peste de los pequeños rumiantes (PPR) es una enfermedad vírica, causada por el virus de la peste de los pequeños rumiantes (PPRV), de progresión aguda. Descrita por primera vez en 1942 en Costa de Marfil [74], cobró especial relevancia a partir de 2011 tras la erradicación de la peste bovina (RP), ya que probablemente haya estado enmascarada por la campaña de vacunación contra RP al existir protección cruzada entre RP y PPR. La PPR está incluida en la lista de enfermedades del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE, y es de declaración obligatoria a la OIE. Además, en 2015 se aprobó la Estrategia mundial para el control y la erradicación de la PPR de la OIE y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) con miras a erradicar la enfermedad en 2030 [75].

La PPR es una enfermedad que afecta a mamíferos ungulados domésticos, principalmente ovejas y cabras, siendo más susceptible el ganado caprino que el ovino [76]. Otros animales domésticos como los camellos y el ganado bovino sufren una infección subclínica de la PPR, pero no contribuyen a la epidemiología de la enfermedad, ya que no tienen la capacidad de excretar el virus [77]. Se han detectado brotes en pequeños rumiantes silvestres en cautiverio y libres en la naturaleza [78, 79].

Los rumiantes domésticos infectados son la principal fuente de PPRV, estando presente en lágrimas, salivas, secreciones nasales, orina y heces [80]. El principal método de transmisión es por contacto directo entre animales sanos e infectados, mediante inhalación de aerosoles y por ingestión de alimento, agua y fómites contaminados. Factores como la obtención de animales de diferentes proveedores, su manejo y estabulación, son prácticas tradicionales en la cría ovino-caprina que supone un alto riesgo en la transmisión del virus [81].

Los signos clínicos generalmente aparecen entre los 2-7 días, después de estar en contacto con un animal infectado [82], y se limitan a fiebre alta, depresión grave, falta de apetito y secreciones nasales [83]. PPRV tiene tropismo por órganos epiteliales y linfoides, originando una inmunosupresión [76], haciendo que los animales afectados sean muy vulnerables a infecciones secundarias [84]. La infección afecta más seriamente a los animales jóvenes y al ganado caprino. Cuando ocurren brotes sobre poblaciones no expuestas previamente (*naïve*), se alcanzan tasas de morbilidad de hasta el 100%, con muerte en 80-90 % de los casos.

PPR está localizada en zonas con pocos recursos para hacer frente a los focos de esta enfermedad. Durante algún tiempo los informes de PPR se limitaron a África Occidental pero actualmente, está distribuida por la mayor parte de África, en Oriente Medio y Próximo, en casi todo el continente asiático, desde el Oeste de Asia hasta China y recientemente ha llegado a Europa, por la notificación a la OIE de un brote en Georgia en 2016 [85, 86]. Existen 4 linajes distinguibles descritos hasta ahora, determinados por la comparación de secuencias de una pequeña región variable del extremo C-terminal del gen que codifica la proteína N (1360±1614, 255 nt de longitud) o una región del gen que codifica la proteína F (256±575, 319 nt de longitud) [87]. Sin embargo, los cuatro linajes comparten el mismo serotipo y una sola cepa vacunal, basada en un aislado nigeriano, que ha proporcionado una protección completa contra la enfermedad en África Occidental y China.



## 2.1. Virus de la peste de los pequeños rumiantes

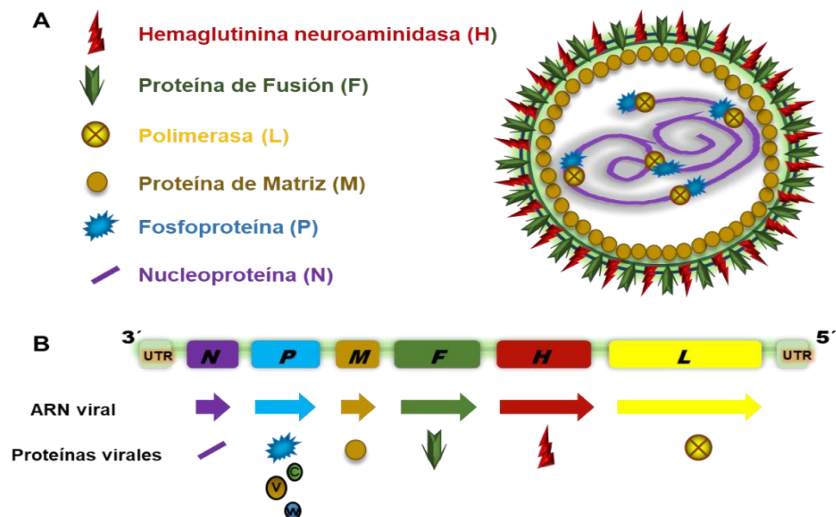
### 2.1.1. Clasificación taxonómica y morfología

PPRV se clasifica dentro del Orden de los *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae* y género *Morbillivirus*, constituido por siete miembros, los cuales pueden producir importantes enfermedades en diferentes hospedadores, como MeV en humanos, virus de la peste bovina (RPV) en vacas, PPRV en cabras y ovejas, virus del Distemper Canino (CDV) en perros, virus del Distemper de la Foca (PDV), Morbillivirus de los cetáceos (CeMV) en ballenas, marsopas y delfines, y Morbillivirus felino (FMV) en mustélidos y grandes felinos [88]. Aunque la más temida de estas enfermedades, la peste bovina, ha sido erradicada, otras enfermedades importantes producidas por morbillivirus siguen siendo una amenaza para sus hospedadores [89-91]

El virión de PPRV presenta una forma pleomórfica con una envuelta lipídica derivada de la membrana celular. Contiene como material genético una cadena de ARN de polaridad negativa y no segmentado de 15.948 nucleótidos (nt) de longitud. La nucleocápsida está formada por el ARN genómico protegido por un complejo de ribonucleoproteína (RNP), compuesto por la nucleoproteína (N), junto con la fosfoproteína (P) y la Polimerasa (L) [92].

### 2.1.2. Composición y organización genómica

El genoma viral de PPRV contiene seis unidades de transcripción no superpuestas, los genes *N*, *P*, *M*, *F*, *H* y *L*, que codifican seis proteínas estructurales: la proteína de la nucleocápsida (N), la fosfoproteína (P), la proteína de fusión (F), la proteína de la matriz (M), la hemaglutinina neuroaminidasa (H) y la proteína de la polimerasa (L), y tres proteínas no estructurales C, V y W [92]. En la Figura 4 se esquematiza una partícula viral de PPRV (A) y su organización genómica (B).



**Figura 4. (A) Representación esquemática de una partícula de PPRV. (B) Representación esquemática de la organización genómica de PPRV.** El genoma de PPRV es un ARN de cadena simple, de polaridad negativa que contiene seis genes que codifican 9 proteínas. A partir del gen P se codifican 3 proteínas no estructurales.

### 2.1.3. Ciclo viral

El ciclo replicativo de PPRV tiene una duración de entre 6 y 8 h en cultivos celulares [93]. Se inicia con la interacción entre el virus y los receptores celulares (Slam/nectina-4), en la que está implicada la proteína H del virión. La nucleocápsida entra al citoplasma celular por fusión de las membranas viral y celular, facilitada por la proteína F [94]. La replicación viral y la transcripción se inician en el citoplasma, donde la RdRP (*RNA-dependent RNA polymerase*) inicia la síntesis del ARNm. Por último, se produce el proceso de ensamblaje de la progenie viral y la liberación de esta mediante gemación. Este último paso no está muy esclarecido en los morbillivirus [82].

### 2.1.4. Proteínas estructurales de PPRV

La proteína N envuelve el genoma viral formando parte del complejo ribonucleoproteico junto con las proteínas P y L. Es la proteína que se produce en mayor cantidad en los morbillivirus [95]. La proteína P es esencial para la replicación del virus y está involucrada en todos los aspectos del ciclo viral, principalmente en el ensamblaje de la nucleocápsida y en la síntesis de ARN [96]. Es la proteína menos conservada dentro de los morbillivirus [97]. Además, la proteína P es una de las herramientas utilizadas por estos virus para bloquear las rutas de señalización del IFN, como en el caso de RPV que bloquea la fosforilación y translocación nuclear de STAT1 y STAT2 [98].

La proteína M hace de enlace entre la nucleocápsida y las glicoproteínas de superficie (F y H). Es la proteína más conservada dentro de los morbillivirus [99]. La

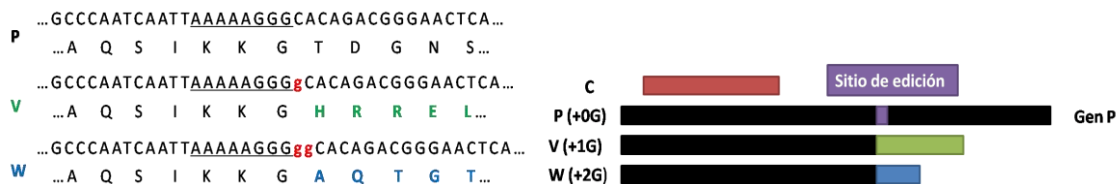
proteína F forma espículas en la superficie de la envoltura viral junto con la proteína H. Está implicada en la hemólisis inducida por el virus, la formación de sincitios por la fusión de membranas entre células y la iniciación de la infección [100, 101]. La proteína H de PPRV tiene tanto actividad hemaglutinante como neuraminidasa, a diferencia de otros morbillivirus [102]. Determina la especificidad de hospedador al reconocer los receptores de la membrana celular y anclar el virus al receptor [103]. La proteína L es la proteína más grande de los morbillivirus y la que menos se expresa en la célula infectada. La proteína L es RdRP, que junto con la proteína P lleva a cabo la replicación, transcripción, capping y poliadenilación de los ARN mensajeros (ARNm) virales.

## 2.1.5. Proteínas no estructurales de PPRV

En los morbillivirus, el *gen P* es policistrónico, codificando además de la proteína estructural P (1530 nt), las proteínas no estructurales C (534 nt), V (897 nt) y W (744 nt), las cuales juegan un papel crucial en el bloqueo de la respuesta inmune del hospedador [98].

Sólo los géneros *Henipavirus*, *Morbillivirus* y *Respirovirus* producen la proteína C, codificada a partir de la transcripción de un ORF alternativo solapante que, en el caso de PPRV comienza 22 nt después del inicio de las proteínas P, V y W [104]. La proteína C está implicada en la replicación del genoma viral en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), en la regulación de la síntesis de ARN [105], en la determinación de virulencia [106], en la traducción de proteínas virales [107] y en el bloqueo de la inducción del IFN tipo I [108] uniéndose a MDA5, interfiriendo con la transcripción del IFN- $\beta$  en el núcleo [109].

Las proteínas V y W se producen por inserción co-transcripcional, adicionando en un sitio específico de edición (posición 685-692) del *gen P*, el nt guanina (g), provocando un cambio de fase de lectura, generando transcritos distintos. En el caso de la proteína P no hay ninguna inserción, en el caso de la proteína V se produce una inserción (+1g) y en el caso de la proteína W se necesitarían dos inserciones (+2g) de nucleótido [110] (Figura 5). La proteína V en los paramixovirus contiene dos dominios evolutivamente distintos. El dominio N-terminal, común entre las proteínas virales P, V y W, que no está altamente conservado entre los virus y el dominio C-terminal, que es diferente entre las tres proteínas (P, V y W), destacándose en la proteína V, el dominio de unión a zinc, altamente conservado y constituido por un residuo de histidina y siete residuos de cisteína [111].



**Figura 5. (A) Sitio de edición del gen P de PPRV (subrayado) (B) Organización de las proteínas codificadas en el gen P.** No hay edición para la proteína P. La co-transcripción se obtiene por la adición de nt guanina (g). V (+1g) y W (+2g). La proteína C tiene un ORF distinto solapante, que inicia 22 nt después.

La tercera parte de la producción del gen P conlleva la transcripción del gen que codifica la proteína V, mientras que la frecuencia de co-transcripción del gen W ha sido descrito entre un 1 y un 2% [112], igual que en RPV [113], sembrando la duda de si es un factor real con una función o algo accidental.

La proteína V tiene la capacidad de modular la respuesta inmune. En cambio, la proteína W de los morbillivirus está poco estudiada en cuanto a su conformación y funciones, y no se sabe con seguridad si tiene funciones distintas o es simplemente un producto accidental del mecanismo de edición que produce la proteína V. Por el contrario, la proteína W de otros paramixovirus, como el virus del Nipah (NiV) actúa sobre la señalización del IFN a través de la interacción y secuestro de STAT1 en el núcleo [114] y la inhibición de la ruta de las TLR3 [115].

## 2.1.6. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por PPRV

PPRV produce una infección aguda que provoca una supresión transitoria del sistema inmune del hospedador durante y después del transcurso de la infección. PPRV es un virus linfotrópico, pudiéndose detectar el ARN y proteínas virales en PBMCs y tejidos linfoides [116]. La inmunosupresión puede ser causada por la inhibición de la inducción del IFN, la alteración de la respuesta de citoquinas, la supresión de la respuesta inflamatoria, por la infección directa y destrucción de leucocitos (leucopenia), inhibición de la síntesis de inmunoglobulinas (pérdida de células B) o por la detención del ciclo celular después del contacto directo con glicoproteínas virales [82].

En general los morbillivirus tienen la capacidad de antagonizar la acción de la respuesta inmune del hospedador con distintas proteínas virales. Así, pueden bloquear a través de distintos mecanismos el sistema de acción del IFN lo cual tiene consecuencias significativas en el desarrollo de la enfermedad [117].

Los únicos datos que existen en PPRV sobre los mecanismos de interferencia con la ruta del IFN están basados en la similitud con otros sistemas virales mejor conocidos, aunque recientemente se han llevado a cabo nuevas investigaciones con PPRV. Se ha

demostrado que las proteínas V y C de PPRV están involucradas en la inhibición de la inducción del IFN, comprobando la interacción de la proteína V con MDA5 y una interacción débil con LGP2 y RIG-I. El mecanismo de la proteína C de PPRV para bloquear la inducción del IFN no está esclarecido [118]. En cambio, en otros paramixovirus la proteína C interfiere con IRF3 afectando a su fosforilación y su traslocación al núcleo [109].

La proteína V de PPRV es eficaz en el bloqueo de la acción del IFN, interactuando con múltiples componentes de la ruta de señalización, como son las quinasas TYK2 y JAK1 y los factores de transcripción STAT1 y STAT2 [104]. El dominio N-terminal de la proteína V de PPRV presenta dos residuos tirosina (Y) altamente conservados implicados en la unión de STAT1, conservados en muchos morbillivirus [119]. El dominio C-terminal interactúa con las quinasas TYK2 y JAK1 y el anillo de zinc permite la unión a STAT2 mediante los residuos triptófano 275 y 277 [120-122]. Las proteínas P y N de PPRV también tienen un efecto en las rutas de señalización tipo I y II, aunque el efecto inhibitorio es mucho menor que el ocasionado por la proteína V [122].

### 3. La lengua azul

La lengua azul (*Bluetongue*, BT) es una enfermedad vírica, no contagiosa, transmitida por varias especies de dípteros hematófagos del género *Culicoides* (familia Ceratopogonidae), que afecta a diferentes especies de rumiantes tanto domésticos como silvestres [123]. La BT fue descrita por primera vez en Sudáfrica en la Colonia del Cabo, tras la introducción de ovejas procedentes de Europa [124] y actualmente está incluida dentro de la lista de enfermedades de la declaración obligatoria de la OIE.

El rango de hospedadores es muy amplio (ovinos, caprinos, bovinos, cérvidos y otros artiodáctilos salvajes) pero el ganado ovino es el más susceptible a desarrollar la enfermedad, pudiéndose alcanzar altas tasas de morbilidad y mortalidad. Se han detectado diferentes especies de rumiantes salvajes seropositivos, como el gamo [125], el antílope [126] y diferentes especies de gacelas [127], en las que la infección es generalmente subclínica [128]. BT también aparece en animales no rumiantes como carnívoros africanos (leones, hienas, chacales, etc...), cuya infección es probablemente debida a la ingesta de animales infectados [129].

La principal vía de transmisión de BTV es a través de la picadura de insectos del género *Culicoides*, [130] y, en consecuencia, los focos dependen de la coexistencia del vector con animales susceptibles a la enfermedad. Existen más de 1400 especies de *Culicoides* [131] pero solamente 30 son considerados vectores competentes en la

transmisión de BTV [132]. Los *Culicoides* habitan en áreas cálidas, húmedas y fangosas y debido al cambio climático se ha prolongado el periodo de transmisión de BTV. La aparición de la enfermedad generalmente coincide con un incremento de la actividad del vector durante los periodos de temperatura alta y lluvias y una remisión con la primera helada o condiciones de frío intenso. Otras vías de transmisión son la vía transplacentaria, como ocurre en el caso del serotipo 8 de BTV en ovejas [133] y ganado vacuno [134], así como a través del semen [135], aunque estos datos son de escasa importancia epidemiológica. Hay pocas evidencias al respecto y no está claro si la transmisión requiere contacto directo o indirecto, aunque recientes estudios realizados con los serotipos 26 y 27 de BTV demuestran una transmisión mediante contacto directo [136, 137]. El virus no se transmite a través de la lana, la carne, la leche y sus derivados.

Tras la picadura de un *Culicoides* infectado, el virus replica inicialmente en la piel [138] y viaja a través de la linfa hacia los nódulos linfáticos locales, donde infecta células dendríticas, macrófagos y linfocitos [139, 140]. Después el virus se disemina a numerosos tejidos y órganos, replicando fundamentalmente en el bazo, los ganglios linfáticos y el pulmón [128, 141]. El cuadro clínico tras la infección de los animales consiste en una viremia detectable a los 3 o 4 días, apareciendo los primeros signos después de un periodo de incubación de entre 7 y 10 días. El primer signo que se observa es la fiebre y se completa con depresión, emaciación y degeneración muscular [142]. Entre los síntomas más característicos destaca la aparición de edemas subcutáneos en cara, párpados, orejas y zona ventral del cuello junto a la presencia de descarga nasal, hipersalivación, inflamación y úlceras en la mucosa oral y lengua cianótica [143-145].

Actualmente existen 27 serotipos de BTV reconocidos y distribuidos en todos los continentes, con la excepción de la Antártida [146, 147]. La distribución global de los serotipos de BTV está en constante cambio y con gran frecuencia se producen nuevas incursiones. La enfermedad es endémica en áreas tropicales y templadas de la mayor parte del mundo, donde el clima favorece la supervivencia del vector. El panorama actual de la Unión Europea muestra la presencia de los serotipos 1, 2, 3, 4, 8 y 16 y en España los serotipos circulantes actualmente son el 1 y el 4 [148].

### 3.1. Virus de la lengua azul

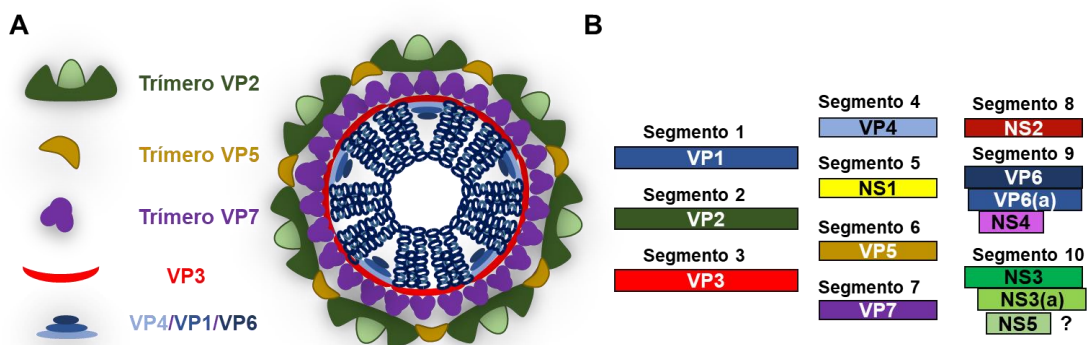
#### 3.1.1. Clasificación taxonómica

BTV se clasifica dentro del Orden de los *Reoviridales*, familia *Reoviridae* y es el prototipo del género *Orbivirus* [149]. Dentro de la familia *Reoviridae* se encuentran patógenos de un amplio espectro de hospedadores, como insectos, reptiles, peces,

crustáceos, mamíferos, plantas y hongos, entre los que se incluyen varios patógenos humanos como los rotavirus y veterinarios como los orbivirus. La familia *Reoviridae* está compuesta por 15 géneros de los cuales los géneros *Coltivirus*, *Fijivirus*, *Orbivirus*, *Oryzavirus* y *Phytoreovirus* son transmitidos por insectos, mientras que los otros géneros se propagan principalmente por vía fecal-oral [150].

### 3.1.2. Composición y organización genómica

BTV es un virus sin envuelta y compuesto por 10 segmentos lineales de ARNcd. Los 10 segmentos están empaquetados dentro de una triple capa proteica de simetría icosaédrica [151]. La capa externa del virión está formada por dos proteínas estructurales, VP2 y VP5 [152]. La capa intermedia está compuesta por la proteína estructural VP7 y la capa interna constituida por la VP3 que envuelve el core interno compuesto por las proteínas involucradas en la transcripción y replicación del virus, siendo éstas, VP1, VP4 y VP6. Además, BTV codifica cinco proteínas no estructurales (NS1-NS5) (Figura 7).



**Figura 7. (A) Representación esquemática de una partícula de BTV. (B) Representación esquemática de la organización genómica de BTV. El genoma de BTV contiene 10 segmentos de ARNcd que codifican 14 proteínas.**

### 3.1.3. Ciclo viral

El ciclo viral se inicia con la interacción de la proteína VP2 con el ácido siálico en la superficie celular, provocando la internalización del virión mediante endocitosis mediada por vesículas revestidas de clatrina [153]. La VP2 se disocia de la cápsida externa y la acidificación induce la fusión de VP5 con la membrana del endosoma [154], liberando el core transcripcional al citoplasma de la célula, donde el virus replica. El complejo de VP1, VP4 y VP6 actúa como la maquinaria de transcripción viral [151] y la traducción de

las proteínas virales se realiza aprovechando la maquinaria de la célula hospedadora. A continuación, en los cuerpos de inclusión se produce la encapsidación de los segmentos dentro de la envoltura que forma la VP3, interviniendo las proteínas NS2 y NS1. La partícula ensamblada abandona los cuerpos de inclusión y a través del tráfico de vesículas exocíticas, mediante la interacción con la proteína NS3, se unen las proteínas VP2 y VP5, formando la cápsida externa. La salida de los viriones al exterior de la célula tiene lugar por la desestabilización de la membrana gracias a la actividad viroporina de la NS3, [155] o por gemación [156].

### 3.1.4. Proteínas estructurales de BTV

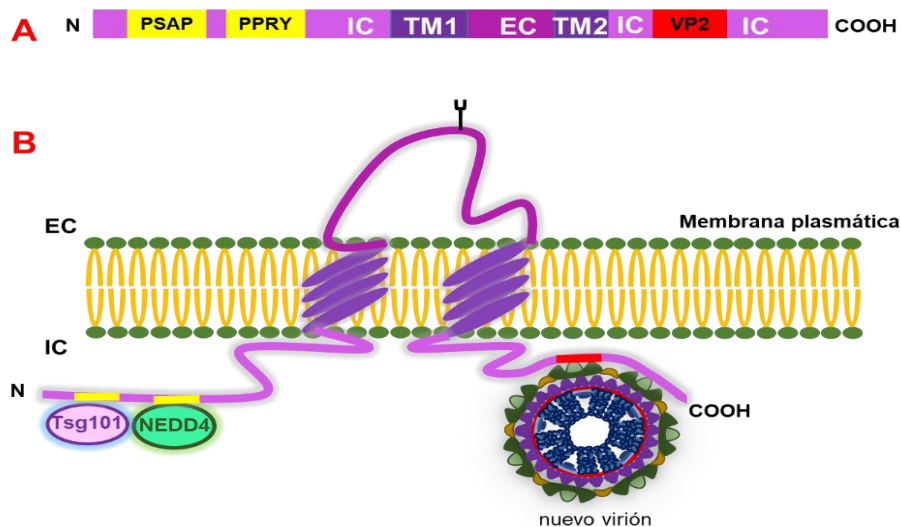
La proteína VP2 es la proteína mayoritaria de la capa externa del virión [157] y la más variable entre las proteínas de BTV, siendo el determinante principal de serotipo [158]. Esta proteína es responsable de la unión al receptor situado en la superficie celular y de hemaglutinación y, es la principal diana para los anticuerpos neutralizantes [159]. También participa en la liberación de los viriones de células infectadas, ya que interacciona con la proteína NS3 y colocaliza con ella en el aparato de Golgi, en las vesículas exocíticas y en la membrana plasmática [160]. El Segmento 6 codifica la proteína VP5 que, junto con la VP2 forma los motivos globulares de la capa externa del virión [157]. VP5 actúa como una proteína de penetración de membranas que media la liberación de las partículas virales del endosoma al citoplasma. VP3 y VP7 son proteínas más conservadas que las descritas previamente y forman la parte estructural del core del virión y expresan en su estructura primaria determinantes antigénicos específicos de grupo [161, 162]. Otras proteínas estructurales son VP1, VP4 y VP6 que forman el complejo de transcripción. VP1 actúa como la replicasa que sintetiza ARNdc a partir de ARN de cadena positiva, VP4 cataliza todas las reacciones necesarias para generar el cap [163] y VP6 tiene actividad de unión a ATP, actividad helicasa [164] y actividad ATPasa RNA dependiente.

### 3.1.5. Proteínas no estructurales de BTV

Las proteínas no estructurales se encuentran altamente conservadas entre serotipos. La proteína NS1 forma túbulos intracelulares, posiblemente causantes del efecto citopático de BTV y favorece la traducción de las proteínas virales [165]. NS2 es el principal componente de los cuerpos de inclusión viral [166], se une a ARNcs viral [167] y está involucrada en el ensamblaje viral [168]. NS3 es una proteína de membrana con dos dominios transmembrana, un dominio N-terminal largo y un dominio C-terminal más corto que se encuentran en el citoplasma, y un dominio extracelular con un sitio de



glicosilación (residuo Asparagina 150) [160]. En el extremo N-terminal presenta dos dominios denominados “late-domains”: el dominio PSAP que interacciona directamente con el gen 101 de susceptibilidad tumoral (Tsg101) y el dominio PPRY que interacciona con una E3 ubiquitin ligasa (NEDD4, *neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4*), implicados en la liberación del virión por gemación [156] (Figura 8). Estos dominios están muy conservados entre serotipos [169]. En el extremo C-terminal existe una región comprendida entre los aminoácidos (aa) 196-202 implicada en la unión a VP2 [156]. Con estas propiedades, la proteína NS3 es esencial para el tráfico de los viriones y su liberación. Además, se ha demostrado que inhibe la inducción del IFN, aunque el mecanismo no está descrito claramente [170]. Existe una isoforma de NS3 llamada NS3A que se codifica a partir de la transducción de un ORF alternativo solapante, situado en la posición 14, con unos niveles de expresión más altos en células de insecto que en las de mamífero [171]. El papel de esta proteína no está totalmente claro, aunque se conoce que no es necesaria para la replicación del virus.



**Figura 8. Representación esquemática de la proteína NS3 de BTV. (A) Esquema lineal de la proteína. (B) Estructura de la proteína NS3.** Presenta un dominio N-terminal intracelular (IC) con los dominios PSAP y PPRY (amarillo), dos dominios transmembrana (TM) separados por un dominio extracelular (EC) con un residuo de glicosilación y un dominio C-terminal IC con la región involucrada en la unión de VP2 (rojo).

NS4 es una proteína pequeña de entre 77 y 79 aa, muy conservada entre los diferentes serotipos, presentando una región de 11 aa en su extremo N-terminal implicada en el tráfico nuclear de la proteína [172]. NS4 está localizada en el nucleolo y es necesaria para la replicación viral y para contrarrestar la respuesta inmune innata del hospedador [173]. Recientemente se ha identificado un nuevo ORF en el segmento 10

de BTV, que codifica una posible proteína funcional (NS5) localizada en el núcleo y que parece no ser necesaria para la replicación del virus [174].

### 3.1.6. Modulación de la respuesta inmune por BTV

La respuesta inmune frente a BTV se caracteriza por la inducción de una respuesta humoral, anticuerpos neutralizantes, y una respuesta celular en animales infectados. A pesar de ello, los animales infectados con BTV pueden mantener la viremia durante largos periodos de tiempo, lo que indica que BTV puede modular la respuesta inmune y crear un estado de pseudo-persistencia [175]. En nuestro grupo hemos descrito que una infección por BTV induce una inmunosupresión aguda en el hospedador, al infectar y destruir las células dendríticas foliculares e impedir la capacidad de inducción de anticuerpos de los centros germinales de los folículos secundarios, donde las células B se diferencian en células memoria o células plasmáticas productoras de anticuerpos, provocando un retardo en la producción de anticuerpos de alta afinidad y en la neutralización del virus. La inmunosupresión inducida por BTV está asociada con la virulencia del virus y la clínica de la infección [140].

Tras la infección con BTV se detecta una fuerte inducción del IFN tipo I en muchos modelos *in vivo* e *in vitro* [176-178]. Dicha producción del IFN en respuesta a la infección de BTV se origina a través de diferentes vías, dependiendo del tipo celular. Así, en células no hematopoyéticas se induce IFN a partir de la ruta de los RLR, sobreexpresando los receptores citoplasmáticos RIG-I y MDA5 [179, 180]. En cambio las células dendríticas plasmacitoides inducen IFN mediante el adaptador MyD88, independientemente de TLR7/8 [180]. A pesar de ello, se ha demostrado que BTV es capaz de inhibir la inducción del IFN tipo I mediante la interferencia de la proteína NS3 de BTV con algún factor involucrado en la ruta de inducción del IFN. Se conoce que la diana de NS3 debe de estar entre el sensor citoplasmático RIG-I y las quinasas TBK-I/IKK- $\epsilon$  [170]. También se ha demostrado una interacción de la proteína NS4 de BTV con la ruta de inducción, aunque no se conoce el mecanismo [173].

El efecto de la infección por BTV en la ruta de señalización del IFN tipo I no está totalmente caracterizado. Tan solo se conoce su implicación en el bloqueo de la fosforilación de STAT1, evitando su traslocación al núcleo [181], desconociéndose la proteína involucrada en esa interferencia. El efecto de BTV en la señalización del IFN tipo II no se conoce todavía.

# **Objetivos**

**“El experimentador que no sabe lo que está buscando, no comprenderá lo que encuentra”**

*Claude Bernard (1813 – 1878)*

Los objetivos de esta Tesis Doctoral son:

1. Caracterizar el efecto de un aislado virulento y una cepa vacunal de PPRV sobre la respuesta al IFN.
2. Determinar el papel de las proteínas P, C, V y W de PPRV en la inducción y respuesta al IFN.
3. Identificar las proteínas de BTV implicadas en la interferencia a la respuesta al IFN.
4. Establecer un posible mecanismo de evasión de la respuesta al IFN por BTV.

# **Materiales y Métodos**

**“Vivir es enfrentar un problema tras otro. La forma en que lo encaras hace  
la diferencia”**

*Benjamin Franklin (1706-1790)*



## 1. Animales

En los experimentos descritos en esta Tesis, se han utilizado ovejas hembra de la raza “Colmenareña” procedentes de una explotación de propiedad particular en la Comunidad Autónoma de Madrid, de 1-2 años de edad, clínicamente sanas y libre de anticuerpos frente a BTV y PPRV.

Todos los animales se mantuvieron al menos una semana en el animalario de nivel de bioseguridad 3 (BSL3) del Centro de Investigación en Sanidad Animal (C.I.S.A), INIA, Madrid, antes de ser manipulados, para permitir su aclimatación.

Los experimentos con animales vivos llevado a cabo en esta Tesis Doctoral cumplieron la normativa de la Comunidad Europea y fueron aprobados en las revisiones del Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) (Número de Permiso: 10/142792.9/12) del INIA y la “Comisión de ética estatal de bienestar animal” (Número de Permiso: CBS2012/06 y PROEX 228/14)

## 2. Células eucariotas

En el desarrollo de esta tesis doctoral se utilizaron 6 líneas celulares establecidas:

- HEK-293T (*Human embryonic kidney 293T*) (ATCC CRL-1573): línea celular proveniente de células de riñón de embrión humano.
- HEK-293pIFN- $\beta$ -GFP: línea celular cedida por el Dr. R. E. Randall de la Universidad de St. Andrews (Reino Unido).
- Vero (ATCC CCL-81): línea celular a partir de células epiteliales de riñón de mono verde africano adulto (*Cercopithecus aethiops*).
- Vero Dog SLAM (VDS): células Vero que expresan permanentemente el receptor canino de moléculas de señalización de activación de linfocitos (SLAM). Las células fueron cedidas por el Dr. S. Parida del Instituto de Sanidad Animal de Pirbright (Reino Unido).
- BHK-21 (*Baby hamster kidney*) (ATCC CRL-6281): línea celular obtenida a partir de células epiteliales de riñón de hámster (*Mesocricetus auratus*) recién nacido, con morfología de fibroblasto.
- SSC: línea celular obtenida a partir de células de bazo ovino en nuestro laboratorio, inmortalizadas con el antígeno T Largo del virus SV40 (*Simian virus 40*) (cedido por el Dr. F. Wandosell del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”).

Las diferentes líneas celulares se cultivaron a 37°C, con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y con una humedad relativa del 98%, en medio *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM, Gibco), suplementado con 100 U/ml de penicilina /100 µg/ml estreptomina (Sigma-Aldrich), aminoácidos no esenciales (AANE) al 1% de un stock (100X) (Sigma-Aldrich), 2 Mm de glutamina (Sigma-Aldrich) y 1 mM de piruvato sódico (Sigma-Aldrich). A lo largo de esta tesis, a dicho medio se le denominará DMEM completo (DMEMc). Además, el medio DMEMc fue suplementado con un determinado porcentaje de suero fetal bovino (SFB) (Sigma- Aldrich) dependiendo de la línea celular, 10% para HEK-293T y VDS, y 5% para BHK-21, Vero y SSC. A los cultivos celulares de VDS adicionalmente se le añadía 10 mM de HEPES (Sigma-Aldrich) y Zeocina (100 mg/ml).

## 2.1. Congelación de células

Para su almacenamiento, las células de una monocapa confluyente se despegaron de la placa por tratamiento con tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich), se resuspendieron en DMEMc con 5% de SFB y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a temperatura (T<sup>a</sup>) ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en una mezcla de 90% de SFB y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) a una densidad de 10<sup>6</sup> células/ml. Se congelaron en criotubos (Nunc) lentamente a -70°C, almacenándose posteriormente en nitrógeno líquido.

## 2.2. Descongelación de células

Las células contenidas en criotubos almacenados en nitrógeno líquido se descongelaron rápidamente en un baño a 37°C y se transfirieron a tubos de plástico (Falcon) de 15 ml con 10-15 ml de DMEM pre-calentado a 37°C. Se agitaron brevemente y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, a T<sup>a</sup> ambiente. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 2 ml de DMEMc con 10% de SFB para resuspender las células y otros 13 ml de DMEMc con 10% de SFB a la suspensión. Las células en suspensión se distribuyeron en placas de 100 mm de diámetro (p100) (Nunc) y se incubaron en las condiciones ya definidas, hasta alcanzar 100% de confluencia.

## 3. Células procarionas

Para el crecimiento y purificación de los distintos plásmidos empleados se utilizaron bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) químicamente competentes de la cepa One Shot® TOP10 (Thermo Fisher). Estas células fueron crecidas en agitación a 37°C en medio de cultivo Luria Broth (LB) suplementado con 0,01 g/ml de cloruro sódico (NaCl) (Sigma-Aldrich) y 50 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich) o kanamicina (Sigma-Aldrich),



dependiendo del gen de resistencia que porte cada plásmido. Para los cultivos en placa, se añadió Bacto-Agar al 1,5% al medio LB y se suplementó con el/los antibiótico correspondiente/s.

Las células bacterianas fueron conservadas en 30% glicerol en medio LB y mantenidas a -80°C.

### 3.1. Preparación de bacterias competentes

Las bacterias competentes fueron preparadas a partir de la cepa One Shot® TOP10. Para ello, se partió de una única colonia que fue crecida en medio LB líquido, sin antibiótico, a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) entre 0.6 y 0.7. A continuación, el cultivo se mantuvo en hielo durante 30 min y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min, a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el *pellet* celular fue resuspendido en CaCl<sub>2</sub> 0.1 M y se mantuvo en hielo durante 20 min. Después de un segundo paso de centrifugación en las mismas condiciones, el *pellet* resultante se resuspendió en el mismo tampón con 15% de glicerol. Se hicieron alícuotas y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

### 3.2. Transformación bacteriana

Sobre una alícuota de 50 µl de bacterias competentes se añadió ADN plasmídico y se mantuvo en hielo durante 30 min. A continuación, las bacterias fueron sometidas a un choque térmico (45 s a 42°C y 10 min en hielo). Se añadió medio SOC (Thermo Fisher) y se incubaron en agitación (220 rpm) durante 1h, a 37°C. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB-agar suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

## 4. Virus

En el transcurso de este trabajo se utilizaron los siguientes virus:

- ICV'89, un aislado virulento de PPRV obtenido del brote que tuvo lugar en Costa de Marfil en el año 1989, clasificado en el linaje I según el análisis de secuencia basado en el gen N. Cedido por la Dra. C. Batten del Instituto de Sanidad Animal de Pirbright (Reino Unido).
- India/94, un aislado virulento de PPRV obtenido del brote que tuvo lugar en India en el año 1994, clasificado en el linaje IV según el análisis de secuencia basado en el gen N. Cedido por el Dra. G. Libeau (CIRAD-Montpellier, Francia).

- Nigeria/75, la cepa vacunal de PPRV Nigeria 1975/1 clasificada en el linaje II según el análisis de secuencia basado en el gen N. Cedido por la Dra. C. Batten del Instituto de Sanidad Animal de Pirbright (Reino Unido).
- BTV serotipo 8 (Belgium/06) (NET2006/04), virus cedido por el Dr. M. Palmarini de la Universidad de Glasgow (Reino Unido).
- Virus Sendai (SeV) cepa Cantell, virus cedido por el Dr. A. García-Sastre (Facultad de Medicina Mount Sinai, Nueva York, USA).

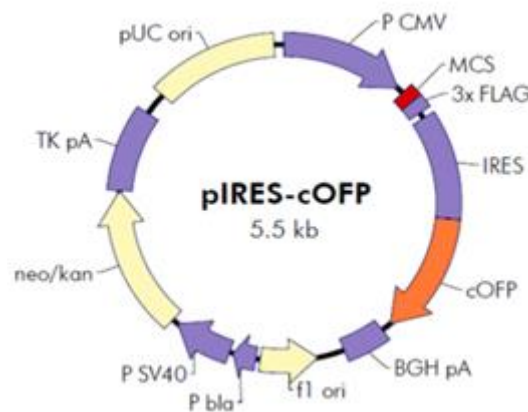
### 5. Plásmidos

Los plásmidos empleados en los diferentes ensayos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

- pNull (Promega), vector de expresión del gen marcador de la luciferasa de Renilla (*Renilla reniformis*) a partir del promotor mínimo TATA box. Este plásmido se ha utilizado para normalizar los valores de la actividad de la luciferasa de luciérnaga, además de como control endógeno y de la eficiencia de transfección.
- pCMV-luc (Addgene), vector de expresión del gen marcador de la luciferasa de Renilla (*Renilla reniformis*) a partir del promotor del citomegalovirus (CMV). Este plásmido se ha utilizado como control endógeno de la actividad transcripcional en células eucariotas infectadas o transfectadas.
- pGL3-luc (Promega), vector de expresión del gen *luc* de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) bajo el promotor temprano del SV40. Este plásmido se ha utilizado como control endógeno de la actividad transcripcional en células eucariotas infectadas o transfectadas.
- pISRE-luc (Clontech), vector de expresión del gen *luc* de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) bajo el promotor de respuesta al IFN tipo I (ISRE), promotor que en la célula permite activar determinados genes en respuesta a la estimulación con IFN tipo I. Este plásmido se ha utilizado para observar el efecto de inhibición de la ruta del IFN tipo I.
- pGL4 (luc2P/GAS/Hygro) (pGAS-luc) (Promega), vector de expresión del gen *luc* de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) bajo el promotor GAS, el cual permite en las células activar los genes en respuesta al IFN- $\gamma$ . Este plásmido se ha utilizado para observar el efecto de inhibición de la ruta del IFN tipo II.
- pIFN- $\beta$ , vector de expresión del gen *luc* de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) controlado por la región promotora completa del gen del IFN- $\beta$  [182] cedido por el Dr. A. García-Sastre (Facultad de Medicina Mount Sinai, Nueva

York, USA). Este plásmido se ha utilizado para observar el efecto de la producción del IFN- $\beta$ .

- Vitality® pIRES-cOFP (Stratagene), vector de expresión en el que el gen de interés queda bajo el control del promotor del CMV y queda fusionado a tres copias del epítipo FLAG® en su extremo carboxilo. Este plásmido contiene el gen que codifica la proteína naranja fluorescente (cOFP), permitiendo su detección por microscopía de fluorescencia (Figura 9). Este vector se ha utilizado para clonar y expresar los genes de interés. Las construcciones obtenidas se encuentran en la Tabla I.



**Figura 9. Representación esquemática del plásmido pIRES-cOFP utilizado para los clonajes**

- pCAGGs, vector de expresión en células de mamífero en el que el gen de interés queda bajo el control del promotor CAG, construido fusionando el promotor amplificador inmediatamente temprano de citomegalovirus (CMV-IE), el promotor del gen de la  $\beta$ -actina de pollo, secuencias del gen de la  $\beta$ -globina de conejo, incluyendo la señal de poliadenilación, así como el origen de replicación del virus SV40 [183]. El gen clonado queda fusionado a un epítipo HA en su extremo carboxilo. Las construcciones obtenidas se encuentran en la Tabla I. Plásmido cedido el Dr. A. García-Sastre (Facultad de Medicina Mount Sinai, Nueva York, USA).
- pEF4/V5-His-B (Thermo Fisher #V92020), vector de expresión en el que el gen de interés queda bajo el control del promotor EF-1 $\alpha$  y queda fusionado a un epítipo V5 y una cola de polihistidina en su extremo carboxilo (Figura 10). Las construcciones obtenidas se encuentran en la Tabla I. Plásmido cedido por el Dr. A. Alejo del CISA-INIA.

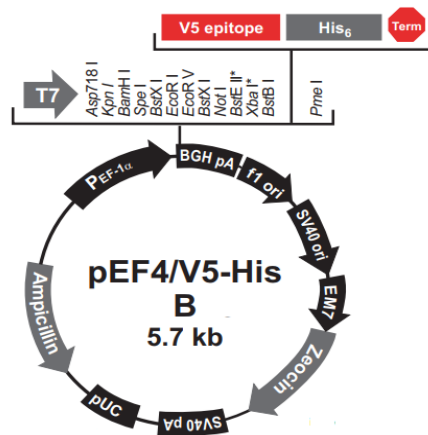


Figura 10. Representación esquemática del plásmido pEF4/V5-His-B utilizado para los clonajes

Tabla II. Serie de construcciones empleadas en el trabajo de Tesis.

Construcción	Vector	Gen	Tag
pIRES-C/ICV'89	pIRES-cOFP	C/ICV'89	FLAG
pIRES-P/ICV'89	pIRES-cOFP	P/ICV'89	FLAG
pIRES-V/ICV'89	pIRES-cOFP	V/ICV'89	FLAG
pIRES-W/ICV'89	pIRES-cOFP	W/ICV'89	FLAG
pIRES-C/Nigeria/75	pIRES-cOFP	C/Nigeria/75	FLAG
pIRES-P/Nigeria/75	pIRES-cOFP	P/Nigeria/75	FLAG
pIRES-V/Nigeria/75	pIRES-cOFP	V/Nigeria/75	FLAG
pIRES-W/Nigeria/75	pIRES-cOFP	W/Nigeria/75	FLAG
pIRES-VP6	pIRES-cOFP	VP6-BTV-8	FLAG
pIRES-VP7	pIRES-cOFP	VP7-BTV-8	FLAG
pIRES-NS1	pIRES-cOFP	NS1-BTV-8	FLAG
pIRES-NS2	pIRES-cOFP	NS2-BTV-8	FLAG
pIRES-NS3	pIRES-cOFP	NS3-BTV-8	FLAG
pIRES-NS4	pIRES-cOFP	NS4-BTV-8	FLAG
pIRES-NS3-K13R	pIRES-cOFP	NS3-BTV-8	FLAG
pIRES-NS3-K15R	pIRES-cOFP	NS3-BTV-8	FLAG
pIRES-NS3-K13/15R	pIRES-cOFP	NS3-BTV-8	FLAG
pIRES-NS3-PPTY/AARH	pIRES-cOFP	NS3-BTV-8	FLAG
pCAGGS-V-NiV*	pCAGGs	V/NiV	HA
pCAGGS-NS5-DenV*	pCAGGs	NS5/DenV	HA
pCAGGS-NS5-WNV*	pCAGGs	NS5/WNV	HA

pCAGGS-UB-K48-only*	pCAGGs	Ubiquitina	HA
pCAGGS-UB-K63-only*	pCAGGs	Ubiquitina	HA
pCAGGS-UB-K63R*	pCAGGs	Ubiquitina	HA
pCAGGS-UB-K48R*	pCAGGs	Ubiquitina	HA
pCAGGS-UB-K33R*	pCAGGs	Ubiquitina	HA
pCAGGS-UB-K29R*	pCAGGs	Ubiquitina	HA
pCAGGS-UB-K27R*	pCAGGs	Ubiquitina	HA
pCAGGS-UB-K11R*	pCAGGs	Ubiquitina	HA
pCAGGS-UB-K6R*	pCAGGs	Ubiquitina	HA
pEF4-JAK1	pEF4	JAK1	V5
pEF4-TYK2	pEF4	TYK2	V5

\*construcciones cedidas por el Dr. A. García-Sastre.

## 6. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en la realización de este trabajo de Tesis para la inmunodetección mediante *Western Blot* (WB), inmunofluorescencia (IF) o citometría de flujo (F), están indicados en la siguiente tabla III:

Tabla III. Anticuerpos empleados

Anticuerpo	Procedencia	Especie	Tipo	Dilución		
				WB	IF	F
<b>Proteínas celulares [clón]</b>						
STAT1	Sigma-aldrich	conejo	Policlonal	1:500	ND	ND
STAT2	Santa Cruz Biotechnology	conejo	Policlonal	1:250	1:250	1:250
GADPH [71.1]	Sigma-aldrich	ratón	Monoclonal	1:3000	ND	ND
pSTAT1 (Tyr 701)	Cell Signaling	conejo	Policlonal	1:1000	1:400	ND
pSTAT1 (Tyr 701)- Alexa 647 [4a]	BD Biosciences	ratón	Monoclonal	ND	ND	1:100
pSTAT2 (Tyr 689)	Millipore	conejo	Policlonal	1:100	ND	ND
pJAK1 (Tyr 1022/1023)	Cell Signaling	conejo	Policlonal	1:1000	ND	ND
pTYK2 (Tyr 1054/1055)	Cell Signaling	conejo	Policlonal	1:1000	ND	ND
<b>Proteínas virales</b>						
VP7-FITC-BTV	VMRD	ratón	Monoclonal	1:10	1:10	1:2.5
N-PPRV	*	ratón	Monoclonal	ND	1:100	ND
<b>Tags</b>						

FLAG	Sigma-aldrich	conejo	Policlonal	1:1000	1:200	1:1000
FLAG [M2]	Sigma-aldrich	ratón	Monoclonal	1:1000	1:200	1:1000
HA [C29F4]	Cell Signaling	conejo	Monoclonal	1:1000	1:200	1:1600
HA [6E2]	Cell Signaling	ratón	Monoclonal	1:1000	1:200	1:1600
V5 [E10/V4RR]	Sigma-aldrich	conejo	Monoclonal	1:1000	ND	ND
<b>Secundarios</b>						
Conejo-IgG-peroxidasa	GE Healthcare	oveja	Policlonal	1:10000	ND	ND
Ratón-IgG-peroxidasa	GE Healthcare	asno	Policlonal	1:10000	ND	ND
Conejo-IgG-Alexa-488	ThermoFisher	cabra	Policlonal	ND	1:400	ND
Ratón-IgG-Alexa-647	ThermoFisher	cabra	Policlonal	ND	1:400	ND

\* Ascites procedente de Maryland Libeau Geneviève Biological Systems Department-CIRAD. Montpellier (Francia).

ND (no definido)

## 7. Amplificación y titulación de virus

### 7.1. PPRV

Para la producción de los diferentes stocks de las cepas de PPRV se sembraron células VDS en placas de 100 o 150 mm de diámetro (p100/p150) (Thermo scientific) y se crecieron a una confluencia de 80%, se realizó la infección con una MOI de 1 PFU/cel en medio *Opti-MEM* sin suero. Tras una hora de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió medio DMEMc suplementado con SFB al 2,5%. Se observó la formación de sincitios a los 2-4 días post-infección (pi) dependiendo de la cepa de PPRV. Se recogieron las células infectadas y tras realizar un tratamiento de congelación y descongelación (3 veces), se sonicó 5 min al 50% en ciclo intermitente en un sonicador (Branson Sonifier 450), se clarificó mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 min, obteniéndose el sobrenadante que contenía el virus. Se tituló y se almacenó en alícuotas a - 80°C hasta su posterior utilización.

Los títulos de los stocks virales fueron determinados mediante ensayos de formación de placa [184]. Brevemente, se infectaron monocapas de células VDS en placas M6 (6 pocillos) a una confluencia del 70-80% con diluciones seriadas desde  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  del virus y control en un volumen de 350  $\mu$ l de DMEMc sin suero. Tras 1 h de adsorción a 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 98 % de humedad, se retiró el inóculo y se añadió medio de plaqueo compuesto por DMEM 2X, agar (0.6%), dextrano (1%), SFB (1%) y glutamina (2%). A los 5 días pi las monocapas fueron fijadas con formaldehído al 2% y teñidas con una solución de cristal violeta al 2% en formaldehído al 2%. El título se determinó mediante conteo de las placas.

## 7.2. BTV

Las infecciones con BTV se realizaron en células BHK-21, con una confluencia del 60-70%, a una MOI de 0.1-0.01 PFU/célula, en un volumen mínimo de *Opti-MEM* sin suero durante 1 h a 37°C, agitándolas cada 15 min. Tras la hora de adsorción se retiró el inóculo de infección y se mantuvieron las células en medio DMEMc con 2.5% de SFB. Se observó efecto citopático a las 48 h post-infección (hpi) y se recogieron las células infectadas. Tras realizar un tratamiento de congelación y descongelación (3 veces), se sonicó 5 min al 50% en ciclo intermitente en un sonicador (Branson Sonifier 450), se clarificó mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 min, y se obtuvo el sobrenadante que contenía el virus. Se tituló y se almacenó en alícuotas a -80°C hasta su posterior utilización.

El plaqueo de BTV se llevó a cabo en células Vero utilizando la misma metodología empleada para PPRV. Tras la hora de adsorción, se añadieron 2 ml de agar semisólido a una concentración final del 0.5 % en medio DMEMc, con 2 % de SFB y al cabo de 5 días se visualizaron las placas virales.

## 7.3. Purificación de virus PPRV por colchón de sacarosa

Para experimentos que requerían una mayor concentración de virus, los sobrenadantes con virus obtenidos a partir de células VDS infectadas con PPRV se sometieron a ultracentrifugación a 30.000 rpm durante 1 h a 4°C en un colchón de sacarosa al 40% en un rotor SW28 (*Beckman-Coulter Inc*). Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido en tampón TNE (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1.5 mM EDTA a pH 7.4). El purificado fue titulado y almacenado a -80°C hasta su posterior utilización. El título obtenido fue de al menos un logaritmo más al de partida.

## 7.4. SeV

Se infectaron cultivos de células HEK-293T y Vero con la cepa Cantel de SeV, dilución 1/100 a partir de un stock previamente titulado por su capacidad de inducir IFN- $\beta$  en medio *Opti-MEM* sin suero. Tras 1 h de adsorción se retiró el inóculo y se añadió medio DMEMc suplementado con 3 % de SFB.

## 8. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos

### 8.1. Ácido ribonucleico (ARN)

#### 8.1.1. Extracción de ARN

A partir de los stocks de virus obtenidos (apartado 7), se extrajo el ARN con Trizol (Sigma Tri Reagent™), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadió una cantidad de Trizol determinada dependiendo del tipo de muestra de partida. Las muestras destinadas a ser usadas en una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo real fueron tratadas con DNasa I (BioLabs New England), siguiendo las instrucciones del fabricante, para eliminar la posible contaminación de ADN. El ARN se eluyó con agua libre de DNasas y RNasas, se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se guardó a -80°C hasta su utilización.

#### 8.1.2. Retrotranscripción del ARN

El ARN se desnaturalizó calentándolo a 70°C durante 3 min, evitando su posterior renaturalización manteniéndolo en hielo. La síntesis de ADNc o retrotranscripción (RT) se realizó utilizando como molde 500 ng de ARN extraído utilizando la enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, el ARN fue añadido a una mezcla de 0.1mM de dNTPs, 100 ng del cebador reverso de cada uno de los fragmentos deseados y se incubó en el termociclador PTC-100 (MJ Research) a 65°C durante 5 min, seguido de 5 min en hielo. A continuación, se añadió una mezcla que contenía el tampón de la enzima 5X First Strand buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 275 nM KCl y 15 mM MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen), 0.1M de ditioneitol (DTT), 10 U de RNAsina (Promega) y 100 U de la polimerasa RT SIII. El programa utilizado en el termociclador fue: 5 min a 65°C, 5 min a 4°C, 1 h a 50°C, 5 min a 70°C, 5 min a 4°C. Las muestras de ADNc fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

#### 8.1.3. RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)

Para la cuantificación de los niveles de ARN de los diferentes genes se realizaron PCRs a tiempo real, utilizando el aparato *Light Cycler 480 System* (Roche). La reacción de PCR se realizó con el kit *LightCycler 480 SYBR Green I Master Reagents* (Roche) junto con primers específicos para los genes seleccionados (Tabla IV), en un volumen final de 10 µl y siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante. Para ello 1.8 µl de ADNc se mezclaron con 5 µl del SYBR Green PCR Core Reagents y 0.6 µl de una mezcla de primers a una concentración final de 0.125 µM cada uno. Para la amplificación, esta mezcla se incubó durante 10 min a 95°C, seguida de 45 ciclos de amplificación (30 s a 95°C y 1 min a 60°C) y un ciclo de disociación (15 s a 95°C y 1 min



a 60°C). Todas las amplificaciones se realizaron por triplicado. Como control negativo de todas las PCRs se incluyó un pocillo conteniendo únicamente mezcla de reacción sin ADNc.

La expresión génica obtenida de cada gen fue normalizada por la expresión de un control endógeno, el gen de la  $\beta$ -actina de oveja o el gen humano de la subunidad 18 del ribosoma en cada muestra. Los resultados se expresaron como  $2^{-\Delta Ct}$  (donde  $\Delta Ct$  es determinada como la diferencia entre el valor de Ct del gen en cuestión y el valor de Ct del gen endógeno).

**Tabla IV. Primers empleados para el estudio por qRT-PCR**

Gen	Primer Forward (5' a 3')	Primer Reverse (5' a 3')	Especie
IFN $\beta$	TCTGGCACAACAGGTAGTAGGC	GAGAAGCACAA CAGGAGAGCAA	Humano
OAS1	GATCTCAGAAATACCCAGCCA	AGCTACCTCGGAAGCACCTT	Humano
ISG15	TCCTGGTGAGGAATAACAAGGG	GTCAGCCAGAACAGGTCGTC	Humano
ISG54	ATGTGCAACCTACTGGCCTAT	TGAGAGTCGGCCCATGTGATA	Humano
MXA	GTGGCTGAGAACAACCTGTG	GGCATCTGGTCACGATCCC	Humano
IFIT1	AGTGTGGGAATAC ACAACCTACT	GGTCACCAGACTC CTCACATT	Humano
IP10	GGAACCTCCAGTCTCAGCACCA	AGACATCTCTTCTCACCTTC	Humano
18S-rRNA	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	Humano
IFN- $\gamma$	CAGAGCCAAATTGTCTCCTTC	ATCCACCGGAATTTGAATCAG	Oveja
Actina B	TGGGCATGGAATCCTG	GGCGCGATGATCTTGAT	Oveja
IFN- $\alpha$	CAGACGATCTCTGTGCTCC	GTGTTTCCTCACAGCCAGG	Oveja
IL-12	CGTGTGGAAGCTGTGCACA	CTTTCCTGGACCTGAACAC	Oveja
IFIT3	GTTGTGCGAGGCTCTGGGAAA	TCCAGTGCCCTTAGCAACAG	Oveja
CXCL10	GCTCATCACCTGAGCTGTT	AGCTGTGAGTAGCAAGGCTG	Oveja
RIG-I	GCCTCAGTTGGTGTGGAGA	GACGTGTCGAGAGAAGCACA	Oveja
N-ICV'89	AGAGTTCAATATGTT ATTAGCATCCAT	TGTCTCCTCTCACTAACCCCTT	Oveja
MXA	GTCCCTGCTAACGTGGACAT	ACCAGGTTTCTCACCACGTC	Oveja
ISG15	GGTATCCGAGCTGAAGCAGTT	ACCTCCCTGCTGTCAAGGT	Oveja
OAS1	TAGGCCTGGAACATCAGGTC	TTTGGTCTGGCTGGATTACC	Oveja

## 8.2. Acido desoxirribonucleico (ADN)

### 8.2.1. Amplificación de fragmentos por PCR

Se amplificaron copias de ADNc mediante PCR. Se diseñaron primers específicos para amplificar fragmentos de nt (Tabla V) de distintos tamaños. Las reacciones se realizaron en un tampón con 0.2 mM dNTPs, 200 ng de cada primer, 2 ng de molde de

ADN, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y tampón de PCR 10X (500 mM Tris-HCl pH 8.9, 220 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 3.5 U de la ADN polimerasa Expand High Fidelity (Roche), en un volumen final de 50 µl. El protocolo de amplificación seguido fue el siguiente: 5 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a la T<sub>m</sub> (temperatura de fusión de los primers) y 30 s por kilobase (kb) a 68°C; 5 min a 68°C, en un termociclador PTC-100 (MJ Research). Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa del 0.5-1% dependiendo del tamaño de ADN a visualizar, en presencia de GelRed (Biotum) para su visualización, con equipo de electroforesis Bio-Rad Power-Pac Basic.

**Tabla V. Primers diseñados para la amplificación de los fragmentos de ADN**

GEN	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<b>PPRV</b>		
C/ ICV'89	GCGCCTGCAGATGTCAACAA GGGACTGGAATGTATC	GCGCGCGGCCGCCATTTTTCGA CATCTGTGGACCTAGCGAAC
P/ ICV'89	GCGCCTGCAGATGGCAGAGG AACAAAGCATACCATGTC	GCGCGCGGCCGCCCGGGTTGCTTGG CAAGAATGGTTGTTAGC
V/ ICV'89	GCGCCTGCAGATGGCAGAGG AACAAAGCATACCATGTC	GTAGTCGCGGCCGCCGGCTGAGTCT GTGATGCTATGGTACCA
W/ ICV'89	GCGCCTGCAGATGGCAGAG GAACAAGCATACCATGTC	GTAGTCGCGGCCGCCGGTAAACTCT GTCGCCGTTCCAGATG
C/ Nigeria/75	GCGCCTGCAGATGTCAACAAGG GACTGGAATGTATC	GCGCGCGGCCGCCATTTTTCGACATCT GTTGACCTAGAGACAT
P/ Nigeria/75	GCGCCTGCAGATGGCAGAGG AACAAAGCATACCATGTCA	GCGCGCGGCCGCCCGGGTGCTT GGCAAGAATGGTTGTTAGCAT
V/ Nigeria/75	GCGCCTGCAGATGGCAGAGG AACAAAGCATACCATGTCA	GTAGTCGCGGCCGCCGGCTGAGTCT GTGATGCTATGGTACCA
W/ Nigeria/75	GCGCCTGCAGATGGCAGAGG AACAAAGCATACCATGTCA	GTAGTCGCGGCCGCCCGTTCCAGATAA GACTGAGTTCCTGCTGTG
W/ Nigeria/75- Mut	ACAGCGTTACCATGTTTATAGC	ACTTGAGAGTTGGATCCTTTATC
<b>BTV</b>		
VP6	CGCGGATCCATGTCAGCTGCGATACTTCTTG	CCCGCGGCCCGCAGAGG TGATCGATCAAATGCAG
VP7	CGCGGATCCATGGACACT ATCGCTGCAAGAG	CCCGCGGCCCGCACACATAGGCGGCGCGTG
NS1	CCAGGATCCATGGAGCGCTTTTTG	ACAGCGGCCGCAAGTCAGTAAC
NS2	CGCGGATCCATGGAG CAAAAGCAACGTAGATTTA	CCCGCGGCCCGCAAACG CCGACCGGCAATATG
NS3	CGCGGATCCATGCTATCCGGGCTGATCC	CCCGCGGCCCGCAGGTTAA TGGCATTTTCAAACCAT
NS4	CGCGGATCCATGGTGAGGGGGCGCAGT	CCCGCGGCCCGCAGAACT GCCATCTTCTCC
NS3 K13R	GAAGAAGAAAGAATGAAACATAATCAAGAC	GAACCTTTGGATCAGCCC

NS3 K15R	GAAAAAATGAGACATAATCAAGACAG	TTCTTCGAACCTTTGGATC
NS3 K13/15R	GAGACATAATCAAGACAGAGTTGAAG	ATTCTTTCTTCTTCGAACCTTTG
NS3 PPTY/AARH	AGGCATGCTCCGAGTGCACCGATG	TGCTGCTTGAGAGATGGTGTCTACACG
<b>Humano</b>		
JAK1	TACCGAGCTCGGATCCATGCAGTATCTA AATATAAAGAGGACTGC	GATATCTGCAGAATTCCCTTTTAAAAGTGCT TCAAATCCTTCAATAAG
TYK2	TACCGAGCTCGGATCCATGCCTCTG CGCCACTGGGGGATGGCCAGG	GATATCTGCAGAATTCCCGCACACGC TGAACACTGAAGGGGCCTGGCC
<b>VECTOR</b>		
pIRES	CGACTCACTATAGGGAG	TCCTTATCATCGTCGTC

## 8.2.2. Reacciones de restricción enzimática

Se utilizaron las enzimas de restricción NotI, BamHI, PstI y EcoRI de New England Biolabs, siguiendo las recomendaciones del proveedor.

## 8.2.3. Reacciones de ligación de fragmentos de ADN

Las ligaciones se realizaron en un volumen final de 10 µl, con los fragmentos (vector e inserto) purificados de gel. Se cuantificó con NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se calculó la cantidad de inserto y vector que se utilizó para realizar la ligación, usando una relación molar 1:3 vector/inserto. Se utilizó el siguiente tampón: 50mM Tris- HCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1mM ATP y 400 U de T4 ADN ligasa (New England Biolabs), y se incubó toda la noche a 16°C.

## 8.2.4. Purificación de ADN

Para la purificación de ADN a partir de cultivos bacterianos a pequeña escala (*Miniprep*) se utilizó el kit comercial *Zippy Plasmid Miniprep kit* (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante. El material obtenido fue utilizado para el análisis de clones por restricción enzimática y secuenciación. Para la purificación de ADN a gran escala (*Maxiprep*) se utilizó el kit comercial *Zippy Plasmid Maxiprep kit* (Zymo Research). El material obtenido fue almacenado a -20°C y utilizado para procesos de clonaje o transfección de células de mamífero.

Para la purificación de fragmentos de ADN obtenidos a partir de geles de agarosa se utilizó el kit comercial QIAquick® Gel Extraction (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. El material obtenido fue utilizado para procesos de clonaje.

## 8.2.5. Transfección de ADN

Para la transfección de ADN en células HEK-293T se utilizó el agente de transfección *TurboFect* (TF) (Thermo Scientific) o alternativamente el agente *TransIT-LT1* (Mirus), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la transfección de ADN en células Vero o SSC se utilizó el agente Lipofectamina 3000 (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante. La mezcla de transfección se realizó en medio *Opti-MEM* (Thermo Fisher) reducido en suero. Esta mezcla se incubó 30 min a temperatura ambiente y se añadió sobre el cultivo celular lentamente gota a gota. En el caso del TF la mezcla se mantuvo 24 h de incubación y transcurrido ese tiempo se sustituyó por DMEMc + 5% de SFB. Cuando se usó Lipofectamina 3000 la mezcla de transfección se retiró a las 4 h de incubación y se suplementó con DMEMc + 5% de SFB.

## 8.3. Generación de plásmidos

### 8.3.1. Plásmidos pIRES-cOFP- (genes de las proteínas C/P/V/W PPRV)

Los fragmentos correspondientes a los genes de las proteínas C (594 nt), P (1529 nt), V (897 nt) y W (693 nt) de las distintas cepas de PPRV fueron obtenidos a partir de una RT-PCR de ARN extraído de células VDS infectadas con las correspondientes cepas de PPRV. Una vez purificados dichos productos de PCR se clonaron en el vector pIRES-cOFP, previamente digerido con las dianas de restricción NotI y PstI, mediante ligación de extremos cohesivos compatibles. Los plásmidos obtenidos fueron secuenciados para comprobar la correcta orientación del inserto y observar los posibles cambios en la secuencia con respecto a una secuencia molde obtenida de *Genbank*. Las secuencias se analizaron con los programas SeqMan® (DNASTAR) y Serial Cloner 2.6.1.

### 8.3.2. Plásmidos pIRES-cOFP- (genes de las proteínas VP6, VP7, NS1, NS2, NS3 y NS4 de BTV)

Los fragmentos correspondientes a los genes de las proteínas VP6 (1005 nt), VP7 (1067 nt), NS1 (1692 nt), NS2 (1084 nt), NS3 (709 nt) y NS4 (339 nt) del serotipo 8 de BTV fueron obtenidos a partir de una RT-PCR de ARN extraído de células BHK-21 infectadas con BTV-8. Los distintos genes purificados de gel se clonaron en el vector pIRES-cOFP, previamente digerido con las dianas de restricción BamHI y PstI, mediante ligación de extremos cohesivos. Los plásmidos obtenidos fueron secuenciados y analizados.

### 8.3.3. Plásmidos pEF4-(JAK1 o TYK2)

Los fragmentos correspondientes a los genes de las proteínas humanas JAK1 (3462 nt) y TYK2 (3564 nt) fueron obtenidos mediante una PCR a partir de los plásmidos pDONR223-JAK1 (Addgene) y pDONR223-TYK2 (Addgene). Una vez purificados, dichas amplificaciones se clonaron en el vector pEF4/V5-His-B, previamente digerido con las dianas de restricción BamHI y EcoRI. El clonaje se realizó con el kit de clonaje In-Fusion Cloning (Takara) independiente de ligación, basado en recombinación, siguiendo el protocolo del fabricante.

### 8.3.4. Mutagénesis dirigida

Para introducir mutaciones puntuales de ADN de doble cadena se utilizó el kit de mutagénesis dirigida *Q5-Site-Directed Mutagénesis* (New England), siguiendo el protocolo del fabricante. Como ADN molde se utilizó un vector plasmídico que contiene el ADN de interés y, como *primers* (Tabla V), dos oligonucleótidos sintéticos que contienen la mutación/es deseada/s, cada uno de ellos complementario a cada una de las hebras de ADN del plásmido.

Los plásmidos que expresan el gen de la proteína W de la cepa Nigeria/75 fue obtenida usando como molde el plásmido pIRES-V/Nigeria/75 por la inserción de un nucleótido de guanina en su región IKKG.

Los mutantes del gen NS3 consisten en la sustitución de los aminoácidos lisina (K) de las posiciones 13 y 15 por arginina (R). También se realizó una sustitución de la región PPTY por AARH. Todos los mutantes fueron obtenidos a partir del molde pIRES-NS3 y secuenciados para la comprobación de la mutación.

### 8.3.5. Secuenciación de ADN

Todas las muestras fueron secuenciadas en el servicio de Secuenciación Sanger de la Unidad de Genómica del Campus de Moncloa de la Universidad Complutense de Madrid.

## 9. Manipulación y Análisis de Proteínas

### 9.1. Extracción de proteínas totales a partir de cultivos celulares

Monocapas de células confluentes en placas M6 se despegaron y se recogieron en tubos eppendorfs previo lavado con PBS. Dependiendo del pellet celular, se añadieron de 2 a 3 volúmenes de buffer de extracción RIPA (0.5% deoxicolato sódico, 0.1 % de SDS, 1% NP40, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl) (Sigma-Aldrich), suplementado

con inhibidores de proteasas (Roche), con EDTA en frío. La mezcla se incubó 30 min a 4°C y a continuación se centrifugó a 14.000 rpm 30 min a 4°C. Los sobrenadantes correspondientes a la fracción soluble se almacenaron a -80°C.

### 9.2. Electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para la resolución electroforética de proteínas se siguió el método de Laemmli [185] de electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida/bisacrilamida al 30% con SDS (SDS-PAGE). Las monocapas celulares fueron lavadas con PBS y recogidas en tampón Laemmli 4X (Bio-Rad) (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.01% azul de bromofenol, 10% glicerol y 5%  $\beta$ -mercaptoetanol), hervidas 5 min a 100 °C, enfriadas 1 min a 4 °C y cargadas en geles de poliacrilamida (acrilamida: bisacrilamida 37,5:1) al 8-15%, según el tamaño de proteína a analizar.

### 9.3. Inmunodetección de proteínas mediante *Western blot*

Las proteínas separadas mediante electroforesis SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.2 o 0.45  $\mu$ m de poro (Bio-Rad), dependiendo del tamaño de la proteína a transferir, durante 30 min a un voltaje constante de 100V en un tampón de transferencia (25 mM Tris, 190 mM glicina, 0.1% SDS y 20% metanol) y el sistema *Transblot SD Semidrycell* (Bio-Rad). Las membranas se lavaron con TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) conteniendo Tween-20 al 0.05% (TBS-T), se bloquearon con leche desnatada al 5% preparada en TBS-T durante 1 h, en agitación y a T<sup>a</sup> ambiente. Posteriormente, se incubaron con la adecuada dilución del anticuerpo primario (Tabla III) específico contra la proteína a detectar, diluido en la misma solución de bloqueo, en agitación a 4°C, durante toda la noche. En el caso de utilizar anticuerpos contra proteínas fosforiladas las incubaciones se llevaron a cabo en TBS con BSA al 5%. Tras 3 lavados con TBS-T de 30 min, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario, diluido en la misma solución de bloqueo, durante 1 h, en agitación y a T<sup>a</sup> ambiente. Nuevamente, se procedió a dar 3 lavados de 10 min con TBS-T. Las bandas inmunoreactivas fueron detectadas por quimioluminiscencia, utilizando el sistema ECL (GE Healthcare) o el reactivo *SuperSignal@West Dura Extenden Duration Substrate* (Thermo Scientific) y películas de auto-radiografía (*Konika Minolta Medical & Graphic, Inc.* o *Kodak Biomax XAR film*).

Cuando se necesitó revelar frente a más de un anticuerpo, tras la incubación con el primario y la detección de la proteína correspondiente, las membranas se incubaron con el tampón *Stripping* (635 mM Tris-HCL a pH 6.8, 2% de SDS y 100 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol) durante 1 h, a 56 °C y en agitación. Tras 3 lavados con TBS-T durante

10 min, se procedió a bloquear la membrana e incubarla con el siguiente anticuerpo de interés.

### 9.4. Ensayo de inmunoprecipitación

Para los experimentos de inmunoprecipitación se sembraron células HEK-293T en placas M6 a una confluencia del 70% y se co-transfectaron los plásmidos de interés con TF. A las 48 horas post-transfección (hpt), las células se lavaron con PBS y se lisaron en 250  $\mu$ l de tampón de inmunoprecipitación (IP) (50 mM Tris-HCL pH 8, 280 mM NaCl y 0.5% NP-40, 0.2 mM EDTA, 2 mM EGTA y 10% glicerol) suplementado con 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM DTT e inhibidores de proteasa, durante 30 min y en hielo. El lisado celular se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 min a 4 °C. Del sobrenadante resultante (250  $\mu$ l), se retiraron 30  $\mu$ l para analizar el lisado total (WCE) y a los 220  $\mu$ l restantes se les añadió 30  $\mu$ l de la resina de afinidad *EZview Red Anti HA Affinity Gel* (Anti HA affinity gel) o *EZview Red Anti FLAG Affinity Gel* (Anti FLAG affinity gel) dependiendo del tag que presente la proteína a inmunoprecipitar. En esta resina de afinidad, el anticuerpo anti-HA o anti-FLAG está unido covalentemente a las partículas de agarosa. Las incubaciones de los extractos proteicos con la resina se realizaron siempre en cámara fría y con agitación orbital durante toda una noche. Finalmente, las muestras se centrifugaron 1 min a 7.000 rpm y el precipitado resultante se lavó 5 veces con 500  $\mu$ l del tampón de IP. Para eluir la proteína inmunoprecipitada, las muestras se resuspendieron en 30  $\mu$ l de tampón Laemli 2x y se calentaron 5 min a 100° C. Finalmente, las muestras correspondientes al extracto total (WCE) y las muestras inmunoprecipitadas se analizaron mediante un gel de electroforesis SDS-PAGE seguido por *Western blot* para determinar la expresión de las distintas proteínas, así como la interacción entre éstas.

### 9.5. Determinación de la concentración de proteínas y análisis densitométricos

La concentración de proteínas fue determinada utilizando los reactivos comerciales BCA (Pierce) o Brad Ford (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó la albúmina de suero bovino (BSA) como estándar, creando una recta patrón midiendo la absorbancia a 562 nm. La concentración de proteínas se calculó extrapolando las densidades ópticas de las muestras en la recta patrón obtenida con las concentraciones conocidas de BSA.

El análisis densitométrico de las bandas de proteínas obtenidas por *Western blot* fue realizado utilizando el programa ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) US National

Institutes of Health). Se utilizó como control endógeno de normalización de la expresión de las proteínas la banda correspondiente a la proteína GADPH.

### 10. Inmunofluorescencia y Microscopía confocal

Las inmunodetecciones se han llevado a cabo sobre células previamente transfectadas o infectadas, y con anticuerpos secundarios marcados con diferentes fluorocromos para permitir la visualización de las proteínas de interés por microscopía de fluorescencia o confocal. Las muestras se analizaron en el departamento de Microscopía Confocal del CISA-INIA con un sistema de Microscopía Confocal LSM 880 de Zeiss y un sistema de Microscopía de fluorescencia AXIO de Zeiss.

Las líneas celulares correspondientes para cada ensayo (HEK-293T o Vero) fueron sembradas sobre cubre objetos en placas M12 (placas de 12 pocillos) a una confluencia del 50-60% y se infectaron con el virus de interés a las MOI indicadas para cada ensayo o se transfectaron con las condiciones concretas de cada ensayo. A los tiempos post-infección o post-transfección especificados, se lavaron las células 3 veces con PBS frío y se fijaron mediante incubación con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 1 h y a T<sup>a</sup> ambiente. Posteriormente, se lavaron las células tres veces con PBS y se permeabilizaron con NP-40 al 0.1% en PBS durante 10 min y a T<sup>a</sup> ambiente. Alternativamente, las células se permeabilizaron con metanol al 100% frío durante 10 min, a -20°C, dependiendo del anticuerpo a utilizar. Tras 3 lavados con PBS, las células se incubaron con una solución de bloqueo comercial *Dako antibody diluent* (tampón Tris-HCL con proteína estabilizante y 0.015 mol/L de azida sódica) durante una hora, a T<sup>a</sup> ambiente y posteriormente, con el anticuerpo primario (Tabla III) diluido en la misma solución de bloqueo durante toda una noche, a 4°C. A continuación, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes, conjugados a los fluorocromos *Alexa 488* ó *647* (Invitrogen) junto con el reactivo de tinción de núcleos 4'-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich) (dilución 1/200) preparados en la solución de bloqueo, durante 1 h en la oscuridad y a T<sup>a</sup> ambiente. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con PBS y se montaron sobre portaobjetos utilizando el reactivo *Prolong Gold antifade reagent* (Invitrogen).

### 11. Ensayos de detección de actividad de la luciferasa

Para los ensayos de detección de la actividad de la luciferasa se utilizó el kit comercial Dual-Glo® Luciferase Assay system (Promega), siguiendo el protocolo comercial.



Brevemente, se colocaron 50  $\mu$ l de cada extracto en una placa opaca de fondo claro de 96 pocillos (Berthold Technologies) y se cuantificó de forma inmediata en el luminómetro (FLUOstar Omega, BMG Labtech), obteniéndose de esta manera la actividad luciferasa de cada lisado expresado como unidades relativas de luciferasa (URL). La actividad del vector de normalización se midió sobre el mismo extracto agregando 25  $\mu$ l del reactivo Stop & Glo. Los resultados se expresaron como el porcentaje de actividad luciferasa (relación LUC *firefly/renilla*).

### **11.1. Detección de la actividad luciferasa inducida por IFN tipo I en células infectadas con PPRV y BTV**

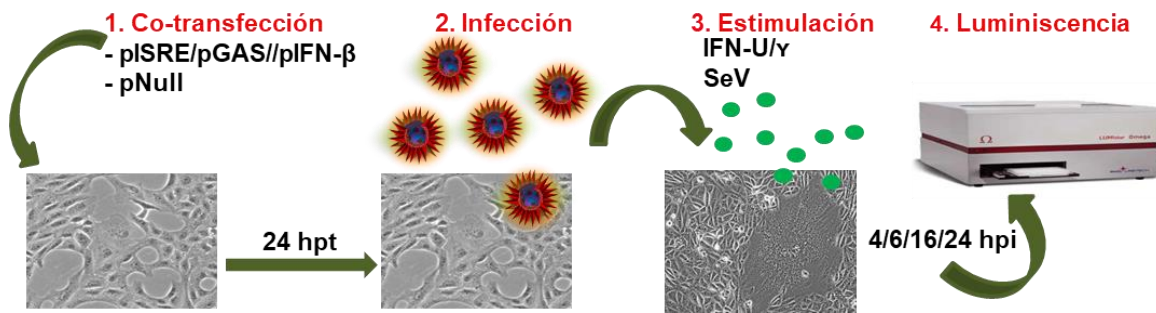
Se sembraron y co-transfectaron células HEK-293T de la forma descrita anteriormente (apartado 8.1.5) con los plásmidos que contenían los genes marcadores, pNull (50 ng/ $\mu$ l) y pSRE-luc (300 ng/ $\mu$ l). A las 24 hpt, las células se infectaron con los aislados de PPRV a una MOI de 1 PFU/cel o alternativamente se infectaron con BTV a una MOI de 1 PFU/cel. Se estimuló con interferón universal (IFN-U) (1000 U/ml) (PBL) tras la infección y a las 8, 16 y 24 hpi se midió la luminiscencia de todos los grupos del ensayo (Figura 11). El ensayo se realizó por triplicado, organizado en grupos control (sin infectar) y expuestos o no a la estimulación del IFN-U.

### **11.2. Detección de la actividad luciferasa inducida por IFN tipo II en células infectadas con PPRV y BTV**

Monocapas de células Vero sembradas en placas de 24 pocillos a una confluencia del 60% se co-transfectaron con los plásmidos pNull (100 ng/ $\mu$ l) y pGL4 (luc2P/GAS/Hygro) (300 ng/ $\mu$ l). A las 24 hpt las células fueron infectadas del mismo modo que en el apartado 11.1. Se estimularon con IFN- $\gamma$  (5 ng/ml) (PBL) tras la infección y a las 4, 16 y 24 hpi se midió la luminiscencia (Figura 11). Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **11.3. Detección de la actividad luciferasa inducida por SeV en células infectadas con PPRV y BTV**

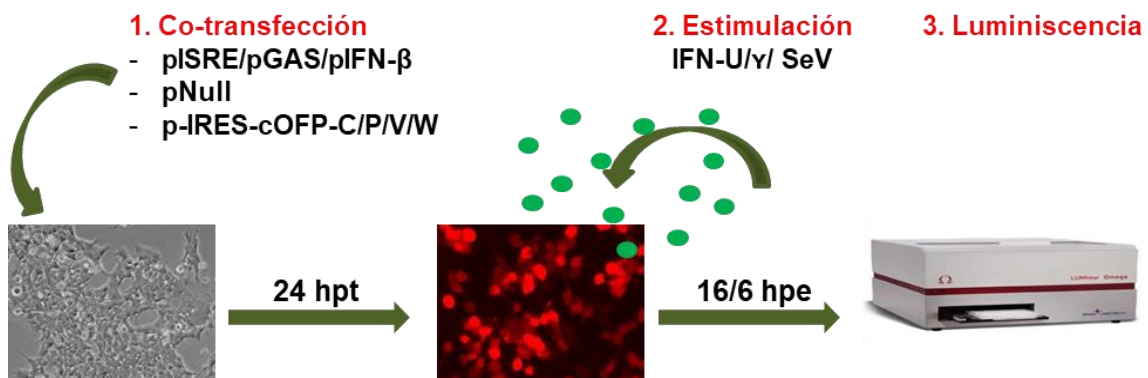
Monocapas de células Vero sembradas en placas de 24 pocillos a una confluencia del 60% se co-transfectaron con los plásmidos pNull (100 ng/ $\mu$ l) y pIFN- $\beta$  (300 ng/ $\mu$ l). A las 24 hpt las células fueron infectadas del mismo modo que en el apartado 11.1. Posteriormente, las células fueron infectadas con SeV (dilución 1/100) y a las 8, 16 y 24 hpi se midió la luminiscencia (Figura 11). Los ensayos se realizaron por triplicado.



**Figura 11. Esquema representativo del ensayo de detección de la actividad luciferasa en una infección con PPRV.** Células VDS (para la inducción del IFN y la señalización del IFN tipo II) o células HEK-293T (para la señalización de IFN tipo I) con una confluencia del 70% fueron co-transfectadas con los plásmidos de interés (1). Tras 24 hpt las células fueron infectadas con PPRV (2). A continuación las células se estimularon con IFN o infectadas con SeV (3), y se midió la luminiscencia a las 4/6, 16 y 24 hpi (4).

## 11.4. Detección de la actividad luciferasa inducida por IFN en células transfectadas con las proteínas de PPRV o BTV.

Se transfectaron células HEK-293T o células Vero con una combinación de tres plásmidos: 50, 300 o 600 ng de los plásmidos que codifican las proteínas de las tres cepas de PPRV o de BTV, o el plásmido vacío (IRES) como control, el plásmido pNull y el plásmido pISRE-luc (para ensayos de señalización del IFN tipo I), el pGL4 (luc2P/GAS/Hygro) (para ensayos de señalización del IFN tipo II) o el pIFN-β (para ensayos de inducción del IFN tipo I). Tras 24 h de transfección, las células se trataron con IFN-U (1000 U/ml) durante 16 h, con IFN-γ (1000 U/ml) durante 6 h o se infectaron con SeV durante 6 h y se midió la luminiscencia (Figura 12). Controles de células sin estimular o infectar se llevaron a cabo en cada caso.



**Figura 12. Esquema representativo del ensayo de detección de la actividad luciferasa en células transfectadas con plásmidos que expresan proteínas virales.** (1) Se co-transfectaron las células HEK-293T (para la señalización de IFN tipo I) o células Vero (para la inducción del IFN y la señalización del IFN tipo II) a una confluencia del 70% con los plásmidos de interés. (2) Tras 24 hpt las células se estimularon con IFN o se infectaron con SeV. (3) A las 16 o 6 horas post-estimulación (hpe) se midió la luminiscencia.

## 12. Citometría de flujo

Se infectaron monocapas de células Vero con BTV a las MOI establecidas para el ensayo. Transcurridas 24 h se levantaron las células con una solución de tripsina/EDTA, se lavaron en tampón de lavado de citometría (PBS + 2 % SFB + 0.04 % azida sódica) y se fijaron durante 15 min con PFA al 4% en PBS. Las células se permeabilizaron con metanol al 100% frío durante 10 min, a -20°C para las preparaciones teñidas con un anticuerpo contra pSTAT1 y se permeabilizaron con saponina para las teñidas contra STAT2.

Los marcajes celulares se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Las células muertas se excluyeron del análisis mediante discriminación por FSC/SSC (tamaño/complejidad). Los datos se analizaron con el software FlowJo (Tree Star, Inc., Oregon, USA).

Con el objetivo de seleccionar las células que expresan la proteína fluorescente OFP, se transfectaron células SSC y Vero con el plásmido pIRES-cOFP-NS3-BTV. Tras 48 hpt las células se estimularon o no con IFN-U durante 30 min, a 37 °C. Las células que expresaban la proteína fluorescente OFP se seleccionaron y separaron mediante el “*sorter*” celular BD FACSAria III. Finalmente, las muestras obtenidas se lisaron y se analizaron mediante un gel de electroforesis SDS-PAGE seguido por *Western blot* incubadas con los anticuerpos de interés como descrito en el apartado 9.3.

## 13. Tratamiento con inhibidores

Monocapas de células HEK-293T fueron transfectadas con el plásmido pIRES-cOFP-NS3-BTV o se dejaron sin transfectar. Tras 24 hpt las células fueron tratadas con los inhibidores del proteasoma MG132 (*Cbz-Leu-Leu-Leucinal*) (Sigma-Aldrich) o Lactacistina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 20 µM durante 12 h. Transcurrido ese tiempo, las células fueron recogidas y se procedió a su análisis mediante un gel de electroforesis SDS-PAGE, seguido de *Western blot*. Alternativamente, las células fueron tratadas a las concentraciones de 0.1, 1, 10 y 50 µM de cloroquina (Sigma-Aldrich) como inhibidor de autofagia. Como control negativo se utilizó células tratadas con DMSO.

### 14. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Para aislar PBMCs de sangre de oveja se partió de un volumen variable de sangre con anticoagulante dependiendo del experimento y se procedió como sigue: se centrifugan las muestras a 3.000 rpm sin freno durante 15 min, a T<sup>a</sup> ambiente; se retira la capa que contiene los leucocitos y se diluye en una proporción 1:2 en PBS-EDTA 0.03%. Las células se ponen en contacto con un colchón de Ficoll-Paque Plus (GH Healthcare, Madrid, España) y se centrifugan durante 25 min, a 3.000 rpm sin freno y a T<sup>a</sup> ambiente. Se recoge la interfase que contiene los PBMCs y se realiza un lavado con PBS-EDTA centrifugando a 1.300 rpm, 15 min y a 4°C. Se lisan los eritrocitos con agua estéril y cloruro sódico al 3.5 % y posteriormente se centrifuga de nuevo para lavar las células. Por último, se procede a contar las células viables tiñendo con azul de tripano.

### 15. Herramientas bioinformáticas

Las herramientas bioinformáticas empleadas durante el proyecto de Tesis fueron:

- SerialCloner: Utilizado para la edición de secuencias y diseño de las estrategias de clonación.
- ImageJ: Utilizado para el análisis de las imágenes de inmunofluorescencia.
- Seqman: Utilizado para el análisis de los cromatogramas de secuenciación.
- BioEdit versión 7.0.5.3: Utilizado para la revisión y alineamiento de las secuencias mediante comparación directa con la secuencia de referencia.
- [www.ubpred.org/](http://www.ubpred.org/): Herramienta de predicción de sitios de ubiquitinación basado en un *Random Forest*.

### 16. Análisis estadísticos

Para todos los parámetros medidos se consideraron los promedios y errores estándar del promedio (SEM) o desviación estándar (DS) como indicado en la leyenda de la figura. Los datos experimentales fueron considerados significativos con  $p < 0.05$  (\*), muy significativos con  $p < 0.01$  (\*\*) y extremadamente significativos con  $p < 0.001$  (\*\*\*). La comparación de múltiples grupos se realizó usando el análisis de varianza ANOVA de dos vías, seguida del post test de Bonferroni, o bien, para análisis comparativo de dos datos, el t test (unpaired). Los análisis y gráficos se realizaron con el software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

# **Resultados**

**“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”**

*Isaac Newton (1643-1727)*

# **Capítulo 1. Mecanismo de inhibición de la respuesta al IFN por PPRV**



En esta Tesis Doctoral se ha estudiado el efecto de la infección de dos cepas de PPRV, una virulenta y otra vacunal, en la respuesta al IFN. Los datos obtenidos muestran que ambas cepas de PPRV inhiben la inducción del IFN tipo I y II. Asimismo, se caracteriza el posible papel de las proteínas de PPRV en la modulación de la respuesta al IFN. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con datos ya publicados y se profundiza en la comprensión de la participación de las proteínas V y C de PPRV como las principales responsables de la inhibición de la inducción del IFN tipo I.

Además, en esta Tesis Doctoral se determina que no solo la proteína V, tal y como lo describen otros autores, es responsable de la inhibición de la respuesta al IFN tipo I y II, sino que también las proteínas P y W están involucradas, revelando la interacción de estas proteínas con factores de la ruta JAK/STAT y las consecuencias en sus formas fosforiladas.

La relevancia de la modulación de la respuesta al IFN por PPRV en infecciones *in vivo* se confirma en los resultados obtenidos tras el análisis de la expresión de distintos ISGs en PBMCs de ovejas infectadas con PPRV.

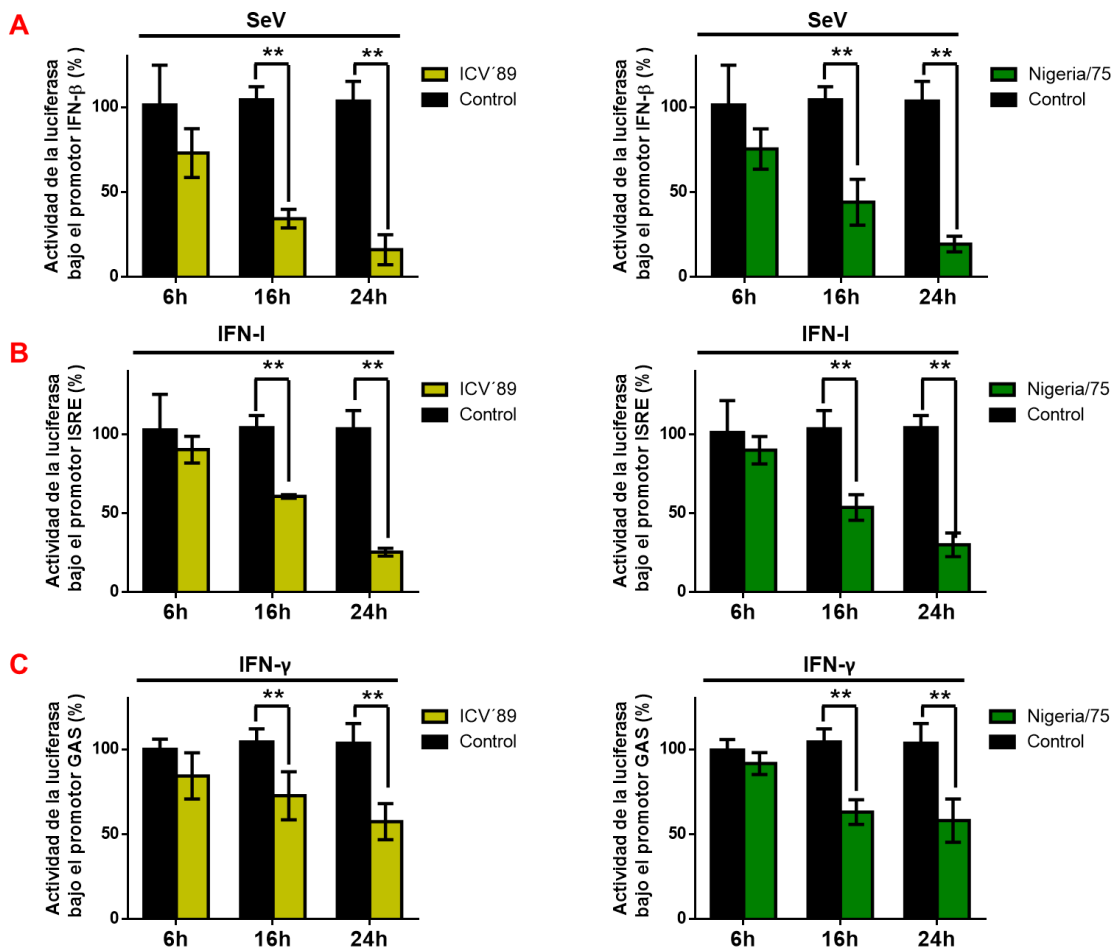
## **1.1. PPRV interfiere con la inducción del IFN tipo I y con la respuesta de los IFNs tipo I y II**

Los paramixovirus, como muchos otros virus han evolucionado para evitar la respuesta al IFN en sus hospedadores. Para determinar si PPRV interfiere con la respuesta al IFN se analizó el efecto de dos cepas de PPRV, una cepa virulenta, la cepa de Costa de Marfil ICV'89 (linaje I) y una cepa vacunal Nigeria/75 (linaje II), en la inducción del IFN tipo I y en la señalización a través de los IFNs tipo I y II.

Para el estudio de la inducción del IFN tipo I se co-transfectaron células VDS con un plásmido de expresión de luciferasa bajo el control del promotor del IFN- $\beta$  y el plásmido pNull, un plásmido de control endógeno que expresa la luciferasa renilla. A las 24 hpt las células se infectaron con las cepas ICV'89 o Nigeria/75 de PPRV a una MOI de 1 PFU/célula, respectivamente. Posteriormente las células se estimularon con SeV y a distintos tiempos pi se midió las actividades de las luciferasas. Ambos aislados producen una inhibición de la expresión de luciferasa bajo el promotor de inducción del IFN- $\beta$  (Figura 1.1. A) desde las 16 hpi, siendo más acusado a las 24 hpi. La inhibición cuantificada a las 24 horas, representa una disminución de casi un 75% en la estimulación comparado con el control.



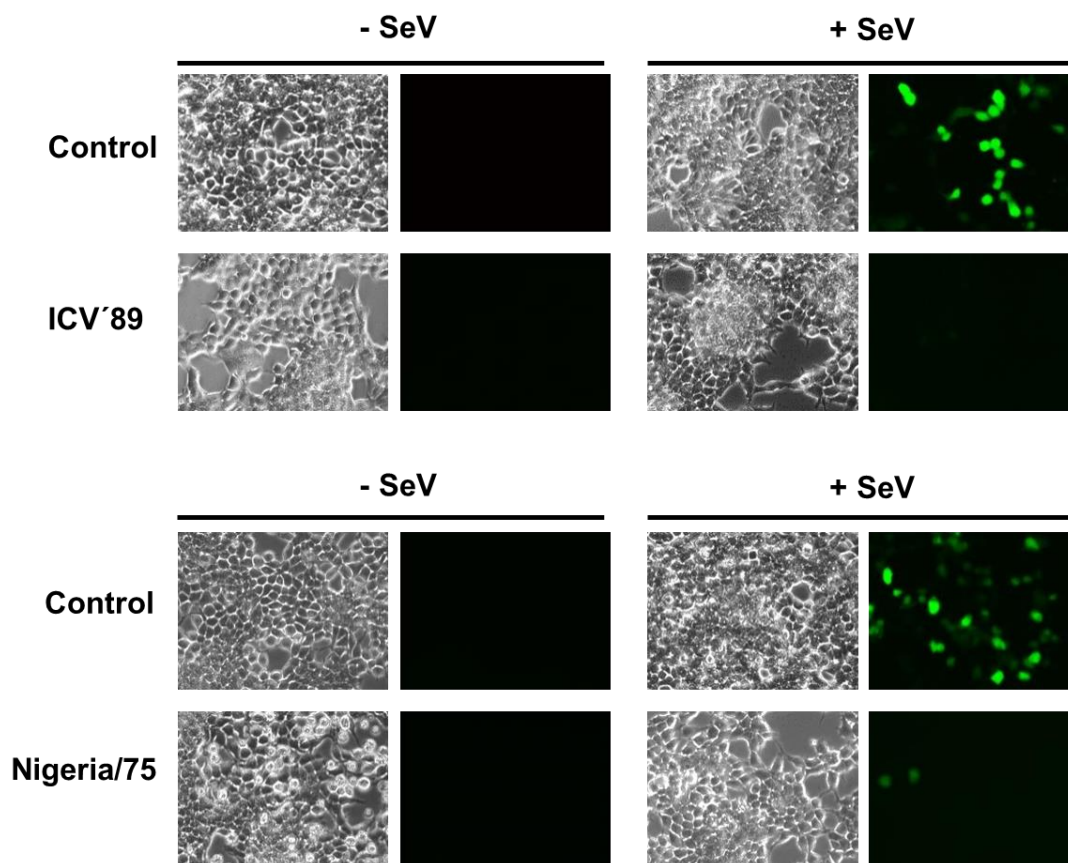
Se estudió también el efecto de la replicación de PPRV sobre la ruta de señalización del IFN tipo I para lo que células HEK-293T se co-transfectaron con pISRE-luc y pNull, infectadas con ambas cepas de PPRV y estimuladas con IFN tipo I. Los resultados indican una inhibición de la actividad luciferasa que comienza a las 16 hpi y es más pronunciada a las 24 hpi (Figura 1.1. B). Asimismo, determinamos la interferencia de PPRV sobre la ruta de señalización del IFN tipo II en células VDS, co-transfectadas con pGAS-luc y pNull, infectadas con ambas cepas de PPRV y estimuladas posteriormente con IFN- $\gamma$ . La inhibición de la expresión de la luciferasa bajo el promotor GAS (Figura 1.1. C) fue leve a las 16 hpi para las dos cepas y a las 24 hpi se observó una disminución de la estimulación de casi la mitad, en comparación con el control.



**Figura 1.1 Efecto de las cepas ICV'89 y Nigeria/75 de PPRV en la inducción de la expresión del gen de la luciferasa a partir del promotor de inducción del IFN- $\beta$  y de los promotores de respuesta a los IFNs tipo I y II. (A y C) Se co-transfectaron células VDS o células HEK-293T (B) con los plásmidos pNull, el plásmido vacío (Control) y el plásmido de inducción del IFN- $\beta$  (A) o el ISRE (B) o el GAS (C) de la manera descrita en Materiales y Métodos. A las 24 hpt, se infectaron las células con ICV'89 (gráficas en amarillo) o Nigeria/75 (gráficas en verde) a una MOI de 1 PFU/célula. Posteriormente, se estimularon las células con SeV (dilución 1/100) (A), con 1000 U/ml de IFN-U (B), con 5 ng/ml de IFN- $\gamma$  (C), respectivamente. Transcurridas 6, 16 y 24 hpi se lisaron las células y se midieron las actividades de la luciferasa y renilla. El ratio de**

estas dos actividades se tomó como actividad relativa de la luciferasa. La representación corresponde al ratio obtenido entre las células estimuladas y no estimuladas, expresado en porcentaje, tomando el resultado de control no infectado como el 100% de estimulación. Los datos se sometieron al test estadístico de varianza ANOVA de dos vías, con una corrección mediante el test de Bonferroni, con un intervalo de confianza de  $P < 0.05$  (\*) y  $P < 0.01$  (\*\*). Las barras de error muestran la desviación estándar (DS) de cada resultado.

Se corroboraron los resultados obtenidos sobre la inducción del IFN con PPRV mediante un ensayo en células HEK-293pIFN-GFP que, al estimular con SeV inducen la expresión del IFN junto con la expresión de una proteína verde fluorescente (GFP). Las células se infectaron tanto con la cepa virulenta de PPRV como con la cepa vacunal y se observó que las células infectadas con PPRV no expresaban GFP en comparación con las células no infectadas (Figura 1.2.) en ningún caso, ni antes de estimular con SeV, ni después, confirmando que PPRV es un mal inductor del IFN. Todos estos datos indican que las cepas ICV'89 y Nigeria/75 de PPRV, a pesar de diferenciarse en cuanto a su virulencia *in vivo*, son capaces de inhibir la inducción al IFN.

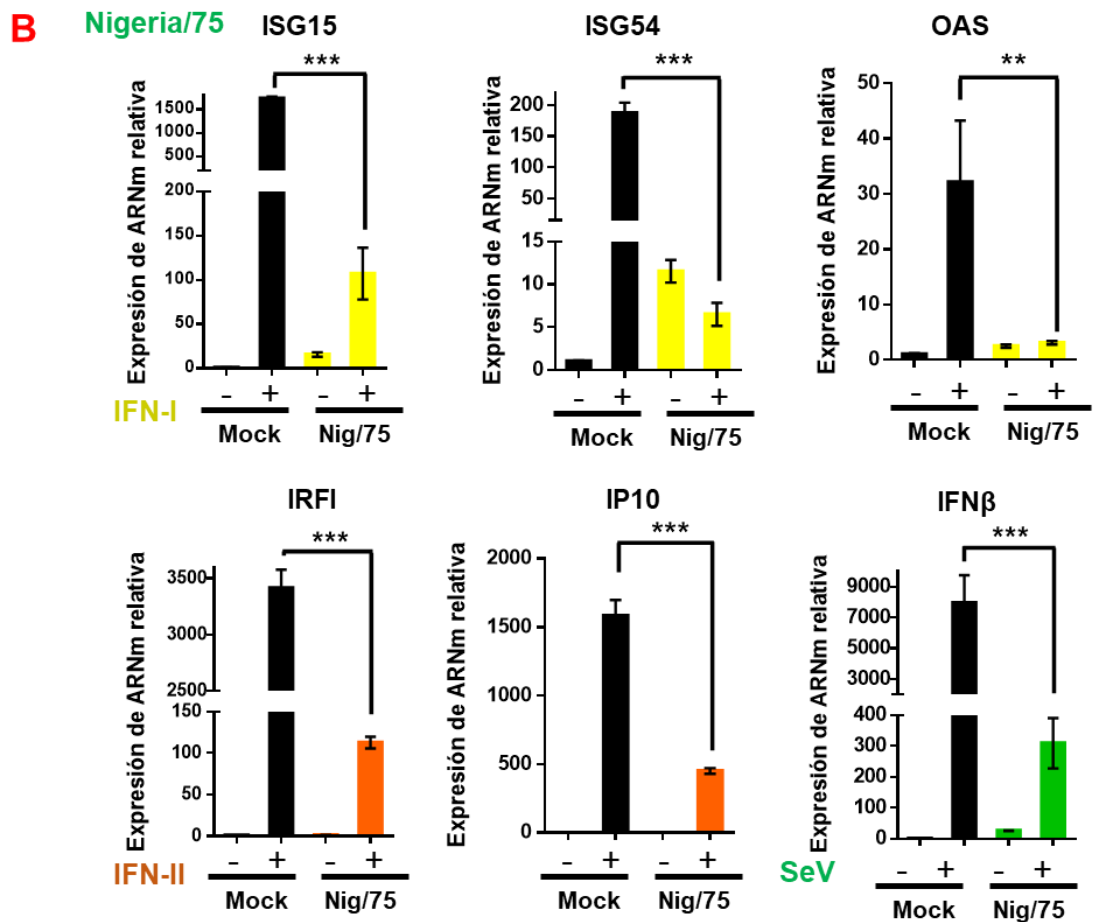
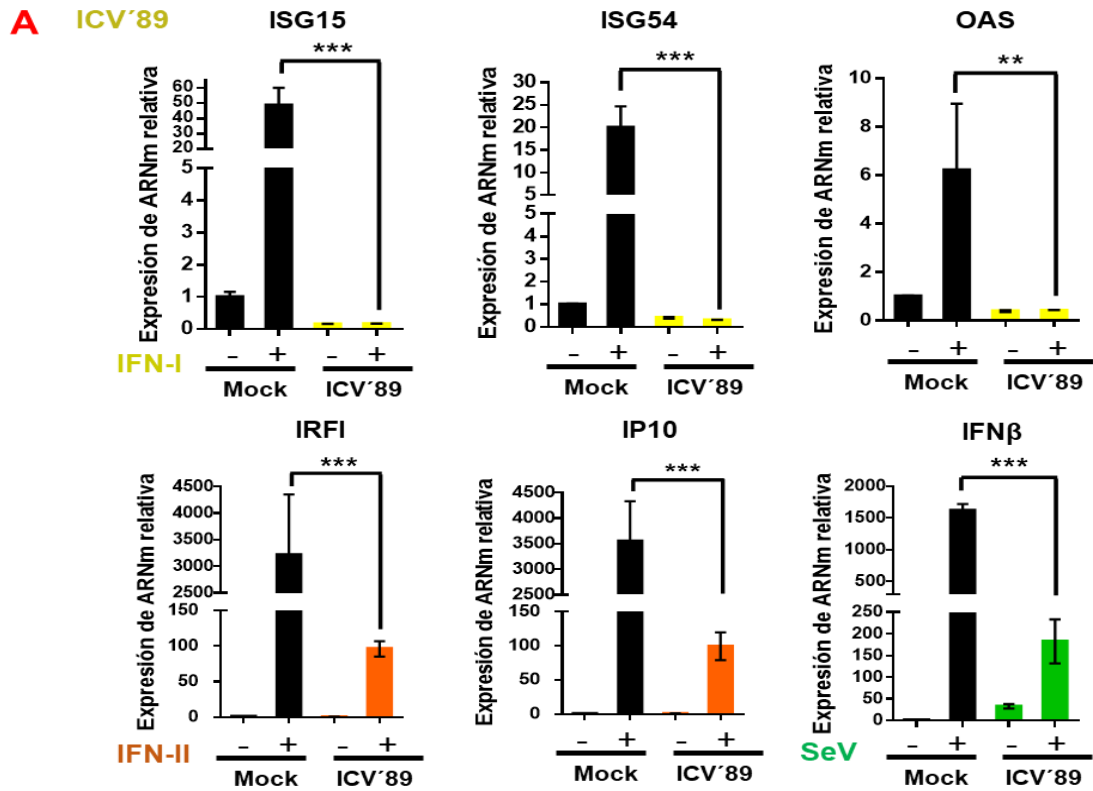


**Figura 1.2. PPRV no induce la expresión del IFN.** Se infectaron células HEK-293pIFN-GFP con ICV'89 o Nigeria/75, respectivamente, a una MOI de 1 PFU/célula. A las 24 hpi se estimularon infectando con SeV (dilución 1/100) y a las 16 hpe se detectó la expresión de GFP mediante microscopía de fluorescencia. Se utilizaron controles sin infectar y sin estimular en cada caso. Las imágenes son una representación de un campo de visualización. Las imágenes se visualizaron con un objetivo 20X

## **1.2. PPRV inhibe la inducción del IFN y de ISGs en células de mamífero y en PBMCs de oveja**

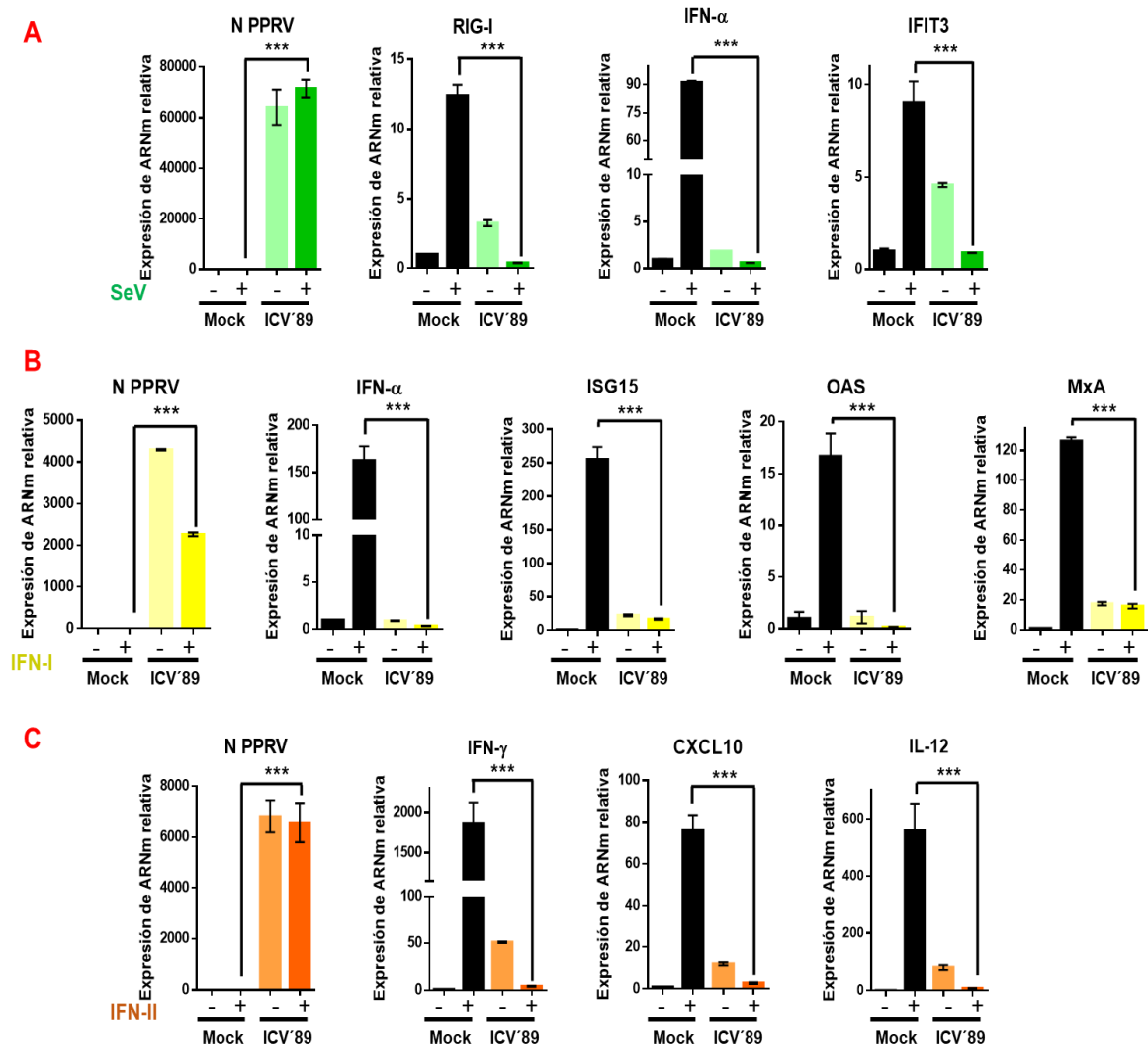
Con el objetivo de determinar si la interferencia observada sobre la producción del IFN por PPRV se manifestaba también en la expresión del IFN en células infectadas por PPRV, se estimularon células HEK-293T con SeV, que induce la expresión del IFN tipo I, y se cuantificó la expresión de ISGs mediante qRT-PCR a 16 hpi. Se comprobó que las células infectadas con ICV'89 expresaban 9 veces menos IFN- $\beta$ , en cambio las infectadas con Nigeria/75 expresaban 26 veces menos, con respecto a las células control (Figura 1.3). Estos resultados indican que la cepa vacunal de PPRV bloquea más eficientemente la ruta de inducción del IFN que la cepa virulenta de PPRV.

El mismo ensayo se realizó para cuantificar la inducción de ISGs en células VDS infectadas con ambas cepas de PPRV. Así, se infectaron células VDS con ICV'89 o Nigeria/75 y a las 16 hpi se estimularon con los IFNs tipo I y II. Tras 24 hpi se analizaron los niveles de expresión de los genes ISG15, ISG54 y OAS en respuesta al IFN-U y los genes IRFI e IP10 en respuesta al IFN- $\gamma$ , mediante qRT-PCR. Se observó que las células infectadas con ICV'89 expresaban 300 veces menos ISG15, 65 veces menos ISG54 y 15 veces menos OAS en comparación con las células control estimuladas con IFN-U (Figura 1.3A). Del mismo modo las células infectadas con Nigeria/75 expresaban 16, 30 y 11 veces menos ISG15, ISG54 y OAS, respectivamente (Figura 1.3B). En el caso de las células infectadas con ICV'89 y estimuladas con IFN- $\gamma$  expresaban 33 y 36 veces menos IRFI e IP10 y las infectadas con Nigeria/75 expresaban 31 y 4 veces menos IRFI e IP10 respectivamente, con respecto a las células control (Figura 1.3). Estos resultados indican que la cepa virulenta inhibe más eficientemente la señalización a través del IFN que la cepa vacunal.



**Figura 1.3. Niveles de expresión de ARNm de ISGs en células de mamífero infectadas con PPRV.** (A) Células VDS (Amarillo y naranja) o HEK-293T (Verde) infectadas con ICV´89 a una MOI de 1 PFU/célula. Tras 16 hpi se estimularon con 1000 U/ml de IFN-U (Amarillo), con 5 ng/ml de IFN- $\gamma$  (Naranja) o con SeV (dilución 1/100) (Verde). Tras 8 hpe (24 hpi) se lisaron las células para extraer el ARN y analizar la transcripción de genes relacionados con la inducción del IFN y la señalización de los IFNs tipo I y II, mediante qRT-PCR. (B) Células VDS (Amarillo y naranja) o HEK-293T (Verde) infectadas con Nigeria/75 a una MOI de 1 PFU/célula, en las que se realizó el mismo ensayo que en el apartado A. Se utilizaron controles sin infectar y sin estimular en cada caso. Los valores obtenidos se normalizaron con la expresión del gen endógeno de la subunidad 18 del ribosoma. Los datos representan la media  $\pm$  la DS de cada experimento por triplicado, representativo de dos experimentos independientes. Los datos se sometieron al test estadístico de varianza ANOVA de dos, con una corrección mediante el test de Bonferroni, con un intervalo de confianza de  $P < 0.01$  (\*\*) y  $P < 0.001$  (\*\*\*)).

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que tanto la cepa vacunal como la cepa virulenta de PPRV se comportan de forma similar. Las dos cepas inhiben tanto la ruta de inducción como la de señalización del IFN, aunque con distintas intensidades. Con objeto de estudiar si esta inhibición tenía lugar en células primarias de oveja, se obtuvieron muestras de sangre con EDTA y a partir de ellas se aislaron los PBMCs (descrito en Materiales y Métodos). Los PBMCs se infectaron con ICV´89 a una MOI de 1 PFU/célula y a las 16 hpi se estimularon con IFN-U, IFN- $\gamma$  o con SeV. A las 24 hpi se aisló el ARN intracelular y se cuantificó mediante qPCR el ARNm de los ISGs. En los PBMCs estimulados con SeV se analizó la expresión de RIG-I, IFN- $\alpha$  e IFIT3 (Figura 1.4 A/Gráficas en verde). En los PBMCs estimulados con IFN-U se cuantificaron IFN- $\alpha$ , ISG15, OAS y MxA. (Figura 1.4B/Gráficas en amarillo). En los PBMCs estimulados con IFN- $\gamma$  se cuantificaron los ISGs: IFN- $\gamma$ , CXCL10 e IL12 (Figura 1.4C/Gráficas en naranja). Además, para determinar que los PBMCs estaban realmente infectados con ICV´89 se amplificó una región conservada del ARNm del gen N de ICV´89.



**Figura 1.4. Niveles de expresión de ARNm de ISGs en PBMCs de oveja infectados con PPRV.** PBMCs infectados con ICV'89 a una MOI de 1 PFU/célula. Tras 16 hpi se estimularon con SeV (dilución 1/100) (Verde) (A), con 1000 U/ml de IFN-U (Amarillo) (B) y con 5 ng/ml de IFN- $\gamma$  (Naranja) (C). Las células se lisaron transcurridas 8 hpe (24 hpi) para extraer el ARN y analizar la transcripción de distintos genes relacionados con la inducción del IFN y la señalización del IFN tipo I y II, mediante qRT-PCR. En cada caso se realizaron controles sin infectar y sin estimular. Los valores obtenidos se normalizaron con la expresión del gen endógeno de actina- $\beta$ . Los datos representan la media  $\pm$  la DS de cada experimento por triplicado, representativo de dos experimentos independientes. Los datos se sometieron al test estadístico de varianza ANOVA de dos vías, con una corrección mediante el test de Bonferroni, con un intervalo de confianza de  $P < 0.001$  (\*\*\*).

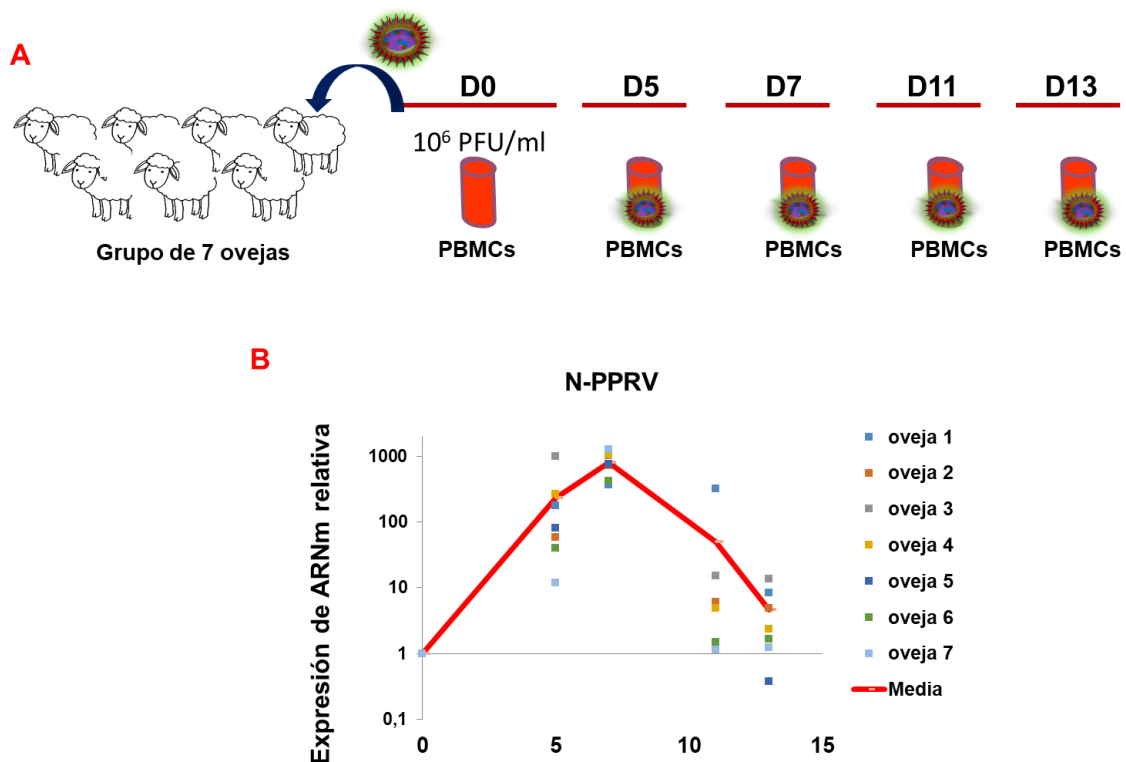
Los PBMCs que estaban infectados con ICV'89 en las tres condiciones de estimulación y además en los PBMCs estimulados con SeV (Figura 1.4A) se observa una disminución de 31, 150 y 10 veces en la expresión de los genes RIG-I, IFN- $\alpha$  e IFIT3, respectivamente. En la estimulación con IFN-U (Figura 1.4B), se observa una disminución de 450, 16, 85 y 8 veces en la expresión de los genes IFN- $\alpha$ , ISG15, OAS y MxA, respectivamente. En los PBMCs estimulados con IFN- $\gamma$  se observa una disminución de 460, 25 y 60 veces en los niveles detectados de ARNm de los genes

IFN- $\gamma$ , CXCL10 e IL12, respectivamente. Estas disminuciones de expresión se producen en comparación con los niveles de expresión de dichos genes en PBMCs no infectados pero estimulados. Estos datos indican que ambas cepas de PPRV son capaces de inhibir la respuesta al IFN en células inmunes del propio hospedador. .

### 1.3. Expresión de ISGs en PBMCs de ovejas infectadas con PPRV

En base a los datos obtenidos anteriormente en los que PPRV reprime la respuesta al IFN en células de mamífero y PBMCs de oveja durante la infección *in vitro*, se determinó la expresión del IFN tipo I y II e ISGs en PBMCs asilados de ovejas infectadas con PPRV. Así, se infectaron 7 individuos por vía intravenosa con  $10^6$  PFU de la cepa virulenta ICV'89 de PPRV. Se recogieron muestras de sangre con EDTA los días 0 (sin infectar), 5, 7, 11 y 13 pi y a partir de ellas se aislaron los PBMCs mediante gradiente de Ficoll (descrito en materiales y métodos). Los animales fueron sacrificados el día 13 pi (Figura 1.5A). Todos los animales infectados desarrollaron signos clínicos (depresión leve, secreciones nasales mucopurulentas moderadas, conjuntivas rojas y falta de apetito) y fiebres ( $40.5^{\circ}\text{C}$ - $41.5^{\circ}\text{C}$ ), entre los días 4-10 pi [186].

Para evaluar la replicación del virus mediante qRT-PCR a partir del ARN total obtenido de los PBMCs, se cuantificaron los niveles de ARNm del gen N de ICV'89, amplificando una zona conservada de la secuencia. Se detectó un pico de viremia en el día 7 pi. La viremia en la mayoría de los individuos desaparece a partir del día 13 pi (Figura 1.5B).

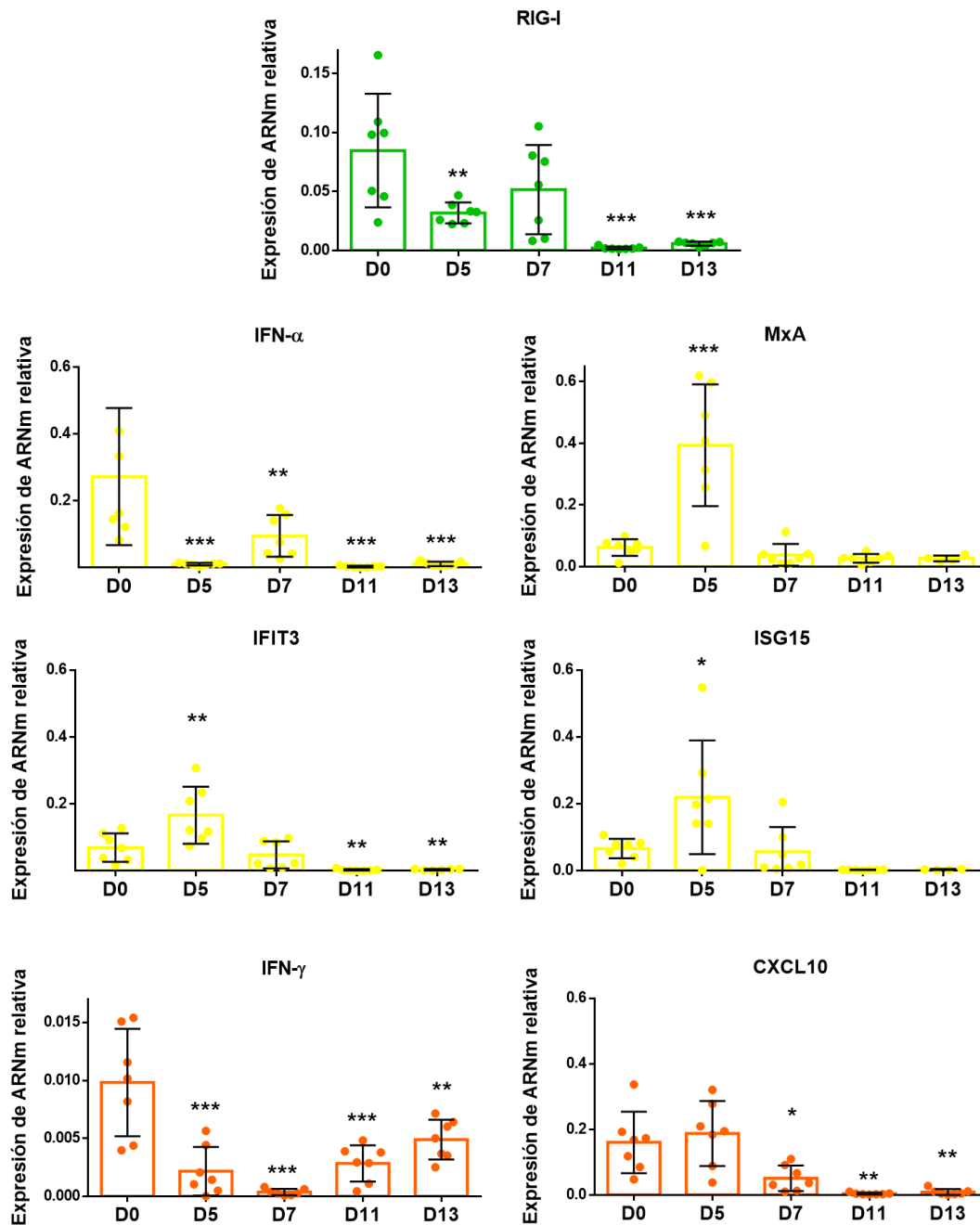


**Figura 1.5. (A) Esquema del protocolo de inoculación y toma de muestras. (B) Carga viral durante la infección por PPRV.** (A) Se inocularon 7 ovejas con 10<sup>6</sup> PFU de ICV'89. Se tomaron muestras los días 0, 5, 7, 11 y 13 pi. (B) A partir de los PBMCs obtenidos de las muestras de sangre de cada oveja se extrajo el ARN total y se realizaron qRT-PCR del ARNm del gen N de ICV'89. Los valores obtenidos para cada oveja se normalizaron con los niveles de ARNm del gen endógeno de actina- $\beta$  del mismo individuo. Se representa la expresión relativa de ARNm del gen N de ICV'89 de cada oveja normalizada con la expresión relativa de ARNm del día 0, del mismo individuo sin infectar.

A partir del ARN total obtenido de los PBMCs de los distintos individuos se cuantificaron los niveles de ARNm correspondientes a la expresión de los ISGs a diferentes tiempos pi en comparación con la expresión basal de dichos ISGs a día 0, antes de la infección. La transcripción del IFN- $\alpha$  sufre una disminución de unas 20 veces a día 5 pi, aumentando levemente a día 7 pi manteniendo sin embargo, una reducción de más de la mitad de la expresión del IFN- $\alpha$  con respecto a día 0. Durante los días 11 y 13 pi la expresión es prácticamente inexistente y comparable a la detectada el día 5 pi. La expresión de RIG-I obtenida tiene un comportamiento similar, reduciendo su expresión a día 5 pi y recuperándose el día 7 pi, pero manteniéndose por debajo de los niveles de día 0 y, a partir del día 11 pi presenta valores muy bajos. La expresión de los genes MxA, ISG15 e IFIT3 presentan una respuesta similar entre ellos, un aumento significativo a día 5 pi, y a partir del día 7 pi, correspondiendo con el pico de viremia, una disminución en su expresión con respecto al día 0. En el caso de la expresión de los genes relacionados con la señalización del IFN tipo II, la expresión del IFN- $\gamma$  se



encuentra reducida significativamente todos los días de toma de muestra, observándose el día 7 pi una disminución de hasta 30 veces, con respecto al día 0. En cambio, la expresión de CXCL10 comienza a reducirse el día 7 pi, siendo significativo los días 11 y 13 pi (Figura 1.6). Estos datos corresponden con una inmunosupresión de la respuesta inmune frente a PPRV en ovejas, y de manera más específica sugieren una inhibición de la expresión de genes relacionados con la respuesta al IFN.

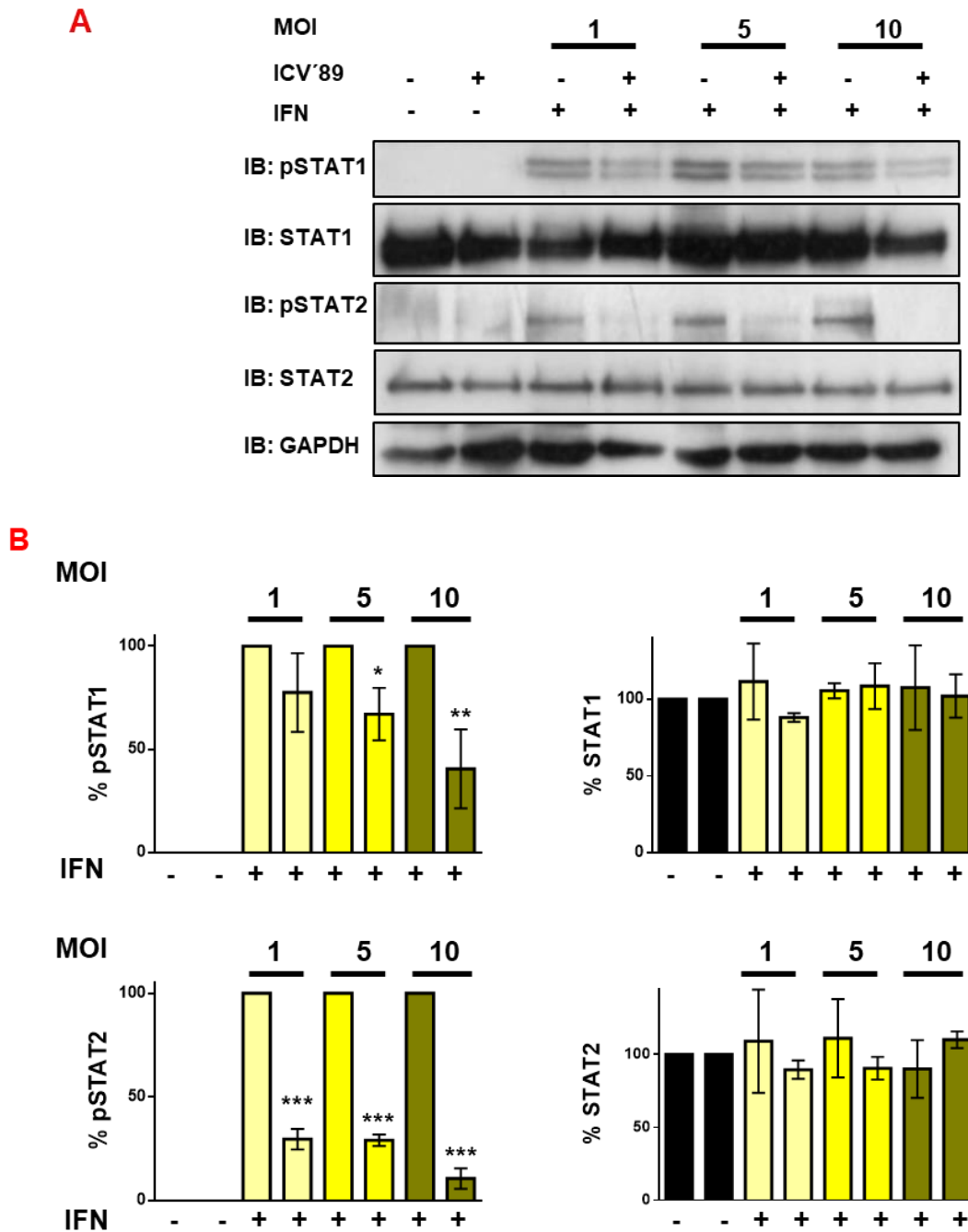


**Figura 1.6. Niveles de expresión de ARNm de ISGs en ovejas infectados con PPRV.** (A) A partir de ARN extraído a partir de PBMCs obtenidos a distintos tiempos pi de sangre de ovejas infectadas con PPRV, se cuantificó mediante qRT-PCR la expresión de genes relacionados con

la inducción del IFN y la señalización del IFN tipo I y II y. Las muestras obtenidas al día 0 se utilizaron como control y la expresión de los ISGs de estos individuos se consideraron como niveles basales de expresión. Los valores obtenidos se normalizaron con los valores de ARNm del gen endógeno de actina- $\beta$  y con los niveles basales de ARNm del día 0, antes de la infección, de cada individuo, respectivamente. Las columnas muestran la media de los datos de los 7 individuos  $\pm$  la DS de cada día de toma de muestra. Los puntos son los valores individuales. Los datos se sometieron al test estadístico de la t-Student;  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) y  $P < 0.001$  (\*\*\*).

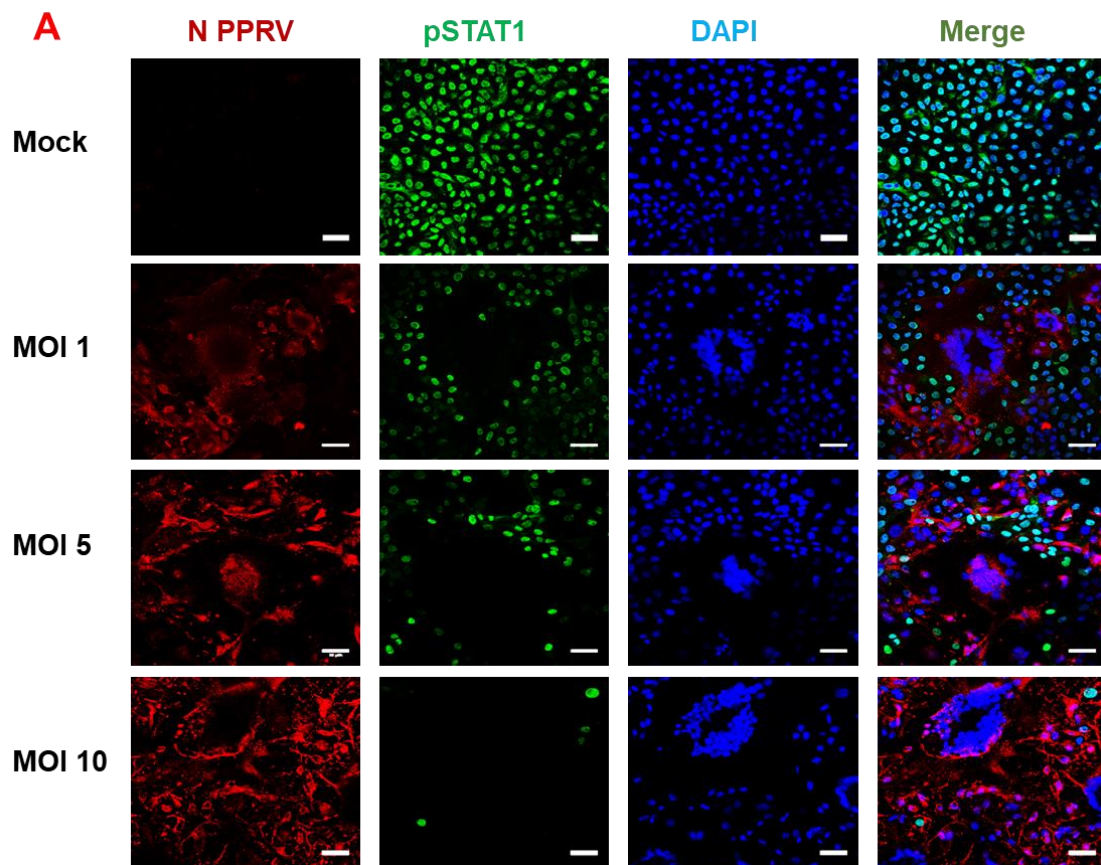
#### **1.4. PPRV inhibe la expresión de las formas fosforiladas de STAT1 y STAT2 y bloquea su traslocación al núcleo.**

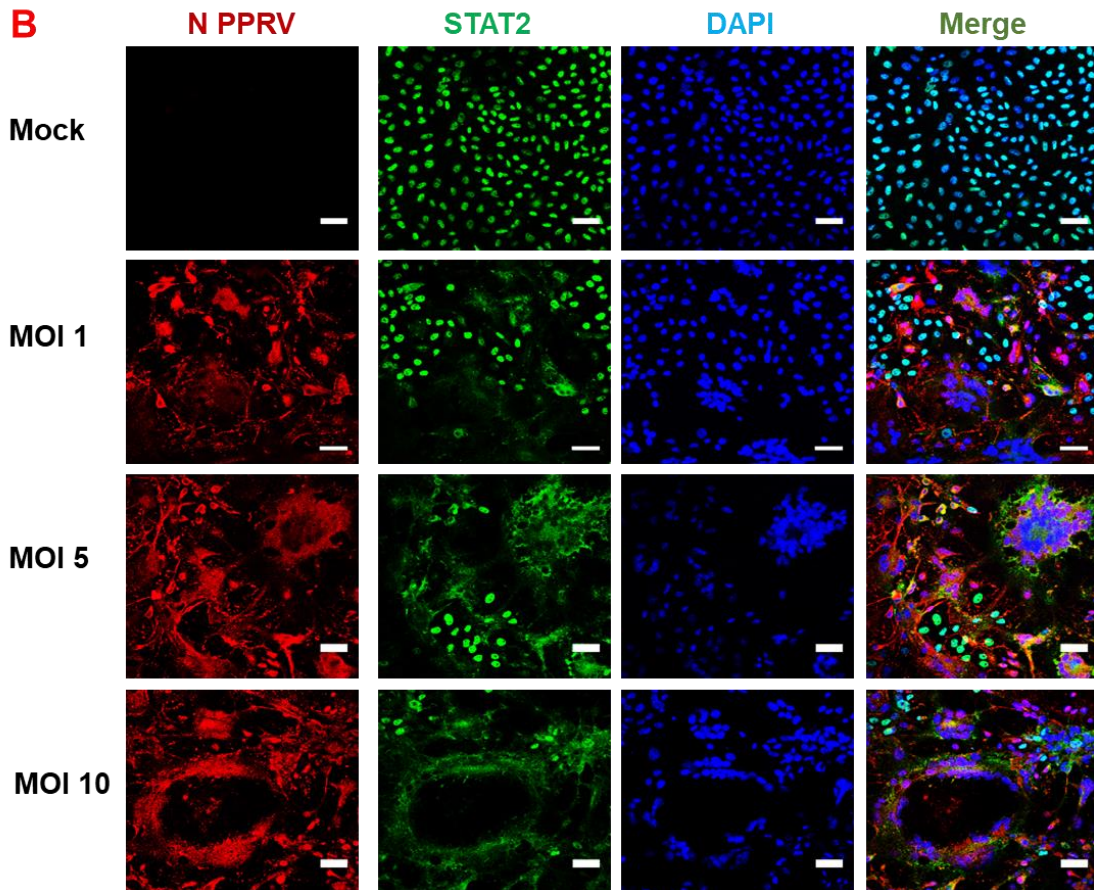
La fosforilación de STAT1 es el paso clave para la activación de la cascada de señalización a través de los IFNs tipo I y II, ya que se necesita fosforilar para formar un heterodímero con STAT2 en el caso de la señalización del IFN tipo I o formar un homodímero en el caso de la señalización del IFN tipo II, y traslocarse al núcleo para activar los promotores de señalización [187]. Muchos virus tienen como diana el bloqueo de la fosforilación de STAT1 y STAT2 como estrategia de evasión del sistema inmune del hospedador. Tras la obtención de los resultados con los ensayos de expresión del gen de la luciferasa, en los que se observó que PPRV inhibía las rutas de señalización del IFN, se planteó estudiar el efecto de PPRV en la fosforilación de STAT1/2 y en su traslocación al núcleo. Para ello, se infectaron células VDS con ICV'89 a diferentes MOI (1, 5 y 10 PFU/célula) y se estimularon con IFN. Los lisados celulares obtenidos se analizaron mediante *Western blot*. Los niveles totales de STAT1 y STAT2 se mantienen constantes en células infectadas con ICV'89, indicando que PPRV no altera estos factores. En cambio los niveles de expresión de los fosforilados disminuyen de forma gradual conforme se aumenta la MOI de infección (Figura 1.7A). Se normalizó la expresión con la de un gen endógeno (GADPH) y se densitómetró la intensidad de las bandas (Figura 1.7B). Estos datos indican que PPRV inhibe parcialmente la expresión de pSTAT1 y pSTAT2.



**Figura 1.7. PPRV disminuye los niveles de pSTAT1 y pSTAT2.** (A) Inmunoblot (IB) de células VDS no infectadas (Mock) o infectadas con ICV'89 a la MOI indicada. Después de 16 hpi las células se trataron con 1000 U/ml de IFN-U durante 30 min, antes de la lisis. Los lisados se analizaron por *Western blot* empleando los anticuerpos pSTAT1, STAT1, pSTAT2, STAT2 y GAPDH. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. (B) Análisis por densitometría de los niveles de proteínas detectados en los IB de pSTAT1, STAT1, pSTAT2, STAT2, normalizados con los niveles de expresión de GAPDH. Los datos representan la media  $\pm$  la DS de tres experimentos independientes. Los datos se sometieron al test estadístico de varianza ANOVA de dos vías, con una corrección del test de Bonferroni, con un intervalo de confianza de  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) y  $P < 0.001$  (\*\*\*).

Las formas fosforiladas de STAT1 y STAT2 se tienen que mover al núcleo para activar los promotores específicos ISRE o GAS [188]. Para estudiar el efecto de PPRV en la traslocación al núcleo de pSTAT1 y pSTAT2 se realizó un ensayo de inmunofluorescencia. Mediante microscopía confocal se observó que las células sin infectar y estimuladas con IFN-U acumulaban pSTAT1 y pSTAT2 en el núcleo de la célula. Por el contrario, en las células infectadas a diferentes MOI con ICV'89 se formaban los sincitios típicos de una infección de PPRV, y el pSTAT1 desaparecía de los núcleos de las células infectadas con PPRV (Figura 1.7A). Del mismo modo, en las células infectadas se observó que el STAT2 total no se localizaba en el núcleo, apareciendo disperso en el citoplasma (Figura 1.7B). Para detectar la ubicación del pSTAT2 se utilizó un anticuerpo que detecta STAT2 total, que al estimularse con IFN, se fosforila y se trasloca al núcleo. Estos resultados indican que no sólo PPRV inhibe parcialmente la expresión de pSTAT1 y pSTAT2, sino que bloquea su traslocación al núcleo.



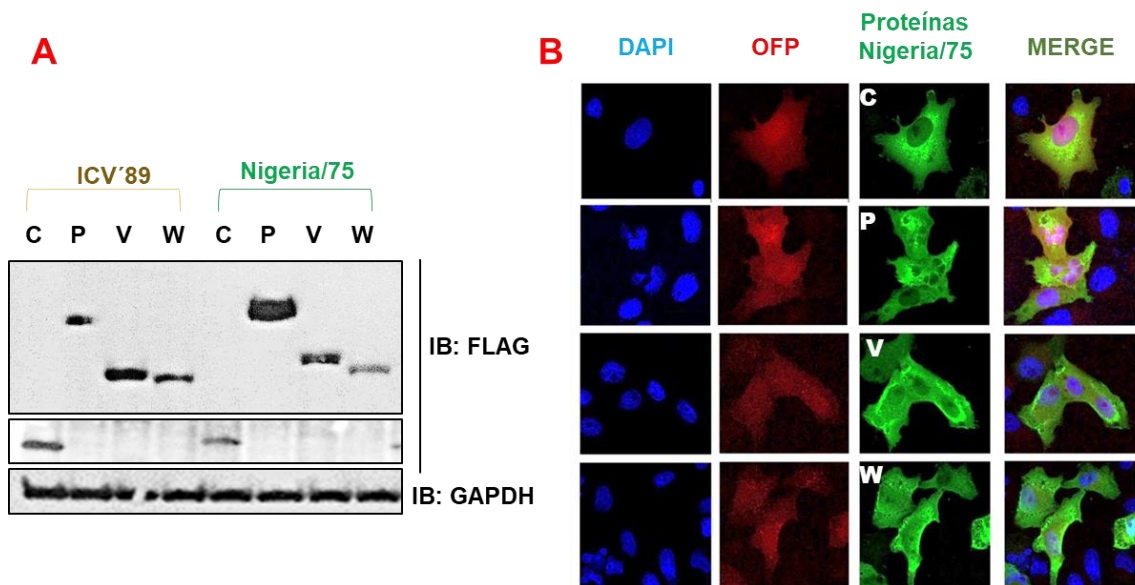


**Figura 1.7. PPRV bloquea la traslocación al núcleo de pSTAT1 y pSTAT2.** (A y B) Se infectaron células VDS con ICV´89 a diferentes MOI (1, 5 Y 10 PFU/célula). A las 16 hpi las células se estimularon con 1000 U/ml de IFN-U durante 30 min y se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con anticuerpos contra pSTAT1 (verde) (A), STAT2 total (verde) (B) y la proteína N de PPRV (rojo) (descrito en Materiales y Métodos). El ADN nuclear se tiñó con DAPI (azul). Las preparaciones se observaron mediante microscopía confocal (Barra de escala = 50  $\mu$ m).

### 1.5. Obtención y caracterización de las proteínas C, P, V y W de las cepas ICV´89 y Nigeria/75 de PPRV

El género *Morbillivirus* codifica la proteína estructural P y tres proteínas no estructurales C, V y W, que se han descrito como relevantes en la evasión de la respuesta inmune innata. Para evaluar el efecto individual de estas proteínas virales de un aislado virulento, ICV´89 y de una cepa vacunal, Nigeria/75, de PPRV sobre la inducción y la respuesta al IFN, se clonaron los genes codificantes de las mismas amplificándolos mediante RT-PCR a partir de ARN extraído de células infectadas con las 2 cepas, respectivamente. Se generaron un total de 8 construcciones, en un vector de expresión de células de mamíferos (pIRES-OFP). No se pudo amplificar el gen W de la cepa Nigeria/75, por lo que se obtuvo una mutagénesis dirigida utilizando como molde el plásmido pIRES-V/Nigeria/75, descrito en Materiales y Métodos.

La expresión de las proteínas se verificó mediante *Western blot* en extractos proteicos obtenidos de células transfectadas con los distintos plásmidos de expresión construidos. Se comprobó que la migración de las proteínas corresponde con los pesos moleculares predichos para cada una de las proteínas (P: 86 kDa, C: 25 kDa, V: 50 kDa y W: 40 kDa) (Figura 1.8A). La proteína P de PPRV migra a 86 kDa en geles de SDS PAGE debido a su carácter ácido y sus altos niveles en serina y treonina, que proporcionan numerosos sitios para la fosforilación post-translacional que aumenta el tamaño y la carga negativa general de la proteína [95, 112]. Las proteínas se clonaron seguidas del epítipo FLAG® en su extremo carboxilo, que permite su detección, lo que nos permitió realizar un ensayo de inmunofluorescencia en el que se detectó la expresión de las proteínas en las células transfectadas con cada construcción (Figura 1.8B). Todas las proteínas presentan una localización tanto citoplasmática como nuclear.



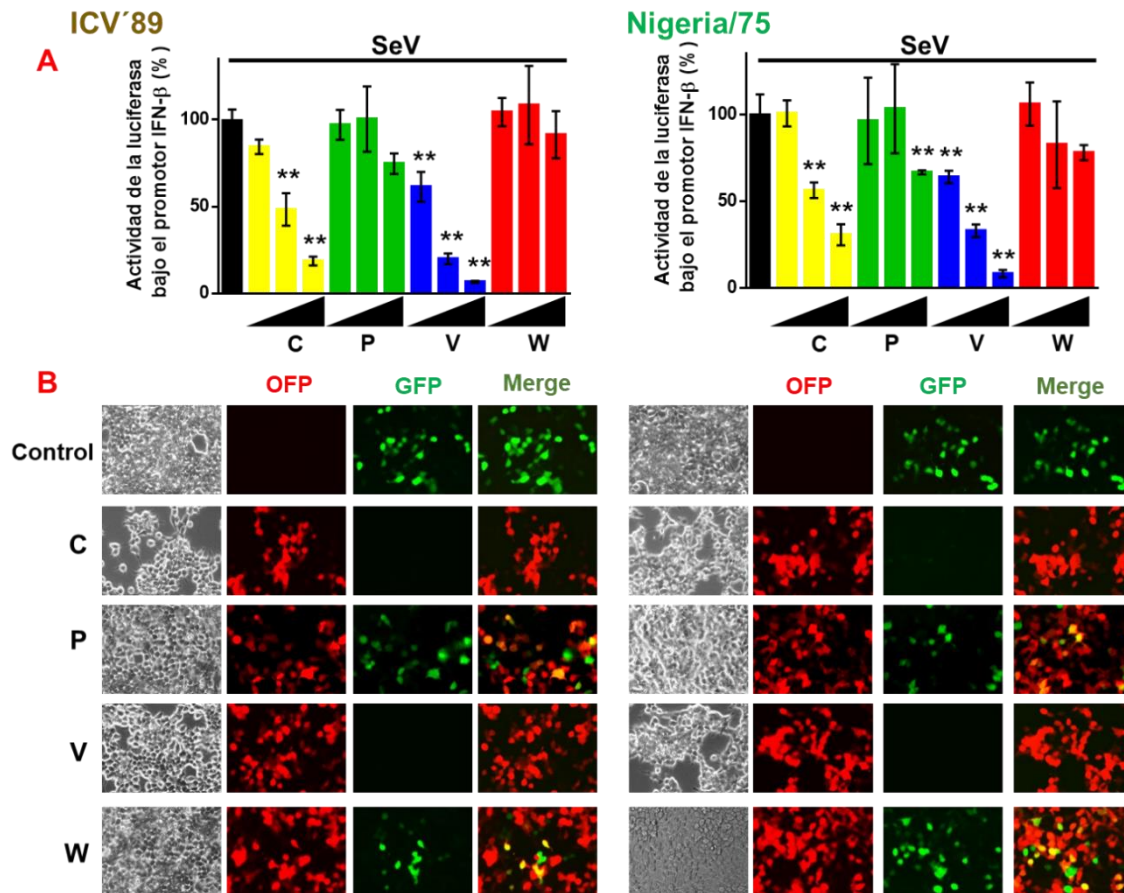
**Figura 1.8. Expresión y localización celular de las proteínas C, P, V y W de ICV'89 y Nigeria/75.** (A) Se transfectaron células HEK-293T con los plásmidos que expresan las proteínas C, P, V y W de ICV'89 y Nigeria/75. Se detectó la expresión de las proteínas por Western blot utilizando un anticuerpo contra el epítipo FLAG. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. (B) Inmunofluorescencia de células VDS transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas C, P, V y W de Nigeria/75. Las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con un anticuerpo contra el epítipo FLAG. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul), la expresión de la OFP (rojo), la expresión de las proteínas clonadas (verde), se observó mediante microscopía confocal.

## 1.6. Las proteínas C y V de PPRV inhiben la ruta de inducción del IFN

Dado que se observó inhibición de la expresión del gen de la luciferasa obtenida a partir del promotor de inducción del IFN- $\beta$  con las dos cepas de PPRV, se procedió a realizar el mismo tipo de ensayo con las proteínas virales expresadas individualmente.

Para evaluar el efecto específico de las proteínas C, P, V y W de ICV'89 y Nigeria/75 en la vía de inducción del IFN- $\beta$ , se realizó un ensayo utilizando diferentes dosis de ADN de cada plásmido construido en la transfección. Al transfectar con los plásmidos que expresan la proteína C y V de las dos cepas se observó un efecto inhibitorio sobre la ruta de inducción del IFN y además, dependiente de dosis, mientras que en las células transfectadas con los plásmidos que permiten la expresión de las proteínas P y W de las dos cepas no se observó disminución de la luminiscencia. Únicamente, en el caso de células transfectadas con la máxima concentración del plásmido que expresa la proteína P de Nigeria/75 se observó una disminución significativa (Figura 1.9A).

Para apoyar estos resultados, se transfectaron células HEK-293pIFN-GFP, que expresan GFP bajo el control del promotor del IFN- $\beta$ , con los plásmidos que expresan las proteínas C, P, V y W de las dos cepas de PPRV y se estimularon infectando con SeV para inducir la expresión del IFN. Se observó la expresión de las proteínas mediante la expresión de la proteína OFP (rojo) y la expresión del IFN mediante la expresión de la proteína GFP (verde). En las células transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas C y V, tanto de ICV'89 como de Nigeria/75, no se detectaba expresión de IFN, ya que la expresión de la proteína GFP desaparecía en comparación con las células sin transfectar e infectadas con SeV.



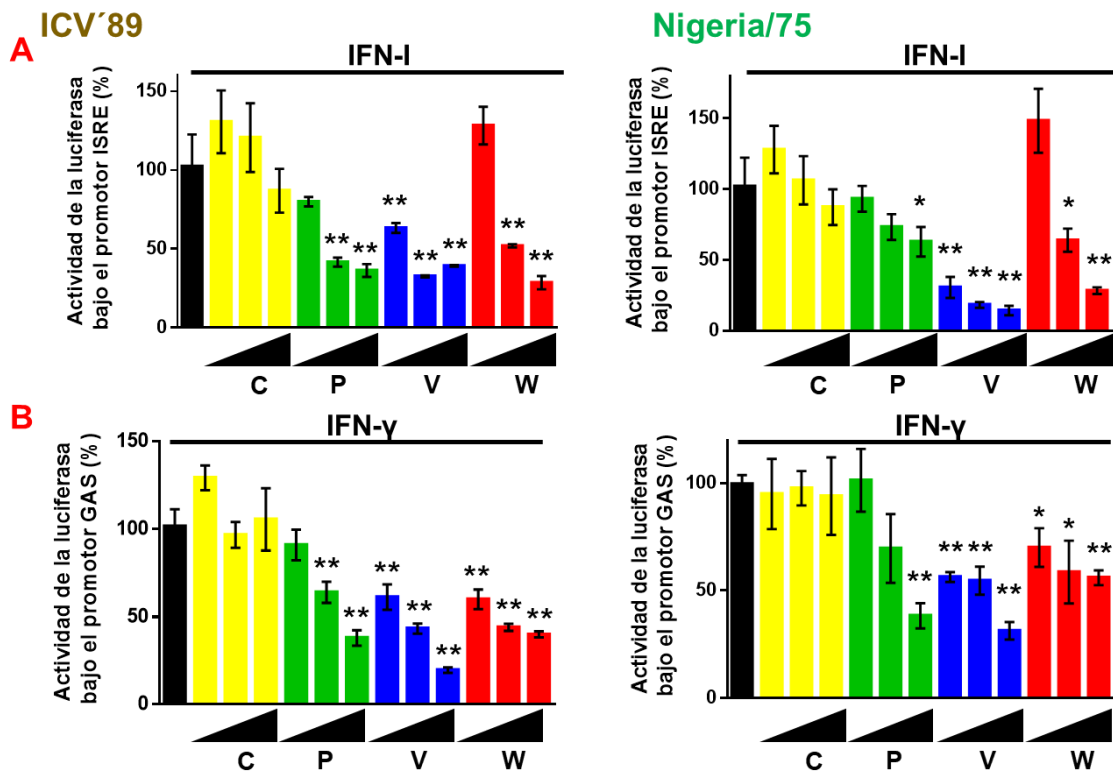
**Figura 1.9. Efecto de las proteínas C, P, V y W de ICV'89 y Nigeria/75 de PPRV en la inducción del IFN- $\beta$ .** (A) Se co-transfectaron células VDS con cantidades crecientes de ADN (50, 300 y 600 ng) de los plásmidos que expresan las proteínas C (amarillo), P (verde), V (azul) y W (rojo) de ICV'89 y Nigeria/75 respectivamente, o el plásmido vacío (Control), junto con los plásmidos pNull y pIFN- $\beta$ , tal y como está descrito en Materiales y Métodos. A las 24 hpt se estimularon con SeV (dilución 1/100). A las 16 hpi, se lisaron las células para medir la luminiscencia de la luciferasa y de la renilla. El ratio de estas dos actividades se tomó como la actividad relativa de la luciferasa. Los resultados se expresan en porcentaje del ratio entre las células estimuladas y no estimuladas con SeV, considerando el resultado del control el 100% de estimulación. Los datos se sometieron al test estadístico de varianza de ANOVA de dos vías, con una corrección del test de Bonferroni, con un intervalo de confianza de  $P < 0.01$  (\*\*). Las barras de error muestran la desviación estándar (DS) de cada resultado. (B) Se transfectaron células HEK-293pIFN-GFP con 600 ng de ADN de los plásmidos que expresan las proteínas C, P, V y W de ICV'89 y Nigeria/75. A las 24 hpi se estimularon con SeV (dilución 1/100) y transcurridas 16 hpe se observó la expresión de OFFP y GFP mediante microscopía de fluorescencia. Se utilizaron controles sin transfectar y sin estimular en cada caso. Las imágenes son una representación de un campo de visualización. Las imágenes se visualizaron con un objetivo de aumento 20X.

### 1.7. Las proteínas P, V y W de PPRV inhiben la señalización del IFN tipo I y II

Se ha descrito el efecto inhibitorio que tiene la proteína V de PPRV sobre la respuesta al IFN tipo I y II [122]. También se conoce el efecto que tienen las proteínas C, P y W en otros morbillivirus como MeV y RPV [98, 117, 189]. Dado que con las dos cepas de PPRV se observó una inhibición de la ruta de señalización del IFN a través de los



promotores ISRE y GAS, se realizó el mismo tipo de experimentos para atribuir a proteínas individuales del virus esta actividad inhibitoria sobre dicha ruta. Se midió la expresión del gen de la luciferasa a partir de los promotores ISRE y GAS. Al transfectar diferentes cantidades del plásmido que expresa la proteína C de las dos cepas de PPRV no se observó un efecto inhibitorio sobre estas rutas, mientras que en las células transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas P, V y W, respectivamente, se observó una disminución de luminiscencia, y por tanto, reducción de la activación de los genes de respuesta al IFN tipo I y II. El efecto de inhibición fue más pronunciado con la expresión de la proteína V, siendo menos acusado con las expresiones individuales de las proteínas P y W. El efecto también es mayor en la respuesta al IFN tipo I que en respuesta al IFN tipo II (Figura 1.10). Esto sugiere que las proteínas P, V y W están implicadas en la inhibición de la señalización del IFN tipo I y tipo II.



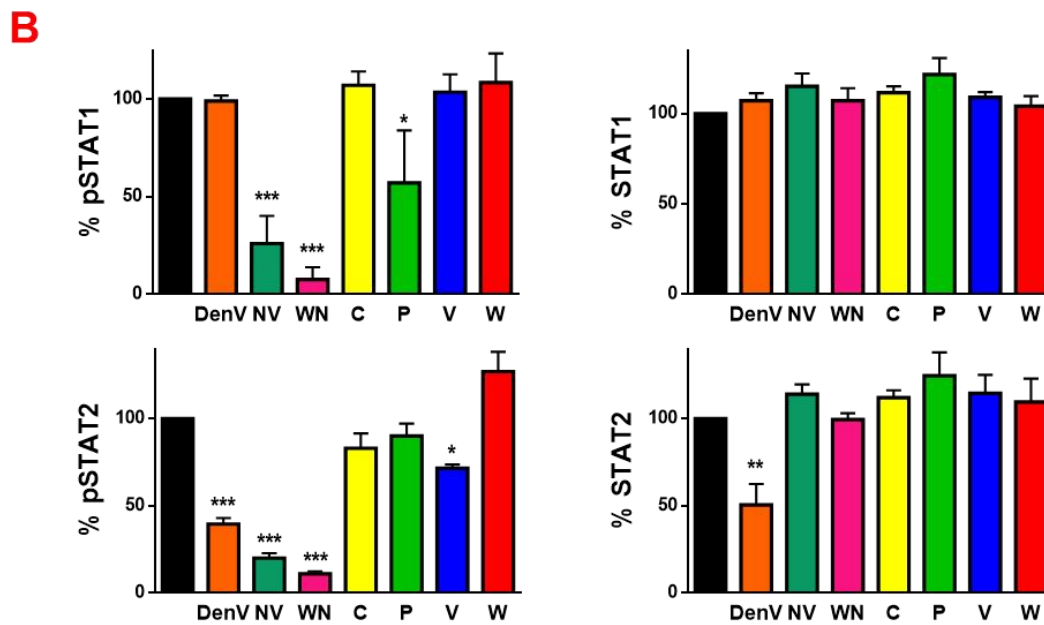
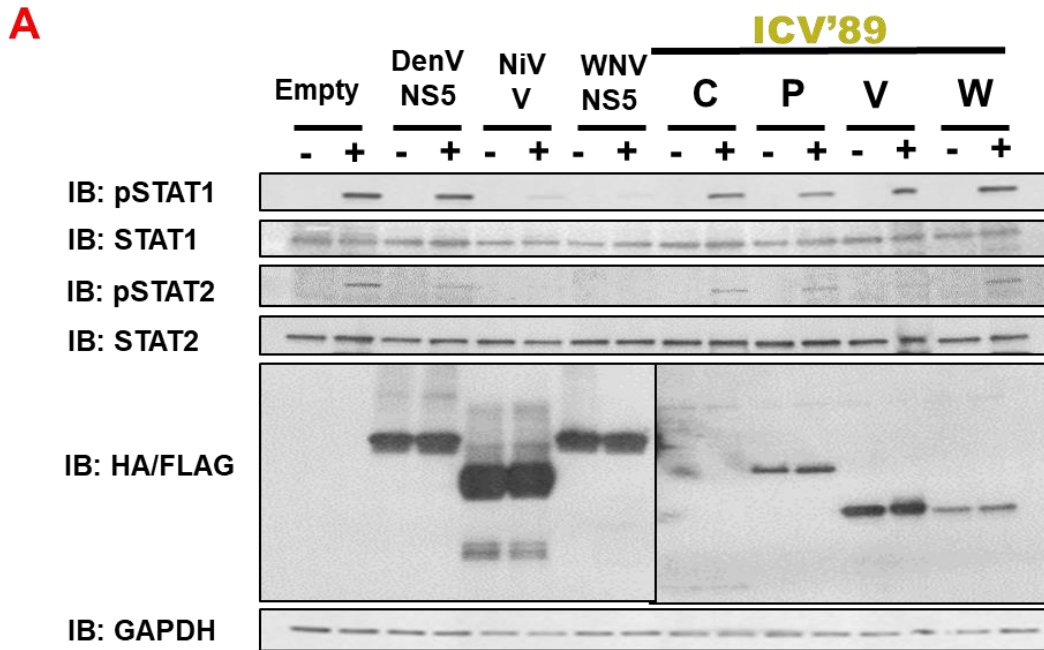
**Figura 1.10. Las proteínas P, V y W de ICV'89 y de Nigeria/75 de PPRV inhiben las rutas de señalización del IFN tipo I y II a través de los promotores ISRE y GAS, respectivamente.** (A) Se co-transfectaron células HEK-293T o células VDS (B) con los plásmidos pNull e ISRE (A), GAS (B) y con cantidades crecientes (50, 300 y 600 ng) de ADN de los plásmidos que expresan las proteínas C (amarillo), P (verde), V (azul) y W (rojo) de ICV'89 y Nigeria/75, respectivamente, o el plásmido vacío (negro) utilizado como control, tal y como está descrito en Materiales y Métodos. A las 24 hpt se estimularon con 1000 U/ml de IFN-U (A) o con 5 ng/ml de IFN- $\gamma$  (B). A las 16 hpe, las células se lisaron para medir la luminiscencia de la luciferasa y de la renilla. El ratio de estas dos actividades se tomó como la actividad relativa de la luciferasa. Los resultados se expresan en porcentaje obtenido del ratio entre las células estimuladas y no estimuladas con IFN, tomando el resultado de control como el 100% de estimulación. Los datos se sometieron al test estadístico de varianza ANOVA de dos vías, con una corrección mediante el test de

Bonferroni, con un intervalo de confianza de  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) y  $P < 0.001$  (\*\*\*). Las barras de error muestran la desviación estándar (DS) de cada resultado.

## 1.8. Las proteínas P, V y W de PPRV afectan los niveles de pSTAT1 y pSTAT2 y su traslocación al núcleo

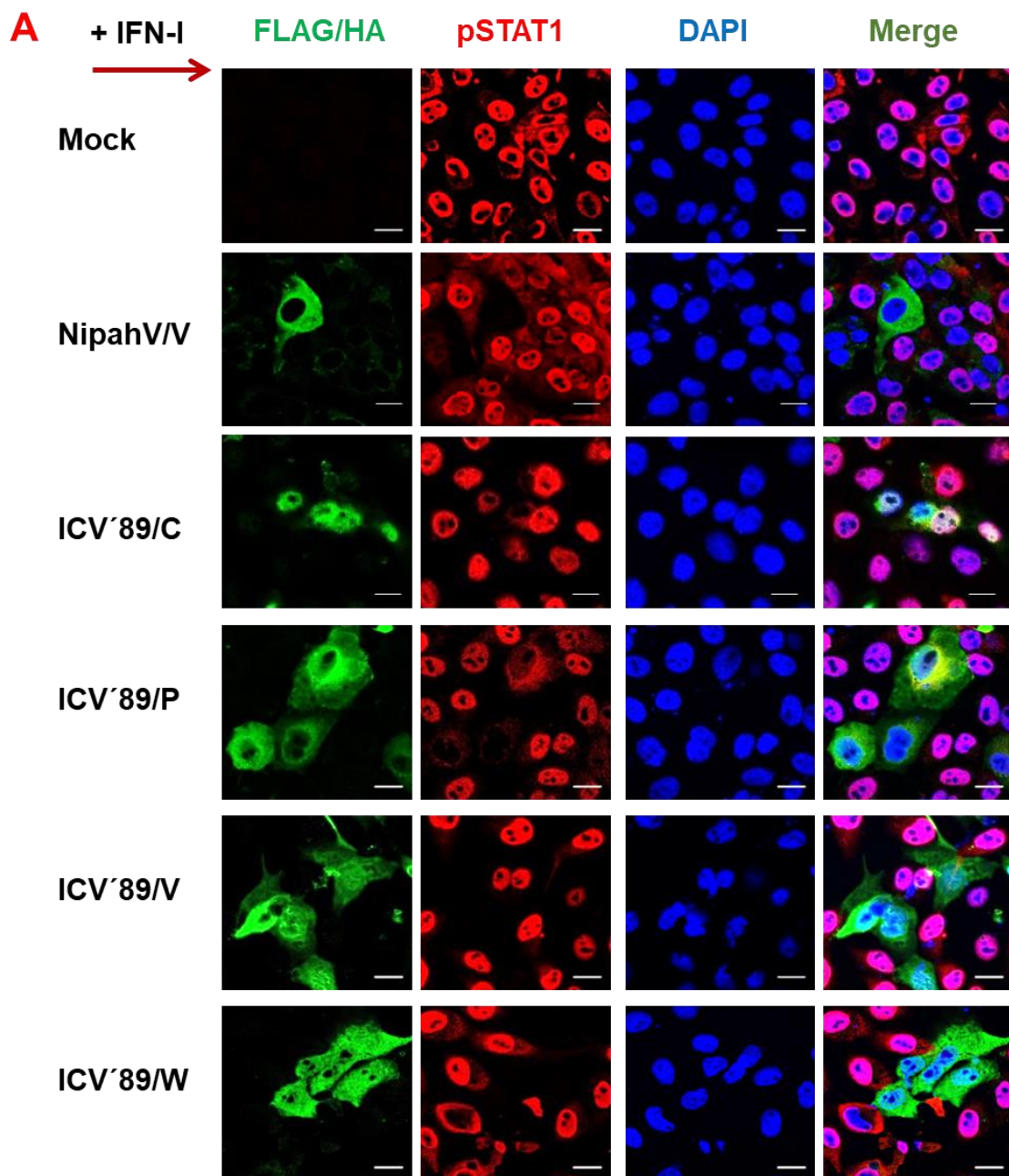
Para esclarecer el mecanismo a través del que las proteínas P, V y W de PPRV inhiben la ruta de señalización de los IFN de tipo I y II, se realizaron ensayos que permitieran observar la interacción de dichas proteínas con diferentes factores que intervienen en la ruta de señalización de las JAK/ STAT. Así, se estudió el efecto producido por la expresión de estas proteínas en los niveles totales de STAT1/2 y pSTAT1/2 mediante *Western blot*. Para la realización de este ensayo se utilizaron como controles positivos los plásmidos que expresan la proteína NS5 del virus del Nilo Occidental (WNV) que inhibe la fosforilación de STAT1 [190], la proteína V de NiV que se une a STAT1 y STAT2 evitando la traslocación al núcleo [191, 192] y la proteína NS5 de DenV que se une y degrada STAT2 [55]. También se utilizaron como controles negativos el plásmido vacío (pIRES-cOFP) y el plásmido que expresa la proteína C de PPRV, ya que en los ensayos de expresión de luciferasa no se observó ningún efecto en la ruta de señalización del IFN tipo I y II.

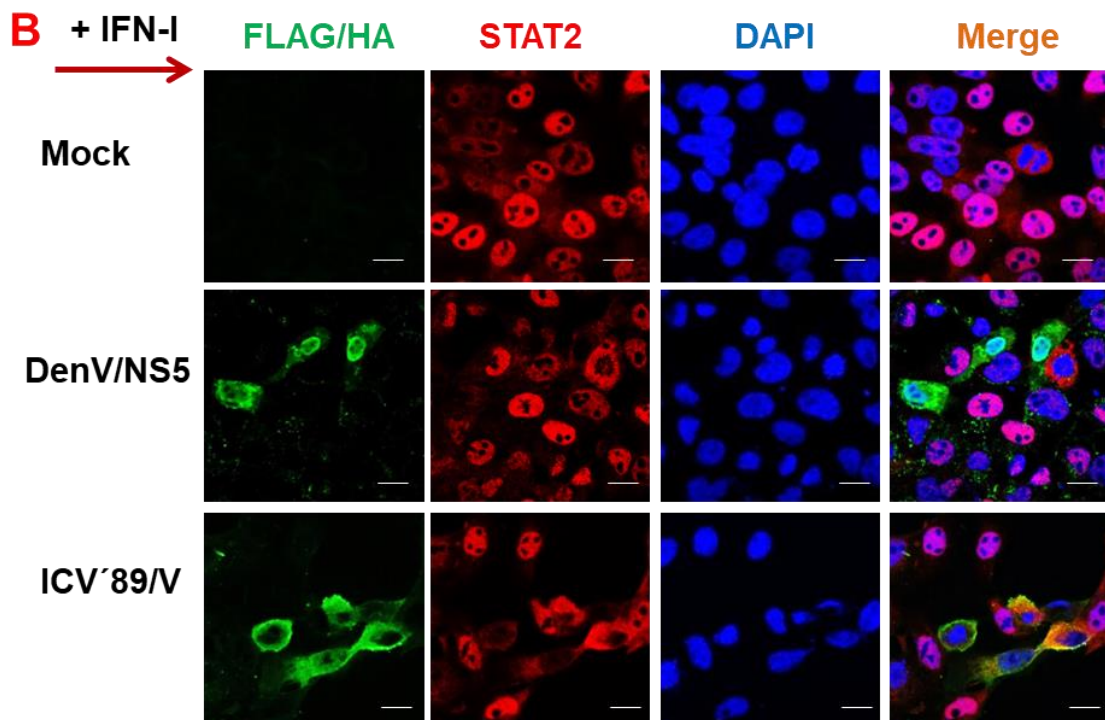
Los niveles de expresión de STAT1 y STAT2 totales se mantienen constantes en células HEK-293T transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas C, P, V y W de ICV'89. Se observó una leve reducción en los niveles de expresión de pSTAT1 en presencia de la proteína P de ICV'89 (Figura 1.11A). Las proteínas V de NiV y NS5 de WNV, utilizadas como controles positivos, también reducen los niveles de expresión de pSTAT1. Los niveles de expresión de pSTAT2 se reducen en presencia de los controles positivos (DenV/NS5, NiV/V y WNV/NS5) utilizados, y levemente en células transfectadas con el plásmido que expresa la proteína V de ICV'89 (Figura 1.11A). Para comprobar esta leve disminución de los niveles de STAT1/2 fosforilados, se cuantificaron tres experimentos diferentes normalizando con los valores obtenidos para GADPH, observándose una disminución leve, pero estadísticamente significativa para las proteínas P y V, respectivamente (Figura 1.11B).



**Figura 1.11. Las proteínas P y V de ICV'89 reducen levemente los niveles de expresión de STAT1/2 fosforilados, respectivamente.** (A) Inmunoblot de células HEK-293T transfectadas con 500 ng de ADN de los plásmidos que expresan las proteínas NiV/V (HA), DenV/NS5 (HA), WNV/NS5 (HA), ICV'89/C/P/V/W (FLAG) y el plásmido vacío (empty). Las células se estimularon con 1000 U/ml de IFN-U durante 30 min. Los lisados se analizaron por *Western blot* utilizando los anticuerpos pSTAT1, STAT1, pSTAT2, STAT2, GAPDH y la expresión de las proteínas se detectó utilizando anticuerpos contra los epítomos FLAG y HA. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. (B) Análisis por densitometría de los niveles de pSTAT1, STAT1, pSTAT2, STAT2, revelados en los IB y normalizados con los niveles de GAPDH. Los datos representan la media  $\pm$  la DS de tres experimentos independientes. Los datos se sometieron al test estadístico de varianza ANOVA con dos vías, con una corrección del test de Bonferroni, con un intervalo de confianza de  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) y  $P < 0.001$  (\*\*\*)

Se comprobó el efecto de las proteínas de PPRV en la traslocación al núcleo de pSTAT1/2 mediante un ensayo de inmunofluorescencia. Se observó que las proteínas P, V y W de ICV'89 evitaban la traslocación al núcleo de pSTAT1 de la misma forma que el control positivo (NiV/V) (Figura 1.12A). Del mismo modo, la proteína V de ICV'89 también evitaba la traslocación al núcleo de pSTAT2 total en células estimuladas con IFN como el control positivo (DenV/NS5) (Figura 1.12B). Estos datos confirman que las proteínas P, V y W de PPRV son las responsables de la inhibición de la traslocación al núcleo de pSTAT1 y que la proteína V evita además, la traslocación al núcleo de pSTAT2.

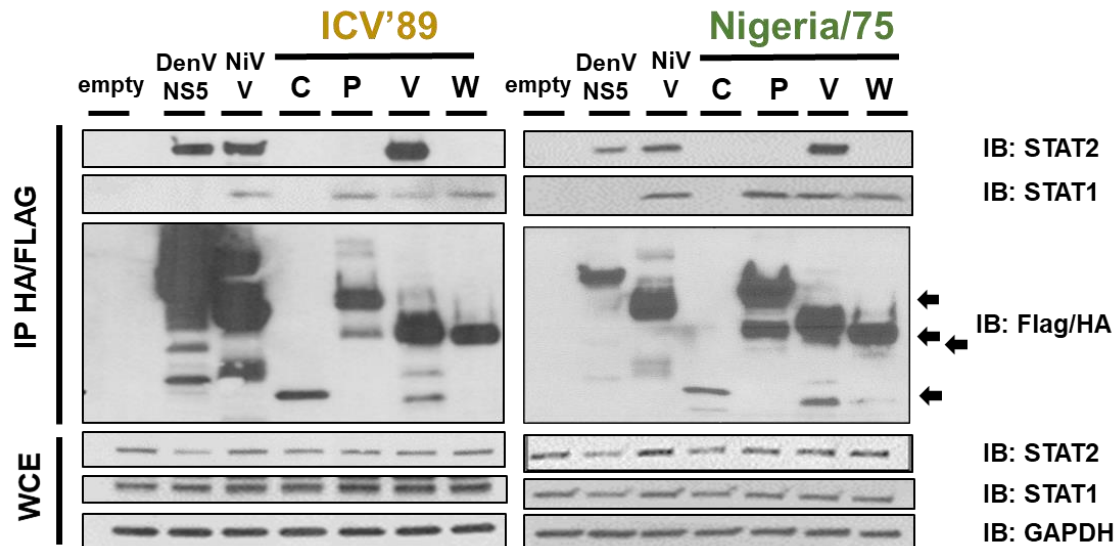




**Figura 1.12. Las proteínas P y W de ICV'89 evitan la translocación al núcleo de pSTAT1 y la proteína V evita la traslocación al núcleo de pSTAT1/2.** (A y B) Inmunofluorescencia de células VDS transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas NiV/V (HA), DenV/NS5 (HA), y ICV'89/C/P/V/W/ (FLAG), respectivamente. A las 24 hpt las células se estimularon con 1000 U/ml de IFN-U durante 30 min, se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con anticuerpos contra pSTAT1 (rojo) (A), STAT2 total (rojo) (B) y contra los epítomos HA/FLAG (verde) (descrito en Materiales y Métodos). El ADN nuclear se tiñó con DAPI (azul). Las preparaciones se observaron mediante microscopía confocal. (Barra de escala = 20  $\mu$ m).

### 1.9. Interacción de las proteínas P, V y W de PPRV con STAT1 y STAT2

Las proteínas P, V y W de los morbillivirus contienen en su dominio N-terminal una región implicada en la unión con STAT1 [119] y en el dominio C-terminal de la proteína V presentan un anillo de zinc implicado en la unión con STAT2. Recientemente, se han identificado los residuos de la proteína V de PPRV (cepa Tibet perteneciente al linaje IV) implicados en la unión con STAT2 [122]. Para estudiar si se produce una interacción entre STAT1 y/o STAT2 y las proteínas P, V y W de las cepas ICV'89 y Nigeria/75 de PPRV, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación (IP), utilizando como control positivo las proteínas DenV/NS5 que unen STAT2 y la proteína NiV/V que une STAT1 y STAT2. Los resultados obtenidos indicaron que la proteína V de las dos cepas de PPRV se une a STAT1 y a STAT2, que las proteínas P y W se unen a STAT1 y no se observa ninguna interacción con dichas proteínas en el caso de la proteína C de PPRV (Figura 1.13).



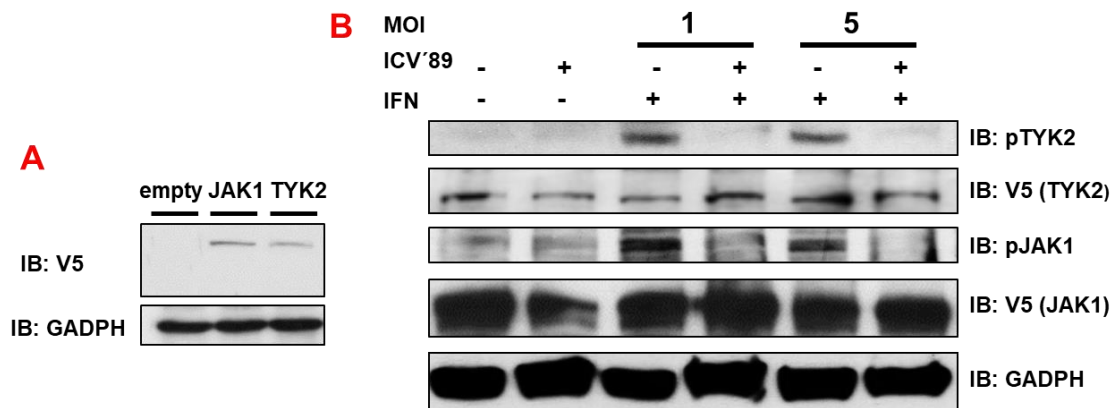
**Figura 1.13. Las proteínas P y W de ICV'89 y Nigeria/75 se unen a STAT1 y la proteína V se une a STAT1 y STAT2.** Inmunoprecipitación de células HEK-293T transfectadas con 2µg de ADN de los plásmidos que expresan las proteínas NiV/V (HA), DenV/NS5 (HA), y ICV'89 /C/P/V/W/ y Nigeria/75 (FLAG), respectivamente. A las 48 hpt se recogieron los lisados celulares y se separaron en dos alícuotas, una para estudiar el extracto celular total (WCE) y otra se incubó toda la noche a 4°C en agitación orbital, con la resina de afinidad anti-HA o anti-FLAG dependiendo del tag que presenta la proteína a inmunoprecipitar (descrito en Materiales y Métodos). Ambas muestras se analizaron mediante la técnica de Western blot, incubándose con anticuerpos contra STAT1, STAT2, pSTAT1, pSTAT2, HA, FLAG y GAPDH, respectivamente.

### 1.10. PPRV induce una disminución en los niveles de expresión de pJAK1 y pTYK2

Se ha demostrado que RPV reduce la expresión de la fosforilación de las quinasas JAK1 y TYK2 [104] y para investigar si otro morbillivirus presenta el mismo efecto, se infectaron células con PPRV y se analizó la expresión de los niveles de expresión de pJAK1 y pTYK2 en células tratadas con IFN. En un primer momento, se infectaron células y se detectaron los niveles de expresión endógenos de pJAK1 y pTYK2, pero el resultado fue negativo, ya que la expresión endógena de estas quinasas en células de mamíferos es muy baja y difícil de detectar con anticuerpos comerciales. Por este motivo, se planteó clonar los genes JAK1 y TYK2 humanos en un vector de expresión de células de mamífero (pEF4/V5-His-B), facilitando la sobreexpresión en células y permitiendo su detección mediante el epítipo V5 (Figura 1.14A).

Para estudiar el efecto inducido por PPRV en los niveles de pJAK1 y pTYK2, se transfectaron células VDS con los plásmidos que expresan las quinasas JAK1 y TYK2 y posteriormente se infectaron con la cepa virulenta de PPRV, ICV'89 y se estimularon con IFN-U. Se observó que los niveles de expresión de JAK1 y TYK2 totales no cambiaron con la infección de PPRV, mientras que sí se observó una disminución en

los niveles de expresión de pJAK1 y pTYK2, en las células infectadas con respecto a las no infectadas. La reducción que se observó fue específica, dado que los niveles de expresión de las quinasas fosforiladas disminuían conforme se aumentaba la MOI (Figura 1.14B). Estos datos indican que PPRV afecta a los niveles de pJAK1 y pTYK2, afectando a la señalización del IFN.



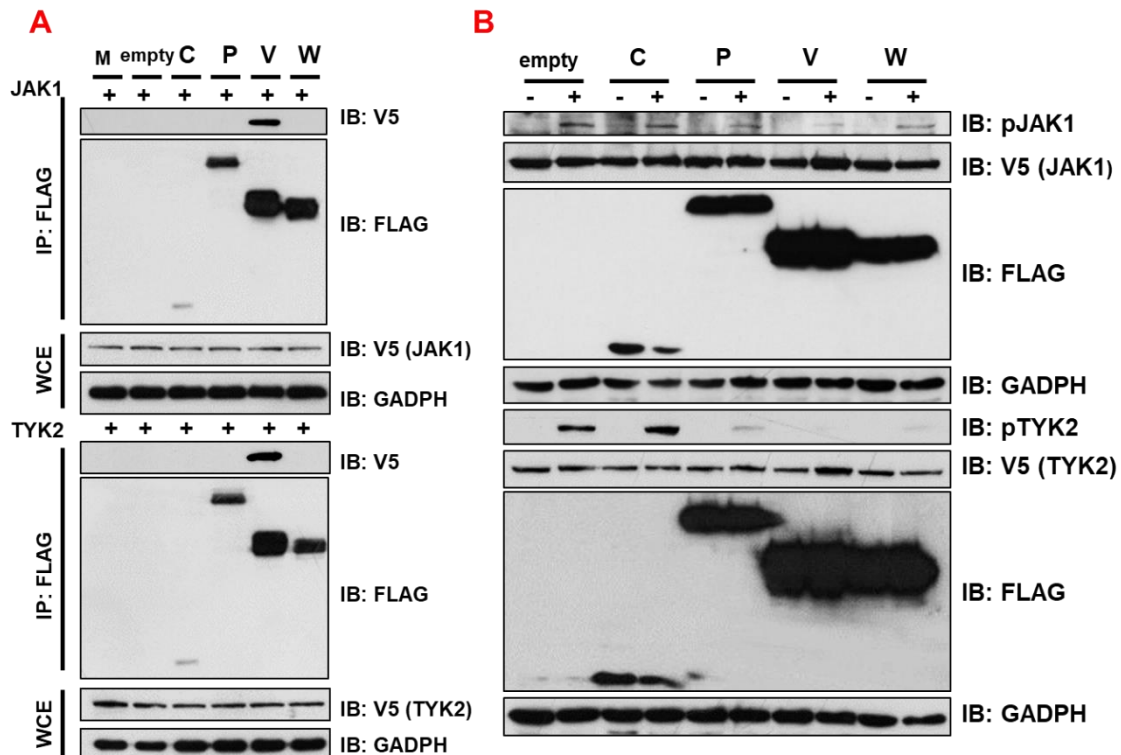
**Figura 1.14. PPRV reduce los niveles de pJAK1 y pTYK2.** (A) Inmunoblot de la expresión de las proteínas JAK1 y Tyk2 en células HEK-293T transfectadas con las construcciones que expresaban dichas quinasas. Se detectó la expresión de las proteínas mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo contra el epítipo V5. Como control de carga se utilizó la proteína GADPH. (B) IB de células VDS transfectadas con los plásmidos de expresión de las quinasas JAK1 y TYK2. A las 24 hpt las células se infectaron o no (Mock), con ICV'89 a las MOI indicadas. Tras 16 hpi las células se estimularon con 1000 U/ml de IFN-U durante 15 min. Los lisados se analizaron por *Western blot* utilizando los anticuerpos contra pJAK1, pTyk2, V5 y GADPH, respectivamente. Como control de carga se utilizó la proteína GADPH.

### 1.11. Efecto de las proteínas P, V y W de PPRV en la expresión de pJAK1 y pTYK2 y su interacción con estas quinasas

Para determinar que proteína/s de PPRV son las determinantes de la reducción de los niveles de las quinasas pJAK1 y pTYK2 se estudió, en primer lugar, la posible interacción de las proteínas C, P, V y W de PPRV con las mismas. Para ello se realizó un ensayo de inmunoprecipitación en el que células HEK-293T se co-transfectaron con los plásmidos de expresión de las quinasas JAK1 y TYK2 junto con los plásmidos de expresión de las proteínas C, P, V y W de PPRV, observándose una interacción directa entre la proteína V de PPRV y las quinasas JAK1 y TYK2, mientras que no se detectó dicha interacción entre las proteínas C, P, V y W de PPRV y JAK1 y/o TYK2 (Figura 1.15A).

La proteína V de PPRV se une directamente con JAK1 y TYK2. Para determinar si la unión inducía una reducción de los niveles de expresión de pJAK1 y pTYK2, se analizaron mediante *Western blot* los niveles totales de JAK1 y TYK2 y de sus

fosforilados en células transfectadas con los plásmidos de expresión de las proteínas C, P, V y W de PPRV. Se observó que en células que expresaban las proteínas P, V y W los niveles de expresión de pTYK2 se reducían. En cambio, los niveles de expresión de pJAK1 solo se reducían en las células que expresaban la proteína V de PPRV (Figura 1.15B). Estos datos indican que las proteínas P, V y W de PPRV reducen los niveles de pTYK2 y que solo la proteína V interacciona con las dos quinasas y reduce la expresión de pJAK1.



**Figura 1.15. La proteína V de ICV'89 se une a JAK1 y TYK2 y reduce su fosforilación, y las proteínas P y W de ICV'89 reducen los niveles de pTYK2.** (A) Inmunoprecipitación de células HEK-293T co-transfectadas con 1µg de ADN de los plásmidos que expresan las proteínas ICV'89/C/P/V/W y 1µg de ADN de los plásmidos que expresan las quinasas JAK1 y TYK2 (V5), respectivamente. A las 48 hpt se recogieron los lisados celulares y se separaron en dos alícuotas, una para estudiar el extracto celular total (WCE) y otra se incubó con la resina de afinidad anti-FLAG toda la noche a 4°C en agitación orbital (descrito en Materiales y Métodos). Las muestras correspondientes al WCE y las muestras inmunoprecipitadas se analizaron mediante un gel de electroforesis SDS-PAGE, seguido de transferencia a membranas de nitrocelulosas incubadas con anticuerpos contra V5, FLAG y GADPH, respectivamente. (B) IB de células HEK-293T co-transfectadas con los plásmidos de expresión de las proteínas JAK1 y TYK2, los plásmidos de expresión de las proteínas C, P, V y W de ICV'89 y el plásmido vacío (empty), respectivamente. A las 24 hpt las células se estimularon con 1000 U/ml de IFN-U durante 15 min. Los lisados se analizaron por *Western blot* empleando los anticuerpos contra pJAK1, pTYK2, V5 y GADPH, respectivamente. Como control de carga se utilizó la proteína GADPH.



# **Discusión Capítulo 1**

*“Duda siempre de ti mismo, hasta que los datos no dejen lugar a dudas”*

*Louis Pasteur (1822 – 1895)*



La infección con PPRV induce una fuerte inmunosupresión que provoca graves consecuencias clínicas en el hospedador, facilitando la aparición de infecciones secundarias, virales o bacterianas, que suelen ser las responsables de la alta tasa de mortalidad existente [84]. La inmunosupresión proporciona al patógeno la oportunidad de maximizar su supervivencia, replicación y transmisión. Esta Tesis Doctoral ha profundizado en el conocimiento de los mecanismos que median la interacción de PPRV y de sus proteínas expresadas individualmente, con el sistema del IFN, una de las primeras defensa desencadenadas tras una infección como respuesta inmune innata del hospedador. PPRV como otros muchos virus y más concretamente los de su misma familia, *Paramixoviridae* han desarrollado diversos mecanismos efectivos para antagonizar el sistema inmune del hospedador, como la inhibición de la producción del IFN o la de los factores antivirales de la respuesta al IFN, mediante distintas proteínas virales [193, 194].

Hemos estudiado la inducción del IFN- $\beta$  después de la infección con dos cepas de PPRV, una virulenta y otra vacunal, en líneas celulares establecidas. Mediante ensayos de expresión de la luciferasa o GFP a partir del promotor del IFN- $\beta$ , observamos que las dos cepas de PPRV utilizadas en este estudio inhiben la expresión a través de dicho promotor, *in vitro*, en cultivos celulares, y de manera creciente en el tiempo. Esto coincide con el comportamiento general de los paramixovirus que desencadenan una pobre expresión del IFN a través de RIG-I en respuesta al ARN no codificante producido durante la transcripción del ARNm [195, 196]. El clonaje y expresión de las 4 proteínas de PPRV implicadas en la regulación de la respuesta innata ha permitido identificar las proteínas C y V como las responsables de la inhibición de la inducción de IFN, mientras que P y W no tienen ningún papel en este mecanismo. Estos resultados confirman datos recientemente publicados, en los que virus defectivos en la proteína C permitían la inducción del IFN, identificando la proteína C como principal responsable del bloqueo en la inducción del IFN. Sin embargo los defectivos en la proteína V mantienen dicho bloqueo, necesitándose más estudios para determinar la implicación de dicha proteína en esta ruta [118].

El papel de la proteína C de los paramixovirus en la inducción del IFN no está esclarecido completamente. Aunque en algunos virus como MeV [109] o SeV [197] se ha estudiado su mecanismo de acción. Sin embargo, la proteína C de estos virus difiere con respecto a PPRV, ya que presenta una localización nuclear. Se conoce que la proteína C está involucrada en la replicación del genoma viral, en la regulación de la síntesis de ARN [105, 198, 199] y en la traducción de proteínas virales [107], funciones que podrían interferir con la activación del promotor de inducción del IFN. Además, se

ha demostrado que los virus defectivos en la expresión de la proteína C sintetizan más ARNcd durante la infección, un PAMP que conduce a la activación del promotor de inducción del IFN a través de PKR [200, 201], mientras que el virus wt no produce tanto ARNcd [202-204]. También se ha sugerido un efecto directo de la proteína C de MeV en el bloqueo de la transcripción del IFN- $\beta$  [205].

De acuerdo con datos de otros autores [122, 206], también observamos una disminución en la expresión a partir de los promotores activados por IFN tipo I (ISRE) y tipo II (GAS), que permiten la expresión de genes en respuesta al IFN (ISGs). La tendencia de interferencia, tanto con la vía de inducción como con la de activación del IFN es la misma en las dos cepas de PPRV utilizadas en estos experimentos. Observándose, sin embargo, una diferencia entre ellas en la intensidad de la respuesta producida, tanto en la inducción del IFN- $\beta$ , donde la cepa vacunal se revela como más eficiente en el bloqueo de dicha inducción, como en los niveles de expresión de ISGs activados en respuesta al IFN-U e IFN- $\gamma$ , siendo, en este caso más eficiente la inhibición de la señalización de la ruta del IFN ejercida por la cepa virulenta de PPRV que con la vacunal.

En esta tesis se demuestra que las proteínas P, V y W son las responsables de la inhibición de la activación de los ISGs a través de los promotores ISRE y GAS, así como el bloqueo de la traslocación al núcleo de pSTAT1. La unión de estas tres proteínas a STAT1, demostrada en este trabajo, puede ser la responsable de los efectos detectados en la cascada de señalización del IFN. Además, comprobamos que la proteína V se une a STAT2, inhibiendo su traslocación al núcleo, y reduciendo los niveles de pSTAT2 levemente. La proteína C no está implicada en la inhibición de la ruta de señalización del IFN. Otros autores han publicado que la proteína V bloquea la inducción del IFN por interacción directa con MDA5 e interacción más débil con RIG-I y LGP2 [118].

Estos resultados son consistentes con los descritos para otros virus, como el NiV donde se demuestra que las proteínas P, V y W bloquean la expresión de un gen marcador a partir del promotor ISRE casi completamente en respuesta al IFN [207]. Además, la proteína C también pudo inhibir la actividad luciferasa aunque en niveles más bajos en comparación con las otras proteínas. En la mayoría de los morbillivirus se ha descrito a la proteína V como la responsable de la inhibición de la respuesta al IFN tipo I y II [206]. La proteína V de RPV bloquea casi por completo la inducción de la actividad luciferasa en respuesta del IFN tipo I, así como la proteína P aunque en menor medida, mientras que la proteína C no bloquea la acción del IFN tipo I, similar a lo ocurrido con nuestros resultados con PPRV. En el caso de PPRV también se ha descrito a la proteína V como principal antagonista de la respuesta al IFN, además de observar

un efecto con las proteínas P y N tanto en la respuesta del IFN tipo I como tipo II [122]. En nuestro trabajo demostramos que no solo las proteínas V y P presentan un efecto inhibitorio sobre la respuesta del IFN tipo I y II, sino que demostramos que la proteína W de PPRV también presenta un efecto significativo en la inhibición de la activación de los promotores ISRE y GAS, y que la proteína C no afecta a estas rutas de señalización.

La capacidad de la proteína P de PPRV de bloquear la respuesta al IFN tipo I y II no es tan fuerte como la de la proteína V. En otros morbillivirus se ha sugerido como posible explicación que, probablemente, la naturaleza polimérica de la proteína P disminuiría su afinidad con STAT1, haciéndola menos eficiente en su fosforilación [98].

Otros autores han detectado en cabras infectadas con PPRV una clásica respuesta inflamatoria caracterizada por el aumento de la expresión de citoquinas tales como IFN- $\beta$ , IL-4, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, IL-6 e IL-12 a los 2, 4 y 6 días pi [208]. Sin embargo, en nuestra caracterización más enfocada al sistema del IFN, objetivo de esta Tesis, tras una infección en ovejas con PPRV, se observó una disminución en la expresión de citoquinas involucradas en las vías del IFN, inducción y señalización. Los niveles de la expresión de diferentes ISGs, como IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y RIG-I, disminuyen a partir del día 5 pi, aumentando sin embargo, la expresión de las moléculas antivirales como ISG15, MxA e IFIT3, coincidiendo con un aumento de la carga viral recuperando sus niveles basales cuando desaparece la carga viral, de acuerdo con estudios recientes [116]. Estos resultados desvelan algunos de los mecanismos utilizados por PPRV para producir inmunosupresión en el hospedador, confirmándose también con la cepa vacunal Nigeria/75 que también inhibe la inducción del IFN, como ocurre con otras cepas vacunales de otros morbillivirus [82, 206].

Entre las diferentes estrategias descubiertas para inhibir la respuesta al IFN, los paramixovirus utilizan la degradación de factores de transcripción STATs como es el caso de los géneros *Rubulavirus* y *Avulavirus* [209-211] o la de inhibir la fosforilación y/o acumulación de STATs en el núcleo, como es el caso de los géneros *Henipavirus*, *Morbilivirus* y *Respirovirus* [98, 212-214]. En esta tesis se demuestra que ICV'89 reduce los niveles de pSTAT1 y pSTAT2 sin inducir su degradación y además se observa la inhibición de acumulación de STATs en el núcleo, demostrando que PPRV comparte esta técnica de evasión al sistema del IFN con otros paramixovirus.

La cascada de señalización iniciada por el IFN al interaccionar con su receptor, se continúa con la activación de dos quinasas, JAK1 y TYK2, que se asocian con el receptor de IFN, en un paso previo a la aparición de los STATs en la ruta, cuya fosforilación está afectada en una infección con PPRV. Los niveles de fosforilación de estas proteínas y

por tanto, la transmisión de la señal a través de la ruta, se encuentran alterados en infecciones con otros virus ARN como el virus Sendai [215], el virus Marbug [216], el virus de la encefalitis japonesa [217, 218], el DenV [54, 219] y el WNV [55]. Esta descrito que RPV también bloquea la fosforilación de JAK1 y TYK2 [206], por lo que se comprobó si ese efecto también se producía con PPRV. Los resultados obtenidos demostraron que ICV'89 disminuye los niveles de pJAK1 y pTYK2, afectando la señalización del IFN en pasos anteriores a los STATs.

En los paramixovirus el mecanismo de acción de la proteína V para evadir la respuesta del IFN está basado en la interacción con los factores de transcripción STAT1 y/o STAT2. Por ejemplo, la proteína V del virus 5 del simio (SV5) interacciona con STAT1 para degradarlo [194], la proteína V de MeV interacciona con STAT1 y STAT2 evitando su traslocación al núcleo [220], o la proteína V de algunos virus del género *Rubulavirus* interacciona con STAT2 y no con STAT1, afectando de esta forma a la respuesta del IFN tipo I pero no a la respuesta del IFN tipo II, ya que es necesario la formación de un homodimero de STAT1 para activar el promotor GAS [221].

La proteína V de los morbillivirus presenta una región N-terminal que comparte con las proteínas P y W donde se encuentra un motivo de unión a STAT1 que abarca los residuos 110-130, en el que el residuo tirosina de la posición 110 es el determinante de la unión y está conservado en muchos morbillivirus [222]. Además, una región C-terminal de la proteína V es rica en cisteína (formando un anillo de zinc) que le confiere una propiedad adicional para potenciar su función en la inhibición de la respuesta al IFN, por la interacción con STAT2 [223] (Figura 1.16). La interacción de la proteína V de los paramixovirus con los factores STATs es objeto de estudio de muchos grupos de investigación, ya que es necesaria la formación de un heterodímero u homodímero para la activación de los promotores ISRE y GAS [114, 191, 212, 224, 225], respectivamente. Asimismo, se debe tener en cuenta que la proteína V podría estar interaccionando con otros factores involucrados en la respuesta del IFN, aún no caracterizados. Se ha demostrado que tanto el dominio N-terminal como el C-terminal de la proteína V de RPV intervienen en el bloqueo de la ruta de señalización del IFN tipo I y II, uniéndose a STAT1 mediante el dominio N-terminal y a STAT2 y las quinasas JAK1 y TYK2 mediante el dominio C-terminal [120]. Sin embargo, dicho estudio concluyó que era indispensable la proteína completa para poder inhibir eficazmente la ruta de señalización del IFN [120, 206]. En PPRV se ha demostrado que el dominio C-terminal con el anillo zinc y los residuos triptófano de las posiciones 275 y 277 están implicados en la unión con STAT2 [122]. Este trabajo de Tesis confirma que la proteína V de PPRV interacciona específicamente con STAT1 y STAT2.

En un estudio sobre el mecanismo de la proteína V de diferentes morbillivirus para bloquear la respuesta del IFN se observó que no todas las proteínas V tienen la misma capacidad de interactuar con los factores STATs, indicando que debe existir otro mecanismo que junto con la vinculación con STATs pueda mediar un bloqueo eficaz de la respuesta del IFN [206]. Se ha demostrado que la proteína V de RPV interactúa con las quinasas JAK1 y TYK2 afectando a sus formas fosforiladas. En cambio otros morbillivirus como MeV, CDV y una cepa del linaje IV de PPRV no afectan a los niveles de pJAK1 pero sí a pTYK2 [206]. En este trabajo de Tesis se demostró que la proteína V de ICV'89 interactúa con JAK1 y TYK2 de la misma forma que la proteína V de RPV. Además se observó que las proteínas P, V y W reducen los niveles de pTYK2 y sólo la proteína V disminuye los niveles de expresión de pJAK1. Estos datos difieren de los resultados obtenidos en un trabajo con la proteína V de una cepa del linaje IV de PPRV, que no reduce los niveles de pJAK1 [206]. Este hecho puede indicar que existen diferencias entre linajes de la misma especie como ha ocurrido con otros virus como MeV, observándose que en una infección con una cepa virulenta de MeV (AK) se reducen los niveles de pJAK1 en células tratadas con IFN, pero no se alteran los niveles de pTYK2 [40], mientras que la proteína V de una cepa diferente de MeV (G954) inhibe la expresión de pTYK2 por interacción con JAK1 [45].

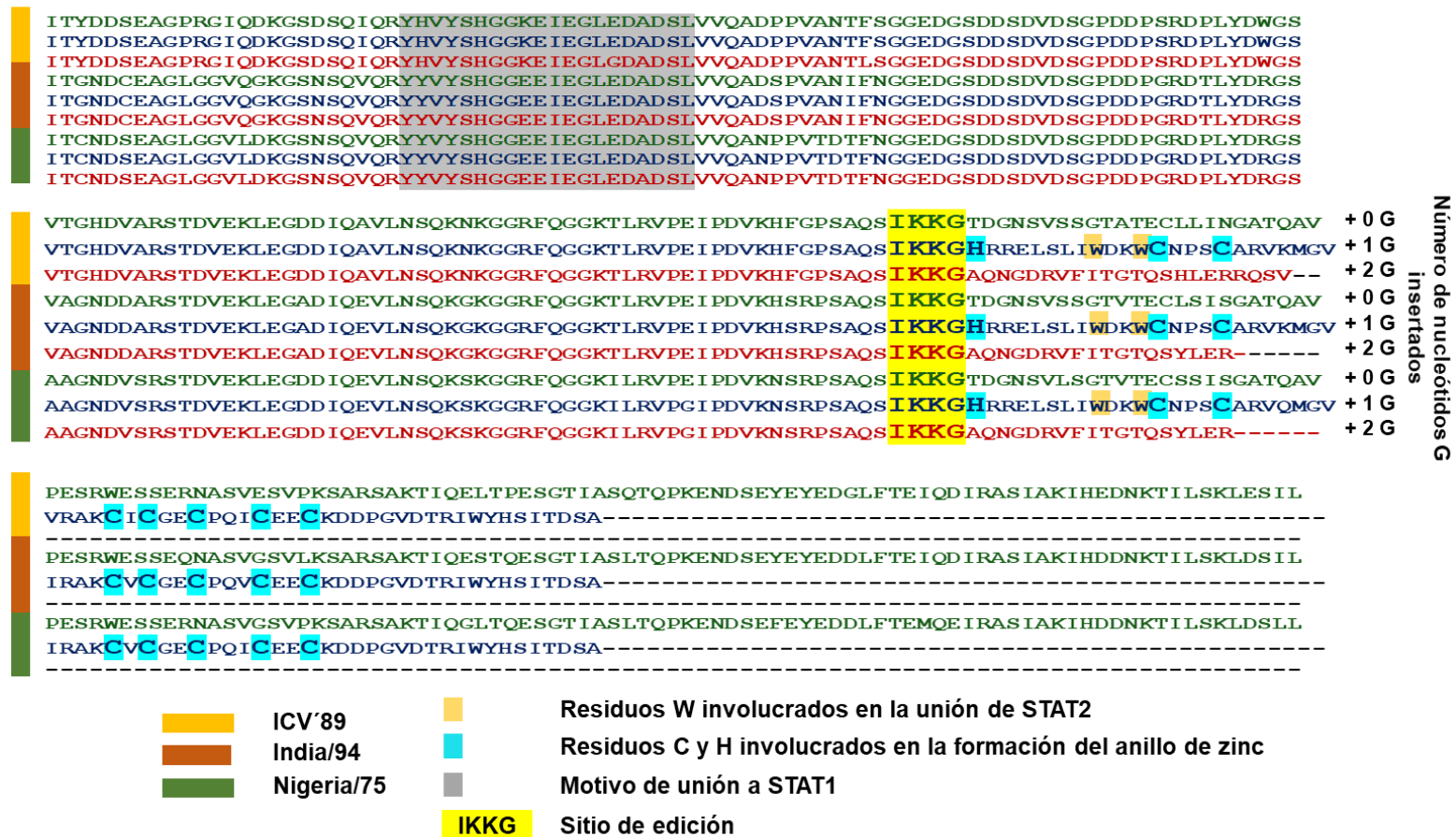
El genoma viral de PPRV codifica seis proteínas estructurales y tres proteínas no estructurales [82]. Las dos proteínas no estructurales V y W se codifican por un fenómeno de co-transcripción utilizado por muchos paramixovirus. Este mecanismo consiste en la inserción de nucleótido/s en un sitio específico de edición, 5'-TTAAAAGGGCACAG-3', localizado entre las posiciones 685-694 del *gen P*, ampliamente descrito en múltiples estudios [113, 226, 227]. El porcentaje de transcripción de las proteínas P, V y W a partir del gen P de los paramixovirus varía mucho entre géneros. Para el caso de NiV es del 33%, 36% y 31% para las proteínas P, V y W, respectivamente y, sin embargo para MeV es del 60%, 35% y 5% para las proteínas P, V y W, respectivamente [228]. La obtención de secuencias del gen P con +2G inserciones en el sitio de edición es muy complicado en morbillivirus ya que la expresión de la proteína W es muy baja en una infección. En nuestro caso, sólo pudimos conseguir amplificar el gen de la proteína W de ICV'89 a partir de una infección celular, por el contrario la W de Nigeria/75 se obtuvo por mutagénesis. En algunos trabajos con RPV y MeV no se pudieron obtener secuencias del *gen P* con +2G inserciones en el sitio de edición [113, 229, 230].

Se realizó un estudio de la secuencia de aminoácidos de la proteína W de tres cepas diferentes de PPRV: ICV'89 perteneciente al linaje I, Nigeria/75 perteneciente al linaje

II e India/94 perteneciente al linaje IV, y se compararon entre ellas y con la secuencia de aminoácidos de la proteína W de RPV y MeV. El análisis de las secuencias reveló que la proteína W de PPRV presenta una cola C-terminal más larga (18-22 aminoácidos) que MeV (5-10 aminoácidos) o RPV (3 aminoácidos) y además entre cepas de diferentes linajes de PPRV también se mostraron diferencias en el tamaño de la cola C-terminal (Figura 1.16), siendo de 22 aminoácidos para ICV'89 y de 18 aminoácidos para Nigeria/75 e India/94. Proponemos que las diferencias de tamaño en el extremo C-terminal pueden dar a la proteína W funciones diferentes entre especies del mismo género e incluso entre cepas de diferentes linajes.

De la proteína W de paramixovirus, se conoce muy poco, siendo actualmente más estudiada por grupos de investigación centrados en otros virus como NiV [114, 115] y RPV [120, 206]. Aquí mostramos por primera vez la secuencia y clonaje de la proteína W de los aislados virulento ICV'89 e India/94 (clonada por mutagénesis a partir de una construcción del gen de la proteína V de India/94) y de la cepa vacunal Nigeria/75. A pesar de haberse demostrado que la proteína W del NiV tiene efecto sobre la respuesta inmune y que se codifica de la misma manera que la W de los morbillivirus, no se ha encontrado homología de de secuencia entre ambas proteínas.





**Figura 1.16. Alineamiento de una parte de las secuencias de aminoácidos de las proteínas P, V y W de 3 cepas de PPRV.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas P (verde), V (azul) y W (rojo) de las cepas ICV'89 (amarillo oscuro), India/94 (marrón) y Nigeria/75 (verde). En gris aparece el dominio de unión a STAT1, en amarillo se recoge el sitio de edición (IKKG) y se marcan los residuos W (marrón claro) y el anillo de zinc (residuos azul claro) implicados en la unión de STAT2

En esta Tesis Doctoral se describe por primera vez el mecanismo de interferencia de la proteína W de PPRV con la señalización del IFN tipo I y II, mediante su interacción con STAT1 y reduciendo los niveles de pTYK2. Al ser una proteína poco estudiada, no encontramos publicaciones donde evaluaran la función de esta proteína sobre esta ruta de señalización. Se han realizado estudios con el dominio N-terminal común entre las proteínas P, V y W (primeros 231 aa) de RPV postulando un mecanismo por el que la proteína W actuaría como antagonista del IFN [120, 206], a través de su interacción con STAT1. Este mecanismo posiblemente sea similar para las proteínas P, V y W de PPRV. Sin embargo, puesto que la proteína W está compuesta por una región C-terminal única de 22 aa más, en el caso de ICV'89, es necesario realizar estudios más específicos para esclarecer su mecanismo de antagonismo con la respuesta del IFN en el caso de PPRV.

Este trabajo ha contribuido a establecer uno de los posibles mecanismos a través de los cuales PPRV afecta a la ruta de inducción y respuesta del IFN tipo I y II. Además, ha permitido comparar el efecto de dos cepas de PPRV una vacunal y una virulenta y determinar las proteínas involucradas en cada mecanismo de evasión del sistema del IFN. Se comprobó que el efecto de evasión de ambas cepas era el mismo, apoyando los datos de que muchas cepas vacunales de morbillivirus inducen una inmunosupresión transitoria en el hospedador, ya que tanto la cepa virulenta como la vacunal tienen un efecto inhibitorio del sistema del IFN. Se pudo confirmar que las proteínas C y V son las responsables de la inhibición de la inducción del IFN y que las proteínas P, V y W lo son de la inhibición de la respuesta del IFN tipo I y II.

En este trabajo se ha esclarecido el mecanismo de actuación de la proteína V de PPRV, ya que mediante su interacción con los factores STAT1 y STAT2 y sin alterar sus niveles de expresión, puede bloquearlos evitando su traslocación al núcleo, inhibiendo la activación de los promotores ISRE o GAS. También se demostró que interactuaba con las quinasas JAK1 y TYK2, reduciendo sus formas fosforiladas. Así, la proteína V interactúa con varios factores y bloquea la ruta en pasos muy tempranos y también tardíos de la señalización. La proteína P y W también interactúan con STAT1 y reducen los niveles de pTYK2. Estos datos pueden sugerir la formación de un complejo de varias proteínas virales interactuando con varios factores involucrados en la respuesta del IFN a nivel del receptor, provocando un bloqueo efectivo en dicha ruta. Esta hipótesis podría asemejarse con el mecanismo propuesto en otro trabajo, en el que se propone que las proteínas C y V de MeV se pueden asociar al receptor IFNAR1 y RACK1 (proteína de unión de la subunidad IFNAR2 del receptor del IFN con STAT1), formando un complejo de varias proteínas virales con factores de la ruta de la respuesta al IFN, bloqueando dicha ruta [40]

## **Capítulo 2. Mecanismo de inhibición de la respuesta al IFN por BTV**



BTV es un fuerte inductor del IFN tipo I pero a pesar de ello, se ha demostrado que es capaz de inhibir la inducción del IFN debido a la interferencia de la proteína NS3 con la ruta de inducción del IFN [170]. También se ha demostrado una implicación de la proteína NS4 de BTV sobre la ruta de inducción, aunque no se conoce el mecanismo [173]. En esta tesis Doctoral se describe que el serotipo 8 de BTV (BTV-8) inhibe la inducción del IFN tipo I y que las proteínas responsables de este efecto son NS3 y NS4.

El efecto de la infección por BTV en la ruta de señalización del IFN tipo I y II no está totalmente caracterizado. Tan solo se conoce que BTV interfiere en la señalización del IFN tipo I mediante el bloqueo de pSTAT1 [181]. En esta Tesis Doctoral se describe que BTV no solo inhibe la inducción de IFN y la señalización del IFN tipo I, sino que además inhibe la señalización del IFN tipo II. Asimismo se demuestra que BTV reduce los niveles de expresión de pSTAT1 y degrada STAT2, mostrando que la proteína NS3 es la responsable. NS3 se une a STAT2 y lo degrada a través del lisosoma por el sistema de ubiquitinación, proponiendo un nuevo mecanismo de modulación del sistema del IFN por un virus.

### 2.1. BTV interfiere con la inducción del IFN y la respuesta al IFN tipo I y II

Para determinar si la infección por BTV interfiere con la ruta de inducción y de señalización del IFN tipo I y II se utilizó un ensayo de expresión génica de la luciferasa bajo distintos promotores.

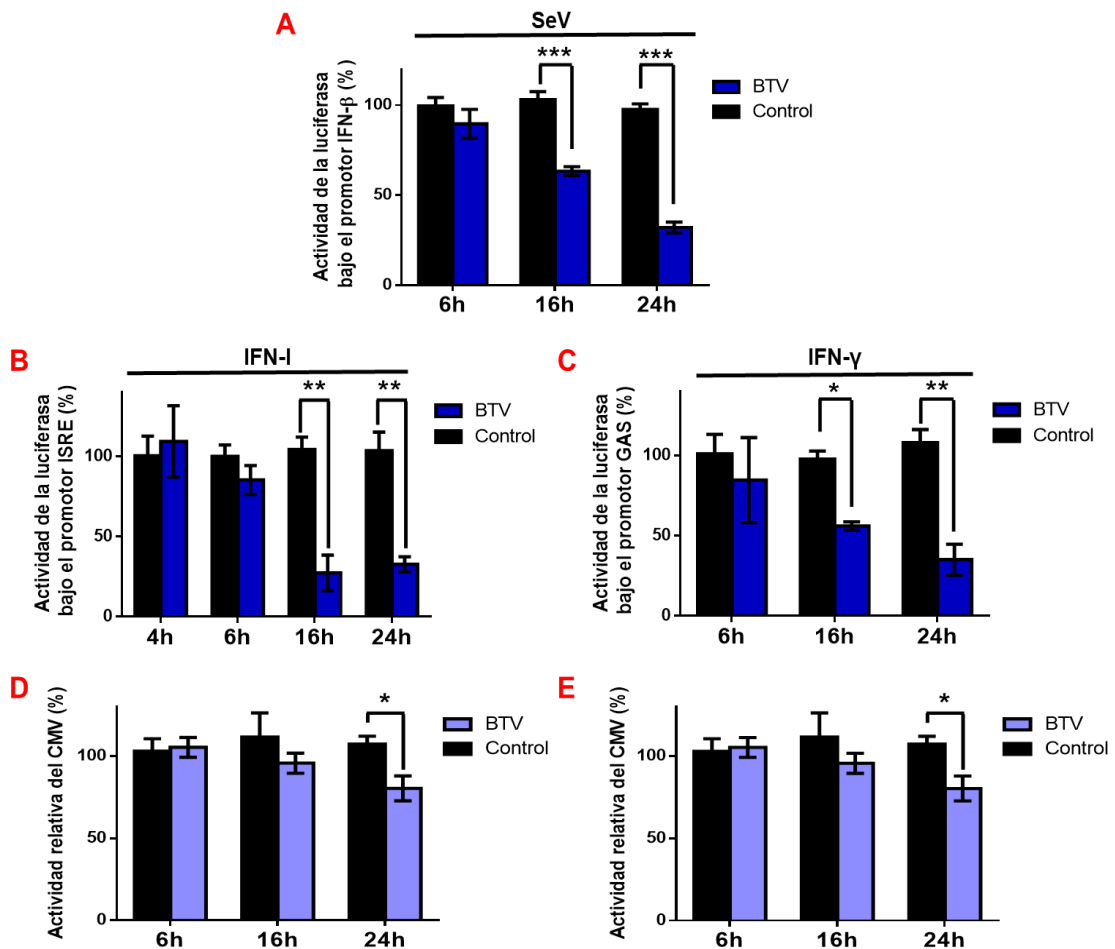
Para el estudio del efecto en la inducción del IFN tipo I se utilizó el plásmido de expresión de luciferasa bajo el promotor del IFN- $\beta$  (pIFN- $\beta$ ). Se utilizaron células Vero debido a que no producen IFN- $\beta$  y así evitar la interferencia con el IFN inducido por la célula ante una infección de BTV. Así, se co-transfectaron células Vero con los plásmidos pIFN- $\beta$  y pNull, un plásmido de control endógeno que expresa la luciferasa renilla. A las 24 hpt las células se infectaron con BTV-8 a una MOI de 1 PFU/célula, y se estimularon con SeV. La luminiscencia se midió a distintos tiempos pi. La actividad luciferasa se redujo significativamente a partir de las 16 hpi, lo que sugiere que BTV interfiere con la inducción del IFN tipo I (Figura 2.1A).

La ruta de señalización del IFN tipo I desencadena la activación del promotor ISRE, induciendo la transcripción de ISGs que confieren un estado antiviral en la célula [233]. Para determinar si la infección por BTV interfiere con la ruta de señalización del IFN tipo I, células HEK-293T se co-transfectaron con los plásmidos pISRE-luc y pNull. A las 24 hpt las células se infectaron con BTV-8 y a continuación se estimularon con IFN tipo I.

La luminiscencia se midió a distintos tiempos pi. Los resultados mostraron que la actividad luciferasa se inhibió significativamente a partir de las 16 hpi, lo que indica que la replicación de BTV interfiere en la señalización del IFN tipo I (Figura 2.1B).

Utilizando el mismo ensayo de expresión génica de la luciferasa se estudió el efecto de la infección por BTV en la ruta de señalización del IFN tipo II. Para ello, se utilizó un plásmido que expresa luciferasa bajo el promotor GAS (pGAS-luc). En estos ensayos células Vero se co-transfectaron con los plásmidos pGAS y pNull y a las 24 hpt se infectaron con BTV-8. A continuación se estimularon con IFN- $\gamma$  se midió la luminiscencia a diferentes tiempos pi. Se observó una disminución de la actividad de la luciferasa a las 16 hpi (Figura 2.1.C).

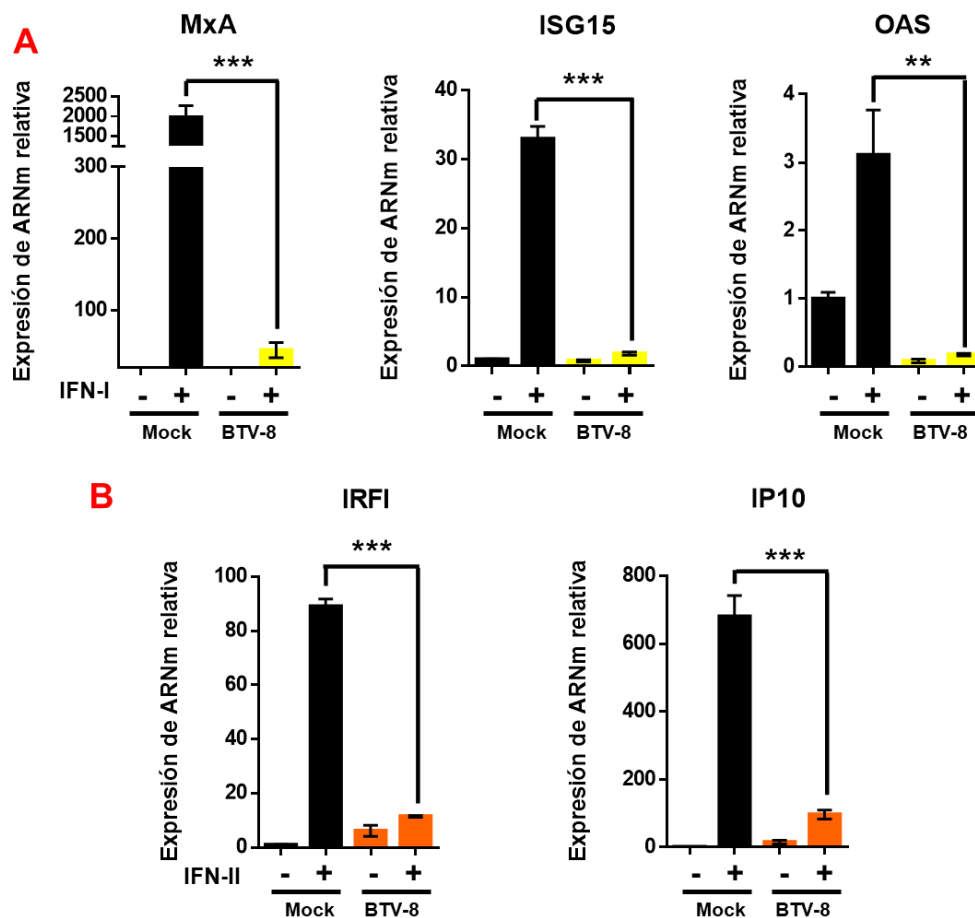
Como control endógeno de la actividad transcripcional en células HEK-293T y Vero infectadas con BTV se realizó un ensayo “reporter” de expresión génica de la luciferasa renilla bajo el promotor del CMV. En ninguno de las dos líneas celulares la actividad relativa de la renilla se vio afectada significativamente por la replicación de BTV-8 a las 16 hpi, aunque a partir de las 24 hpi se empezó a observar una inhibición significativa debido al inicio del efecto citopático producido por BTV (Figura 2.1D y E/Gráfica azul claro). A pesar de ello, la inhibición de la actividad luciferasa de los promotores ISRE/GAS/IFN- $\beta$  es mayor que la inhibición de la actividad renilla, demostrando que el efecto producido en las 3 rutas es específico de BTV.



**Figura 2.1 Efecto de BTV en la inducción de la expresión de luciferasa a partir de los promotores de respuesta al IFN tipo I y II y el promotor de inducción del IFN-β.** Se co-transfectaron células Vero (A y C) o células HEK-293T (B) con los plásmidos pNull, el plásmido vacío (Control) e ISRE (A), GAS (B) o el plásmido de inducción de IFN-β (C) de la manera descrita en Materiales y Métodos. A las 24 hpt, las células se infectaron con BTV-8 a una MOI de 1 PFU/célula. Las células se estimularon con 1000 U/ml de IFN-U (A), 5 ng/ml de IFN-γ (B) o con SeV (dilución 1/100) (C), respectivamente. Después de 4/6, 16 y 24 hpi las células se lisaron y se midieron las actividades de la luciferasa y renilla. El ratio de estas dos actividades se tomó como actividad relativa de la luciferasa. Se representa la expresión de luciferasa obtenida del ratio entre las células estimuladas y no estimuladas con IFN o con SeV y normalizadas con los valores de la renilla, expresada en porcentaje, tomando el resultado de control no infectado como el 100% de estimulación. Se co-transfectaron células HEK-293T (D) o células Vero (E) con 100 ng de ADN del plásmido pGL3-luc y 300 ng de ADN del plásmido pCMV-luc. A las 24 hpt, las células se infectaron con BTV-8 a una MOI de 1 PFU/célula. Después de 4/6, 16 y 24 hpi las células se lisaron y se midieron las actividades de la luciferasa y renilla. El ratio de estas dos actividades se tomó como actividad relativa de la luciferasa. Los datos se sometieron al test estadístico de varianza Anova de dos vías, con una corrección mediante el test de Bonferroni, con un intervalo de confianza de  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) y  $P < 0.001$  (\*\*\*). Las barras de error muestran la desviación estándar (DS) de cada resultado.

## 2.2. BTV inhibe la expresión de ISGs inducidos por el tratamiento con IFN

Dado que habíamos demostrado que la replicación de BTV interfería con las rutas de señalización del IFN tipo I y II, estudiamos el efecto de la replicación de BTV en la expresión de ISGs en células de mamífero. Para estos ensayos se utilizaron células Vero, ya que no inducen IFN pero si responden a la estimulación con IFN tipo I y II. Las células se infectaron con BTV (MOI de 1 PFU/célula) y a las 8 hpi se estimularon con IFN durante 8 h más. A las 16 hpi se determinaron los niveles de expresión de los genes MxA, ISG15 y OAS en respuesta al IFN tipo I, mediante qRT-PCR (Figura 2.2A). Los niveles de expresión de MxA fueron 45 veces, los de ISG15 18 veces y los de OAS 17 veces más bajos en células infectadas con BTV que en células sin infectar y estimuladas con IFN tipo I. De forma similar, se estudiaron los niveles de expresión de IRFI e IP10, como genes representativos inducidos por IFN tipo II (Figura 2.2B). La expresión de IRFI e IP10 en células infectadas con BTV fue de 8 y 7 veces más baja que la expresión de células sin infectar y estimuladas con IFN tipo II, respectivamente. Estos datos confirman la inhibición de las rutas de señalización del IFN tipo I y II por BTV.



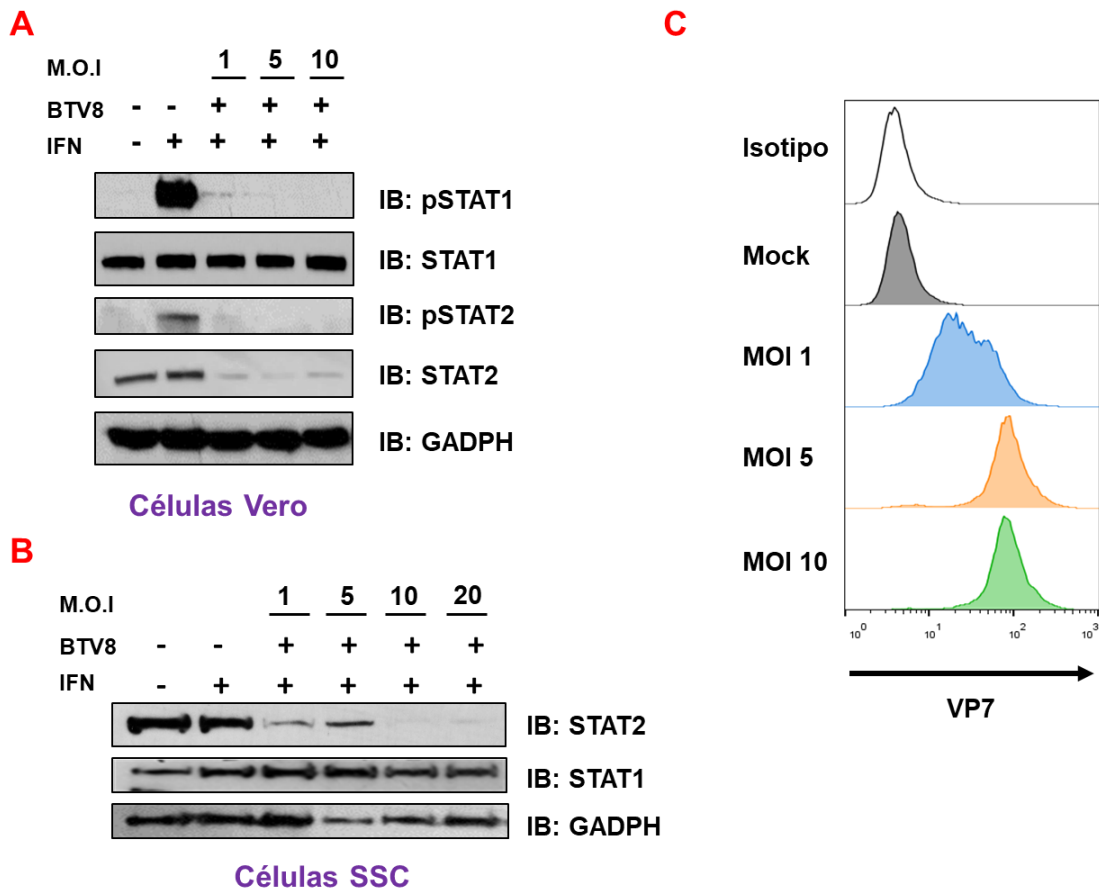


**Figura 2.2. Niveles de expresión de ARNm de ISGs en células de mamífero infectadas con BTV.** (A y B) Se infectaron células Vero con BTV-8 a una MOI de 1 PFU/célula. Tras 8 hpi se estimularon con 1000 U/ml de IFN-U (Amarillo) o con 5 ng/ml de IFN- $\gamma$  (Naranja) durante 8 h. A las 16 hpi las células se lisaron para extraer el ARN y analizar la transcripción de genes relacionados con la señalización del IFN tipo I y II, mediante qRT-PCR. Los valores obtenidos se normalizaron con los del gen endógeno de la subunidad 18 del ribosoma. Los datos representan la media  $\pm$  la DS de cada experimento por triplicado, representativo de dos experimentos independientes. Los datos se sometieron al test estadístico de varianza Anova de dos vías, con una corrección mediante el test de Bonferroni, con un intervalo de confianza de  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) y  $P < 0.001$  (\*\*\*)).

### 2.3. Efecto de BTV en los niveles de expresión STAT1 y STAT2 y sus formas fosforiladas

Los resultados obtenidos en los ensayos anteriores demostraban la inhibición de las rutas de señalización del IFN tipo I y II en células infectadas con BTV, por lo que se estudió el efecto del virus en los niveles de expresión de los factores de transcripción STAT1 y STAT2 total y sus fosforilados, ya que la fosforilación de STAT1 y STAT2 permite la formación de homodímeros STAT1-STAT1 en el caso del IFN tipo II y heterodímeros STAT1-STAT2 para IFN tipo I, lo que conduce a la activación de los promotores ISRE y GAS, respectivamente [10, 231]. Para ello, se infectaron células Vero con BTV a diferentes MOI (1, 5, 10 PFU/célula), se estimularon con IFN y los lisados celulares obtenidos se analizaron mediante *Western blot* (Figura 2.3A). Los niveles de STAT1 en células infectadas con BTV permanecieron constantes, sin embargo los niveles de STAT2, disminuyeron. Se observó el mismo efecto en una línea celular ovina (SSC) (Figura 2.3B), indicando que la degradación de STAT2 inducida por BTV se produce en células del propio hospedador.

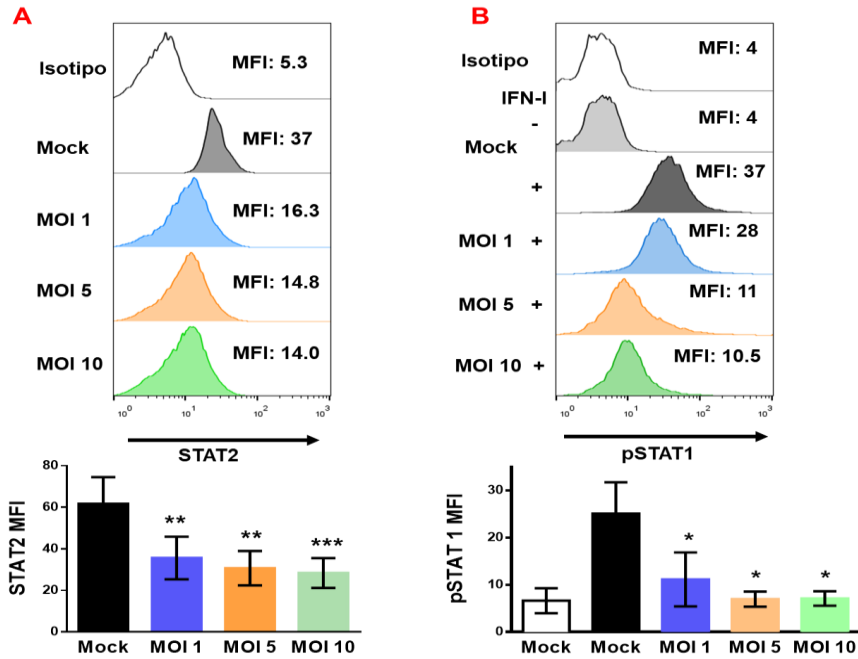
Además, los niveles de pSTAT1 y pSTAT2 desaparecieron totalmente en células Vero infectadas con BTV a cualquier MOI (Figura 2.3A). En las células SSC de oveja no se pudo comprobar ese efecto debido a que los anticuerpos comerciales empleados no funcionaron en células de oveja. Dado que solo disponemos en el laboratorio de un anticuerpo comercial que reconoce un epítipo conformacional en VP7, por lo cual no funcionó en *Western blot*, los niveles de infección con BTV en estos experimentos se confirmaron mediante citometría de flujo. (Figura 2.3C).

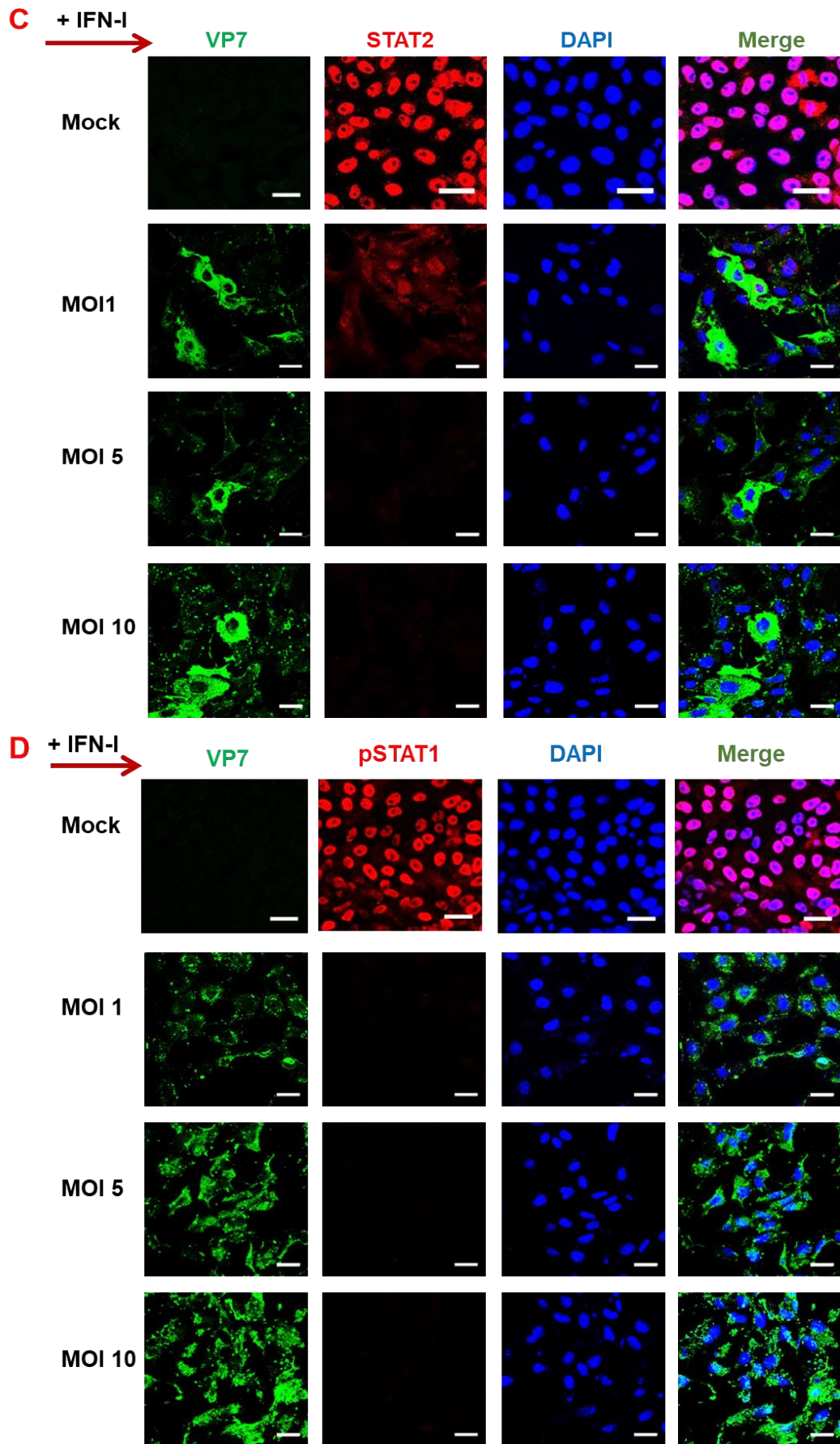


**Figura 2.3. BTV reduce los niveles de expresión de pSTAT1 y pSTAT2 y degrada STAT2.** A) Inmunoblot (IB) de células Vero no infectadas (Mock) o infectadas con BTV-8 a la MOI indicada, durante 16 h. Después de 16 hpi las células se estimularon con 1000 U/ml de IFN-U durante 30 min, y después se lisaron. Los lisados se analizaron mediante *Western blot* con los anticuerpos contra pSTAT1, STAT1, pSTAT2, STAT2 y GADPH, respectivamente. Como control de carga se utilizó la proteína GADPH. (B) IB de células SSC, siguiendo la misma técnica que el apartado (A). Los lisados se analizaron por *Western blot* utilizando los anticuerpos contra STAT1, STAT2 y GADPH, respectivamente. Como control de carga se utilizó la proteína GADPH. (C) Se infectaron células Vero con BTV-8 a diferentes MOI (1, 5 y 10 PFU/célula). A las 16 hpi las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con un anticuerpo contra la proteína VP7 de BTV para analizar las muestras mediante la técnica de citometría de flujo.

Para confirmar los datos obtenidos mediante *Western blot* se determinaron los niveles de STAT2 total y pSTAT1 mediante citometría de flujo (Figura 2.4A y B). La degradación de STAT2 se confirmó en células infectadas con BTV mediante esta técnica, ya que se detectó una disminución significativa de más de un 50% en la intensidad de fluorescencia media (MFI) de STAT2 después de la infección con BTV (Figura 2.4A). Del mismo modo, los análisis de citometría de flujo confirmaron una reducción significativa de más de un 70 % en la MFI de pSTAT1 en células infectadas con BTV en MOI de 5 y 10 PFU/célula (Figura 2.4B). Asimismo, se determinaron los niveles de STAT2 mediante microscopía de fluorescencia, observándose que STAT2 se expresaba en células sin infectar y estimuladas con IFN, pero no se detectaba en células

infectadas con BTV a diferentes MOI (Figura 2.4C). La expresión de pSTAT1 no se pudo detectar en células infectadas con BTV, mientras que células sin infectar mostraron su expresión y su traslocación al núcleo después del tratamiento con IFN (Figura 2.4D). Todos estos datos indican que BTV degrada STAT2 y reduce los niveles de pSTAT1 y pSTAT2 en respuesta a la estimulación con IFN.

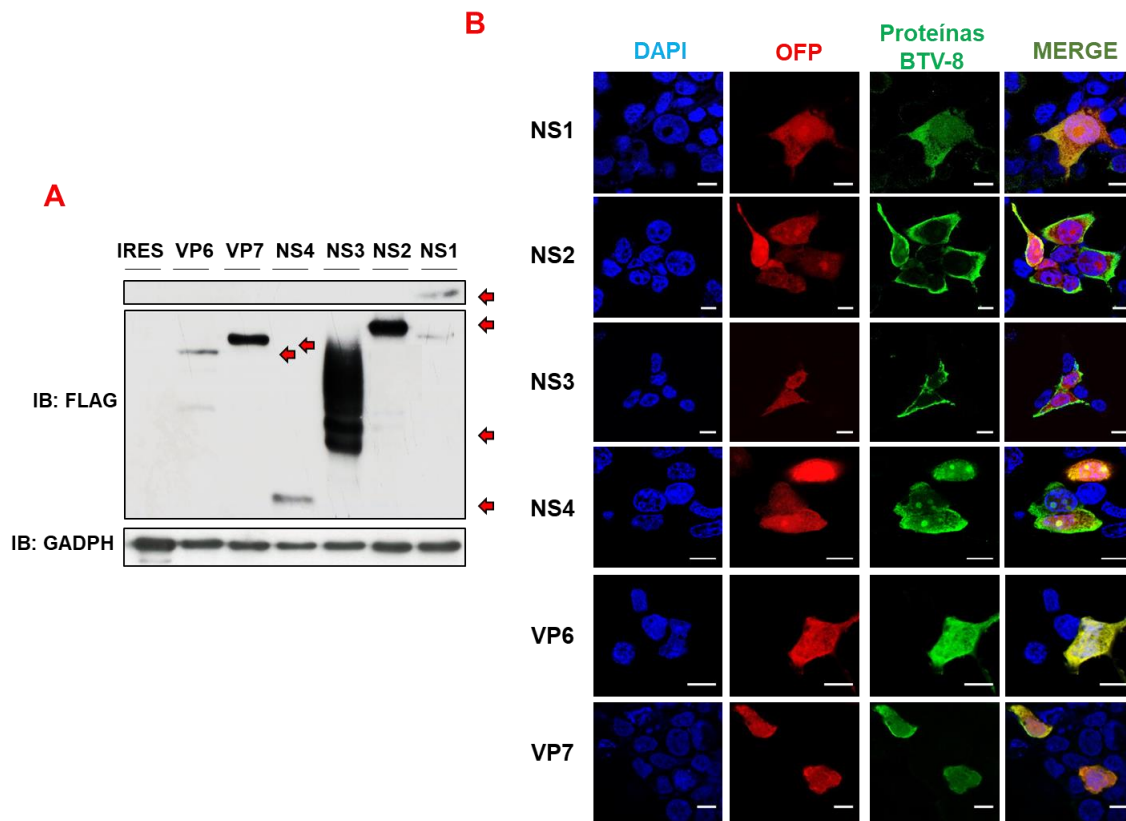




**Figura 2.4. BTV degrada STAT2 y bloquea la translocación al núcleo de pSTAT1.** Células Vero fueron infectadas con BTV-8 a diferentes MOI (1, 5 y 10 UFP/célula). A las 16 hpi las células fueron tratadas con 1000 U/ml de IFN-U durante 30 min. Para citometría de flujo (A y B) las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con anticuerpos contra STAT2 total, pSTAT1. Los datos de citometría de flujo representan la media  $\pm$  la DS de tres experimentos independientes (A y B). Se analizó por la prueba estadística de análisis de varianza ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni, con intervalos de confianza de  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) y  $P < 0.001$  (\*\*\*). Para la inmunofluorescencia (C y D) las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con anticuerpos contra STAT2 total, pSTAT1, la proteína VP7 de BTV (descrito en Materiales y Métodos) y el ADN nuclear se tiñó con DAPI (azul). Las imágenes fueron tomadas por microscopía confocal. (Barra de escala = 30  $\mu$ m).

### 2.4. Obtención y caracterización de las proteínas VP6, VP7, NS1, NS2, NS3 y NS4 de BTV

Con el objetivo de determinar qué proteína de BTV era responsable de la inhibición de la ruta de señalización del IFN tipo I y II por BTV, se clonaron amplificando mediante RT-PCR los genes que codifican las proteínas VP6, VP7, NS1, NS2, NS3 y NS4 de BTV-8. A partir de ARN extraído de células infectadas con BTV-8 se generaron un total de 6 construcciones, en un vector de expresión de células de mamíferos (pIRES-OFP). Se analizó la expresión y localización celular de las proteínas de BTV mediante la detección del epítipo FLAG expresado en su extremo carboxilo. Para determinar la expresión de las proteínas se realizó un *Western blot* de las proteínas extraídas de células transfectadas con los distintos plásmidos de expresión construidos, comprobando que la migración de las proteínas corresponde con los pesos moleculares descritos y atribuidos a cada proteína (VP6: 35 kDa, VP7: 38 kDa, NS1: 61 kDa, NS2: 39 kDa, NS3: 25 kDa y NS4: 12 kDa) (Figura 2.5A). Los análisis de inmunofluorescencia mostraron la localización celular esperada para cada proteína: VP7 y VP6 se expresaron en el citoplasma [232]; NS4 se localizó tanto en el citoplasma como en el núcleo, y se acumuló en los nucléolos [233]; NS2 se localizó en el citoplasma, donde forma cuerpos de inclusión [234]; NS1 se localizó en los túbulos citoplasmáticos [155] y NS3 se localizó en las membranas plasmáticas y el aparato de Golgi [235] (Figura 2.5B).



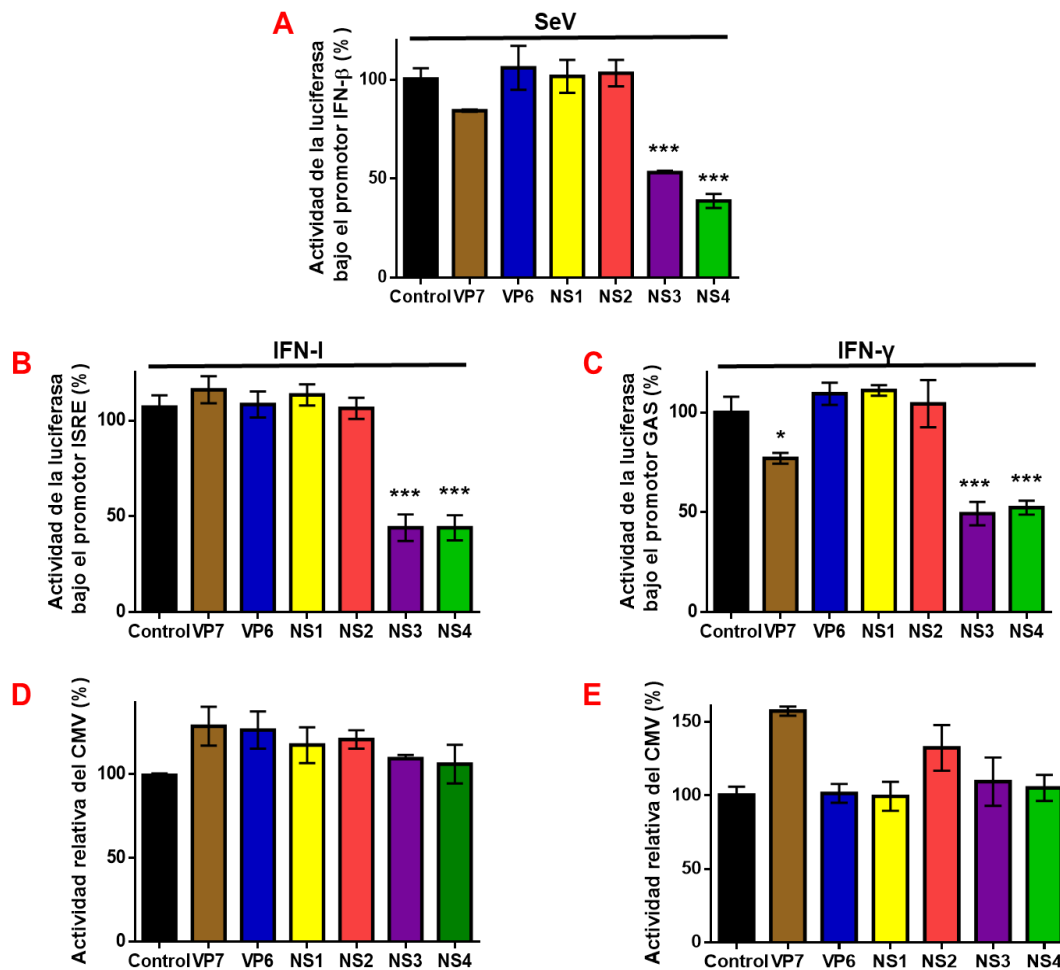
**Figura 2.5. Expresión y localización celular de las proteínas VP6, VP7, NS1, NS2, NS3 y NS4 de BTV-8.** Se transfectaron células HEK-293T con los plásmidos que expresan las proteínas VP6, VP7, NS1, NS2, NS3 y NS4 de BTV-8. (A) Se detectó la expresión de las proteínas por *Western blot* utilizando un anticuerpo contra el epítipo FLAG. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. (B) Se detectó la expresión de las proteínas mediante inmunofluorescencia de células Vero transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas de BTV, fijadas, permeabilizadas e incubadas con un anticuerpo contra el epítipo FLAG (verde). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul), y se muestra la expresión de la OFP en rojo y, la expresión de las proteínas en verde. Las imágenes se observaron mediante microscopía confocal. (Barra de escala = 10  $\mu$ m).

## 2.5. Las proteínas NS3 y NS4 de BTV bloquean la inducción del IFN y la señalización del IFN tipo I y II

Se realizó un ensayo luciferasa similar al del Apartado 2.1., con el objetivo de identificar las proteínas de BTV implicadas en la inhibición de la actividad de los promotores de inducción del IFN- $\beta$  estimulando con SeV, del promotor ISRE mediante tratamiento con IFN tipo I y/o del promotor GAS estimulando con IFN- $\gamma$ .

Se examinó el potencial de las proteínas de BTV para modular la activación del promotor de inducción del IFN tipo I inducido por la infección con SeV como estímulo en células co-transfectadas con pIFN- $\beta$ -Luc y pNull (Figura 2.6A). La actividad del promotor de inducción del IFN- $\beta$  se redujo en células que expresan NS3 o NS4, pero no en el control o células que expresan VP6, VP7, NS1 o NS2.

Se co-transfectaron células HEK-293T con los plásmidos pISRE-Luc, pNull y el plásmido que expresa cada proteína de BTV. A las 24 hpt las células se estimularon durante 16 h con IFN tipo I y los lisados celulares se analizaron para determinar la actividad luciferasa. Se obtuvo como resultado que las células que expresaban las proteínas NS3 o NS4 reducían significativamente la actividad luciferasa en comparación con el control (células transfectadas con el plásmido vacío) o con las células que expresaban las proteínas VP7, VP6, NS1 o NS2 (Figura 2.6B). Se utilizó el mismo ensayo para determinar el efecto de la expresión de las proteínas de BTV sobre la activación del promotor GAS después del tratamiento con IFN tipo II. La actividad de la luciferasa bajo el control del promotor GAS no se vio afectada por la expresión de VP7, VP6, NS2, NS1 o por el plásmido vacío (Figura 2.6C). Sin embargo, las células que expresan las proteínas NS3 o NS4 mostraron una actividad luciferasa dirigida por GAS significativamente reducida. Los niveles de expresión de la renilla bajo el promotor del CMV se analizaron para excluir la posibilidad de que la reducción en la actividad luciferasa inducida por ISRE, GAS o IFN- $\beta$  fuere causada por una inhibición general de la expresión génica de NS3 o NS4 (Figura 2.6). En todos los experimentos la expresión de las proteínas de BTV no alteraron la actividad de la renilla, lo que confirma que NS3 y NS4 inhiben específicamente la producción del IFN tipo I y la activación del IFN tipo I y II.

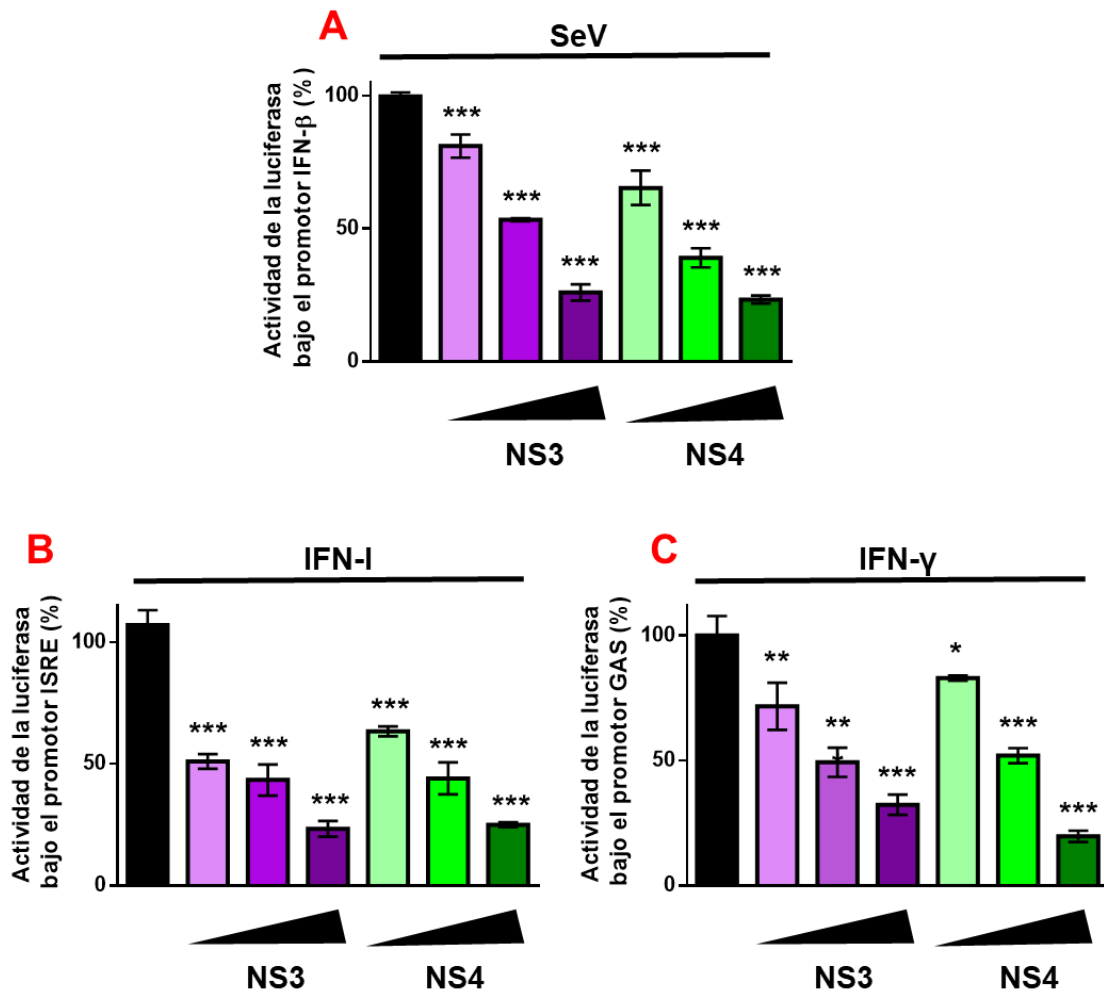


**Figura 2.6.** Las proteínas NS3 y NS4 de BTV inhiben las rutas de señalización del IFN tipo I y II y la ruta de inducción del IFN a través de los promotores ISRE, GAS y el promotor de inducción del IFN-β, respectivamente. (A y C) Células Vero o células HEK-293T (B) fueron co-transfectadas con los plásmidos pNull e pIFN-β (A), ISRE (B), GAS (C) y con 300 ng de ADN de los plásmidos que expresan las proteínas VP7 (marrón), VP6 (azul), NS1 (amarillo), NS2 (rojo), NS3 (morado) y NS4 (verde) de BTV-8, o el plásmido vacío (negro) usado como control, tal y como está descrito en Materiales y Métodos. A las 24 hpt se estimularon con 1000 U/ml de IFN-U (A), con 5 ng/ml de IFN-γ (B) o con SeV (dilución 1/100). A las 16 hpe, las células se lisaron para medir la luminiscencia de la luciferasa y la renilla. El ratio de estas dos actividades se tomó como la actividad relativa de la luciferasa. Los resultados se expresan en porcentaje del ratio entre las estimuladas y no estimuladas con SeV, considerando el resultado del control el 100% de estimulación. Se co-transfectaron células HEK-293T (D) o células Vero (E) con 100 ng de ADN del plásmido pGL3-luc, 300 ng de ADN del plásmido pCMV-luc y 300 ng de ADN de los plásmidos que expresan las proteínas de BTV. A las 24 hpt, las células se lisaron y se midieron las actividades de la luciferasa y renilla. El ratio de estas dos actividades se tomó como actividad relativa de la luciferasa. Los datos se sometieron al test estadístico de varianza Anova de dos vías, con una corrección mediante el test de Bonferroni, con un intervalo de confianza de  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) y  $P < 0.001$  (\*\*\*). Las barras de error muestran la desviación estándar (DS) de cada resultado.

Además, la expresión en cantidades crecientes de las proteínas NS3 y NS4 mostró que ambas proteínas inhiben la actividad del promotor de inducción del IFN-β y de los promotores ISRE, GAS de una manera dependiente de la dosis (Figura 2.7). Todos



estos datos indican que las proteínas NS3 y NS4 contribuyen al antagonismo viral de la producción del IFN tipo I y de la señalización del IFN tipo I y II.

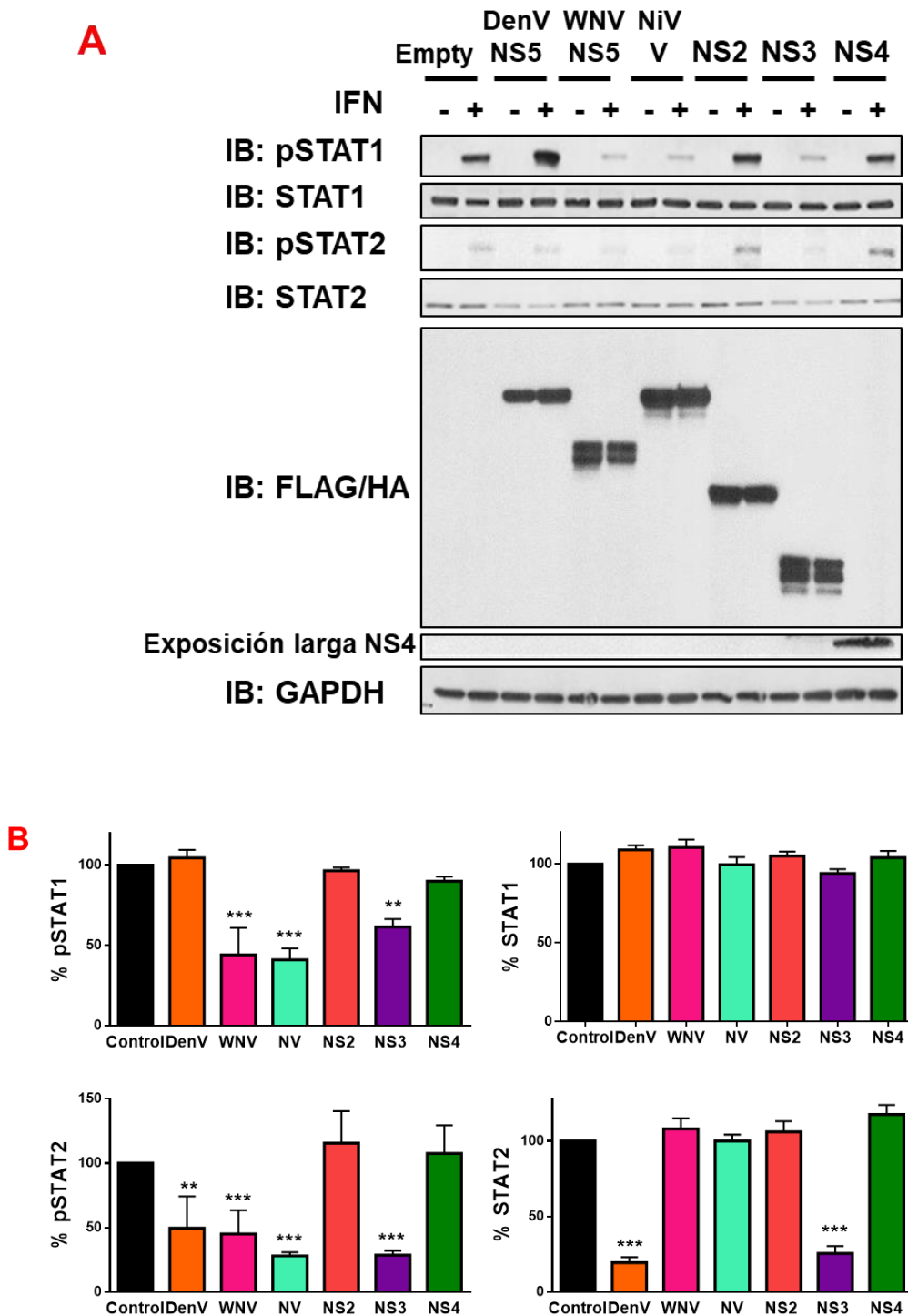


**Figura 2.7.** Las proteínas NS3 y NS4 de BTV inhiben las rutas de señalización del IFN tipo I y II y la ruta de inducción del IFN a través de los promotores ISRE, GAS y el promotor de inducción del IFN-β, respectivamente, de manera dependiente de dosis. (A y C) Células Vero o células HEK-293T (B) se co-transfectadas con los plásmidos pNull, pIFN-β (A), ISRE (B), GAS (C), pIFN-β (A) y con 600, 300 y 50 ng de ADN de los plásmidos que expresan las proteínas NS3 (morado) y NS4 (verde) de BTV-8, o el plásmido vacío (negro) utilizado como control, tal y como está descrito en Materiales y Métodos. A las 24 hpt se estimularon con 1000 U/ml de IFN-U (A), con 5 ng/ml de IFN-γ (B) o con SeV (dilución 1/100). A las 16 hpe, las células se lisaron para medir la luminiscencia de la luciferasa y la renilla. El ratio de estas dos actividades se tomó como actividad relativa de la luciferasa. Los resultados se expresan en porcentaje del ratio entre las células estimuladas y no estimuladas con SeV, considerando el resultado del control el 100% de estimulación. Los datos se sometieron al test estadístico de varianza Anova de dos vías, con una corrección mediante el test de Bonferroni, con un intervalo de confianza de  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) y  $P < 0.001$  (\*\*\*). Las barras de error muestran la desviación estándar (DS) de cada resultado.

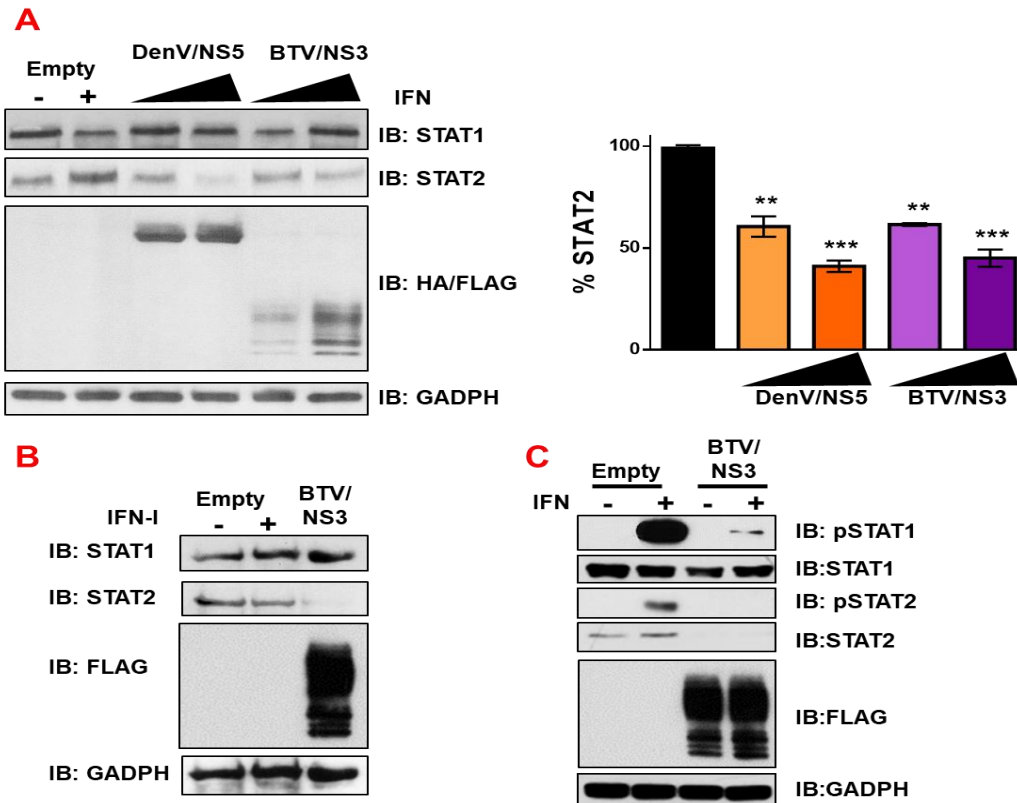
### **2.6. La proteína NS3 de BTV degrada STAT2 y reduce los niveles de expresión de pSTAT1**

Para investigar el mecanismo por el cual las proteínas NS3 y NS4 de BTV interfieren con la ruta de señalización del IFN tipo I y II se monitorizaron los niveles de expresión de STAT1/2 totales y sus formas fosforiladas en células HEK-293T, antes y después de ser estimuladas con IFN tipo I. Para la realización de este ensayo se utilizaron como controles positivos los plásmidos que expresan la proteína NS5 de DenV que degrada STAT2 [55], la proteína NS5 de WNV que inhibe la fosforilación de STAT1 [190] y la proteína V de NiV que se une a STAT1 y STAT2 evitando la traslocación al núcleo [114, 191, 192]. Como control negativo se utilizó el plásmido vacío (pIRES-cOFP). Los niveles de STAT1 totales se mostraron constantes en células HEK-293T transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas de BTV. En cambio los niveles de STAT2 totales se reducen en presencia de la proteína NS3 de BTV (Figura 2.8A), del mismo modo que con la proteína NS5 de DenV utilizada como control positivo, sugiriendo que NS3 podría desempeñar un papel en la degradación de STAT2. Esta reducción en los niveles de STAT2 es dependiente de la dosis de expresión de la proteína NS3 de BTV (Figura 2.9A), de forma similar a la proteína NS5 de DenV. Los niveles de pSTAT2 son reducidos en los controles positivos (DenV/NS5, WNV/NS5 y NiV/V) y en células transfectadas con el plásmido que expresa la proteína NS3 de BTV (Figura 2.8A). Para determinar si la reducción de los niveles de STAT2 inducida por NS3 también se produce en células del hospedador natural, se llevó a cabo un ensayo en células ovinas SSC transfectadas con el plásmido que expresa la proteína NS3 de BTV (Figura 2.9B). La expresión de NS3 también reduce los niveles de STAT2 en células ovinas, indicando que NS3 induce la degradación de STAT2 en el hospedador natural.

Los niveles de pSTAT1 disminuyen en los controles positivos y cuando se expresaba la proteína NS3. Para comprobar esta disminución de los niveles de pSTAT1, se cuantificaron tres experimentos diferentes normalizando con los niveles de GADPH, observándose una disminución estadísticamente significativa de pSTAT1 en presencia de la proteína NS3 (Figura 2.8B). Además, se comprobó que la inhibición de los niveles de pSTAT1 en presencia de la proteína NS3 de BTV fue más pronunciada en células Vero, que son defectuosas en el gen del IFN- $\beta$  (Figura 2.9C), que en células HEK-293T que retienen la capacidad de producción del IFN tipo I.

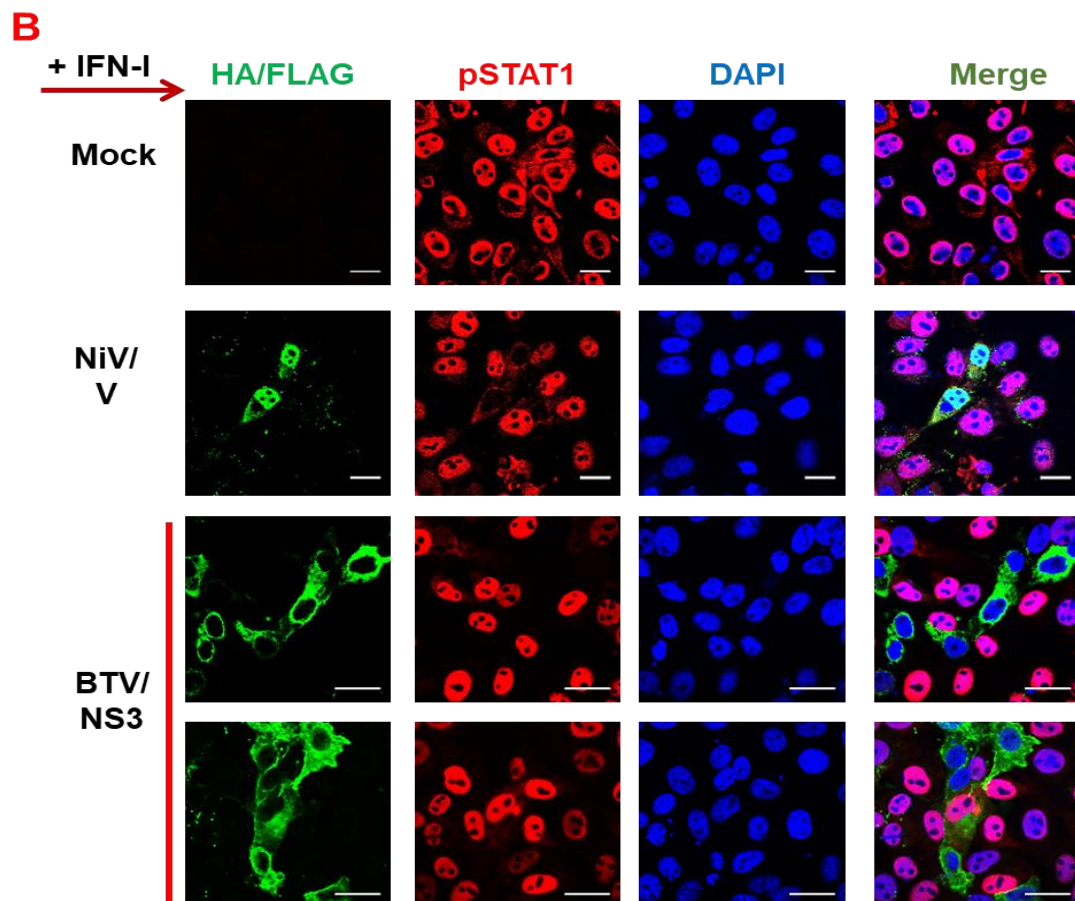
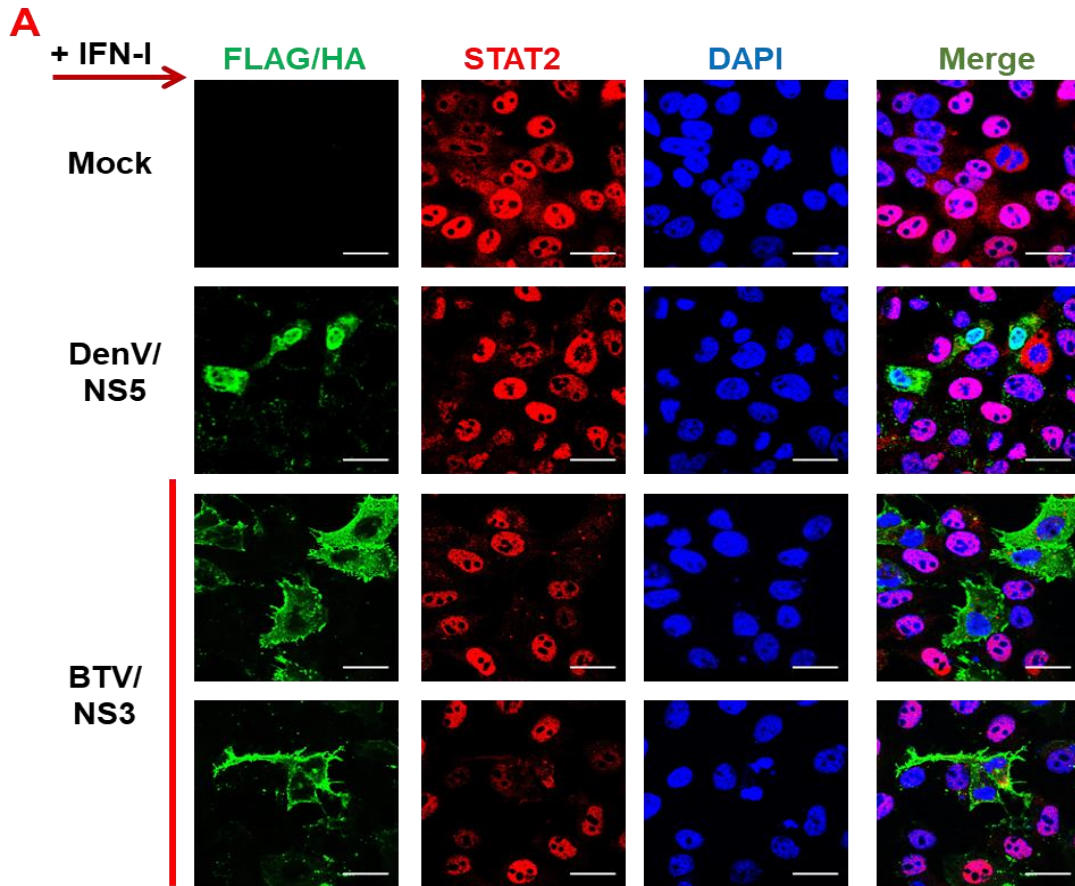


**Figura 2.8. La proteína NS3 de BTV reduce levemente los niveles de pSTAT1 y degrada STAT2.** (A) Inmunoblot de células HEK-293T transfectadas con 500 ng de ADN de los plásmidos que expresan las proteínas NS5/WNV (HA), NiV/V (HA), DenV/NS5 (HA) y BTV/NS2/NS3/NS4 (FLAG) y el plásmido vacío (empty). Las células se estimularon con 1000 U/ml de IFN-U durante 30 min. Los lisados se analizaron mediante *Western blot* empleando los anticuerpos contra pSTAT1, STAT1, pSTAT2, STAT2, GAPDH, respectivamente. La expresión de las proteínas se detectó utilizando anticuerpos contra el epítipo FLAG y HA. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. (B) Análisis por densitometría de los niveles de expresión de los IB de pSTAT1, STAT1, pSTAT2, STAT2, normalizados con los niveles de expresión de GAPDH. Los datos representan la media  $\pm$  la DS de tres experimentos independientes. Los datos se sometieron al test estadístico de varianza Anova de dos vías, con una corrección mediante el test de Bonferroni, con un intervalo de confianza de  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) y  $P < 0.001$  (\*\*\*)



**Figura 2.9. La proteína NS3 de BTV degrada STAT2 de manera dependiente de dosis y reduce los niveles de pSTAT1.** (A) IB de células HEK-293T transfectadas con 500 ng y 1 µg de ADN de los plásmidos que expresan las proteínas DenV/NS5 (HA), BTV/NS3 (FLAG) y el plásmido vacío (empty). Las células se estimularon con 1000 U/ml de IFN-U durante 30 min. Los lisados se analizaron mediante *Western blot* empleando los anticuerpos contra STAT1, STAT2, GADPH. La expresión de las proteínas se detectó utilizando anticuerpos contra el epítipo FLAG y HA. Como control de carga se utilizó la proteína GADPH. Análisis por densitometría de los niveles de expresión del IB de STAT2 normalizados con los niveles de expresión de GADPH. Los datos representan la media  $\pm$  la DS de tres experimentos independientes. Los datos se sometieron al test estadístico de varianza Anova de dos vías, con una corrección mediante el test de Bonferroni, con un intervalo de confianza de  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) y  $P < 0.001$  (\*\*\*). (B) IB de células SSC o (C) células Vero transfectadas con el plásmido que expresa la proteína NS3 de BTV, sorteadas mediante citometría de flujo, e incubadas con anticuerpos contra STAT1, STAT2, pSTAT1 (C), pSTAT2 (C), FLAG y GADPH, respectivamente.

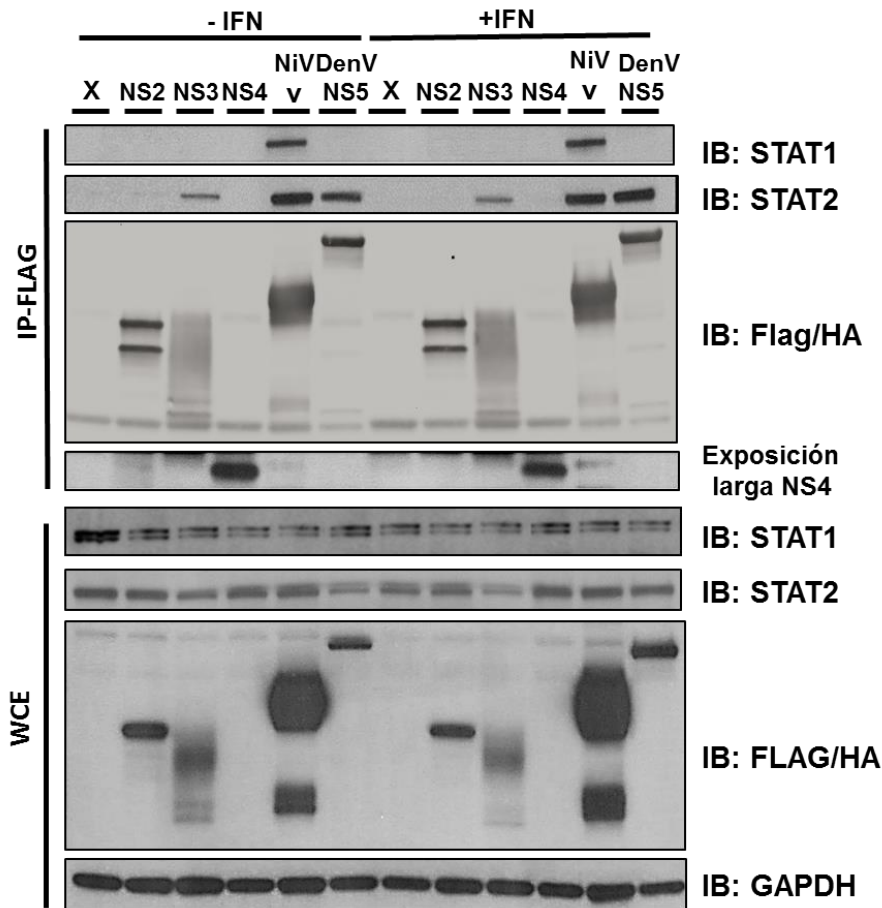
Para confirmar la degradación de STAT2 y la inhibición de la fosforilación de STAT1 por la proteína NS3 de BTV, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en células Vero. Como control positivo para la degradación de STAT2 se utilizó el plásmido que expresa la proteína NS5 de DenV. En células transfectadas con el plásmido que expresa NS3 de BTV no se detectaba la expresión de STAT2, del mismo modo que en presencia de la proteína NS5 de DenV (Figura 2.10A). Células Vero transfectadas con el plásmido que expresaba la proteína NS3 de BTV mostraban una inhibición de los niveles de pSTAT1 y de su posterior translocación al núcleo, del mismo modo que las células que expresaban la proteína V de NiV, utilizadas como control positivo (Figura 2.10B).



**Figura 2.10. La proteína NS3 de BTV degrada STAT2 y bloquea la traslocación al núcleo de STAT1.** Inmunofluorescencia de células Vero transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas NiV/V (HA), DenV/NS5 (HA) y BTV/NS3 (FLAG). A las 24 hpt las células se estimularon con 1000 U/ml de IFN-U durante 30 min y se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con anticuerpos contra STAT2 total (rojo) (A), pSTAT1 (rojo) (B) y contra los epítomos HA/FLAG (verde). El ADN nuclear se tiñó con DAPI (azul). Las preparaciones se observaron mediante microscopía confocal. (Barra de escala = 20  $\mu$ m).

### 2.7. La proteína NS3 de BTV interacciona con STAT2

En base a los datos obtenidos, en los que la proteína NS3 de BTV degrada STAT2 e inhibe la fosforilación de STAT1, se estudió la interacción de la proteína NS3 de BTV con los factores de transcripción STAT1 y STAT2. Para ello se llevó a cabo un ensayo de inmunoprecipitación, utilizando como controles positivos la proteína NiV/V que se une a STAT1 y STAT2 [114] y la proteína DenV/NS5 que se une a STAT2 [55], junto con las proteínas NS2/NS3/NS4 de BTV. Se incluyó un control negativo con el plásmido vacío (X). Los resultados mostraron que la proteína NS3 de BTV se une a STAT2 pero no a STAT1, independientemente del tratamiento con IFN tipo I (Figura 2.11). No se observó ninguna interacción de las demás proteínas de BTV analizadas con STAT1 o STAT2. Estos datos, junto con los obtenidos en los ensayos de inmunofluorescencia y *Western Blot* indican que NS3 se une específicamente a STAT2 e induce su degradación.

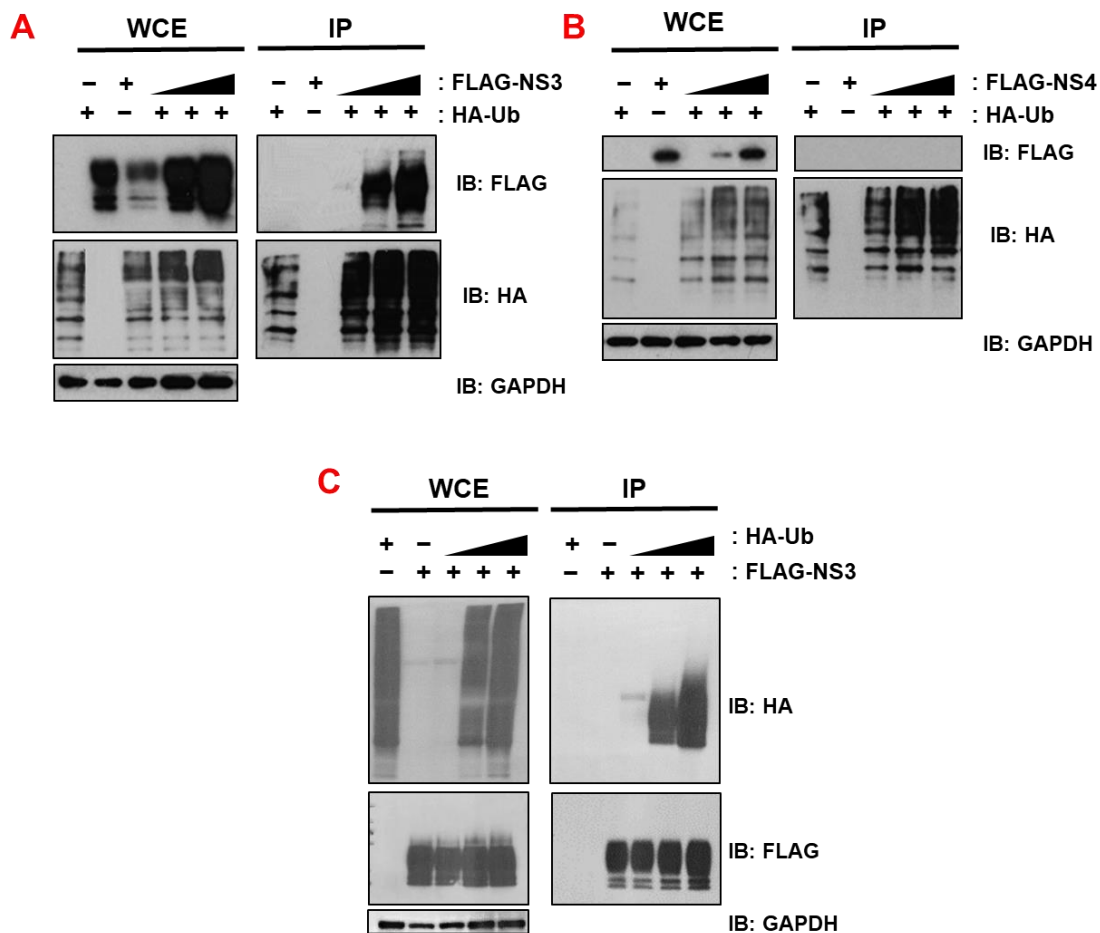


**Figura 2.11. La proteína NS3 de BTV se une a STAT2.** Inmunoprecipitación de células HEK-293T transfectadas con 2µg de ADN de los plásmidos que expresan las proteínas NiV/V (HA), DenV/NS5 (HA), BTV/NS2/NS3/NS4 (FLAG) o el plásmido vacío (X). A las 48 hpt se recogieron los lisados celulares y se separaron en alícuotas para estudiar el extracto celular total (WCE) y el resto se incubó toda la noche a 4°C en agitación orbital, con la resina de afinidad anti-HA o anti-FLAG dependiendo del tag que presenta la proteína a inmunoprecipitar (descrito en Materiales y Métodos). Las muestras correspondientes al WCE y las muestras inmunoprecipitadas se analizaron, mediante un gel de electroforesis SDS-PAGE seguido por transferencia a membranas de nitrocelulosas incubadas con anticuerpos contra STAT1, STAT2, HA, FLAG y GAPDH, respectivamente.

### 2.8. La proteína NS3 de BTV está ubiquitinada

Los virus pueden utilizar la proteína Ub del hospedador para marcar diferentes factores de la respuesta inmunitaria y dirigir dichos factores ubiquitinados a su degradación, como un mecanismo para evadir la respuesta inmune [236]. Además, el patrón de expresión de la proteína NS3 de BTV observado mediante *Western Blot* sugiere la posible ubiquitinación de la proteína. Para comprobar si NS3 se unía a Ub, se realizó un ensayo de IP. Para ello, células HEK-293T se co-transfectaron con cantidades crecientes de los plásmidos que expresan las proteínas NS3 y NS4 de BTV con un tag FLAG junto con la misma cantidad de ADN del plásmido que expresa la proteína Ub con un tag HA. Los lisados celulares se incubaron con anticuerpos con una resina de

afinidad contra el epítipo HA y se revelaron con un anticuerpo contra el epítipo FLAG (Figura 2.12A y B). Los datos mostraron que la Ub se une específicamente a la proteína NS3 pero no a la proteína NS4 (Figura 2.12A y B). Para confirmar la unión se realizó una inmunoprecipitación inversa donde células HEK-293T se co-transfectaron con cantidades crecientes de un plásmido que expresa Ub con un tag HA junto con la misma cantidad de ADN del plásmido que expresa la proteína NS3 de BTV con un tag FLAG, mostrando del mismo modo una unión específica entre la Ub y la proteína NS3 (Figura 2.12C).

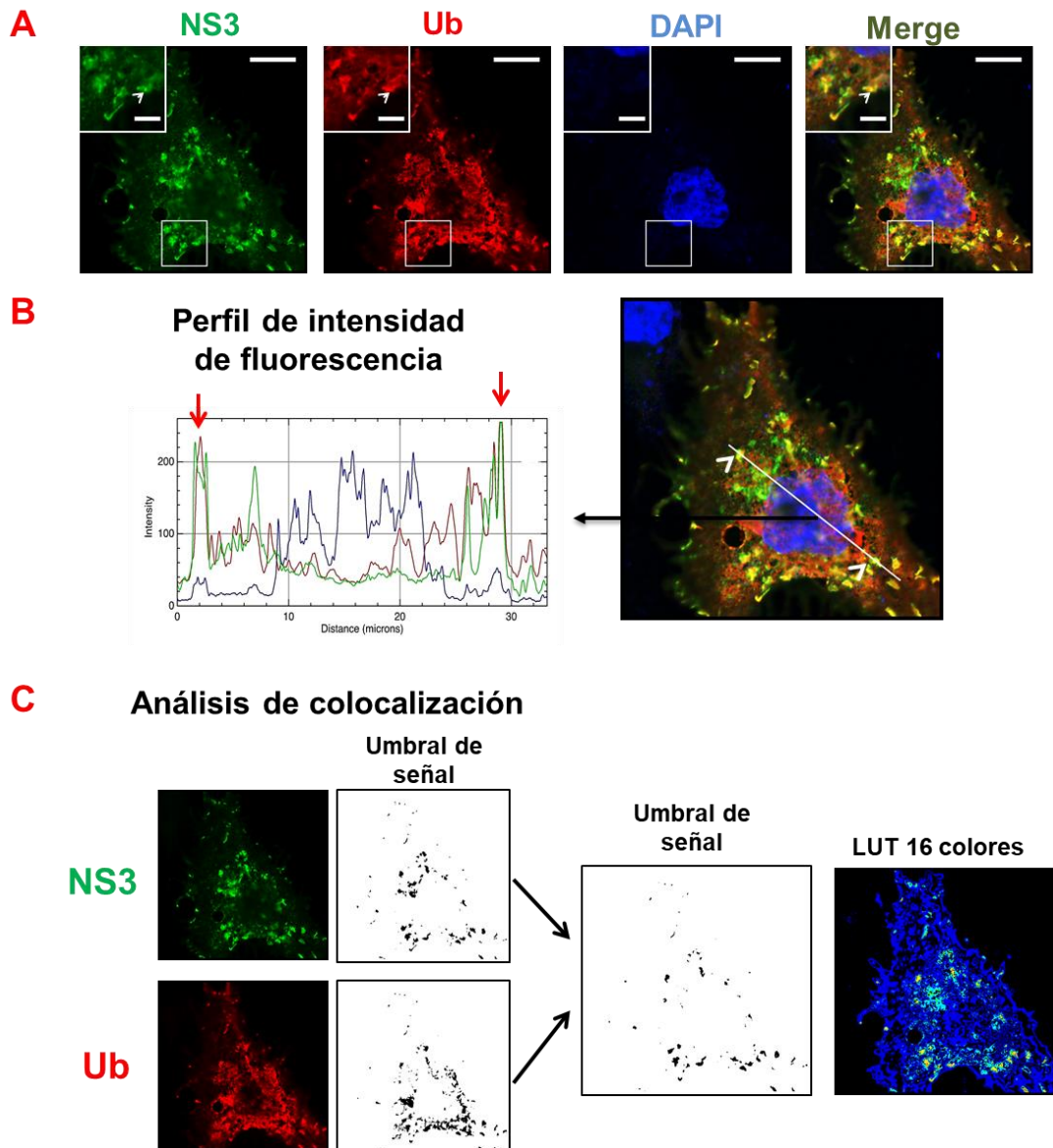


**Figura 2.12. La proteína NS3 de BTV está ubiquitinada.** (A y B) IP de células HEK-293T co-transfectadas con cantidades crecientes de ADN de los plásmidos que expresan las proteínas NS3 y NS4 de BTV (FLAG) (100ng, 500ng y 1µg) y con 500 ng de ADN del plásmido que expresa la proteína Ub (HA). A las 48 hpt se recogieron los lisados celulares y se separaron en alícuotas para estudiar el extracto celular total (WCE) y el resto fue incubado toda la noche a 4°C en agitación orbital, con la resina de afinidad anti-HA (descrito en Materiales y Métodos). (C) IP de células HEK-293T co-transfectadas con cantidades crecientes de ADN del plásmido que expresa la proteína Ub (HA) (100ng, 500ng y 1µg) y con 500 ng de ADN del plásmido que expresa la proteína BTV/NS3 (FLAG). A las 48 hpt se recogieron los lisados celulares y se separaron en alícuotas para estudiar el extracto celular total (WCE) y el resto fue incubado toda la noche a 4°C en agitación orbital, con la resina de afinidad anti-FLAG (descrito en Materiales y Métodos). Las muestras correspondientes al WCE y las muestras inmunoprecipitadas se analizaron, mediante



un gel de electroforesis SDS-PAGE seguido por transferencia a membranas de nitrocelulosas incubadas con anticuerpos contra los epítomos HA y FLAG y contra GADPH, respectivamente.

Para apoyar los datos aportados por el ensayo de IP, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en células HEK-293T co-transfectadas con los plásmidos HA-Ub y FLAG-NS3, observándose una colocalización de las señales de fluorescencia entre las expresiones de las proteínas Ub y NS3 (Figura 2.13). Todos estos datos indican que la proteína NS3 está ubiquitinada.



**Figura 2.13. Colocalización de NS3 con Ub por microscopía confocal y super-resolución airyscan.** Inmunofluorescencia de células Vero co-transfectadas con 500 ng de ADN de los plásmidos que expresan las proteínas HA-Ub (rojo) y FLAG-NS3 (verde). El ADN fue teñido con DAPI (azul). (A) Se muestra un plano z para cada canal y los canales combinados (merge) (barra de escala = 10  $\mu$ m). El recuadro muestra en más detalles un ejemplo de colocalización de la señal de NS3 y Ub indicado por las puntas de flechas (barra de escala = 3  $\mu$ m). (B) Perfil de intensidad de fluorescencia de los 3 canales (verde: NS3; rojo Ub; azul: DAPI) en la sección indicada en la imagen de canales combinados. Las puntas de flechas en la imagen y las flechas

rojas en el perfil de intensidad de fluorescencia indican la coincidencia de señal de NS3 y Ub. (C) Usando el programa ImageJ, se determinó el umbral de señal de fluorescencia para NS3 y Ub, y se utilizó la función "image calculator" para detectar los píxeles donde ambas señales coinciden. Esta coincidencia de señal se ha representado en blanco y negro con el umbral de señal, y como un mapa de calor aplicando el filtro LUT 16 colores (rojo alta coincidencia de señal; azul baja coincidencia de señal).

### **2.9. La proteína NS3 de BTV se ubiquitina en las lisina 13 y 15 y recluta una E3 ligasa para degradar STAT2**

Un análisis *in silico* de predicción de posibles sitios de ubiquitinación mostró que la proteína NS3 presenta dos supuestos residuos de lisina en las posiciones 13 y 15 susceptibles a ser ubiquitinados [237]. Para confirmar la ubiquitinación de NS3 e identificar su sitio de ubiquitinación, se mutaron los supuestos residuos de lisina de unión a Ub mediante una sustitución de un residuo lisina por un residuo arginina, produciéndose 3 mutantes: NS3-K13R, NS3-K15R y un doble mutante NS3-K13 /15R (Figura 2.14A). Asimismo, la proteína NS3 de BTV presenta un motivo PPRY altamente conservado que recluta a la proteína NEDD4, enzima E3 ligasa [169, 238]. Para determinar si el dominio de reclutamiento de E3 ligasa participa en la ubiquitinación de NS3 se mutó el motivo PPRY a AARH (Figura 2.14A). Se co-transfectaron los mutantes de NS3 que expresan el epítipo FLAG junto con el plásmido que expresa HA-Ub y se realizó una IP para NS3 usando una resina de afinidad anti-FLAG. La inmunotransferencia se reveló con un anticuerpo contra el epítipo HA para detectar la Ub. Todos los mutantes, excepto el doble mutante NS3-K13/15R, fueron capaces de unirse a la Ub (Figura 2.14B). Estos datos indican que NS3 está ubiquitinada en los residuos K13 y K15, y que el motivo PPRY no participa en la ubiquitinación NS3. Para apoyar estos datos se realizó una inmunoprecipitación donde células HEK-293T se co-transfectaron con cantidades crecientes del plásmido que expresa el mutante NS3-K13/15R con un tag FLAG junto con la misma cantidad de ADN del plásmido que expresa la proteína Ub con un tag HA. Los lisados celulares se incubaron con anticuerpos con una resina de afinidad contra el epítipo HA y se revelaron con un anticuerpo contra el epítipo FLAG. Se observó que el mutante de NS3 perdió la unión específica con Ub (Figura 2.14C).

También se determinó la unión de STAT2 a los mutantes de NS3. Los resultados mostraron que tanto los mutantes simples como el doble mutante, o el que tiene mutado el dominio PPRY se unen a STAT2, lo que indica que la unión de STAT2 a NS3 es independiente de su estado de ubiquitinación y la presencia del motivo PPRY. Cuando los niveles de expresión de STAT2 se evaluaron en el WCE, solo la NS3 *wild type* (WT) pudo reducir los niveles de expresión de STAT2. Estos datos indican que la

ubiquitinación en ambas lisinas (13 y 15) de NS3 es necesaria para la degradación de STAT2. Además, la recuperación de los niveles de STAT2 en células transfectadas con el plásmido que expresa el mutante NS3 PPRY/AARH implica que, además de la ubiquitinación de NS3, se requiere el motivo PPRY para la degradación de STAT2.

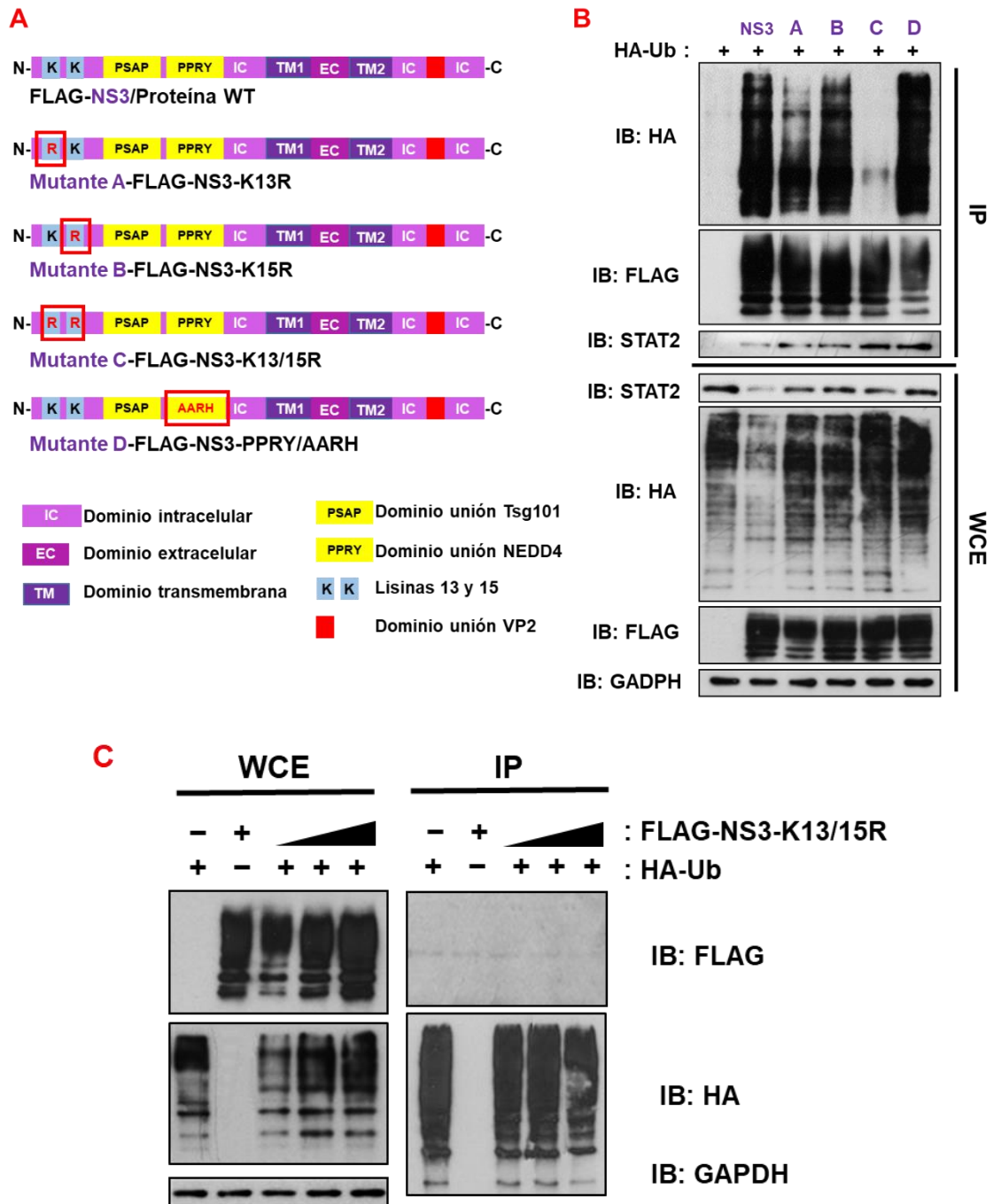
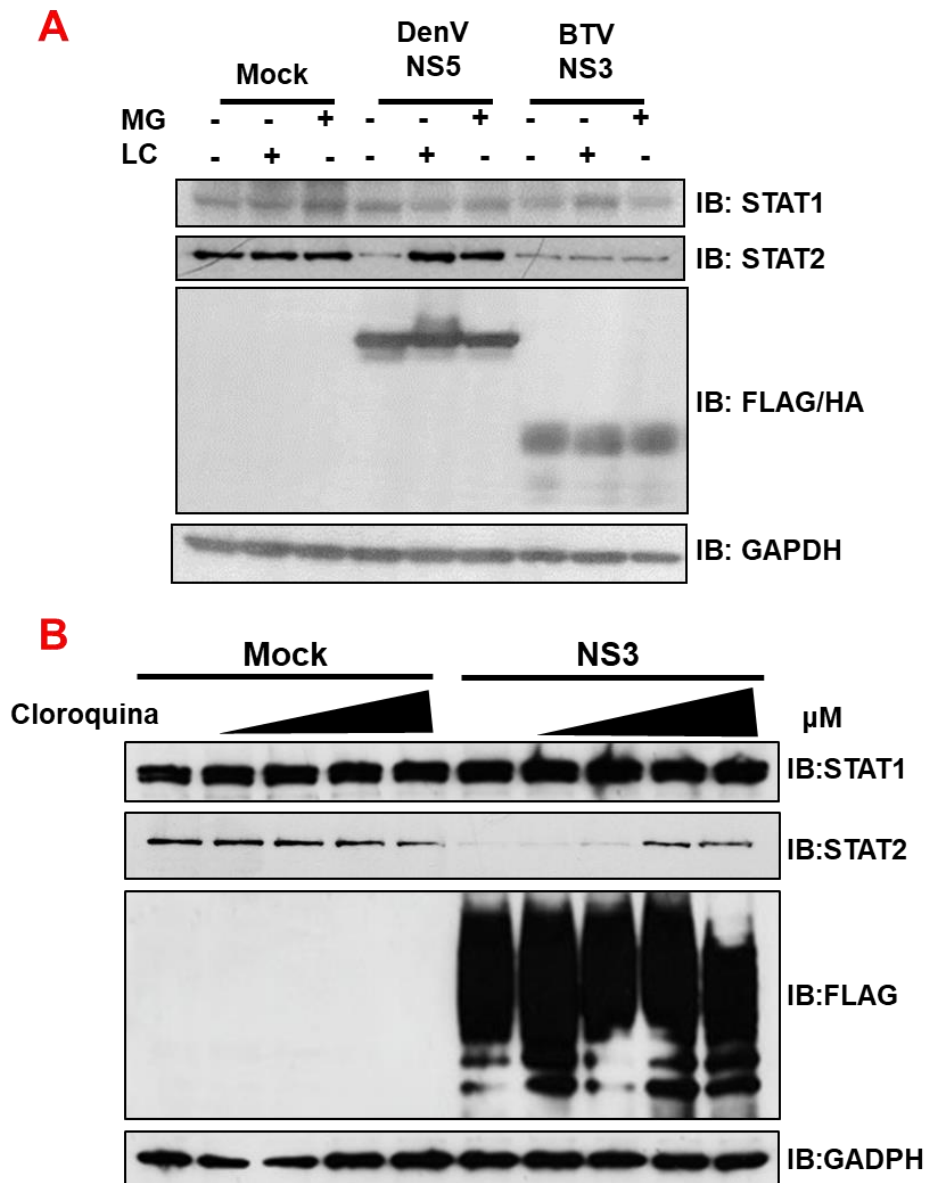


Figura 2.14. La proteína NS3 de BTV se ubiquitina en los residuos K13 y K15 y necesita del dominio PPRY para la degradación de STAT2. (A) Esquema representativo de la estructura de la proteína NS3 de BTV donde se marcan los aminoácidos mutados (recuadros en rojo) elegidos para la creación de los 4 mutantes de NS3. (B) IP de células HEK-293T co-transfectadas con 1µg de ADN de los plásmidos que expresan los mutantes de NS3 (FLAG) (Mutante A: NS3-K13R, Mutante B: NS3-K15R, Mutante C: NS3-K13/15R y Mutante D: NS3-PPRY/AARH) junto

con 1 µg de ADN del plásmido que expresa la Ub (HA). A las 48 hpt se recogieron los lisados celulares y se separaron en alícuotas para analizar el extracto celular total (WCE) y el resto fue incubado toda la noche a 4°C en agitación orbital, con la resina de afinidad anti-FLAG (descrito en Materiales y Métodos). (C) IP de células HEK-293T co-transfectadas con cantidades crecientes de ADN con el plásmido que expresa el mutante NS3-K13/15R de BTV (FLAG) (100ng, 500ng y 1 µg) y con 500 ng de ADN del plásmido que expresa la proteína Ub (HA). A las 48 hpt se recogieron los lisados celulares y se separaron en alícuotas para estudiar el extracto celular total (WCE) y el resto fue incubado toda la noche a 4°C en agitación orbital, con la resina de afinidad anti-HA. Las muestras correspondientes al WCE y las muestras inmunoprecipitadas se analizaron, mediante un gel de electroforesis SDS-PAGE seguido por transferencia a membranas de nitrocelulosas incubadas con anticuerpos contra los epítomos HA, FLAG y STAT2 y GADPH, respectivamente.

### 2.10. La proteína NS3 de BTV degrada STAT2 por la vía lisosomal

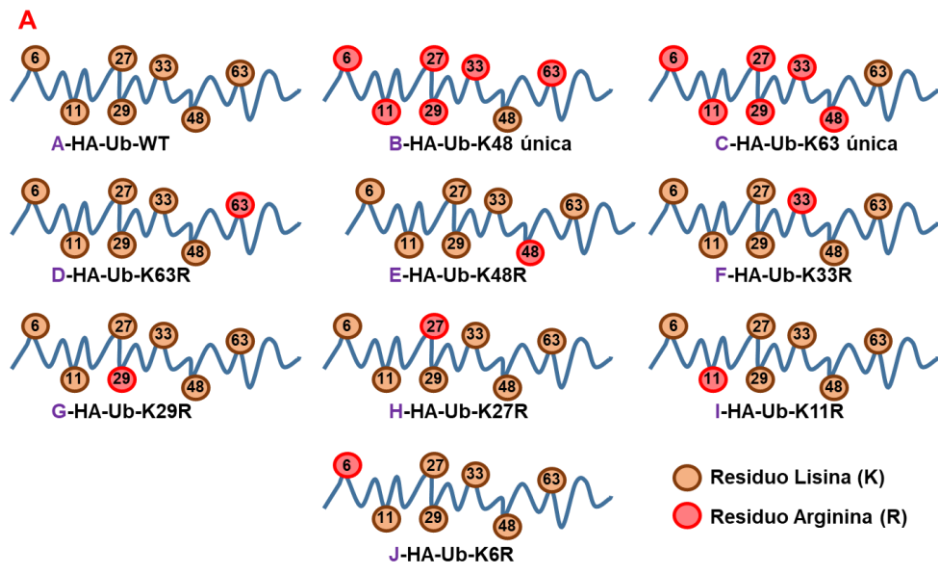
En general, las cadenas de poli-Ub, excepto las cadenas K63, dirigen los sustratos hacia el proteasoma [239]. En cambio, la formación de cadenas de poli-Ub K63 dirigen los sustratos a la vía lisosomal para su degradación [240]. Para estudiar si la degradación de STAT2 por la proteína NS3 de BTV se produce por la vía del proteasoma o por la vía lisosomal, células HEK-293T fueron transfectadas con el plásmido que expresa la proteína NS3 de BTV y tratadas con dos inhibidores del proteasoma: MG132 y lactacistina o con un inhibidor de la acidificación de los lisosomas, la cloroquina. Los niveles de expresión de STAT2 fueron cuantificados por *Western Blot*, mostrando que la inhibición del proteasoma no afectó a la degradación de STAT2 en células que expresan NS3. En cambio, en células que expresaban la proteína NS5 de DenV se observó una recuperación de los niveles de STAT2 en las células tratadas con los inhibidor del proteasoma [55]. Estos datos sugieren que la degradación de STAT2 por la proteína NS3 de BTV ocurre por una ruta alternativa a la degradación vía proteasoma (Figura 2.15A). En el caso de las células que expresan NS3 y tratadas con diferentes concentraciones de cloroquina se observó una recuperación de los niveles de expresión de STAT2 de una manera dependiente de dosis (Figura 2.15B), sugiriendo que la vía lisosomal está implicada en la degradación de STAT2 por NS3.

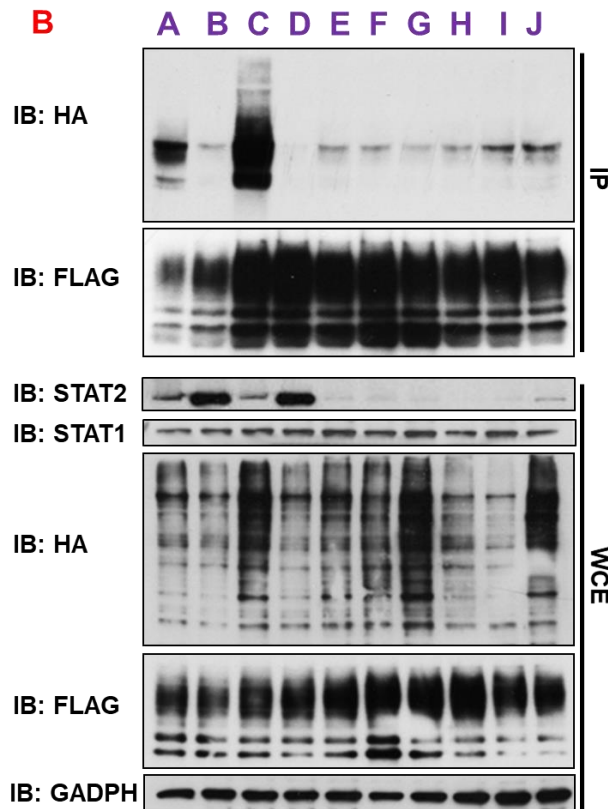


**Figura 2.15. La proteína NS3 de BTV degrada STAT2 por la vía lisosomal.** (A) Inmunoblot de células HEK-293T transfectadas con el plásmido de expresión de la proteína NS3 de BTV y el plásmido de expresión de la proteína NS5 de DenV tratadas con inhibidores del proteasoma MG132 (MG) y lactacistina (LC) a una concentración 20  $\mu$ M. (B) IB de células HEK-293T transfectadas con el plásmido de expresión de la proteína NS3 de BTV y tratadas con una concentración creciente de un inhibidor de la acidificación lisosomal (cloroquina). Se utilizaron controles sin transfectar y sin tratar en cada caso. Los lisados fueron analizados mediante *Western blot* empleando los anticuerpos contra STAT1, STAT2, FLAG y GAPDH, respectivamente. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH.

La Ub tiene siete lisinas (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63) involucradas en la formación de las cadenas de poliubiquitinación [241]. Por ello, se planteó determinar el tipo de cadena de poli-Ub de la proteína NS3 necesaria para la degradación de STAT2. Células HEK-293T se co-transfectaron con el plásmido de expresión de la proteína NS3 y con diferentes mutantes de la Ub, en los que los residuos de lisina fueron sustituidos

por arginina (Figura 2.16A) y se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación. Los resultados mostraron que las cadenas de poli-Ub estaban unidas a K63 ya que la expresión del mutante Ub-K63R (D) reduce los niveles de expresión de la inmunoprecipitación con NS3 y la expresión del mutante Ub-K63 única (C) se une más eficientemente con NS3, en comparación con UB-WT (Figura 2.16B). Los mutantes de NS3 con Ub-K63R (D) y Ub-K48 única (B) no degradaron STAT2, por lo que la cadena de poli-Ub K63 es esencial para la degradación de STAT2 (Figura 2.16B).





**Figura 2.16. La proteína NS3 de BTV forma cadenas de poli-Ub K63 involucradas en la degradación de STAT2.** (A) Esquema representativo de la estructura de la proteína Ub y los residuos mutados (lisinas-marrón/arginina-rojo) elegidos para la creación de los 9 mutantes de Ub. (B) IP de células HEK-293T co-transfectadas con 1  $\mu$ g de ADN de los plásmidos que expresan los mutantes de Ub (HA) (A: Ub-WT, B: Ub-K48 única, C: Ub-K63 única, D: Ub-K63R, E: Ub-K48R, F: Ub-K33R, G: Ub-K29R, H: Ub-K27R, I: Ub-K11R y J: Ub-K6R) junto con 1  $\mu$ g de ADN del plásmido que expresa la NS3 (FLAG). A las 48 hpt se recogieron los lisados celulares y se separaron en alícuotas para estudiar el extracto celular total (WCE) y el resto fue incubado, toda la noche a 4°C en agitación orbital, con la resina de afinidad anti-FLAG (descrito en Materiales y Métodos). Las muestras correspondientes al WCE y las muestras inmunoprecipitadas se analizaron, mediante un gel de electroforesis SDS-PAGE seguido por transferencia a membranas de nitrocelulosas incubadas con anticuerpos contra los epítopos HA, FLAG y STAT1, STAT2 y GADPH, respectivamente.

## **Discusión Capítulo 2**

**“Lo más incomprensible acerca de este mundo es que es comprensible”**

*Albert Einstein (1879-1955)*





Los virus han desarrollado múltiples estrategias para contrarrestar la respuesta antiviral del hospedador, permitiendo su evasión y replicación en células del hospedador. Entre estas estrategias se encuentra la degradación de factores claves involucrados en la respuesta al IFN a través del sistema endógeno de ubiquitinación. Este sistema marca proteínas mediante el anclaje de cadenas de poli-Ub K48 que dirigen el sustrato al proteasoma, para su degradación [55, 56, 242]. En esta Tesis Doctoral se demuestra que BTV inhibe la señalización del IFN tipo I y II mediante la degradación de STAT2, identificando a la proteína NS3 como antagonista del IFN mediante la interacción con STAT2 que conduce a su degradación. Además, se determina que la proteína NS3 está poliubiquitinada por cadenas de poli-Ub K63 que dirigen a STAT2 a su degradación a través de la vía lisosomal. Recientemente se ha demostrado que la proteína NS2B de DenV degrada el sensor citoplasmático cGAS a través del lisosoma [243], pero los resultados de esta Tesis describen por primera vez un mecanismo de degradación que utiliza el sistema de ubiquitinación para degradar una proteína mediante la vía lisosomal.

Se ha demostrado previamente por otros grupos que BTV es un fuerte inductor del IFN [176-178], pero capaz de inhibir la inducción del IFN tipo I en células epiteliales. Esta inhibición está mediada por la proteína NS3 que interfiere en la ruta de inducción en un paso entre la activación del sensor citoplasmático RIG-I y las quinasas TBK1/IKKε [170]. Recientemente se ha demostrado que la proteína NS4 presenta un efecto antagónico con la inducción del IFN [173]. En esta Tesis Doctoral se confirma que BTV interfiere con la ruta de inducción del IFN mostrado por la inhibición del promotor de inducción del IFN-β en un ensayo de luciferasa. Asimismo, se muestra que BTV interfiere con la ruta de señalización del IFN tipo I al inhibir la activación del promotor ISRE o de la señalización del IFN tipo II al inhibir la activación del promotor GAS.

La iniciación de la ruta de señalización del IFN tipo I comienza con la unión del IFN tipo I a su receptor celular, promoviendo la activación de las quinasas JAK1 y TYK2, y la movilización de STAT1 y STAT2 para ser fosforilados por JAK1 y TYK2 [244]. La fosforilación de STAT1 y STAT2 lleva a la formación de un heterodímero pSTAT1-pSTAT2, que junto con el factor IRF9 forman el complejo de transcripción ISGF3 que entra en el núcleo para activar el promotor ISRE [188]. La ruta de señalización del IFN tipo II comienza con la unión del IFN-γ a su receptor celular, activando las quinasas JAK1 y JAK2 que inducen la fosforilación de STAT1, formándose un homodímero pSTAT1-pSTAT1 que actúa como factor transcripcional del promotor GAS [188]. Nuestros datos muestran que BTV inhibe la fosforilación de STAT1 y degrada STAT2, eliminando la formación del heterodímero pSTAT1-pSTAT2 o el homodímero pSTAT1-

pSTAT1 y la consiguiente activación de los promotores ISRE y GAS, respectivamente. Esta inhibición y degradación ocurre a tiempos tempranos de la infección, antes de que el virus induzca el “shut-off” en las células infectadas, por lo que la degradación de STAT2 no se debe a la parada en la síntesis de proteínas inducida durante este “shut-off” viral. La degradación de STAT2 es una estrategia utilizada por muchos virus de diferentes familias y géneros, como los flavivirus entre los que se encuentran virus transmitidos por insectos como DenV [55] y ZikV [56], dos virus relacionados evolutivamente que degradan STAT2 a través de la proteína NS5, pero presentan un mecanismo de degradación de STAT2 diferente, a pesar de tener la misma proteína en común, indicando la increíble versatilidad de los virus para evadir el sistema del IFN. Otros virus como los paramixovirus [245, 246] o el virus respiratorio sincitial [245] también degradan STAT2.

Mediante la expresión *in vitro* de varias proteínas codificadas por BTV hemos demostrado que las proteínas NS4 y NS3 inhiben la activación de los promotores ISRE, GAS y el promotor de inducción del IFN- $\beta$ . Asimismo se muestra que la proteína NS3 interacciona con STAT2 induciendo su degradación e inhibiendo la fosforilación de STAT1. Por el contrario, no hemos encontrado el mecanismo de actuación de la proteína NS4 como antagonista del IFN ya que en nuestros ensayos NS4 no interacciona, ni altera los niveles de expresión de los factores de transcripción de STAT1/2 totales ni de sus fosforilados. Se ha descrito previamente que la proteína NS4 permite la replicación de BTV en células tratadas con IFN [233] y que células infectadas con un virus de BTV defectivo en la expresión de NS4 induce una mayor síntesis del IFN que células infectadas con BTV wt [173]. De acuerdo a nuestro datos, el mecanismo por el que NS4 interfiere con la señalización del IFN tipo I no implica a los factores de transcripción STAT1 o STAT2, o la translocación nuclear de IRF3 como han descrito Ratinier et al [173]. Debido a la localización nucleolar de NS4 [233] es posible que los mecanismos por el que la proteína NS4 interfiere con la señalización del IFN tipo I impliquen la interacción con otras proteínas nucleares que inhiban la unión del complejo ISGF3 a su promotor. Así por ejemplo, la proteína NP1 del bocavirus porcino impide la unión del complejo ISGF3 a la región del promotor ISRE o la proteína del core de HCV que bloquea el mismo paso [64], utilizando proteínas que alteran la respuesta del IFN a nivel nuclear. Se requieren experimentos adicionales para determinar el mecanismo por el cual la proteína NS4 inhibe la respuesta al IFN que no se han realizado en esta Tesis Doctoral.

Trabajos de otros grupos han mostrado que la proteína NS3 de BTV interfiere con la inducción del IFN tipo I mediante la inhibición de la cascada de inducción dependiente

de RLR [170], pero no se ha estudiado el efecto de NS3 con la ruta de señalización del IFN. Nuestros resultados muestran que la proteína NS3 de BTV actúa como un antagonista del IFN a través de la degradación de STAT2 e inhibiendo la fosforilación de STAT1. NS3 es una proteína transmembrana localizada en la membrana plasmática y en membranas intracelulares [247], que presenta un dominio N-terminal intracelular, dos dominios transmembranas, separados por un dominio extracelular glicosilado y un dominio C-terminal intracelular. En esta Tesis Doctoral se demuestra que NS3 interacciona con STAT2, pero no se ha estudiado la región de la proteína implicada en esta unión. El dominio C-terminal de NS3 presenta un motivo de unión con la proteína VP2 de BTV [156] y el dominio N-terminal contiene dos *late-domains* implicados en el reclutamiento de NEDD4 y Tsg101. Los dominios intracelulares deberían ser los implicados en la unión con STAT2, ya que este factor se localiza en el citoplasma celular. Para determinar los residuos implicados se deberían realizar nuevos ensayos, basados en la creación de mutantes de diferentes regiones de los dominios intracelulares de la proteína NS3 de BTV.

Nuestros datos muestran que la unión de NS3 con STAT2 es necesaria pero no suficiente para reducir los niveles de expresión de STAT2. El mecanismo por el que STAT2 se degrada requiere la ubiquitinación de NS3. Así, nosotros demostramos que NS3 está ubiquitinada en los residuos lisina de las posiciones 13 y 15, y las unidades de Ub se unen mediante enlaces isopeptídicos entre K63, formando cadenas de poli-Ub. La mutación de los residuos K de las posiciones 13 y 15 por residuos R permitió demostrar que los dos residuos de ubiquitinación son necesarios para la degradación de STAT2, ya que pudimos comprobar que los mutantes NS3-K13R y NS3-K15R y el doble mutante NS3-K13/15R co-expresados con el plásmido de expresión de Ub rescataban los niveles de expresión de STAT2. Por otro lado, los 3 mutantes mantenían la unión con STAT2, indicando que STAT2 se une a NS3 en una región diferente y que los residuos K de las posiciones 13 y 15 no están implicadas en la interacción con STAT2.

NS3 presenta dos "*late domains*" altamente conservados [248], el motivo PSAP que une específicamente a la proteína Tsg101, un componente del complejo ESCRT-1 (complejo de clasificación endosomal requeridos para la maquinaria de transporte I), implicada en la liberación del virión [238] y el motivo PPRY que recluta los dominios WW (dominios de interacción proteína-proteína) de la enzima NEDD4, una E3 ubiquitina ligasa de tipo HECT, también implicados en la liberación del virión [238, 249]. Nuestros datos muestran que cuando el motivo PPRY se muta por AARH se recuperan los niveles de STAT2, indicando que este motivo es necesario para la degradación de STAT2.

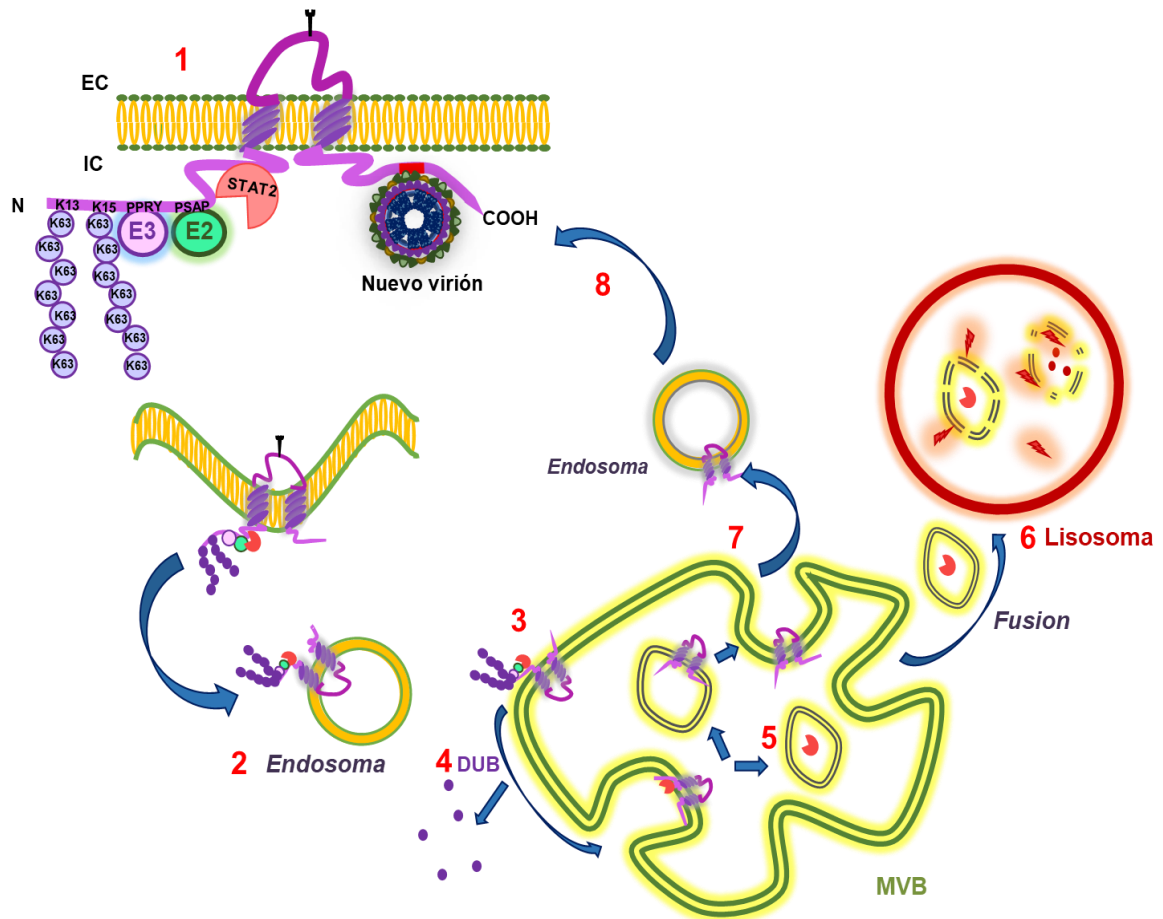
Asimismo, el mutante NS3-PPRY/AARH también se ubiquitina lo que indica que la ubiquitinación de NS3 es independiente del motivo PPRY. Además, también comprobamos que el mutante NS3-PPRY/AARH mantenía la interacción con STAT2, por lo que la unión de STAT2 con NS3 es independiente del motivo PPRY. Estos resultados nos permiten concluir que el motivo PPRY de la proteína NS3 de BTV no juega ningún papel en la unión de STAT2 y además no recluta a la E3 ligasa encargada de la ubiquitinación de NS3.

El sistema de ubiquitinación necesita la acción consecutiva de tres enzimas para poder actuar, la E1 (de activación), la E2 (de conjugación) y la E3 (de ligación) [250]. La Ub se une al sustrato a través de uno de sus residuos lisina mediante un enlace isopeptídico formado entre una glicina del extremo C-terminal de la Ub con el grupo  $\epsilon$ -amino del residuo lisina del sustrato [251, 252]. Se forman polímeros de Ub en donde participan principalmente las lisinas de las posiciones 48 o 63, aunque se ha descrito que las lisinas de las posiciones 6, 11, 27, 29 y 33 también son susceptibles de formar enlaces isopeptídicos. Las cadenas de poli-Ub de lisinas 48 o 63 son usadas principalmente como una señal de proteólisis en la célula [253, 254] y en respuesta a daños al ADN o daño mitocondrial. En esta Tesis Doctoral, mediante la co-transfección de NS3 con mutantes de Ub, demostramos que la Ub se une a la NS3 a través de la K63, y que esta unión era responsable de la degradación de STAT2. En mamíferos, la ubiquitinación basada en cadenas de poli-Ub K63 está involucrada en la reparación del ADN, la activación de quinasas e interviene en numerosos pasos del tráfico celular y la autofagia [255]. Estas cadenas se unen a proteínas de membrana induciendo su endocitosis y direccionándolas a la vía de los cuerpos multivesiculares (MVB) [256]. Se ha demostrado que al alterar la vía MVB mediante inhibidores de lípidos que conforman las membranas de los MVB, provoca una reducción del título viral de BTV, indicando que la vía de MVB es necesaria para la replicación viral y liberación del virión, mecanismo en el que la proteína NS3 se encuentra implicada [169, 238]. La proteína NS3 interacciona a través del dominio PSAP con Tsg101, componente del complejo ESCRT-1 involucrado en la salida del virión y en el direccionamiento de proteínas a los MVB [169, 238]. Estos datos indican que probablemente la proteína NS3 de BTV viaja en los endosomas y se dirige a los MVB, gracias a la unión de las cadenas de poli-Ub K63. En el MVB las proteínas pueden ser dirigidas hacia la degradación que implica la formación de vesículas de fusión con lisosomas, o recicladas a la superficie de la célula. En este trabajo mostramos que la degradación de STAT2 mediada por NS3 implica a los lisosomas ya que los niveles de STAT2 se recuperaban en células tratadas con cloroquina, un inhibidor de la acidificación de los lisosomas. Además, el marcado de

NS3 con cadenas de poli-Ub K63 podría apoyar la hipótesis de degradación de STAT2 mediante la vía lisosomal, ya que STAT2 solo es degradado con cadenas de poli-Ub K63 y estas cadenas marcan proteínas que son dirigidas a los lisosomas para su degradación. Los datos que muestran el requerimiento de que ambas K13 y K15 en NS3 se encuentren ubiquitinadas para que se produzca la degradación de STAT2 apoya la hipótesis de un mecanismo de reconocimiento para el direccionamiento de NS3 a los lisosomas y la degradación de STAT2. Sin embargo, NS3 no se degrada junto con STAT2 ya que los niveles de NS3 no disminuyen. Se necesita seguir trabajando para comprender y aclarar el mecanismo y los factores involucrados en la degradación de STAT2 por la proteína NS3 de BTV. Del mismo modo, se debe continuar estudiando el mecanismo responsable de la reducción de los niveles de pSTAT1.

Basándonos en los datos mostrados, proponemos un modelo de mecanismo de degradación de STAT2 por la proteína NS3 (Figura 2.17). En este modelo, NS3 podría actuar como una proteína de andamio (scaffolding) que interacciona con STAT2 y que a través de las cadenas de poli-Ub K63 y el mecanismo de acción endógeno del sistema de ubiquitinación de la célula formado por las enzimas E1-E2-E3 dan lugar a la endocitosis de la proteína NS3 con STAT2 unido, dirigiéndose al MVB. Una vez en los MVB, NS3 envía a STAT2 hacia el lisosoma para su degradación y ella misma es reciclada dirigiéndose a la membrana celular para continuar con su papel en el ciclo viral. Probablemente en este paso estén implicadas deubiquitininasas que al quitar las ubiquitinas de NS3 permite su reciclaje. Aunque este modelo es consistente con los datos aportados en esta Tesis Doctoral así como con previos datos publicados por otros laboratorios, no se puede excluir la posibilidad de que STAT2 se degrade vía lisosoma sin estar involucrado el MVB. Sin embargo, el hecho de que el dominio PPRY de NS3 se requiera para la degradación de STAT2 sugiere que el tráfico al MVB puede jugar un papel en este proceso.

Los datos de esta Tesis Doctoral muestran por primera vez el uso de la vía lisosomal por una proteína viral para degradar un factor de señalización de la ruta del IFN. Aunque se requieren estudios adicionales para completar la caracterización del mecanismo propuesto, este estudio destaca la diversidad y complejidad de los mecanismos celulares aprovechados por los virus para evadir el sistema del IFN y favorecer su replicación y propagación.



**Figura 2.17. Modelo de mecanismo de degradación de STAT2 por la proteína NS3 de BTV.** (1) Representación de la estructura de la proteína NS3 de BTV, con dos dominios transmembrana, un dominio extracelular (EC) y dos dominios intracelulares (IC), uno en el extremo N-terminal donde se encuentran las lisinas de las posiciones 13 y 15 poli-Ub con ubiquitinas K63 y los *late-domains*, PSAP y PPRY, y un dominio C-terminal con el motivo de unión a VP2 (rojo). PPRY recluta enzimas E3 y PSAP enzimas E2. NS3 se une a STAT2, se representa la unión en el dominio IC del extremo N-terminal (suposición, no definido). (2) Una vez unido STAT2 y las cadenas poli-Ub K63, se produce una invaginación de la membrana, formando un endosoma que se dirige a los MVB. (3) El endosoma se fusiona en los MVB y (4) las DUB desubiquitinan a NS3. (5) NS3 dirige STAT2 a degradación. (6) STAT2 se fusiona con el lisosoma donde se produce su degradación. (7) NS3 es reciclada en el MVB y vuelve a la membrana celular, (8) donde continuará con su papel en el ciclo viral de BTV.

## **Conclusiones**

**“La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la  
verdad”**

*Julio Verne (1828 – 1905)*



De los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se obtienen las siguientes conclusiones:

- 1- PPRV modula el sistema del IFN mediante el bloqueo de la traslocación al núcleo de los factores pSTAT1 y pSTAT2 y reduciendo los niveles de las formas fosforiladas de las quinasas JAK1 y TYK2.
- 2- La inhibición de la inducción del IFN por PPRV es ocasionada por las proteínas C y V de PPRV, mientras que las proteínas P, V y W son las involucradas en el bloqueo de la señalización del IFN tipo I y II.
- 3- Una infección con BTV induce un bloqueo en la inducción del IFN y en la señalización del IFN tipo I y II, mediante la degradación de STAT2 y la reducción de los niveles de pSTAT1.
- 4- La proteína NS3 de BTV es la responsable de la degradación de STAT2 y la reducción de los niveles de pSTAT1.
- 5- NS3 degrada STAT2 mediante la utilización del sistema endógeno de ubiquitinación de la célula dirigiéndolo a la vía lisosomal para su degradación.

From the results obtained in this Doctoral Thesis the following conclusions are obtained:

- 1- PPRV modulates the IFN system by blocking the translocation to the nucleus of the pSTAT1 and pSTAT2 factors and by reducing the levels of the phosphorylated forms of the JAK1 and TYK2 kinases.
- 2- The inhibition of the IFN induction by PPRV is caused by PPRV C and V proteins, while P, V and W proteins are involved in type I and II IFN signaling blockade.
- 3- BTV infection blocks IFN induction and interferes with IFN type I and II by degrading STAT2 and reducing of pSTAT1 levels.
- 4- BTV NS3 protein is responsible for the degradation of STAT2 and the reduction of pSTAT1 levels.
- 5- NS3 degrades STAT2 by using the endogenous system of ubiquitination of the cell directing it to the lysosomal pathway for its degradation.

## **Bibliografía**

**“Aquel que no quiere ser aconsejado, no puede ser ayudado”**

*Benjamin Franklin (1706-1790)*

1. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006. 124(4): p. 783-801.
2. Stetson, D.B. and R. Medzhitov, Antiviral defense: interferons and beyond. *J Exp Med*, 2006. 203(8): p. 1837-41.
3. Pestka, S., The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J Biol Chem*, 2007. 282(28): p. 20047-51.
4. Fensterl, V. and G.C. Sen, Interferons and viral infections. *Biofactors*, 2009. 35(1): p. 14-20.
5. Pestka, S., C.D. Krause, and M.R. Walter, Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*, 2004. 202: p. 8-32.
6. Pestka, S., et al., Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol*, 2004. 22: p. 929-79.
7. Ank, N., et al., Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *J Virol*, 2006. 80(9): p. 4501-9.
8. Garcia-Sastre, A., Ten Strategies of Interferon Evasion by Viruses. *Cell Host Microbe*, 2017. 22(2): p. 176-184.
9. Nan, Y., C. Wu, and Y.-J. Zhang, Interplay between Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling Activated by Type I Interferons and Viral Antagonism. *Frontiers in Immunology*, 2017. 8(1758).
10. Gonzalez-Navajas, J.M., et al., Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat Rev Immunol*, 2012. 12(2): p. 125-35.
11. Nan, Y., G. Nan, and Y.J. Zhang, Interferon Induction by RNA Viruses and Antagonism by Viral Pathogens. *Viruses*, 2014. 6(12): p. 4999-5027.
12. Li, X.D., et al., Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science*, 2013. 341(6152): p. 1390-4.
13. Barton, G.M., Viral recognition by Toll-like receptors. *Semin Immunol*, 2007. 19(1): p. 33-40.
14. Kawai, T. and S. Akira, TLR signaling. *Cell Death Differ*, 2006. 13(5): p. 816-25.
15. Kawai, T. and S. Akira, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 2010. 11(5): p. 373-84.

16. Matsumiya, T. and D.M. Stafforini, Function and regulation of retinoic acid-inducible gene-I. *Crit Rev Immunol*, 2010. 30(6): p. 489-513.
17. Schlee, M., Master sensors of pathogenic RNA - RIG-I like receptors. *Immunobiology*, 2013. 218(11): p. 1322-35.
18. Belgnaoui, S.M., S. Paz, and J. Hiscott, Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. *Curr Opin Immunol*, 2011. 23(5): p. 564-72.
19. Zinzula, L. and E. Tramontano, Strategies of highly pathogenic RNA viruses to block dsRNA detection by RIG-I-like receptors: hide, mask, hit. *Antiviral Res*, 2013. 100(3): p. 615-35.
20. de Veer, M.J., et al., Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol*, 2001. 69(6): p. 912-20.
21. Barber, G.N., Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ*, 2001. 8(2): p. 113-26.
22. Ponten, A., et al., Dominant-negative mutants of human MxA protein: domains in the carboxy-terminal moiety are important for oligomerization and antiviral activity. *J Virol*, 1997. 71(4): p. 2591-9.
23. Morales, D.J. and D.J. Lenschow, The antiviral activities of ISG15. *J Mol Biol*, 2013. 425(24): p. 4995-5008.
24. Terenzi, F., et al., Distinct induction patterns and functions of two closely related interferon-inducible human genes, ISG54 and ISG56. *J Biol Chem*, 2006. 281(45): p. 34064-71.
25. Miyamoto, M., et al., Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell*, 1988. 54(6): p. 903-13.
26. Rollins, B.J., Chemokines. *Blood*, 1997. 90(3): p. 909-28.
27. Mibayashi, M., et al., Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol*, 2007. 81(2): p. 514-24.
28. Andrejeva, J., et al., The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(49): p. 17264-9.

29. Verpooten, D., et al., Control of TANK-binding kinase 1-mediated signaling by the gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1. *J Biol Chem*, 2009. 284(2): p. 1097-105.
30. Prins, K.C., W.B. Cardenas, and C.F. Basler, Ebola virus protein VP35 impairs the function of interferon regulatory factor-activating kinases IKKepsilon and TBK-1. *J Virol*, 2009. 83(7): p. 3069-77.
31. Papon, L., et al., The viral RNA recognition sensor RIG-I is degraded during encephalomyocarditis virus (EMCV) infection. *Virology*, 2009. 393(2): p. 311-8.
32. Bauhofer, O., et al., Classical swine fever virus Npro interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. *J Virol*, 2007. 81(7): p. 3087-96.
33. Foy, E., et al., Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science*, 2003. 300(5622): p. 1145-8.
34. Beura, L.K., et al., Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation. *J Virol*, 2010. 84(3): p. 1574-84.
35. Zeng, W., et al., Key role of Ubc5 and lysine-63 polyubiquitination in viral activation of IRF3. *Mol Cell*, 2009. 36(2): p. 315-25.
36. Liu, X., et al., Dynamic regulation of innate immunity by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013. 24(6): p. 559-70.
37. Bowie, A., et al., A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(18): p. 10162-7.
38. Stack, J., et al., Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *J Exp Med*, 2005. 201(6): p. 1007-18.
39. Ahmed, C.M. and H.M. Johnson, Type I Interferon Mimetics Bypass Vaccinia Virus Decoy Receptor Virulence Factor for Protection of Mice against Lethal Infection. *Clin Vaccine Immunol*, 2014. 21(8): p. 1178-84.
40. Yokota, S., et al., Measles virus suppresses interferon-alpha signaling pathway: suppression of Jak1 phosphorylation and association of viral accessory proteins, C and V, with interferon-alpha receptor complex. *Virology*, 2003. 306(1): p. 135-46.

41. Jia, D., et al., Influenza virus non-structural protein 1 (NS1) disrupts interferon signaling. *PLoS One*, 2010. 5(11): p. e13927.
42. Lee, A.W., et al., Human cytomegalovirus decreases constitutive transcription of MHC class II genes in mature Langerhans cells by reducing CIITA transcript levels. *Mol Immunol*, 2011. 48(9-10): p. 1160-7.
43. Sohn, S.Y. and P. Hearing, Adenovirus Sequesters Phosphorylated STAT1 at Viral Replication Centers and Inhibits STAT Dephosphorylation. *J Virol*, 2011. 85(15): p. 7555-62.
44. Li, S., et al., The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon-alpha. *Oncogene*, 1999. 18(42): p. 5727-37.
45. Caignard, G., et al., Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling. *Virology*, 2007. 368(2): p. 351-62.
46. Fleming, S.B., Viral Inhibition of the IFN-Induced JAK/STAT Signalling Pathway: Development of Live Attenuated Vaccines by Mutation of Viral-Encoded IFN-Antagonists. *Vaccines (Basel)*, 2016. 4(3).
47. Rodriguez, J.J., L.F. Wang, and C.M. Horvath, Hendra Virus V Protein Inhibits Interferon Signaling by Preventing STAT1 and STAT2 Nuclear Accumulation. *J Virol*, 2003. 77(21): p. 11842-5.
48. Andrejeva, J., et al., Degradation of STAT1 and STAT2 by the V proteins of simian virus 5 and human parainfluenza virus type 2, respectively: consequences for virus replication in the presence of alpha/beta and gamma interferons. *J Virol*, 2002. 76(5): p. 2159-67.
49. Brzózka, K., S. Finke, and K.K. Conzelmann, Inhibition of Interferon Signaling by Rabies Virus Phosphoprotein P: Activation-Dependent Binding of STAT1 and STAT2. *J Virol*, 2006. 80(6): p. 2675-83.
50. Precious, B., et al., In vitro and in vivo specificity of ubiquitination and degradation of STAT1 and STAT2 by the V proteins of the paramyxoviruses simian virus 5 and human parainfluenza virus type 2. *J Gen Virol*, 2005. 86(Pt 1): p. 151-8.
51. Li, X., et al., Japanese Encephalitis Virus Upregulates the Expression of SOCS3 in Mouse Brain and Raw264.7 Cells. *Viruses*, 2014. 6(11): p. 4280-93.

52. Best, S.M., et al., Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *J Virol*, 2005. 79(20): p. 12828-39.
53. Clarke, P., et al., Death Receptor-Mediated Apoptotic Signaling Is Activated in the Brain following Infection with West Nile Virus in the Absence of a Peripheral Immune Response. *J Virol*, 2014. 88(2): p. 1080-9.
54. Ho, L.J., et al., Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. *J Immunol*, 2005. 174(12): p. 8163-72.
55. Ashour, J., et al., NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J Virol*, 2009. 83(11): p. 5408-18.
56. Grant, A., et al., Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host Microbe*, 2016. 19(6): p. 882-90.
57. Arnold, M.M., M. Barro, and J.T. Patton, Rotavirus NSP1 mediates degradation of interferon regulatory factors through targeting of the dimerization domain. *J Virol*, 2013. 87(17): p. 9813-21.
58. Yamaoka, S., et al., Defect of rabies virus phosphoprotein in its interferon-antagonist activity. *J Vet Med Sci*, 2017. 79(8): p. 1394-7.
59. Zhang, A.P.P., et al., The ebolavirus VP24 interferon antagonist: Know your enemy. *Virulence*, 2012. 3(5): p. 440-5.
60. Ding, J.N., et al., An all-atom molecular dynamics study of the anti-interferon signaling of Ebola virus: interaction mechanisms of EBOV VP24 binding to Karyopherin alpha5. *Mol Biosyst*, 2017. 13(5): p. 1031-1045.
61. Wang, R., et al., Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nsp1 $\beta$  Inhibits Interferon-Activated JAK/STAT Signal Transduction by Inducing Karyopherin- $\alpha$ 1 Degradation. *J Virol*, 2013. 87(9): p. 5219-28.
62. Du, Y., et al., 3C(pro) of Foot-and-Mouth Disease Virus Antagonizes the Interferon Signaling Pathway by Blocking STAT1/STAT2 Nuclear Translocation. *J Virol*, 2014. 88(9): p. 4908-20.
63. Barnard, P. and N.A. McMillan, The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology*, 1999. 259(2): p. 305-13.



64. Zhang, R., et al., Porcine bocavirus NP1 negatively regulates interferon signaling pathway by targeting the DNA-binding domain of IRF9. *Virology*, 2015. 485: p. 414-21.
65. de Lucas, S., J. Bartolome, and V. Carreno, Hepatitis C virus core protein down-regulates transcription of interferon-induced antiviral genes. *J Infect Dis*, 2005. 191(1): p. 93-9.
66. Zhang, Q., et al., MicroRNA-30c Modulates Type I IFN Responses To Facilitate Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection by Targeting JAK1. *J Immunol*, 2016. 196(5): p. 2272-82.
67. Mukherjee, A., A.M. Di Bisceglie, and R.B. Ray, Hepatitis C virus-mediated enhancement of microRNA miR-373 impairs the JAK/STAT signaling pathway. *J Virol*, 2015. 89(6): p. 3356-65.
68. Akhtar, L.N. and E.N. Benveniste, Viral exploitation of host SOCS protein functions. *J Virol*, 2011. 85(5): p. 1912-21.
69. Persico, M., et al., Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) expression and hepatitis C virus-related chronic hepatitis: Insulin resistance and response to antiviral therapy. *Hepatology*, 2007. 46(4): p. 1009-15.
70. Pauli, E.K., et al., Influenza A virus inhibits type I IFN signaling via NF-kappaB-dependent induction of SOCS-3 expression. *PLoS Pathog*, 2008. 4(11): p. e1000196.
71. Ciechanover, A. and A.L. Schwartz, The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2004. 1695(1): p. 3-17.
72. Nijman, S.M., et al., A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*, 2005. 123(5): p. 773-86.
73. Frias-Staheli, N., et al., Ovarian tumor domain-containing viral proteases evade ubiquitin- and ISG15-dependent innate immune responses. *Cell Host Microbe*, 2007. 2(6): p. 404-16.
74. Gargadennec, L. and A. Lalanne, La peste des petits ruminants. *Bulletin des Services Zoo Techniques et des Epizzoties de l'Afrique Occidentale Francaise*1942. 5: p. 16-21.
75. Mariner, J.C., et al., The Opportunity To Eradicate Peste des Petits Ruminants. *J Immunol*, 2016. 196(9): p. 3499-506.

76. Truong, T., et al., Peste des petits ruminants virus tissue tropism and pathogenesis in sheep and goats following experimental infection. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e87145.
77. Taylor, W.P., The distribution and epidemiology of peste des petits ruminants. *Preventive Veterinary Medicine*, 1984. 2(1): p. 157-166.
78. Sharawi, S., et al., Isolation, Serological and Real time PCR diagnosis of Peste Des Petites Ruminants virus in naturally exposed Arabian Gazelle in Saudi Arabia. Vol. 3. 2010.
79. Kinne, J., et al., Peste des petits ruminants in Arabian wildlife. *Epidemiology and Infection*, 2010. 138(8): p. 1211-1214.
80. Abubakar, M., et al., Natural infection with peste des petits ruminants virus: a pre and post vaccinal assessment following an outbreak scenario. *Virus Res*, 2012. 167(1): p. 43-7.
81. Libeau, G., A. Diallo, and S. Parida, Evolutionary genetics underlying the spread of Peste des Petits Ruminants virus. Vol. 4. 2013. 14-20.
82. Kumar, N., et al., Peste des petits ruminants virus infection of small ruminants: a comprehensive review. *Viruses*, 2014. 6(6): p. 2287-327.
83. Pope, R.A., et al., Early Events following Experimental Infection with Peste-Des-Petits Ruminants Virus Suggest Immune Cell Targeting. *PLoS One*, 2013. 8(2).
84. Kerdiles, Y.M., et al., Immunomodulatory properties of morbillivirus nucleoproteins. *Viral Immunol*, 2006. 19(2): p. 324-34.
85. Banyard, A.C., et al., Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control. *J Gen Virol*, 2010. 91(Pt 12): p. 2885-97.
86. Rajko-Nenow, P.Z., et al., Complete Genome Sequence of Peste des Petits Ruminants Virus from Georgia, 2016. *Genome Announc*, 2017. 5(41).
87. Forsyth, M.A. and T. Barrett, Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus Res*, 1995. 39(2-3): p. 151-63.
88. Fauquet, C. and D. Fargette, International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virol J*, 2005. 2: p. 64.
89. Roeder, P., J. Mariner, and R. Kock, Rinderpest: the veterinary perspective on eradication. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013. 368(1623).

90. Baron, M.D., S. Parida, and C.A. Oura, Peste des petits ruminants: a suitable candidate for eradication? *Vet Rec*, 2011. 169(1): p. 16-21.
91. Roeder, P.L., Rinderpest: the end of cattle plague. *Prev Vet Med*, 2011. 102(2): p. 98-106.
92. Muhammad, M., Peste des petits ruminants virus. Springer Heidelberg New York Dordrecht London, 2015.
93. Kumar, N., et al., Isolation, identification and characterization of a Peste des Petits Ruminants virus from an outbreak in Nanakpur, India. *J Virol Methods*, 2013. 189(2): p. 388-92.
94. Mahapatra, M., et al., Matrix protein and glycoproteins F and H of Peste-des-petits-ruminants virus function better as a homologous complex. *J Gen Virol*, 2006. 87(Pt 7): p. 2021-9.
95. Diallo, A., et al., Comparison of proteins induced in cells infected with rinderpest and peste des petits ruminants viruses. *J Gen Virol*, 1987. 68 ( Pt 7): p. 2033-8.
96. Munir, M., Rinderpest and Peste des Petits Ruminants: Virus Plagues of Large and Small Ruminants. *Emerg Infect Dis*, 2010. 16(12): p. 2024.
97. Bao, J.Y., et al., [Sequence analysis of the phosphoprotein gene of peste des petits ruminants virus of Chinese origin]. *Bing Du Xue Bao*, 2011. 27(1): p. 26-33.
98. Nanda, S.K. and M.D. Baron, Rinderpest virus blocks type I and type II interferon action: role of structural and nonstructural proteins. *J Virol*, 2006. 80(15): p. 7555-68.
99. Haffar, A., et al., The matrix protein gene sequence analysis reveals close relationship between peste des petits ruminants virus (PPRV) and dolphin morbillivirus. *Virus Res*, 1999. 64(1): p. 69-75.
100. Moll, M., H.D. Klenk, and A. Maisner, Importance of the Cytoplasmic Tails of the Measles Virus Glycoproteins for Fusogenic Activity and the Generation of Recombinant Measles Viruses. *J Virol*, 2002. 76(14): p. 7174-86.
101. Seth, S. and M.S. Shaila, The fusion protein of Peste des petits ruminants virus mediates biological fusion in the absence of hemagglutinin-neuraminidase protein. *Virology*, 2001. 289(1): p. 86-94.

102. Langedijk, J.P., F.J. Daus, and J.T. van Oirschot, Sequence and structure alignment of Paramyxoviridae attachment proteins and discovery of enzymatic activity for a morbillivirus hemagglutinin. *J Virol*, 1997. 71(8): p. 6155-67.
103. Seth, S. and M.S. Shaila, The Fusion Protein of Peste des Petits Ruminants Virus Mediates Biological Fusion in the Absence of Hemagglutinin–Neuraminidase Protein. *Virology*, 2001. 289(1): p. 86-94.
104. Chinnakannan, S.K., S.K. Nanda, and M.D. Baron, Morbillivirus v proteins exhibit multiple mechanisms to block type 1 and type 2 interferon signalling pathways. *PLoS One*, 2013. 8(2): p. e57063.
105. Baron, M.D. and T. Barrett, Rinderpest Viruses Lacking the C and V Proteins Show Specific Defects in Growth and Transcription of Viral RNAs. *J Virol*, 2000. 74(6): p. 2603-11.
106. Patterson, J.B., et al., V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo. *Virology*, 2000. 267(1): p. 80-9.
107. Nakatsu, Y., et al., Translational Inhibition and Increased Interferon Induction in Cells Infected with C Protein-Deficient Measles Virus. *J Virol*, 2006. 80(23): p. 11861-7.
108. Boxer, E.L., S.K. Nanda, and M.D. Baron, The rinderpest virus non-structural C protein blocks the induction of type 1 interferon. *Virology*, 2009. 385(1): p. 134-142.
109. Sparrer, K.M., C.K. Pfaller, and K.K. Conzelmann, Measles virus C protein interferes with Beta interferon transcription in the nucleus. *J Virol*, 2012. 86(2): p. 796-805.
110. Goodbourn, S. and R.E. Randall, The Regulation of Type I Interferon Production by Paramyxoviruses. *J Interferon Cytokine Res*, 2009. 29(9): p. 539-47.
111. Liston, P. and D.J. Briedis, Measles Virus V Protein Binds Zinc. *Virology*, 1994. 198(1): p. 399-404.
112. Mahapatra, M., et al., Sequence analysis of the phosphoprotein gene of peste des petits ruminants (PPR) virus: editing of the gene transcript. *Virus Research*, 2003. 96(1): p. 85-98.
113. Baron, M.D., M.S. Shaila, and T. Barrett, Cloning and sequence analysis of the phosphoprotein gene of rinderpest virus. *Journal of General Virology*, 1993. 74(2): p. 299-304.

114. Shaw, M.L., et al., Nipah virus V and W proteins have a common STAT1-binding domain yet inhibit STAT1 activation from the cytoplasmic and nuclear compartments, respectively. *J Virol*, 2004. 78(11): p. 5633-41.
115. Shaw, M.L., et al., Nuclear localization of the Nipah virus W protein allows for inhibition of both virus- and toll-like receptor 3-triggered signaling pathways. *J Virol*, 2005. 79(10): p. 6078-88.
116. Wani, S.A., et al., Expression kinetics of ISG15, IRF3, IFN $\gamma$ , IL10, IL2 and IL4 genes vis-a-vis virus shedding, tissue tropism and antibody dynamics in PPRV vaccinated, challenged, infected sheep and goats. *Microb Pathog*, 2018.
117. Svitek, N., et al., Morbillivirus control of the interferon response: relevance of STAT2 and mda5 but not STAT1 for canine distemper virus virulence in ferrets. *J Virol*, 2014. 88(5): p. 2941-50.
118. Sanz Bernardo, B., S. Goodbourn, and M.D. Baron, Control of the induction of type I interferon by Peste des petits ruminants virus. *PLoS One*, 2017. 12(5): p. e0177300.
119. Ramachandran, A., J.P. Parisien, and C.M. Horvath, STAT2 Is a Primary Target for Measles Virus V Protein-Mediated Alpha/Beta Interferon Signaling Inhibition. *J Virol*, 2008. 82(17): p. 8330-8.
120. Chinnakannan, S.K., et al., Different functions of the common P/V/W and V-specific domains of rinderpest virus V protein in blocking IFN signalling. *J Gen Virol*, 2014. 95(Pt 1): p. 44-51.
121. Caignard, G., et al., Inhibition of IFN-alpha/beta signaling by two discrete peptides within measles virus V protein that specifically bind STAT1 and STAT2. *Virology*, 2009. 383(1): p. 112-20.
122. Ma, X., et al., Identification of amino-acid residues in the V protein of peste des petits ruminants essential for interference and suppression of STAT-mediated interferon signaling. *Virology*, 2015. 483: p. 54-63.
123. Wilson, A.J. and P.S. Mellor, Bluetongue in Europe: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2009. 364(1530): p. 2669-81.
124. Spreull, J., Malarial Catarrhal Fever (Bluetongue) of Sheep in South Africa. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 1905. 18: p. 321-337.
125. Ruiz-Fons, F., et al., Spatial and Temporal Evolution of Bluetongue Virus in Wild Ruminants, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 2008. 14(6): p. 951-953.

126. Frolich, K., et al., Serologic surveillance for selected viral agents in captive and free-ranging populations of Arabian oryx (*Oryx leucoryx*) from Saudi Arabia and the United Arab Emirates. *J Wildl Dis*, 2005. 41(1): p. 67-79.
127. Davies, F.G. and A.R. Walker, The distribution in Kenya of bluetongue virus and antibody, and the *Culicoides* vector. *J Hyg (Lond)*, 1974.
128. Maclachlan, N.J., Bluetongue: history, global epidemiology, and pathogenesis. *Preventive Veterinary Medicine*, 2011. 102(2): p. 107-111.
129. Alexander, K.A., et al., Evidence of natural bluetongue virus infection among African carnivores. *Am J Trop Med Hyg*, 1994. 51(5): p. 568-76.
130. Du Toit, R.M., The Transmission of Blue-tongue and Horse-sickness by *Culicoides*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science*, 1944. 19(1-2): p. 7-16 pp.
131. Mellor, P.S., J. Boorman, and M. Baylis, *Culicoides* Biting Midges: Their Role as Arbovirus Vectors. *Annual Review of Entomology*, 2000. 45(1): p. 307-340.
132. Meiswinkel, R., et al., The 2006 outbreak of bluetongue in northern Europe--the entomological perspective. *Prev Vet Med*, 2008. 87(1-2): p. 55-63.
133. Worwa, G., et al., Experimental transplacental infection of sheep with bluetongue virus serotype 8. *Vet Rec*, 2009. 164(16): p. 499-500.
134. Desmecht, D., et al., Evidence for transplacental transmission of the current wild-type strain of bluetongue virus serotype 8 in cattle. *Vet Rec*, 2008. 163(2): p. 50-2.
135. Kirkland, P.D., et al., Excretion of bluetongue virus in cattle semen: a feature of laboratory-adapted virus. *Veterinaria italiana*, 2004. 40(4): p. 497-501.
136. Batten, C., et al., Evidence for transmission of bluetongue virus serotype 26 through direct contact. *PLoS One*, 2014. 9(5): p. e96049.
137. Breard, E., et al., Bluetongue virus serotype 27: Experimental infection of goats, sheep and cattle with three BTV-27 variants reveal atypical characteristics and likely direct contact transmission BTV-27 between goats. *Transbound Emerg Dis*, 2017.
138. Darpel, K.E., et al., Involvement of the skin during bluetongue virus infection and replication in the ruminant host. *Vet Res*, 2012. 43: p. 40.
139. Hemati, B., et al., Bluetongue Virus Targets Conventional Dendritic Cells in Skin Lymph. *J Virol*, 2009. 83(17): p. 8789-99.

140. Melzi, E., et al., Follicular dendritic cell disruption as a novel mechanism of virus-induced immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. 113(41): p. E6238-47.
141. Caporale, M., et al., Determinants of bluetongue virus virulence in murine models of disease. *J Virol*, 2011. 85(21): p. 11479-89.
142. Erasmus, B.J., Bluetongue in sheep and goats. *Aust Vet J*, 1975. 51(4): p. 165-70.
143. Anderson, G.A., et al., Identification of Bluetongue Virus-specific Immunoglobulin E in Cattle. *Journal of General Virology*, 1987. 68(9): p. 2509-2514.
144. Maclachlan, N.J., et al., The pathology and pathogenesis of bluetongue. *J Comp Pathol*, 2009. 141(1): p. 1-16.
145. MacLachlan, N.J., Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. *Veterinaria italiana*, 2004. 40(4): p. 462-7.
146. Jenckel, M., et al., Complete coding genome sequence of putative novel bluetongue virus serotype 27. *Genome Announc*, 2015. 3(2).
147. Belbis, G., et al., Chapter Seven - Bluetongue Virus: From BTV-1 to BTV-27, in *Advances in Virus Research*, M. Beer and D. Höper, Editors. 2017, Academic Press. p. 161-197.
148. Bluetongue - European Commission. 2018; Available from: [https://ec.europa.eu/food/animals/animal-diseases/control-measures/bluetongue\\_en](https://ec.europa.eu/food/animals/animal-diseases/control-measures/bluetongue_en).
149. Pringle, C.R., Virus taxonomy--1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. *Arch Virol*, 1999. 144(2): p. 421-9.
150. Attoui, H., et al., Chapter 3 - Bluetongue virus, other orbiviruses and other reoviruses: Their relationships and taxonomy, in *Bluetongue*. 2009, Academic Press: London. p. 23-52.
151. Mertens, P.P.C. and J. Diprose, The bluetongue virus core: a nano-scale transcription machine. *Virus research*, 2004. 101(1): p. 29-43.
152. Schwartz-Cornil, I., et al., Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet Res*, 2008. 39(5): p. 46.
153. Forzan, M., M. Marsh, and P. Roy, Bluetongue virus entry into cells. *J Virol*, 2007. 81(9): p. 4819-27.

154. Forzan, M., C. Wirblich, and P. Roy, A capsid protein of nonenveloped Bluetongue virus exhibits membrane fusion activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(7): p. 2100-5.
155. Owens, R.J., C. Limn, and P. Roy, Role of an arbovirus nonstructural protein in cellular pathogenesis and virus release. *J Virol*, 2004. 78(12): p. 6649-56.
156. Celma, C.C.P. and P. Roy, A Viral Nonstructural Protein Regulates Bluetongue Virus Trafficking and Release. *J Virol*, 2009. 83(13): p. 6806-16.
157. Zhang, X., et al., Bluetongue virus coat protein VP2 contains sialic acid-binding domains, and VP5 resembles enveloped virus fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(14): p. 6292-7.
158. Mertens, P.P., et al., Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus serotype. *Virology*, 1989. 170(2): p. 561-5.
159. Purdy, M.A., et al., Complete sequence of bluetongue virus L2 RNA that codes for the antigen recognized by neutralizing antibodies. *J Virol*, 1985. 55(3): p. 826-30.
160. Beaton, A.R., et al., The membrane trafficking protein calpactin forms a complex with bluetongue virus protein NS3 and mediates virus release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(20): p. 13154-9.
161. DeMaula, C.D., K.R. Bonneau, and N.J. MacLachlan, Changes in the outer capsid proteins of bluetongue virus serotype ten that abrogate neutralization by monoclonal antibodies. *Virus research*, 2000. 67(1): p. 59-66.
162. Rojas, J.M., et al., T cell responses to bluetongue virus are directed against multiple and identical CD4+ and CD8+ T cell epitopes from the VP7 core protein in mouse and sheep. *Vaccine*, 2011. 29(40): p. 6848-57.
163. Martinez-Costas, J., et al., Guanylyltransferase and RNA 5'-triphosphatase activities of the purified expressed VP4 protein of bluetongue virus. *Journal of molecular biology*, 1998. 280(5): p. 859-866.
164. Matsuo, E. and P. Roy, Bluetongue virus VP6 acts early in the replication cycle and can form the basis of chimeric virus formation. *J Virol*, 2009. 83(17): p. 8842-8.
165. Boyce, M., C.C. Celma, and P. Roy, Bluetongue virus non-structural protein 1 is a positive regulator of viral protein synthesis. *Virol J*, 2012. 9: p. 178.



166. Thomas, C.P., T.F. Booth, and P. Roy, Synthesis of bluetongue virus-encoded phosphoprotein and formation of inclusion bodies by recombinant baculovirus in insect cells: it binds the single-stranded RNA species. *Journal of General Virology*, 1990. 71(9): p. 2073-2083.
167. Lympelopoulos, K., et al., Specific binding of Bluetongue virus NS2 to different viral plus-strand RNAs. *Virology*, 2006. 353(1): p. 17-26.
168. Lympelopoulos, K., et al., Sequence specificity in the interaction of Bluetongue virus non-structural protein 2 (NS2) with viral RNA. *J Biol Chem*, 2003. 278(34): p. 31722-30.
169. Bhattacharya, B., C.C. Celma, and P. Roy, Influence of Cellular Trafficking Pathway on Bluetongue Virus Infection in Ovine Cells. *Viruses*, 2015. 7(5): p. 2378-403.
170. Chauveau, E., et al., NS3 of bluetongue virus interferes with the induction of type I interferon. *J Virol*, 2013. 87(14): p. 8241-6.
171. Guirakhoo, F., J.A. Catalan, and T.P. Monath, Adaptation of bluetongue virus in mosquito cells results in overexpression of NS3 proteins and release of virus particles. *Archives of Virology*, 1995. 140(5): p. 967-974.
172. Ratinier, M., et al., Identification and characterization of a novel non-structural protein of bluetongue virus. *PLoS Pathog*, 2011. 7(12): p. e1002477.
173. Ratinier, M., et al., Bluetongue Virus NS4 Protein Is an Interferon Antagonist and a Determinant of Virus Virulence. *J Virol*, 2016. 90(11): p. 5427-39.
174. Stewart, M., et al., Characterization of a second open reading frame in genome segment 10 of bluetongue virus. *J Gen Virol*, 2015. 96(11): p. 3280-93.
175. Rojas, J.M., T. Rodriguez-Calvo, and N. Sevilla, Recall T cell responses to bluetongue virus produce a narrowing of the T cell repertoire. *Vet Res*, 2017. 48(1): p. 38.
176. Foster, N.M., et al., Temporal relationships of viremia, interferon activity, and antibody responses of sheep infected with several bluetongue virus strains. *Am J Vet Res*, 1991. 52(2): p. 192-6.
177. Jameson, P., C.K. Schoenherr, and S.E. Grossberg, Bluetongue virus, an exceptionally potent interferon inducer in mice. *Infect Immun*, 1978. 20(1): p. 321-3.

178. MacLachlan, N.J. and J. Thompson, Bluetongue virus-induced interferon in cattle. *Am J Vet Res*, 1985. 46(6): p. 1238-41.
179. Chauveau, E., et al., Sensing and control of bluetongue virus infection in epithelial cells via RIG-I and MDA5 helicases. *J Virol*, 2012. 86(21): p. 11789-99.
180. Ruscanu, S., et al., The Double-Stranded RNA Bluetongue Virus Induces Type I Interferon in Plasmacytoid Dendritic Cells via a MYD88-Dependent TLR7/8-Independent Signaling Pathway. *Journal of Virology*, 2012. 86(10): p. 5817-5828.
181. Doceul, V., et al., Dual modulation of type I interferon response by bluetongue virus. *J Virol*, 2014. 88(18): p. 10792-802.
182. King, P. and S. Goodbourn, The beta-interferon promoter responds to priming through multiple independent regulatory elements. *J Biol Chem*, 1994. 269(48): p. 30609-15.
183. Niwa, H., K. Yamamura, and J. Miyazaki, Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 1991. 108(2): p. 193-9.
184. Parish, J.H., *The Biochemistry of viruses: By S. J. Martin*. Pp 145. Cambridge University Press, Cambridge and London. 1978. Cambridge texts in chemistry and biochemistry series. £10.45 (hard cover) or £3.95 (paperback). *Biochemical Education*, 1978. 6(3): p. 68-68.
185. Laemmli, U.K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 1970. 227: p. 680.
186. Rojas, J.M., et al., Vaccination with Recombinant Adenoviruses Expressing the Peste des Petits Ruminants Virus F or H Proteins Overcomes Viral Immunosuppression and Induces Protective Immunity against PPRV Challenge in Sheep. *PLoS One*, 2014. 9(7): p. e101226.
187. González-Navajas, J.M., et al., Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nature Reviews Immunology*, 2012. 12: p. 125.
188. Ivashkiv, L.B. and L.T. Donlin, Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, 2013. 14: p. 36.
189. Yokota, S., et al., Measles virus P protein suppresses Toll-like receptor signal through up-regulation of ubiquitin-modifying enzyme A20. *FASEB J*, 2008. 22(1): p. 74-83.

190. Laurent-Rolle, M., et al., The NS5 protein of the virulent West Nile virus NY99 strain is a potent antagonist of type I interferon-mediated JAK-STAT signaling. *J Virol*, 2010. 84(7): p. 3503-15.
191. Rodriguez, J.J., C.D. Cruz, and C.M. Horvath, Identification of the nuclear export signal and STAT-binding domains of the Nipah virus V protein reveals mechanisms underlying interferon evasion. *J Virol*, 2004. 78(10): p. 5358-67.
192. Rodriguez, J.J., J.P. Parisien, and C.M. Horvath, Nipah virus V protein evades alpha and gamma interferons by preventing STAT1 and STAT2 activation and nuclear accumulation. *J Virol*, 2002. 76(22): p. 11476-83.
193. Takaki, H., et al., Strain-to-strain difference of V protein of measles virus affects MDA5-mediated IFN- $\beta$ -inducing potential. *Molecular Immunology*, 2011. 48(4): p. 497-504.
194. Poole, E., et al., The V proteins of simian virus 5 and other paramyxoviruses inhibit induction of interferon-beta. *Virology*, 2002. 303(1): p. 33-46.
195. Plumet, S., et al., Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response. *PLoS One*, 2007. 2(3): p. e279.
196. Weber, F., et al., Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J Virol*, 2006. 80(10): p. 5059-64.
197. Komatsu, T., et al., C and V proteins of Sendai virus target signaling pathways leading to IRF-3 activation for the negative regulation of interferon-beta production. *Virology*, 2004. 325(1): p. 137-48.
198. Nakatsu, Y., et al., Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and V proteins. *J Virol*, 2008. 82(17): p. 8296-306.
199. Ito, M., et al., Measles virus nonstructural C protein modulates viral RNA polymerase activity by interacting with host protein SHCBP1. *J Virol*, 2013. 87(17): p. 9633-42.
200. Toth, A.M., et al., Protein kinase PKR mediates the apoptosis induction and growth restriction phenotypes of C protein-deficient measles virus. *J Virol*, 2009. 83(2): p. 961-8.

201. McAllister, C.S., et al., Mechanisms of protein kinase PKR-mediated amplification of beta interferon induction by C protein-deficient measles virus. *J Virol*, 2010. 84(1): p. 380-6.
202. Takeuchi, K., et al., Sendai virus C protein plays a role in restricting PKR activation by limiting the generation of intracellular double-stranded RNA. *J Virol*, 2008. 82(20): p. 10102-10.
203. Pfaller, C.K., et al., Measles virus C protein impairs production of defective copyback double-stranded viral RNA and activation of protein kinase R. *J Virol*, 2014. 88(1): p. 456-68.
204. Pfaller, C.K., et al., Measles Virus Defective Interfering RNAs Are Generated Frequently and Early in the Absence of C Protein and Can Be Destabilized by Adenosine Deaminase Acting on RNA-1-Like Hypermutations. *J Virol*, 2015. 89(15): p. 7735-47.
205. Sparrer, K.M., et al., Measles virus C protein interferes with Beta interferon transcription in the nucleus. *J Virol.*, 2012. 86(2): p. 796-805. doi 10.1128/JVI.05899-11. Epub 2011 Nov 9.
206. Chinnakannan, S.K., S.K. Nanda, and M.D. Baron, Morbillivirus V Proteins Exhibit Multiple Mechanisms to Block Type 1 and Type 2 Interferon Signalling Pathways. *PLoS One*, 2013. 8(2).
207. Yoneda, M., et al., The nonstructural proteins of Nipah virus play a key role in pathogenicity in experimentally infected animals. *PLoS One*, 2010. 5(9): p. e12709.
208. Baron, J., et al., Early changes in cytokine expression in peste des petits ruminants disease. *Vet Res*, 2014. 45: p. 22.
209. Andrejeva, J., et al., The p127 subunit (DDB1) of the UV-DNA damage repair binding protein is essential for the targeted degradation of STAT1 by the V protein of the paramyxovirus simian virus 5. *J Virol*, 2002. 76(22): p. 11379-86.
210. Didcock, L., et al., The V protein of simian virus 5 inhibits interferon signalling by targeting STAT1 for proteasome-mediated degradation. *J Virol*, 1999. 73(12): p. 9928-33.
211. Huang, Z., et al., Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist. *J Virol*, 2003. 77(16): p. 8676-85.

212. Palosaari, H., et al., STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J Virol*, 2003. 77(13): p. 7635-44.
213. Bousse, T., et al., Human parainfluenza virus type 1 but not Sendai virus replicates in human respiratory cells despite IFN treatment. *Virus Res*, 2006. 121(1): p. 23-32.
214. Chambers, R. and T. Takimoto, Host specificity of the anti-interferon and anti-apoptosis activities of parainfluenza virus P/C gene products. *J Gen Virol*, 2009. 90(Pt 8): p. 1906-15.
215. Komatsu, T., et al., Sendai virus blocks alpha interferon signaling to signal transducers and activators of transcription. *J Virol*, 2000. 74(5): p. 2477-80.
216. Valmas, C., et al., Marburg virus evades interferon responses by a mechanism distinct from ebola virus. *PLoS Pathog*, 2010. 6(1): p. e1000721.
217. Lin, R.J., et al., Blocking of interferon-induced Jak-Stat signaling by Japanese encephalitis virus NS5 through a protein tyrosine phosphatase-mediated mechanism. *J Virol*, 2006. 80(12): p. 5908-18.
218. Lin, R.J., et al., Blocking of the alpha interferon-induced Jak-Stat signaling pathway by Japanese encephalitis virus infection. *J Virol*, 2004. 78(17): p. 9285-94.
219. Guo, J.T., J. Hayashi, and C. Seeger, West Nile virus inhibits the signal transduction pathway of alpha interferon. *J Virol*, 2005. 79(3): p. 1343-50.
220. Ramachandran, A., J.P. Parisien, and C.M. Horvath, STAT2 Is a Primary Target for Measles Virus V Protein-Mediated Alpha/Beta Interferon Signaling Inhibition: *J Virol*. 2008 Sep;. Epub 2008 Jun 25 doi:10.1128/JVI.00831-08.
221. Pisanelli, G., et al., La Piedad Michoacan Mexico Virus V protein antagonizes type I interferon response by binding STAT2 protein and preventing STATs nuclear translocation. *Virus Res*, 2016. 213: p. 11-22.
222. Devaux, P., et al., Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation. *Virology*, 2007. 360(1): p. 72-83.
223. Fontana, J.M., B. Bankamp, and P.A. Rota, Inhibition of interferon induction and signaling by paramyxoviruses. *Immunol Rev*, 2008. 225: p. 46-67.
224. Röthlisberger, A., et al., Two Domains of the V Protein of Virulent Canine Distemper Virus Selectively Inhibit STAT1 and STAT2 Nuclear Import. *Journal of Virology*, 2010. 84(13): p. 6328-6343.

225. Ramachandran, A. and C.M. Horvath, Paramyxovirus Disruption of Interferon Signal Transduction: STATus Report. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2009. 29(9): p. 531-537.
226. Hausmann, S., J.P. Jacques, and D. Kolakofsky, Paramyxovirus RNA editing and the requirement for hexamer genome length. *RNA*, 1996. 2(10): p. 1033-45.
227. Jacques, J.P., S. Hausmann, and D. Kolakofsky, Paramyxovirus mRNA editing leads to G deletions as well as insertions. *EMBO J*, 1994. 13(22): p. 5496-503.
228. Kulkarni, S., et al., Nipah virus edits its P gene at high frequency to express the V and W proteins. *J Virol*, 2009. 83(8): p. 3982-7.
229. Cattaneo, R., et al., Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell*, 1989. 56(5): p. 759-64.
230. Bankamp, B., et al., Genetic variability and mRNA editing frequencies of the phosphoprotein genes of wild-type measles viruses. *Virus Res*, 2008. 135(2): p. 298-306.
231. Mowen, K. and M. David, Role of the STAT1-SH2 domain and STAT2 in the activation and nuclear translocation of STAT1. *J Biol Chem*, 1998. 273(46): p. 30073-6.
232. Roy, P., et al., Identification of bluetongue virus VP6 protein as a nucleic acid-binding protein and the localization of VP6 in virus-infected vertebrate cells. *J Virol*, 1990. 64(1): p. 1-8.
233. Ratinier, M., et al., Identification and Characterization of a Novel Non-Structural Protein of Bluetongue Virus. *PLOS Pathogens*, 2011. 7(12): p. e1002477.
234. Kar, A.K., B. Bhattacharya, and P. Roy, Bluetongue virus RNA binding protein NS2 is a modulator of viral replication and assembly. *BMC Molecular Biology*, 2007. 8(1): p. 4.
235. Han, Z. and R.N. Harty, The NS3 protein of bluetongue virus exhibits viroporin-like properties. *J Biol Chem*, 2004. 279(41): p. 43092-7.
236. Viswanathan, K., K. Früh, and V. DeFilippis, Viral hijacking of the host ubiquitin system to evade interferon responses. *Curr Opin Microbiol*, 2010. 13(4): p. 517-23.
237. Ftaich, N., et al., Turnover Rate of NS3 Proteins Modulates Bluetongue Virus Replication Kinetics in a Host-Specific Manner. *J Virol*, 2015. 89(20): p. 10467-81.

238. Wirblich, C., B. Bhattacharya, and P. Roy, Nonstructural Protein 3 of Bluetongue Virus Assists Virus Release by Recruiting ESCRT-I Protein Tsg101. *J Virol*, 2006. 80(1): p. 460-73.
239. Thrower, J.S., et al., Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO Journal*, 2000. 19(1): p. 94.
240. Nathan, J.A., et al., Why do cellular proteins linked to K63-polyubiquitin chains not associate with proteasomes? *EMBO J*, 2013. 32(4): p. 552-65.
241. Chen, Z.J. and L.J. Sun, Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell*, 2009. 33(3): p. 275-86.
242. Morrison, J., et al., Dengue Virus Co-opts UBR4 to Degrade STAT2 and Antagonize Type I Interferon Signaling. *PLOS Pathogens*, 2013. 9(3): p. e1003265.
243. Aguirre, S., et al., Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. *Nat Microbiol*, 2017. 2: p. 17037.
244. Platanias, L.C., Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology*, 2005. 5: p. 375.
245. Xu, X., et al., Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by inducing SOCS1 expression. *Intervirology*, 2014. 57(2): p. 65-73.
246. Ulane, C.M., et al., Composition and assembly of STAT-targeting ubiquitin ligase complexes: paramyxovirus V protein carboxyl terminus is an oligomerization domain. *J Virol*, 2005. 79(16): p. 10180-9.
247. Bansal, O.B., et al., Membrane organization of bluetongue virus nonstructural glycoprotein NS3. *J Virol*, 1998. 72(4): p. 3362-9.
248. Freed, E.O., Viral late domains. *J Virol*, 2002. 76(10): p. 4679-87.
249. Macias, M.J., S. Wiesner, and M. Sudol, WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett*, 2002. 513(1): p. 30-7.
250. Hershko, A. and A. Ciechanover, The Ubiquitin System. *Annual Review of Biochemistry*, 1998. 67(1): p. 425-479.
251. Hershko, A., Ubiquitin: roles in protein modification and breakdown. *Cell*, 1983. 34(1): p. 11-2.

252. Lee, I. and H. Schindelin, Structural insights into E1-catalyzed ubiquitin activation and transfer to conjugating enzymes. *Cell*, 2008. 134(2): p. 268-78.
253. Kulathu, Y. and D. Komander, Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. 13(8): p. 508-23.
254. Hu, H. and S.-C. Sun, Ubiquitin signaling in immune responses. *Cell Research*, 2016. 26: p. 457.
255. Erpapazoglou, Z., O. Walker, and R. Haguenauer-Tsapis, Versatile Roles of K63-Linked Ubiquitin Chains in Trafficking. *Cells*, 2014. 3(4): p. 1027.
256. Lauwers, E., C. Jacob, and B. Andre, K63-linked ubiquitin chains as a specific signal for protein sorting into the multivesicular body pathway. *J Cell Biol*, 2009. 185(3): p. 493-502.