



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA 3A DEL
VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA**

TESIS DOCTORAL

Raúl Postigo Fernández

Madrid, 2009

Memoria presentada por el Licenciado en Farmacia Raúl Postigo Fernández para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, Septiembre de 2009

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

A mi abuela

A mis padres

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a Pachi por haberme dado la oportunidad de trabajar junto a él todo este tiempo. Gracias por ser como eres y por demostrarme que ser un gran científico no está reñido con ser una mejor persona. Gracias también a Charo, por la amabilidad con que siempre me trataste, por tu ejemplar manera de ser.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, empezando por Mari, que siempre me has mostrado tu aprecio y apoyo; Maite, porque después de tanto tiempo compartiendo madrugones y desdichas, no nos quedamos sin motivos para reír; Miguel, por todo lo que me has enseñado sin pretender hacerlo, por lo bien que lo hemos pasado; Ángela, por tu ilusión y tu forma de ser ¡suerte!; Mónica, por tu cariño; Yuri, por tu silenciosa compañía; Marga y Miguel, por todo vuestro apoyo y palabras amables. Al resto de personas con las que he coincidido en los C006, A107 y 105, gracias por hacer esto más fácil.

A Mada, por ser la persona con la que hablé en el CBM una calurosa tarde de Septiembre y me convenció de iniciar este viaje. Gracias por tu ayuda y comprensión, por tu apoyo cuando más lo necesité.

A mis ex-compañeros del 209: Esther G., Desi, María José, Esther F., Juanjo, One, Paula, Talina... por enseñarme todo en mis primeros tiempos, por compartir tantas cosas juntos (Alicante, Ibiza), por demostrarme lo importante que es sentirte arropado por la gente que te quiere.

Gracias a toda la gente del CBM que me ha demostrado su cariño y que hacen las cosas más sencillas: a mis compañeros de cultivos por las risas, por los sábados pasando células, por los conciertos a los que fuimos sin sabernos las canciones, por facebook-acompañarme durante la escritura de mi Tesis. A Antonio, fuente inagotable de conversaciones, por su confianza y enseñanzas. A mis compañeras de Seguridad Biológica (M.Cruz, Gema, Jose), por su paciencia conmigo y confidencias a media tarde. A la gente de cultivos (Alfonso y M^a Ángeles), de lavado (África) y del resto de servicios.

A mis amigos: Mayte, Noemí (tenemos tantas cosas pendientes); Santi, Isa, Rober, Laura, Ana, Ana B., por vuestra amistad; Guille, por ser quien me habló por primera vez de hacer el doctorado; Delia, Alex, Naza, Bea, Juan, Laura, Oscar, Owen, Lourdes, Paco, Ximena, Antonio, Estela, David, por tantos ratos juntos y recuerdos contruidos. Aitor, por tu revisión de esta Tesis, por ser tal y como eres, por ayudarme a ser alguien un poco mejor.

A mi familia, por ser ellos quienes más han sufrido mis altibajos científicos. A mi hermana y a Carlos por vuestro apoyo y cariño, a mis tíos Charo y Emilio por estar siempre ahí.

A mi abuela, a quien está dedicada esta Tesis, por quererme incondicionalmente. Sé que esto te enorgullece tanto como a mí.

Finalmente, a mis padres (M^a Teresa y Eusebio), por haber contribuido a que este trabajo haya sido realidad, por vuestro amor sin reparos, por vuestro ejemplo de vida.

Abreviaturas

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

Resumen en inglés

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

Introducción

I-1 La fiebre aftosa	11
I-2 El virus de la fiebre aftosa	13
I-2-1 Genoma del VFA	14
I-2-2 Proteínas del VFA	15
I-2-3 Ciclo infectivo	17
I-2-3-1 Internalización celular	17
I-2-3-2 Traducción y procesamiento proteolítico	18
I-2-3-3 Replicación del ARN	20
I-2-3-4 Encapsidación y maduración	23
I-2-4 La proteína 3A de los picornavirus	24
I-2-4-1 Proteína 3A de Poliovirus	27
I-2-4-2 Proteína 3A del VFA	29

Objetivos

Objetivos	35
-----------	----

Material y Métodos

M-1 Líneas celulares y virus	39
M-2 Clones infecciosos	40
M-3 Anticuerpos	41
M-4 Cultivo de células	42
M-5 Crecimiento de virus	42
M-6 Obtención de ADN plasmídico	43
M-7 Extracción de ARN	43
M-8 Clonaje molecular: clones infecciosos de la proteína 3A	43
M-8-1 Metodología empleada para la construcción de los clones infecciosos mutantes	45
M-8-1-1 Deleción de la proteína 3A del VFA. Mutante pMT28-Δ3A	45
M-8-1-2 Mutante de inserción pMT28-▼G-3A-▼G	47
M-8-1-3 Mutante de inserción pMT28-▼G-3A	48
M-8-1-4 Sustitución de la proteína 3A por su homóloga del VRE-A. Mutantes pMT28-3A-VRE-C y pMT28-3A-VRE-I	48
M-8-1-5 Mutantes puntuales	49

M-9 Construcción de plásmidos derivados del pRSV portando versiones mutadas de la proteína 3A del VFA	51
M-10 Transcripción <i>in vitro</i>	52
M-11 Transfección en cultivos celulares	53
M-11-1 Transfección con ARN	53
M-11-2 Transfección con ADN	53
M-12 Titulación de virus	53
M-13 Determinación de la infectividad específica del ARN de los mutantes.	54
M-14 Traducción <i>in vitro</i>	54
M-14-1 Cuantificación de incorporación de radiactividad	54
M-14-2 Análisis de las proteínas marcadas con ³⁵ S mediante electroforesis en gel de poliacrilamida	55
M-15 Ensayo de sensibilidad a Brefeldina A	55
M-16 Condiciones empleadas en las amplificaciones por PCR	55
M-16-1 RT-PCR	56
M-16-2 PCR en tiempo real	56
M-17 Inmunoensayos	57
M-17-1 <i>Western-Blot</i>	57
M-17-2 Inmunoprecipitación	58
M-17-3 Inmunofluorescencia	59
M-18 Ensayo de letalidad en ratón lactante	59
M-19 Métodos estadísticos y tratamiento de datos	60
M-20 Disoluciones y tampones	60
M-21 Oligonucleótidos	61

Resultados

R-1 Construcción de clones infecciosos del VFA para la obtención de virus mutantes en 3A	65
R-1-1 Mutantes de delección	66
R-1-2 Mutantes de inserción	67
R-1-3 Mutantes de reemplazo de 3A	68
R-1-4 Mutantes puntuales	71
R-2 Síntesis y procesamiento <i>in vitro</i> de la poliproteína viral de los distintos mutantes de 3A	74
R-3 Infectividad del ARN de mutantes de 3A en cultivos celulares	78
R-3-1 Citopatogenicidad de mutantes de 3A en células BHK-21	78
R-3-2 Citopatogenicidad de mutantes de 3A en células VERO	81
R-3-3 Producción de virus infecciosos a partir del ARN de los mutantes de la proteína 3A	82
R-3-3-1 Infectividad específica del ARN de los mutantes de 3A	82
R-3-3-2 Cuantificación de la producción viral de mutantes de la proteína 3A	84
R-3-4 Expresión de proteínas virales de los mutantes de la proteína 3A en cultivos celulares	86
R-3-4-1 Análisis mediante <i>western-blot</i>	86
R-3-4-2 Análisis por inmunofluorescencia de productos virales en células transfectadas con ARN de mutantes de la proteína 3A	89

R-3-5 Estudio de la expresión transitoria de las proteínas mutadas en los residuos L38E y L41E	92
R-3-6 Análisis de la producción de ARN viral en células transfectadas con ARN de mutantes de 3A	94
R-3-6-1 Detección de la producción de ARN viral por RT-PCR semicuantitativa	94
R-3-6-2 RT-PCR a tiempo real	95
R-4 Evaluación de la posible complementación en <i>trans</i> de mutantes de la proteína 3A	97
R-4-1 Producción de ECP por ARN de mutantes de la proteína 3A en clones celulares que expresan 3A o 3ABBB	98
R-4-2 Producción viral de mutantes de la proteína 3A en clones celulares que expresan 3A o 3ABBB	101
R-5 Patogenicidad de los ARNs de mutantes de 3A en ratón lactante	103

Discusión

D Estudio funcional de la proteína 3A	109
D-1 Mutantes de delección de 3A	111
D-2 Mutantes de sustitución por la proteína 3A del VRE-A	115
D-3 Mutantes de inserción	117
D-4 Mutante pMT28-C65S	120
D-5 Mutantes pMT28-Q44R y pMT28-Q44D	120
D-6 Mutantes pMT28-L38E y pMT28-L41E	122
D-7 Consideraciones finales	124

Conclusiones

Conclusiones	129
--------------	-----

Bibliografía

Bibliografía	133
--------------	-----

Anexo

Rosas, M. F., Y. A. Vieira, R. Postigo, M. A. Martin-Acebes, R. Armas-Portela, E. Martinez-Salas, and F. Sobrino. 2008. Susceptibility to viral infection is enhanced by stable expression of 3A or 3AB proteins from foot-and-mouth disease virus. *Virology* **380**:34-45.

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARN+	ARN de polaridad positiva
ARN-	ARN de polaridad negativa
ATTC	Colección americana de cultivos tipo (<i>American Type Culture Collection</i>)
BFA	Brefeldina A
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
BHK-21	Células de riñón de hamster (<i>Baby Hamster Kidney</i>)
ADNc	ADN copia
CBMSO	Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”
c.p.m.	Cuentas por millón
“cre”	Elemento de replicación en <i>cis</i> (<i>cis replication element</i>)
DEAE	Dietilaminoetil
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	2'-desoxinucleósido-5'-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
ECP	Efecto citopático
EDTA	Etilen-diamino-tetraacetato
FA	Fiebre aftosa
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
h.p.t.	Horas pos-transfección
h.p.i.	Horas pos-infección
HS	Heparán sulfato
IRES	Sitio interno de entrada de ribosomas (<i>Internal Ribosomal Entry Site</i>)
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
M	Molar
m.d.i.	Multiplicidad de infección
mg	Miligramo

MHC-I	Complejo principal de histocompatibilidad I (<i>Main histocompatibility complex</i>)
ITAF	Factor trans-activante del IRES (<i>IRES Trans-acting factor</i>)
min.	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milimetro
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
PAC	Puromicina acetil transferasa
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>PolyacrylAmide Gel Electrophoresis</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PCBP	Proteína de unión a poli-C (<i>Poli-C Binding Protein</i>)
PTBP	Proteína de unión a tramo de polipirimidinas (<i>Polypyrimidine Tract Binding Protein</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Proteína estructural
PK	Pseudonudos (<i>Pseudoknots</i>)
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PNE	Proteína no estructural
PoliA	Poliadenilato
PoliC	Polirribocitidilato
Pur	Puromicina
PV	Poliovirus
RNC	Región no codificante
rNTPs	Ribonucleótido 5'-trifosfato
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscriptasa
RT-PCR	Reacción de retrotranscripción seguida de una amplificación por PCR
SDS	Dodecil sulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
TCA	Ácido tricloroacético
TNF	Factor de necrosis tumoral (<i>Tumor necrosis factor</i>)
U	Unidad

UFP	Unidad formadora de placa
V	Voltio
VERO	Células epiteliales de mono verde africano
VFA	Virus de la fiebre aftosa
VHA	Virus de la Hepatitis A
VRB-1	Virus de la rinitis bovina 2
VRE-A	Virus de la rinitis equina A
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
<i>wt</i>	Tipo silvestre
5'NC	Región 5 prima no codificante
3'NC	Región 3 prima no codificante
°C	Grado centígrado
μCi	Microcurio
μg	Microgramo
μl	Microlitro
Ø	Diámetro

Códigos de una letra de aminoácidos

Ácido aspártico	D	Isoleucina	I
Ácido glutámico	E	Leucina	L
Alanina	A	Lisina	K
Arginina	R	Metionina	M
Aspargina	N	Prolina	P
Cisteína	C	Serina	S
Fenilalanina	F	Tirosina	Y
Glicina	G	Treonina	T
Glutamina	Q	Triptófano	W
Histidina	H	Valina	V

Resumen en inglés

Non-structural protein (NSP) 3A can play different roles in picornavirus replication and growth. In foot-and-mouth disease virus (FMDV), 3A is longer than that of the remaining picornavirus and is linked to three tandem-copies of 3B, instead of a single one.

To evaluate different aspects of FMDV 3A functionality, we have generated several mutants derived from plasmid pMT28, including mutants on the aminoterminal region that were designed using folding predictions based on structural data available for this region of poliovirus 3A protein. We first determined the ability of these mutant RNAs to: i) *in vitro* translate and process the viral protein, ii) produce cytopathogenicity and infection, as well as synthesize viral RNA and proteins when transfected in BHK-21 cells, iii) multiply in and kill suckling mice, and iv) be rescued when transfected in BHK-21-derived clones expressing 3A or 3ABBB FMDV proteins.

Deletion of 3A rendered non viable RNAs in BHK-21 cells and in suckling mice, and this defect correlated with a blockage of RNA and protein synthesis in BHK-21 cells. This pattern of lethality was also observed in mutants with the complete sequence of 3A replaced by that of the equine rhinitis A virus, another member of the *Aphthovirus* genus.

Likewise, no viable viruses were recovered from transfections with RNA from mutants carrying insertions of a G at residues 151 and 5, or 5 of 3A, which flank the target cleavage sites of 3C, responsible for its processing. In this case, the double mutant, but not the single mutant, showed an altered pattern of *in vitro* protein processing. This result suggests that insertion of a G at position 5 of 3A blocks viral RNA synthesis.

A point mutant (C65S) in the single cysteine residue found in FMDV 3A, located in the hydrophobic region of this protein, rendered a fully infectious RNA in both BHK-21 cells and suckling mice, indicating that the impairment of the interactions in which this residue C65 is involved, which could mediate protein-protein interactions, does not affect virus viability and pathogenicity.

Mutants in position 44, in which the substitution Q44R adapts FMDV to guinea pig, revealed tolerance to electrostatic charge changes at that position. Position 44 of 3A overlaps with the α -helix domains predicted to conform a hydrophobic interface in 3A, which could be involved in relevant protein-protein interactions, including protein dimerization. While substitution of Q by the positive charged aminoacid R (mutation

Q44R) rendered a fully infectious RNA, the mutant carrying a negative charged aminoacid (Q44D) was killed in mice and showed a delay in the onset of pathogenic effect, virus production, and viral RNA and protein synthesis in BHK-21 cells. This delay was associated to the selection in the recovered virus of substitution D44E, indicating that mutation Q44D impaired but did not abolish viral replication.

Aminoacids L38 and L41 are located exposed in a dimer model predicted for FMDV 3A, which made them interesting candidates to be mutated. Our results showed that RNA carrying mutations L38E and L41E showed a viable phenotype similar to that of the RNA carrying mutation Q44D, and required the selection of virus variants restoring the hydrophobicity of the residue (E38V and E41A, respectively).

Only those mutants showing viability in BHK-21 cells upon selection of virus variants, but not those whose mutations were lethal, could be partially complemented when transfected in BHK-21-derived clones expressing *in trans* 3A or 3ABBB FMDV proteins, showing a decrease in the time required for virus variant selection.



Introducción

I-1 La fiebre aftosa

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad vesicular aguda que afecta a animales de pezuña hendida, entre los que destacan especies de importancia ganadera como vacas, cerdos, ovejas, cabras y más de 30 especies de rumiantes salvajes (Thomson *et al.*, 2003). Además, la FA es considerada como una de las enfermedades animales más transmisibles (revisado en Sobrino y Domingo, 2004).

Aunque la enfermedad llegó a estar muy extendida en el pasado, en la actualidad se ha conseguido su erradicación en diversas zonas del planeta como Europa Occidental y América del Norte.

La FA figura en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2008). Además, se trata de la primera enfermedad para la cual la OIE ha establecido una lista oficial de países y zonas reconocidos como libres de misma. Para obtener información actualizada sobre la FA, se puede consultar la página web de la Organización Mundial de Sanidad Animal (www.oie.int).

Aunque la tasa de mortalidad de la FA no es elevada (Pereira *et al.*, 1981; Collen *et al.*, 1994), sí puede serlo su tasa de morbilidad, que varía en función de la especie animal afectada y el estado inmunológico, entre otros factores. En regiones donde la enfermedad no es endémica, la tasa de morbilidad puede llegar a ser del 100% (Ficha Técnica de la Fiebre Aftosa, OIE, 2007). La FA produce un marcado descenso en la productividad ganadera, además de causar restricciones en el tráfico de animales y productos derivados desde las zonas afectadas (Sutmoller *et al.*, 2003). Un claro ejemplo de las consecuencias de la aparición de esta enfermedad lo representan los brotes de fiebre aftosa que tuvieron lugar en Taiwan en 1997, donde se sacrificaron 4 millones de cerdos, con un coste aproximado para su economía de 6.000 millones de dólares (Kitching, 1998), y el brote de Reino Unido de 2001, donde se produjeron enormes pérdidas económicas y ganaderas (Knowles *et al.*, 2001).

En la actualidad, la FA se localiza, fundamentalmente, en regiones en desarrollo, agravando los problemas económicos de estos países. El control de la enfermedad en zonas endémicas se realiza mediante el empleo de vacunas basadas en virus inactivados (Barteling *et al.*, 1991). Esta estrategia permitió en los años 70 la erradicación del virus en regiones como la Unión Europea (Brown *et al.*, 1992). Sin embargo, la vacunación presenta una serie de desventajas que desaconsejan actualmente su uso indiscriminado

(De Diego *et al.*, 1997; Doel *et al.*, 1994; Doel, 1999). Las políticas actuales de no vacunación en los países libres de la enfermedad, junto con el sacrificio de los animales infectados en el caso de los nuevos brotes y las severas restricciones al tráfico de ganado desde las zonas afectadas, han permitido mantener libres de la enfermedad a los países en los que ya fue erradicada (Donaldson y Doel, 1992). No obstante, el sacrificio masivo de animales en el caso de reintroducción de la enfermedad, como la ocurrida en el Reino Unido en 2001 (revisado en Sobrino y Domingo, 2004), ha levantado una fuerte controversia sobre la conveniencia o no de la vacunación de los animales susceptibles en situaciones de emergencia.

La enfermedad está causada por el virus de la fiebre aftosa (VFA). La vía más común de infección por este virus es la transmisión aérea (Donaldson *et al.*, 1987), aunque también pueden producirse infecciones mecánicas a través de la piel (Brooksby, 1982) o por ingestión (Burrows *et al.*, 1981). Cuando la transmisión es aérea, el VFA infecta inicialmente células del epitelio estratificado de la faringe, dando lugar a lesiones o aftas primarias (Burrows *et al.*, 1981). Entre 24 y 48 horas, tras una primera ronda de replicación, aparecen viremia y fiebre. Como consecuencia de la viremia, el virus se disemina por todo el organismo y genera aftas secundarias en zonas distintas de la vía de entrada. Una de las regiones del cuerpo del animal en que más frecuentemente aparecen aftas secundarias son las extremidades, lo que provoca debilidad y tendencia a la postración (Yilma, 1980).

En cerdos, la fase aguda de la enfermedad dura aproximadamente una semana, disminuyendo en intensidad al aparecer anticuerpos circulantes específicos (Bachrach, 1977). En rumiantes, se puede establecer una infección persistente asintomática en la que se puede aislar virus del animal en muestras de esófago o de fluidos respiratorios durante semanas y, en algunos casos, años (Van Bekkum *et al.*, 1966). Esto parece ser debido al establecimiento de un equilibrio dinámico entre la respuesta inmunológica del animal y la selección de variantes antigénicos virales en la mucosa del tracto respiratorio superior (Salt, 1993). Se ha descrito el estado de portador asintomático en vacas, ovejas y cabras, pero no en cerdos.

En el caso del ganado ovino, los animales son muy sensibles al contagio aéreo o a la exposición a animales infectados (Kitching *et al.*, 2002b). Sin embargo, aunque éstos secretan gran cantidad de virus en forma de aerosol, un gran número del total de animales infectados no desarrollan lesiones o sufre tan solo una lesión (Hughes *et al.*, 2002). La presencia de portadores asintomáticos hace difícil el diagnóstico clínico en

ovejas, favoreciendo la diseminación viral, como ocurrió durante el brote epidémico que asoló Reino Unido en 2001 (Kitching *et al.*, 2002a).

Diagnóstico y control de la enfermedad

El diagnóstico de la enfermedad se basa inicialmente en el reconocimiento de los signos clínicos característicos. En una segunda fase, es necesaria su confirmación mediante las pruebas de laboratorio que permiten distinguir si el agente causal es el VFA u otro de los virus que provocan enfermedad vesicular. Las técnicas de diagnóstico oficialmente reconocidas utilizan el aislamiento viral, la detección de antígenos o ácidos nucleicos virales y pruebas serológicas. Actualmente, también se contempla la posibilidad de analizar las proteínas no estructurales del virus para distinguir entre animales infectados y vacunados “Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres” (OIE, 2008).

Las medidas de obligado cumplimiento ante un brote de FA incluyen, además de la comunicación en menos de 24 horas a la OIE, un sistema de detección y de alerta temprano y la adopción de las medidas de prevención según las directrices marcadas en el “Código Sanitario para los Animales Terrestres” (OIE, 2008).

El control de la enfermedad se centra básicamente en los planes de vacunación selectiva. La vacunación se emplea en los países donde la FA es endémica para proteger a los animales no infectados de la enfermedad. Por otra parte, existe un banco con las vacunas de emergencia más eficaces que permiten alcanzar una alta protección a los 4 días post-vacunación (Salt *et al.*, 1998), empleadas en el caso de reintroducción de la enfermedad en una zona libre de la misma.

I-2 El virus de la fiebre aftosa

El agente etiológico de la enfermedad es el VFA, un virus perteneciente a la familia *Picornaviridae* (Rueckert *et al.*, 1996) y que, junto con el virus de la rinitis equina-A (VRE-A) (Li *et al.*, 1996) y el virus de la rinitis bovina-2 (VRB-2) (Hollister *et al.*, 2008), constituye el género *Aphthovirus*.

El VFA es un virus pequeño sin envoltura, con una cápsida icosaédrica compuesta por 60 copias de cada una de las cuatro proteínas estructurales que codifica (1A, 1B, 1C y 1D). Esta cápsida protege a un genoma de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 8,5 Kb (Bachrach, 1977), poliadenilado en su extremo 3' y unido covalentemente en su extremo 5' a una pequeña proteína viral no estructural uridilada, llamada 3B o Vpg (Sangar *et al.*, 1977) (Figura 1).

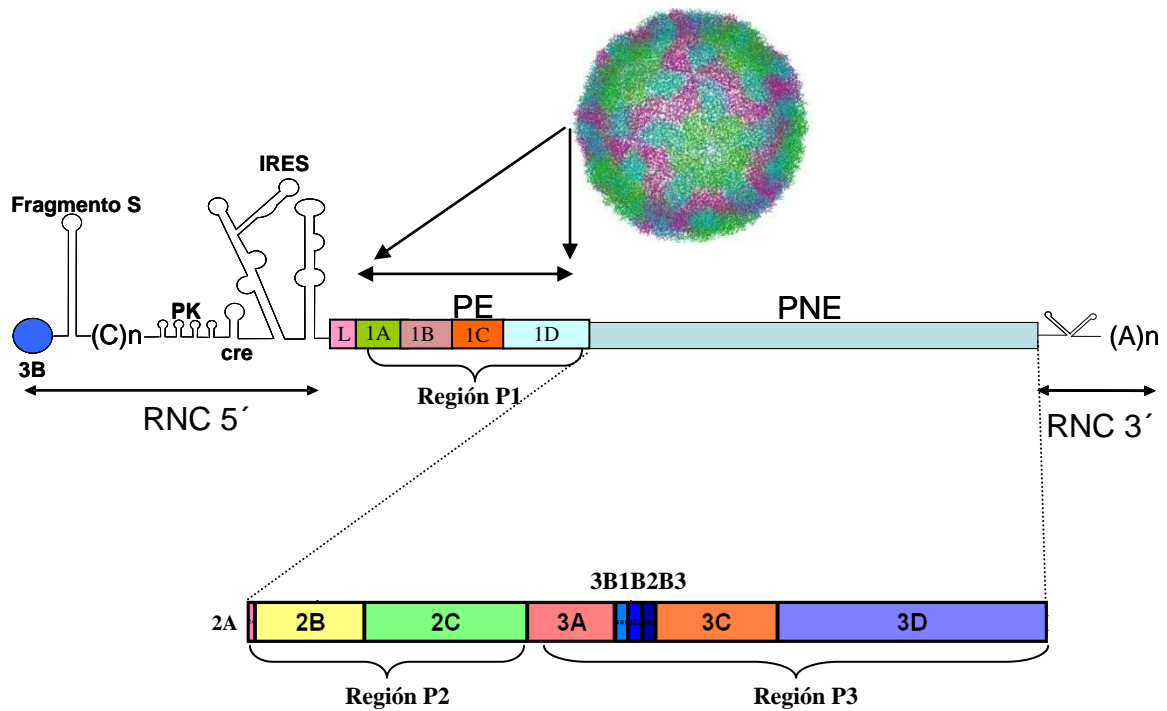


Figura 1. Representación esquemática del genoma y las proteínas del VFA. En trazos lineales se representan las estructuras secundarias del ARN viral y en recuadros coloreados las distintas proteínas codificadas en el genoma. La estructura de la cápsida viral se representa en base a las coordenadas atómicas de la cápsida del aislado C-S8c1 (Lea *et al.*, 1994), con el programa PyMol (Delano Scientific LLC).

Tras la entrada del virus en la célula susceptible, el ARN viral es rápidamente traducido, originando una única poliproteína que es procesada mediante diversas proteasas virales y posiblemente celulares (Ryan *et al.*, 1989; datos del laboratorio no publicados). Este proceso da lugar a diversos productos intermediarios, para alguno de los cuales existe evidencia de su funcionalidad (Moffat *et al.*, 2005; Capozzo *et al.*, 2002), y cuyo procesamiento posterior da lugar a 15 proteínas maduras (Grubman *et al.*, 1984).

I-2-1 Genoma del VFA

El genoma del VFA es similar al del resto de picornavirus; posee una única pauta abierta de lectura, flanqueada en sus extremos por regiones con secuencias no codificantes (RNC), que presentan una estructura secundaria muy marcada (Figura 1). En la región no codificante del extremo 5' (RNC 5') se pueden distinguir varios elementos: el fragmento "S" de 350-380 pares de bases, seguido de un fragmento de Poli-C, implicado según ciertos autores en la virulencia del virus (Zibert *et al.*, 1990), y de cuatro regiones de "pseudoknots" o pseudonudos (PK), de función desconocida. A continuación se encuentran una región con estructura de bucle denominada "cre" implicada en la replicación viral, ya que es necesaria para la uridilación específica de la

proteína 3B (Paul *et al.*, 2000; Mason *et al.*, 2002). El elemento “cre” se encuentra inmediatamente adyacente a una región con estructura secundaria muy conservada responsable de la iniciación interna de la traducción, denominada IRES (Kuhn *et al.*, 1990; Martínez-Salas *et al.*, 2002). A continuación se encuentra la secuencia codificante de la poliproteína viral, cuya traducción tiene lugar a partir de 2 codones AUG, distanciados entre sí por 84 nucleótidos. Ambos codones AUG se utilizan alternativamente para la iniciación de la traducción (Clarke *et al.*, 1985), dando lugar a dos formas funcionales de la proteína L (*leader*): Lab y Lb (Beck *et al.*, 1983; Belsham, 1992 y 1993). En el extremo 3' del ARN se localiza otra región no codificante (RNC 3') de unos 100 nucleótidos, para la que se predice una estructura secundaria altamente organizada (Chatterjee *et al.*, 1976), esencial para la infectividad del ARN viral (Saiz *et al.*, 2001; Rodríguez Pulido *et al.*, 2009) (Figura 1). La RNC 3' está seguida de un tramo de poli-A de entre 60 a 80 nucleótidos, que se encuentra codificado por el virus, a diferencia de lo que ocurre en los ARN mensajeros celulares en los que se añade postranscripcionalmente.

El ARN del VFA es infeccioso al ser transfectado en líneas celulares susceptibles (Belsham y Bostock, 1988) y tras ser inoculado en ratón lactante y en cerdo (Baranowski *et al.*, 2003; Rodríguez Pulido *et al.*, 2009). Esto ha permitido la obtención de clones infecciosos (ver M-2) a partir de plásmidos conteniendo su secuencia genómica, capaces de sintetizar *in vitro* ARN viral, en los que es posible introducir mutaciones (Zibert *et al.*, 1990; Toja *et al.*, 1999). Esto ha hecho posible el estudio de mutagénesis dirigida del ARN viral, como el desarrollado en esta Tesis Doctoral.

I-2-2 Proteínas del VFA

La poliproteína viral se puede dividir, excluyendo a la proteína *leader*, en dos regiones diferenciadas: la correspondiente a las proteínas estructurales (PE), codificadas por la región P1 del genoma y encargadas de constituir la cápsida del virus; y la correspondiente a las proteínas no estructurales (PNE), codificadas en las regiones P2 y P3 del genoma, que están implicadas en el desarrollo de las distintas etapas de la replicación y patogenicidad virales (Figura 1).

El procesamiento de la poliproteína viral se realiza básicamente por una serie de proteasas que se encuentran codificadas dentro del genoma viral: Lab/Lb, 2A y 3C (ver I-2-3-2 Traducción y Procesamiento proteolítico).

Las proteínas estructurales del VFA son cuatro y se denominan 1A, 1B, 1C y 1D (más conocidas como VP4, VP2, VP3 y VP1, respectivamente). Con la excepción de VP4, que no se encuentra expuesta en la superficie de la partícula viral, todas ellas son responsables de la antigenicidad del virus, y participan en el reconocimiento y unión a receptores de superficie presentes en las membranas de las células susceptibles (Jackson *et al.*, 2002). Las PNE se denominan: Lab, Lb, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B1, 3B2, 3B3, 3C y 3D, existiendo tres copias no idénticas de la proteína 3B situadas en tándem (Figura 1).

Dentro de la región P2 del genoma viral, además de la secuencia de la proteasa 2A se encuentran las de las proteínas 2B y 2C. Estas proteínas colocalizan en células infectadas, como ocurre con otros picornavirus, con marcadores de vesículas que derivan del retículo endoplásmico en las que tiene lugar la replicación viral (Bienz *et al.*, 1990; García-Briones *et al.*, 2006; Moffat *et al.*, 2005). En el caso específico del VFA, el precursor 2BC es el responsable de la inhibición de la secreción de proteínas observada en las células infectadas (Moffat *et al.*, 2005). Además, la proteína 2C se ha relacionado con la replicación del VFA ya que modificaciones en ella son responsables de la resistencia del virus al tratamiento con cloruro de guanidinio, una droga que afecta a la replicación viral (Saunders y King, 1982).

El procesamiento del precursor P3 del VFA da lugar a distintos productos intermedios de procesamiento (3ABBBC, 3ABBB, 3ABB y 3AB, entre otros) y a las proteínas virales maduras (3A, 3B, 3C y 3D), según se representa en la Figura 2.

La proteína 3A del VFA consta de aproximadamente 153 aminoácidos y es escindida del resto de la poliproteína por efecto de la proteasa 3C. Sus funciones específicas se detallan en el apartado I-2-4-2.

Con respecto a la proteína 3B, la presencia de tres copias en tándem no idénticas, pero igualmente funcionales (King *et al.*, 1980), supone una característica diferencial del VFA respecto al resto de picornavirus (Forss *et al.*, 1982). La proteína 3B participa en el inicio de la replicación del ARN viral (ver apartado 1-2-3-3), y se encuentra unida al extremo 5' de las moléculas de ARN de polaridad positiva (ARN+) y negativa (ARN-) (Grubman, 1980; Sangar *et al.*, 1977). Cada una de las copias de 3B es capaz de uridilarse *in vitro* por mediación de la polimerasa 3D (Ferrer-Orta *et al.*, 2006; Nayak *et al.*, 2005).

Se han obtenido, mediante ingeniería genética, virus viables con tan solo una copia de 3B que replican con menor eficiencia que el virus salvaje (*wt*) (Falk *et al.*, 1992), relacionándose la infectividad viral con el número de copias de la proteína 3B.

Por otro lado, también se ha relacionado el número de copias de la proteína 3B con la patogenicidad del VFA en cerdos (Pacheco *et al.*, 2003).

La proteína 3C es la proteasa responsable de la mayoría de los cortes proteolíticos que tienen lugar en la poliproteína viral del VFA (Ryan *et al.*, 1989), según se detalla en el apartado I-2-3-2. Su estructura tridimensional ha sido resuelta mediante cristalografía de Rayos X (Birtley *et al.*, 2005). A diferencia de lo observado en poliovirus (PV), la proteína 3C del VFA no requiere la presencia de 3D en forma del precursor 3CD para ejercer su función proteolítica (Ryan *et al.*, 1989).

La proteína 3D es una ARN polimerasa dependiente de ARN, de la que se conoce su estructura molecular (Ferrer-Orta *et al.*, 2004). Esta proteína es la encargada de la replicación del genoma del VFA (Newman *et al.*, 1979) y de la uridilación de 3B (Nayak *et al.*, 2005), según se detalla en el apartado I-2-3-3.

I-2-3 Ciclo infectivo

Como otros picornavirus, el VFA tiene un ciclo infectivo corto de 4 a 6 horas en células en cultivo (BHK-21). Este ciclo es lítico con generación de efecto citopático (ECP), presentando como efecto más destacado la reorganización de membranas subcelulares (Rueckert *et al.*, 1996; Knox *et al.*, 2005; Monaghan *et al.*, 2004).

Por otro lado, se ha descrito el establecimiento de infecciones persistentes del VFA en células BHK-21 (de la Torre *et al.*, 1985). El mecanismo por el cual se establece esta infección persistente implica una coevolución de las células, que se hacen progresivamente más resistentes a la infección por el VFA, y del virus, que incrementa su virulencia sobre las células infectadas (Toja *et al.*, 1999; Herrera *et al.*, 2008).

I-2-3-1 Internalización celular

El VFA se une a receptores específicos en la superficie de algunas células, lo que media su internalización. Experimentos iniciales mostraron que el tratamiento del virión con tripsina provocaba una única ruptura del residuo R144 de la proteína VP1, lo que suponía la pérdida de la capacidad de unirse a células susceptibles (Robertson *et al.*, 1983). El residuo R144 pertenece a la secuencia aminoacídica RGD, localizada en un bucle expuesto superficialmente en la proteína VP1 - bucle G-H -, que participa en la unión del virus al receptor en la superficie celular.

El primer receptor celular identificado para el VFA fue la integrina $\alpha v \beta 3$, observándose que el virus era capaz de infectar células no permisivas que expresaban

transitoriamente esta molécula (Neff *et al.*, 1998). Desde entonces se han identificado otras integrinas que también actúan como receptores, como son $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 6$ y $\alpha v\beta 8$ (Jackson *et al.*, 2000, 2002 y 2004).

Tras su unión a integrinas, el virión es introducido en la célula mediante un mecanismo dependiente de clatrina (Berryman *et al.*, 2005; O'Donnell *et al.*, 2005; Martin-Acebes *et al.*, 2007). Posteriormente, el virus internalizado se localiza en un compartimento endosomal ácido, donde se produce el desensamblaje de la cápsida debido a las fuerzas electrostáticas que generan la protonación de unos residuos de H en la proteína 1C de la cápsida, y se libera al citoplasma su ARN unido covalentemente a la proteína 3B (Curry *et al.*, 1995, Ellard *et al.*, 1999; van Vlijmen *et al.*, 1998).

El crecimiento del VFA en líneas celulares susceptibles selecciona, preferentemente en aislados de serotipo O, el uso alternativo de heparán sulfato (HS) como receptor. En este serotipo, la capacidad de unirse a HS implica la adquisición de residuos con carga positiva en la cápsida, siendo relevante la sustitución H56R en la proteína VP3 (Sa-Carvalho *et al.*, 1997). Los virus que utilizan HS como receptor son internalizados en la célula empleando la ruta de caveolas (O'Donnell *et al.*, 2008).

I-2-3-2 Traducción y procesamiento proteolítico

Después de la desencapsidación, el ARN de los picornavirus es liberado al citoplasma por un mecanismo no bien establecido. Se postula que una vez en el citoplasma se produciría la separación de la proteína 3B del extremo 5' del ARN, como paso previo al inicio de la traducción (Ambros *et al.*, 1978b), si bien algunos autores han descrito que el complejo de iniciación de la traducción puede establecerse con la proteína 3B unida al ARN (Golini *et al.*, 1980). El primer paso de la replicación del VFA consiste en la traducción del ARN liberado. Este paso es imprescindible para la síntesis de las proteínas virales que permitirán la replicación del ARN y de todas las modificaciones celulares asociadas a este proceso. Es tras esta primera ronda de traducción cuando se produce la traducción secundaria masiva de proteínas virales, que tiene lugar empleando como molde las nuevas cadenas de ARN⁺ sintetizadas. En otros picornavirus, este proceso está acoplado espacial y temporalmente al de la replicación del ARN viral (revisado en Mason *et al.*, 2003).

A diferencia de los ARN mensajeros celulares, el ARN de los picornavirus carece de estructura *cap* (7-metil-G) en su extremo 5'. Sin embargo, los ribosomas celulares se unen a la estructura IRES para iniciar la traducción del ARN viral, de

manera independiente de *cap* (Belsham *et al.*, 1992; Martínez-Salas *et al.*, 2002). Este hecho proporciona un mecanismo de traducción alternativo al celular, el cual se inhibe rápidamente por el corte de factores de iniciación de la traducción dependiente de *cap* que llevan a cabo proteasas virales (Devaney *et al.*, 1988). Además, las proteasas virales proteolizan otras proteínas de la célula infectada que participan en procesos necesarios para la viabilidad celular, como factores de transcripción, histonas (H3), proteínas implicadas en el tráfico de membranas (β -COP y membrina) y reguladores del ciclo celular (ciclina A y ciclina B2), entre otros (Ryan *et al.*, 2004).

Para una correcta traducción del genoma de los picornavirus es necesaria la unión de ciertas proteínas celulares al IRES, como PTBP (Luz y Beck, 1990), ITAF45 (Martínez-Salas *et al.*, 2001) y PCBP (Blyn *et al.*, 1997). En PV y en el VFA, se cree que PCBP interviene en la circularización del ARN, modulando, de este modo, los procesos de traducción y replicación (Herold y Andino, 2001; Serrano *et al.*, 2006).

Como se ha comentado anteriormente, el ARN del VFA se traduce a una poliproteína de 2330 aminoácidos que se procesa cotraduccionalmente por la acción en *cis* y en *trans* de las diversas proteasas virales para dar lugar a diferentes productos intermedios y a las proteínas virales maduras (ver Figura 2). Las proteasas que intervienen en el procesamiento primario del VFA son:

- 1) La proteasa L, que se clasifica dentro del grupo de la papaína (Guarne *et al.*, 1998) y que se encuentra presente únicamente en los géneros *Aphthovirus* y *Erbovirus*, catalizando su propia escisión del resto de la poliproteína viral P1-P2-P3 (Strebel y Beck, 1986; Medina *et al.*, 1993). L es también responsable de la ruptura del factor de iniciación de la traducción celular eIFG4 (Devaney *et al.*, 1988; Strebel y Beck, 1986), provocando así la interrupción específica de la maquinaria de síntesis proteica dependiente de *cap* de la célula hospedadora.

- 2) La proteína 2A, de tan solo 18 aminoácidos, responsable de liberar el precursor P1-2A de 2BC-P3 mediante un mecanismo de modificación de la maquinaria traducción (Donnely *et al.*, 2001; de Felipe *et al.*, 2003; Ryan *et al.*, 2004).

- 3) La proteasa 3C, responsable del resto de rupturas proteolíticas de la poliproteína viral. Para distintos picornavirus se ha descrito que la proteasa 3C es una serín-proteasa de la familia de la tripsina (Gorbalenya *et al.*, 1989) que tiene como dianas de proteólisis los pares de aminoácidos Q-I, E-G, Q-G, Q-L, Q-T y E-T (Palmenberg, 1990). 3C se encarga de producir la ruptura primaria de la unión entre 2C y 3A, en las etapas iniciales de la traducción y, posteriormente, de realizar la proteólisis

de los distintos precursores proteicos virales que dan lugar a las proteínas de la cápsida (excepto la ruptura entre VP4 y VP2 que tiene lugar en la etapa de encapsidación), y a las diferentes PNE (Figura 2).

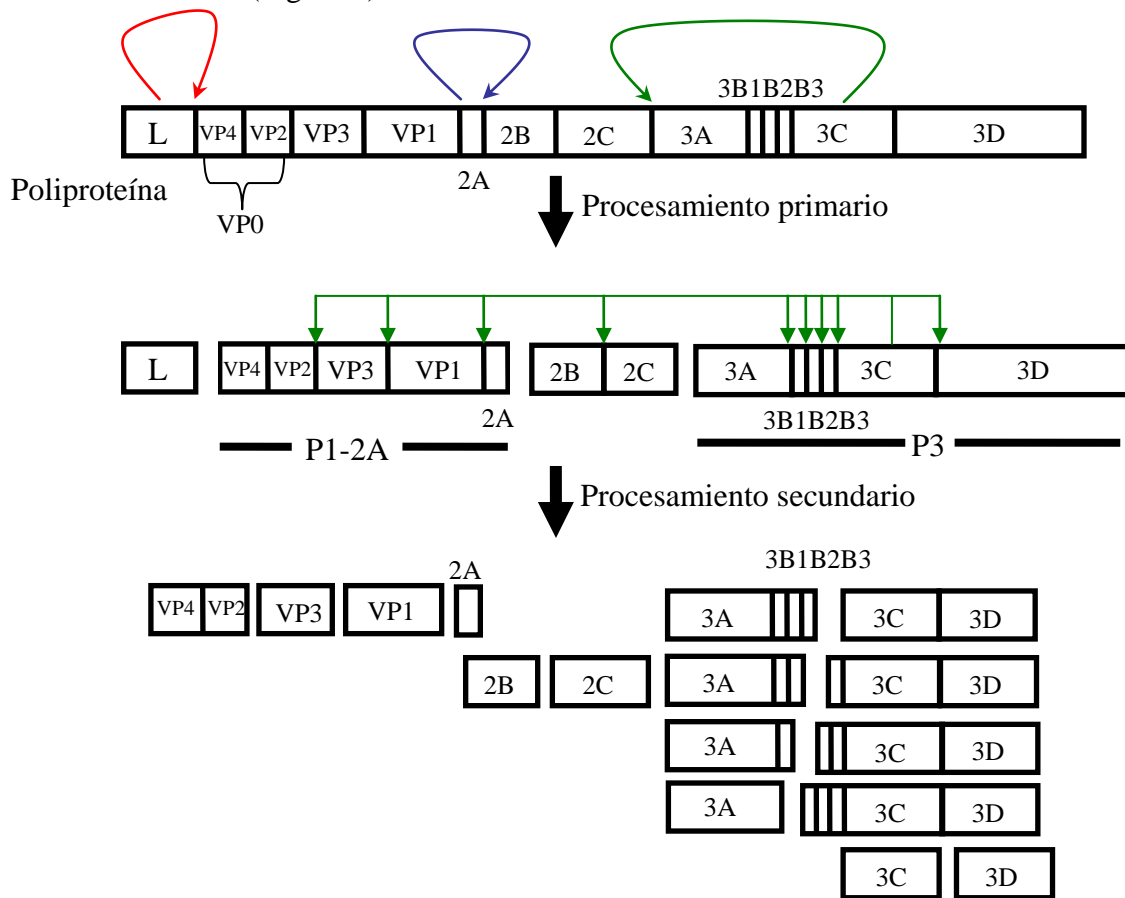


Figura 2. Representación esquemática del procesamiento proteolítico de la poliproteína del VFA. La flecha en rojo indica el procesamiento proteolítico mediado por L, la flecha en azul el mediado por 2A y las flechas en verde los mediados por 3C. Basado en (Ryan *et al.*, 2004).

I-2-3-3 Replicación del ARN

La información relativa al mecanismo de replicación del ARN del VFA es escasa, y los pocos modelos con los que se trata de explicar este proceso se infieren, básicamente, de lo que se conoce para PV. Los datos sugieren que este proceso, crítico dentro del ciclo infeccioso viral (replicación viral), se encuentra estrictamente regulado espacial y temporalmente dentro de la célula, teniendo lugar en sistemas membranosos derivados del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi (Barco y Carrasco, 1995; Schlegel *et al.*, 1996; Teterina *et al.*, 1997; Bolten *et al.*, 1998).

La polimerasa 3D presenta una baja fidelidad de copia, debido a la ausencia de actividad correctora de pruebas. Esta característica es la responsable de la gran

variabilidad genética observada en el VFA (Domingo *et al.*, 2001). Por ello, las poblaciones del VFA se componen de una distribución de mutantes relacionados denominada cuasiespecie, con un espectro de eficacia biológica (*fitness*) ante las diferentes presiones selectivas del ambiente (Domingo *et al.*, 2006). Esta dinámica de cuasiespecie constituye la base de la elevada adaptabilidad de los virus ARN a cambios en el medioambiente y de la rápida selección de variantes virales frente a diferentes presiones de selección, como tratamientos farmacológicos (Sierra *et al.*, 2007) o anticuerpos monoclonales (Lea *et al.*, 1994).

Se postula que para que comience la síntesis de ARN- es necesario que cese previamente la traducción inicial de la molécula de ARN+ (Gamarnik y Andino, 1998). En PV, se ha descrito que la proteína 3CD, acumulada durante las primeras rondas de traducción del ARN infectante, es capaz de unirse a la región no codificante del extremo 5' del ARN, incrementando la afinidad del IRES por PCBP, una proteína celular esencial en el comienzo de la replicación (Gamarnik y Andino, 1998).

La mayoría de las PNE y sus precursores, junto con el ARN de PV, se localizan asociados a estructuras membranosas celulares, formando el denominado “complejo de replicación” (Parsley y Dasgupta, 1997; Xiang *et al.*, 1995b; Harris *et al.*, 1994; Barnejee *et al.*, 2001; Echeverri *et al.*, 1995; Paul *et al.*, 1994; Giachetti *et al.*, 1992). La función de este complejo de replicación sería la de localizar en la misma estructura celular a todos los componentes necesarios para la replicación del ARN viral, incrementando, de esa manera, la concentración local de PNE virales (Bienz *et al.*, 1992).

Las restantes proteínas de la región P3 del genoma están también implicadas en la replicación del ARN viral. Debido al dominio hidrofóbico presente en la proteína 3A (ver apartado I-2-4) y a la capacidad del precursor 3AB para interactuar con otras proteínas virales, este precursor sería el responsable, entre otros eventos, del reclutamiento en las membranas celulares de la polimerasa 3D y del precursor 3CD, que tiene actividades de proteasa, y de facilitar la unión de 3D al ARN viral a través de distintos dominios de la proteína 3C (Harris *et al.*, 1994). La proteína 3B de los picornavirus se encuentra unida covalentemente a todas las moléculas de ARN viral (Ambros y Baltimore, 1978), siendo esencial para la replicación viral su función como cebador de la síntesis del ARN catalizada por 3D (Paul *et al.*, 2003).

El primer paso para la iniciación de la síntesis del ARN viral es la uridilación de 3B por parte de 3D. Este paso requiere de una secuencia molde y puede reproducirse *in*

vitro empleando como tal, bien una secuencia de poli-A o la secuencia nucleotídica del “cre”. Por otro lado, los datos disponibles sugieren la existencia de un mecanismo de uridilación de 3B distinto en función de la polaridad de ARN a sintetizar. De esta manera, se ha descrito que la uridilación de la proteína 3B de PV mediada por el poli-A estaría implicada en la síntesis de ARN⁻ (Murray y Barton, 2003; Paul *et al.*, 2003), mientras que la uridilación utilizando como molde la estructura del “cre”, solo sería necesaria en la síntesis de ARN⁺ (Murray y Barton, 2003). Sin embargo, otros autores han relacionado la uridilación de 3B mediada por “cre” a la síntesis de ARN de ambas polaridades (Van Ooij *et al.*, 2006).

Aunque se ha reproducido *in vitro* la uridilación de la proteína 3B cuando ésta forma parte de distintos precursores proteolíticos, no se ha podido caracterizar inequívocamente el sustrato *in vivo* de dicho proceso. Se ha descrito que algunos de los precursores de 3B como 3BC y 3BCD son uridilados *in vitro*, mientras que otros como 3AB no lo son, ni en forma de proteína libre en el citoplasma ni unidos a membranas (Liu *et al.*, 2007). Sin embargo, otros autores han descrito la uridilación *in vitro* de 3AB utilizando como molde un poli-A de longitud definida (Richards *et al.*, 2006). Por otro lado, el comportamiento *in vivo* de diversas proteínas tanto virales como celulares puede diferir del observado *in vitro*. De hecho, algunos autores sugieren la posibilidad de que otras proteínas de la región P3 del genoma pudieran encontrarse uridiladas en cultivos celulares (Richards *et al.*, 2006 y resultados preliminares de Y.Vieira en nuestro laboratorio). En cultivos celulares se ha descrito que, empleando un plásmido infeccioso de PV con una mutación letal en la proteína 3B, el único precursor expresado en *cis* capaz de revertir los efectos letales de la mutación introducida fue el precursor 3AB y no otros precursores de 3B como 3BC, 3BCD o P3. Esto sugiere que, pese a las observaciones realizadas en los sistemas *in vitro* libres de células, el precursor 3AB sería el responsable de aportar la proteína 3B al complejo de replicación para su posterior uridilación (Liu *et al.*, 2007).

El precursor 3AB de PV se localiza en las membranas subcelulares con los extremos amino y carboxi libres y expuestos hacia el citoplasma (Fujita *et al.*, 2007). Este precursor 3AB sería, además, el responsable de la localización en membranas de la polimerasa 3D, debido a su capacidad de unión a esta proteína, mientras que el sustrato de la uridilación podría ser tanto el precursor 3AB o la proteína 3B escindida localmente por la proteasa 3C (Liu *et al.*, 2007).

Hay varios modelos que tratan de explicar el inicio de la síntesis de las moléculas de polaridad negativa en PV. En cualquier caso, todos ellos contemplan el hecho de que el ARN genómico sirve de molde para la síntesis de unas pocas moléculas de ARN⁻, para lo cual la proteína 3B serviría de cebador. Estas cadenas de ARN⁻ serían, a su vez, molde para la síntesis de nuevas moléculas de ARN⁺, que llevarían también unidas covalentemente en su extremo 3' a la proteína 3B uridilada empleada como cebador en dicha síntesis (Figura 3). Debido a este mecanismo, en el interior de la célula infectada se acumula mayor cantidad de moléculas de ARN⁺ que de ARN⁻. Esto puede deberse o bien a un reconocimiento preferencial de la proteína 3D de una polaridad de ARN frente a la otra polaridad o bien a diferencias en su estabilidad de los distintos transcritos.

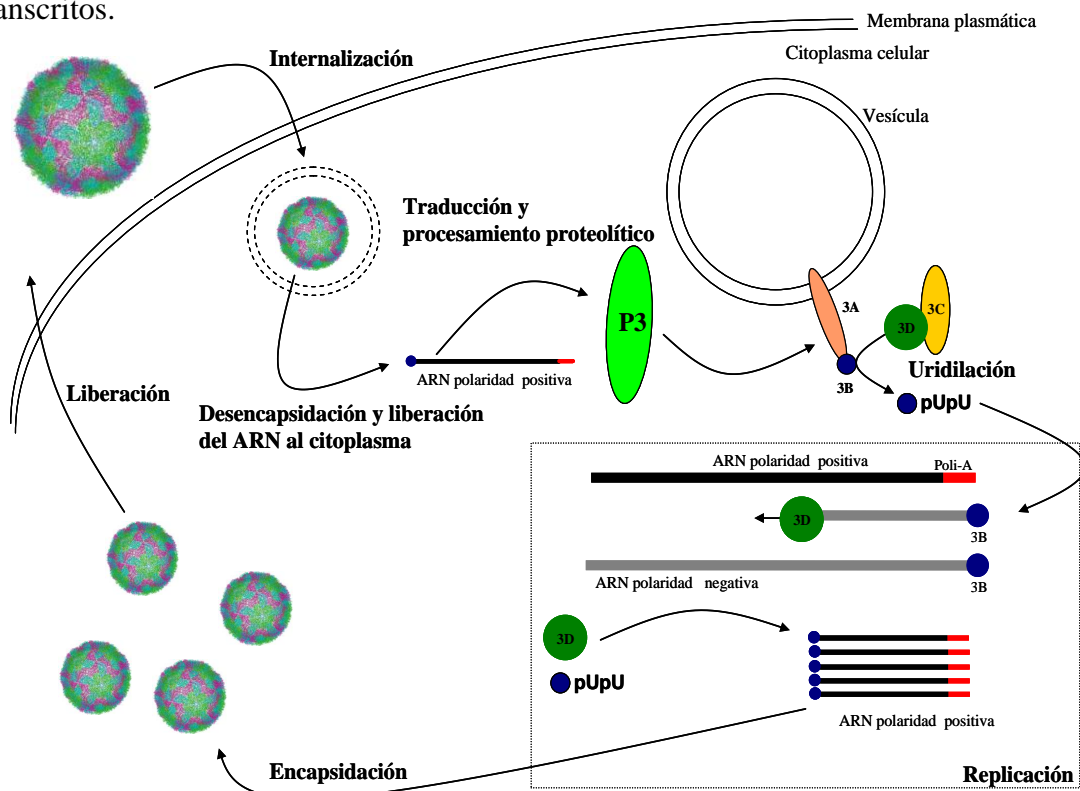


Figura 3. Representación esquemática del ciclo replicativo de picornavirus.

I-2-3-4 Encapsidación y maduración

Los pasos finales del ciclo viral son la encapsidación de moléculas de ARN⁺ y la maduración del precursor VP0 a VP4 y VP2.

Es posible que exista una sincronización entre replicación activa y encapsidación mediante una señal de empaquetamiento en *cis* en la misma molécula de ARN⁺. En PV

se ha descrito que únicamente las moléculas de ARN⁺ unidas a la proteína 3B, y no las de ARN⁻, son encapsidadas (Nomoto *et al.*, 1977; Novak y Kirkegaard, 1991).

La señal de encapsidación de los picornavirus parece no encontrarse en la región P1 del genoma, ya que se pueden eliminar, en VFA y en PV, las secuencias de nucleótidos de esta región, y sustituirlas por otras heterólogas, obteniéndose un replicón capaz de ser encapsidado si se aportan las moléculas de la cápsida en *trans* (Barclay *et al.*, 1998; McInerney *et al.*, 2000). Para el virus Aichi, se ha descrito que existe una señal de encapsidación en un bucle de ARN cercano al extremo 5' de la molécula (Sasaki *et al.*, 2003).

Hay varios modelos que explican el ensamblaje de los nuevos viriones. Uno de ellos propone que las PE en forma de pentámeros se agruparían formando cápsidas vacías dónde luego entraría el ARN; según el otro, los pentámeros se unirían al ARN para formar el pro-virión (revisado en Grubman y Baxt, 2004). Ambos modelos proponen la necesidad de la maduración de VP0 mediante una ruptura catalítica entre VP4 y VP2, una vez ensamblada la cápsida (Arnold *et al.*, 1987; Knipe *et al.*, 1997). Este paso es esencial para la formación de virus infectivo, ya que los virus que no sufren ese proceso de maduración presentan un impedimento para liberar el ARN al citoplasma de las células infectadas (Knipe *et al.*, 1997). Además, se ha descrito que la miristoilación del extremo amino del precursor VP4-VP2, que ocurre en las células infectadas, sería necesaria tanto para el correcto procesamiento y ensamblaje de las subunidades de la cápsida como para su localización en las membranas celulares, donde tiene lugar la replicación del ARN viral (Chow *et al.*, 1987; Krausslian *et al.*, 1990).

I-2-4 La proteína 3A de los picornavirus

La proteína 3A del VFA es considerablemente distinta en tamaño y secuencia a la del resto de picornavirus. Las proteínas 3A de los virus de la rinitis equina A (VRE-A) y del recientemente caracterizado virus de la rinitis bovina-2 (VRB-2), aunque presentan un bajo nivel de homología (16 % y 11 %, respectivamente), son las que tienen mayor similitud con la proteína 3A del VFA (Li *et al.* 1996; Hollister *et al.*, 2008). El análisis de sus secuencias muestra también diferencias en la localización de la región hidrofóbica correspondiente al dominio transmembrana, definiendo en cada caso regiones amino y carboxi terminales de tamaños diferentes (Figura 4).

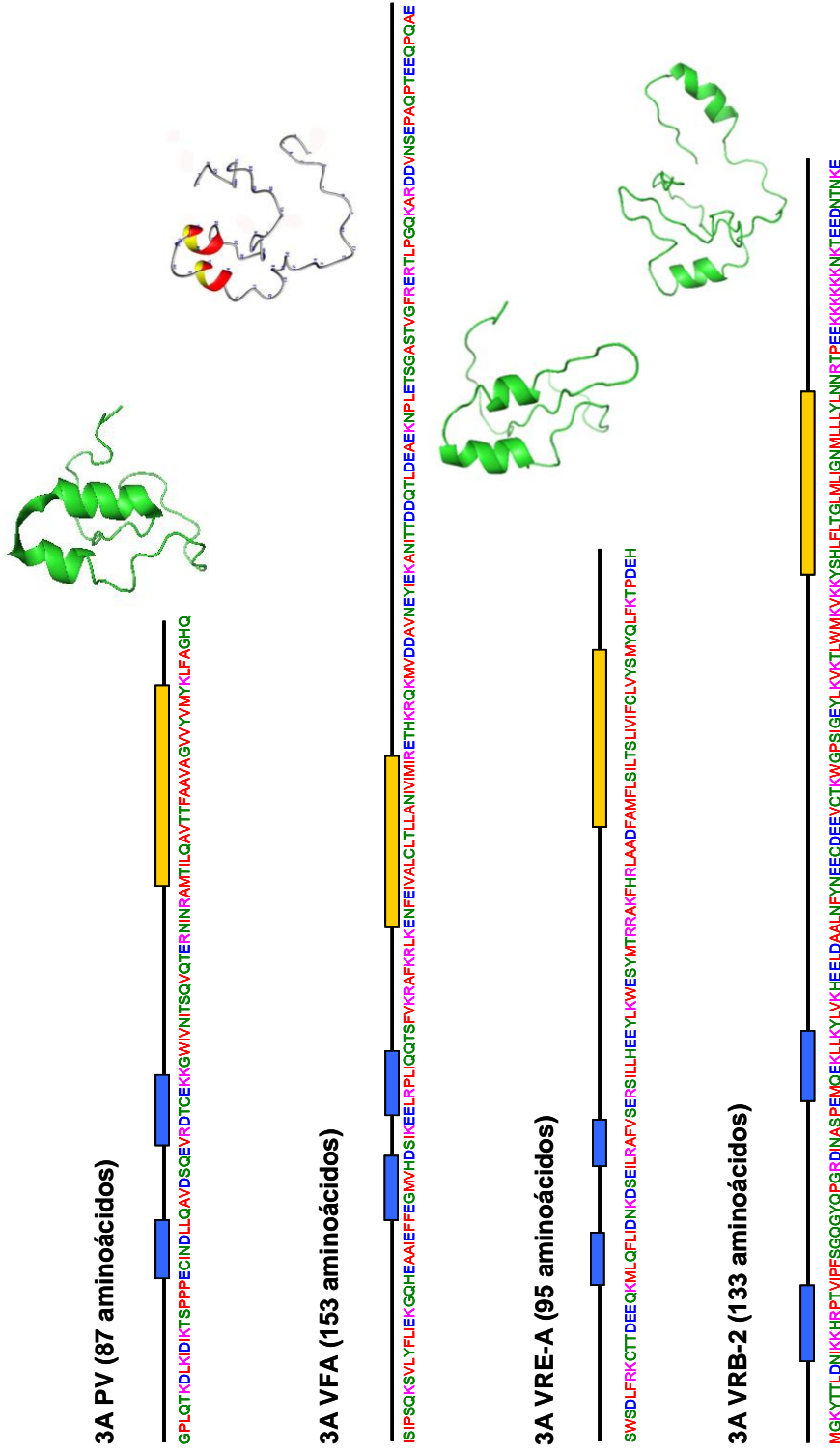


Figura 4. Proteínas 3A de diferentes picornavirus. Sobre cada una de las secuencias se indica la posición del dominio transmembrana (recuadro naranja), predicha mediante el análisis de las diferentes secuencias con los programas HMMTOP (Hungarian Academy of Sciences) y TMPred (EMBNet-CH), así como las posiciones que se predice se estructuran en α -hélice (recuadros azules) empleando el programa Swiss-Model (Arnold *et al.*, 2006). A la derecha de cada secuencia, se representa la estructura terciaria del dominio amino terminal de cada proteína, que se extiende hasta el inicio del dominio transmembrana. La estructura de la proteína 3A de PV se determinó en base a las coordenadas atómicas publicadas (Strauss *et al.*, 2003). La estructura de la proteína 3A del VFA (ver Figura 18), se determinó mediante el programa "Hex" de docking macromolecular (Ritchie y Kemp, 2000). Las estructuras de las proteínas 3A del VRE-A y del VRB-2 se determinaron con el programa Swiss-Model (Arnold *et al.*, 2006), basándose en la información estructural de la proteína 3A de PV. Los aminoácidos se representan en distintos colores en función de sus características físico-químicas: verde, polar sin carga; rojo, apolar; azul, polar con carga negativa; rosa, polar con carga positiva.

La organización genómica del ARN del VRE-A, un patógeno del aparato respiratorio de caballos (Plummer *et al.*, 1962), es más parecida a la del VFA que a la de cualquier otro picornavirus (Li *et al.*, 1996). Además, posee una proteína 2A cuya secuencia es similar en un 87,5% a la del VFA y una proteína L de tamaño también parecido. A diferencia del VFA, solamente codifica una copia de la proteína 3B en su secuencia y posee una proteasa 3C que es capaz de reconocer dianas distintas de proteólisis (Li *et al.*, 1996). Sin embargo, no existen trabajos que hayan analizado la relación funcional (o estructural) entre las proteína 3A del ambos virus.

Como se detalla en el siguiente apartado, una diferencia importante entre la proteína 3A del VFA y la de otros picornavirus (fundamentalmente PV), es su insensibilidad a brefeldina A (BFA), droga que inhibe el tráfico retrógrado de vesículas entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Belov *et al.*, 2008; O'Donnell *et al.*, 2001). Sin embargo, no se ha analizado el efecto de la BFA sobre la infección con VRE-A.

Proteína 3A y brefeldina A

La BFA es un compuesto sintetizado por ciertas especies de hongos, utilizado ampliamente como antiviral (Tamura *et al.*, 1968). El tratamiento de las células con BFA provoca el bloqueo de la acción de diversas moléculas activadoras de las GTPasas Arfs. Estos activadores denominados GEFs, entre los que se encuentra GF1, son los encargados del mantenimiento del sistema secretor celular necesario para la formación de los complejos de replicación de algunos virus (Wessels *et al.*, 2006; Belov *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la proteína 3A de PV es capaz de unirse a GF1 y localizarlo en membranas para favorecer la formación de los complejos de replicación viral (Belov *et al.*, 2008). La BFA, al bloquear la actividad de GF1, estaría afectando al menos a una de las funciones de la proteína 3A de PV.

El tratamiento de células con BFA provoca una desestructuración del aparato de Golgi e impide la replicación de PV, efecto similar al observado tras la transfección con la proteína 3A de PV (Irurzun *et al.*, 1992; Bolten *et al.*, 1998, Cho *et al.*, 1994, Doedens y Kirkegaard 1995, Sandoval y Carrasco 1997). Sin embargo, el tratamiento con BFA no afecta a la replicación del VFA, aunque la infección por el VFA también desensambla el aparato de Golgi, de manera similar al provocado por la acción de la BFA (García-Briones *et al.*, 2006; O'Donnell *et al.*, 2001). Esto sugiere que el VFA utiliza un mecanismo alternativo al de PV para reclutar las membranas que forman los complejos de replicación.

I-2-4-1 Proteína 3A de Poliovirus

Como ya se ha mencionado, mucha de la información disponible sobre la proteína 3A del VFA proviene de extrapolar datos obtenidos para PV. Por ello, a continuación se detallan las características más relevantes de la proteína 3A de PV.

Se ha podido determinar la estructura tridimensional de la porción amino terminal de esta proteína mediante espectroscopía RMN (Strauss *et al.*, 2003), observándose que forma un homodímero simétrico, como ya se había propuesto a partir de experimentos con el sistema de doble híbrido (Xiang *et al.*, 1998). Este dímero se produce por la interacción intermolecular de las zonas hidrofóbicas presentes en los dos dominios de α -hélice que se predicen en la porción amino terminal de 3A (Figura 5). Los restantes residuos de esta región no parecen tener una estructura definida, aunque deleciones y mutantes puntuales en su extremo amino terminal afectan diversas funciones, como la inhibición del tráfico de vesículas entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, o la estimulación de la actividad proteasa de la proteína 3CD (Xiang *et al.*, 1995a; Doedens *et al.*, 1997). Esto sugiere que las regiones donde se localizan estos residuos pueden adoptar, en determinadas condiciones, una conformación específica para la realización de esas funciones (Strauss *et al.*, 2003).

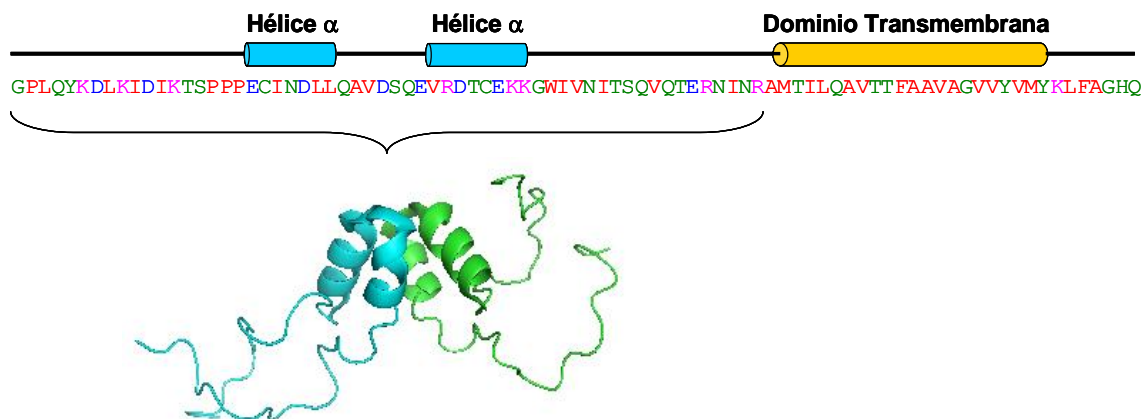


Figura 5. Proteína 3A de PV. Secuencia de la proteína 3A de PV y estructura tridimensional de la porción amino terminal de la misma (basado en Strauss *et al.*, 2003). Sobre la secuencia de la proteína 3A se indican en cilindros azules la localización de las regiones estructuradas en α -hélice y, mediante el cilindro naranja, el dominio transmembrana de la misma. Los aminoácidos se representan en distintos colores en función de sus características físico-químicas según lo descrito en la Figura 4.

A continuación de la porción amino terminal, la proteína 3A de PV posee un dominio hidrofóbico transmembrana responsable de su unión a estructuras membranosas celulares. Este dominio, junto con las interacciones que establece con otras proteínas virales, contribuye a localizar el complejo de replicación en la superficie de las vesículas membranosas que proliferan en las células infectadas (Bienz *et al.*, 1987; Semler *et al.*, 1982).

La proteína 3B es necesaria, como cebador de la polimerasa viral, para el inicio de la síntesis de nuevas moléculas de ARN viral (ver I-2-3-3). Sin embargo, dado su marcado carácter polar, que imposibilita su localización en membranas, se ha propuesto que el precursor 3AB sería el responsable de aportar la proteína 3B al complejo de replicación (Andino *et al.*, 1993; Lyle *et al.*, 2002).

Además de su localización en membranas, la proteína 3A y su precursor 3AB son capaces de interactuar directamente con otras proteínas virales modulando su actividad. De esta manera, se ha descrito que el precursor 3AB (y no la proteína 3A madura) se une específicamente a la ARN polimerasa 3D (Lama *et al.*, 1994; Xiang *et al.*, 1995a; Hope *et al.*, 1997; Xiang *et al.*, 1998), y estimula *in vitro* tanto a la propia actividad polimerasa de 3D (Plotch *et al.*, 1995; Lama *et al.*, 1995), como a la actividad proteasa de 3CD (Molla *et al.*, 1994).

Además de interactuar con otras proteínas virales, el precursor 3AB posee la capacidad de unirse de manera no específica a ARN (Paul *et al.*, 1994) y puede asociarse, unido al precursor 3CD, a la estructura secundaria de la RNC 5' del ARN+ para formar un complejo nucleoproteico necesario para la síntesis de ARN (Hope *et al.*, 1997; Lama *et al.*, 1994; Xiang *et al.*, 1995a; Xiang *et al.*, 1998).

Por otra parte, existen indicios de que 3A interviene específicamente en la síntesis de ARN+ viral, ya que determinadas mutaciones en su secuencia producen virus defectivos en la síntesis de nuevas moléculas de polaridad positiva (Teterina *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha demostrado que tanto el precursor 3AB de PV como los productos finales de proteólisis 3A y 3B tienen un papel fundamental en alteraciones en el rango de hospedador *in vitro* (Lama *et al.*, 1998) y en distintas etapas de la replicación viral. Así, la resistencia del virus a un fármaco que actúa inhibiendo la replicación del ARN viral (enviroxima) se asocia a mutaciones en la secuencia de la propia 3A (Heinz y Vance, 1995).

Otra de las funciones que se han descrito para la proteína 3A es la inhibición de la secreción proteica en células infectadas; la inhibición de la exportación de moléculas

de MHC de clase I constituye uno de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedador (Choe *et al.*, 2005; Deitz *et al.*, 2000, Doedens *et al.*, 1997). Esta inhibición afecta al tráfico de vesículas membranosas entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Wessels *et al.*, 2006; Belov *et al.*, 2008).

I-2-4-2 Proteína 3A del VFA

Existen pocos datos directos sobre la funcionalidad de la proteína 3A del VFA. Entre los disponibles, se ha observado que no todas las funciones que 3A tiene en PV son compartidas por la proteína 3A del VFA, lo que hace particularmente relevante su estudio.

La proteína 3A es una de las más variables entre aislados de los distintos serotipos del VFA, siendo la proteína viral que presenta un menor número (37%) de residuos conservados en su secuencia (Carrillo *et al.*, 2005).

Como se ha comentado anteriormente, la proteína 3A del VFA es de tamaño considerablemente mayor que el del resto de picornavirus (143 a 153 aminoácidos dependiendo del serotipo) y contiene, según se esquematiza en la Figura 6, un dominio hidrofóbico de 28 aminoácidos (Forss *et al.*, 1984), que se postula como el responsable de su unión a membranas en células infectadas (Forss *et al.*, 1984; Moffat *et al.*, 2005).

El dominio hidrofóbico de 3A divide la proteína en una región amino terminal que tiene mayor similitud a la de otros picornavirus, y otra carboxi terminal de mayor longitud (Figura 4). Se ha descrito que deleciones parciales de esta región carboxi terminal permiten la viabilidad viral (Pacheco *et al.*, 2003), aunque provocan alteraciones tanto en la virulencia como en el rango de hospedador del virus (Giraudó *et al.*, 1990; Beard y Mason, 2000).

En células infectadas, la proteína 3A del VFA colocaliza con marcadores de compartimentos membranosos celulares como calreticulina (retículo endoplásmico) y p58 (aparato de Golgi) (O'Donnell *et al.*, 2001; García-Briones *et al.*, 2006).

La expresión de la proteína 3A del VFA en células BHK-21 no origina modificaciones de las estructuras membranosas de líneas celulares susceptibles (García-Briones *et al.*, 2006; O'Donnell *et al.*, 2001). Tras su expresión transitoria, 3A se localiza en pequeñas vesículas citoplasmáticas (O'Donnell *et al.*, 2001; García-Briones *et al.*, 2006). Este patrón de distribución varía hacia otro más fibrilar con la adición de sucesivas copias de 3B al expresarse como 3AB, 3ABB y 3ABBB (García-Briones *et*

al., 2006), lo que sugiere que el número de copias de 3B condiciona la localización subcelular de estos precursores.

A diferencia de PV y de Coxsackievirus, en los que la proteína 3A es la responsable de inhibir el tráfico retrógrado de proteínas celulares entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Doedens y Kirkegaard, 1995), en el VFA es la expresión de 2BC, y no la de 3A, la responsable de dicha inhibición (Moffat *et al.*, 2005).

Existen evidencias de que la proteína 3A del VFA es un determinante viral de infectividad y rango de hospedador, tanto en cultivos celulares como *in vivo*. Dichas alteraciones se detallan a continuación, indicándose los cambios asociados a cada una de ellas en la Figura 6.

La primera evidencia de la relación entre la proteína 3A y la virulencia del VFA se obtuvo al analizar virus atenuados por pases en huevos embrionados. Los virus seleccionados poseían una proteína 3A de tamaño inferior al normal (Giraudó *et al.*, 1987), debido a deleciones en su extremo carboxi terminal de 19 ó 20 aminoácidos (Giraudó *et al.*, 1990).

Posteriormente, en el brote de FA que ocurrió en Taiwán en 1997, causado por la cepa “porcinofílica” de serotipo O O/TAW/97, se observó que el virus afectó únicamente a cerdos y no al ganado vacuno (Dunn y Donaldson, 1997; Huang *et al.*, 2000). El análisis de la secuencia de este virus mostró la existencia de una deleción de 10 aminoácidos en el extremo carboxi terminal de 3A, similar a la encontrada en los virus atenuados en huevos embrionados (Beard y Mason, 2000) y en otros aislados “porcinofílicos” de serotipo O circulantes en el sudeste asiático, como la cepa O/VIT/2/97. El virus O/TAW/97 mostró una menor capacidad de síntesis de ARN en células de origen bovino que en células de origen porcino (Pacheco *et al.*, 2003).

Por otro lado, nuestro laboratorio ha descrito que un único cambio de aminoácido en el extremo amino terminal de 3A es responsable de la adaptación del VFA a cobaya. El residuo implicado (Q44), está localizado en una región diferente a la deleción encontrada en la cepa O/TAW/97 (Núñez *et al.*, 2001).

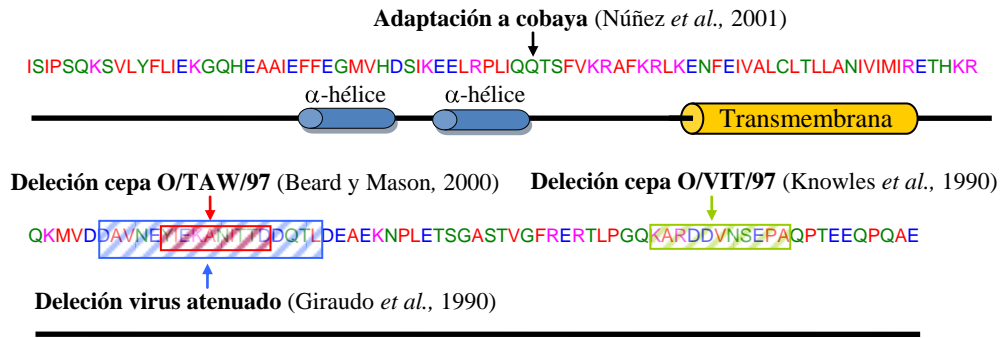
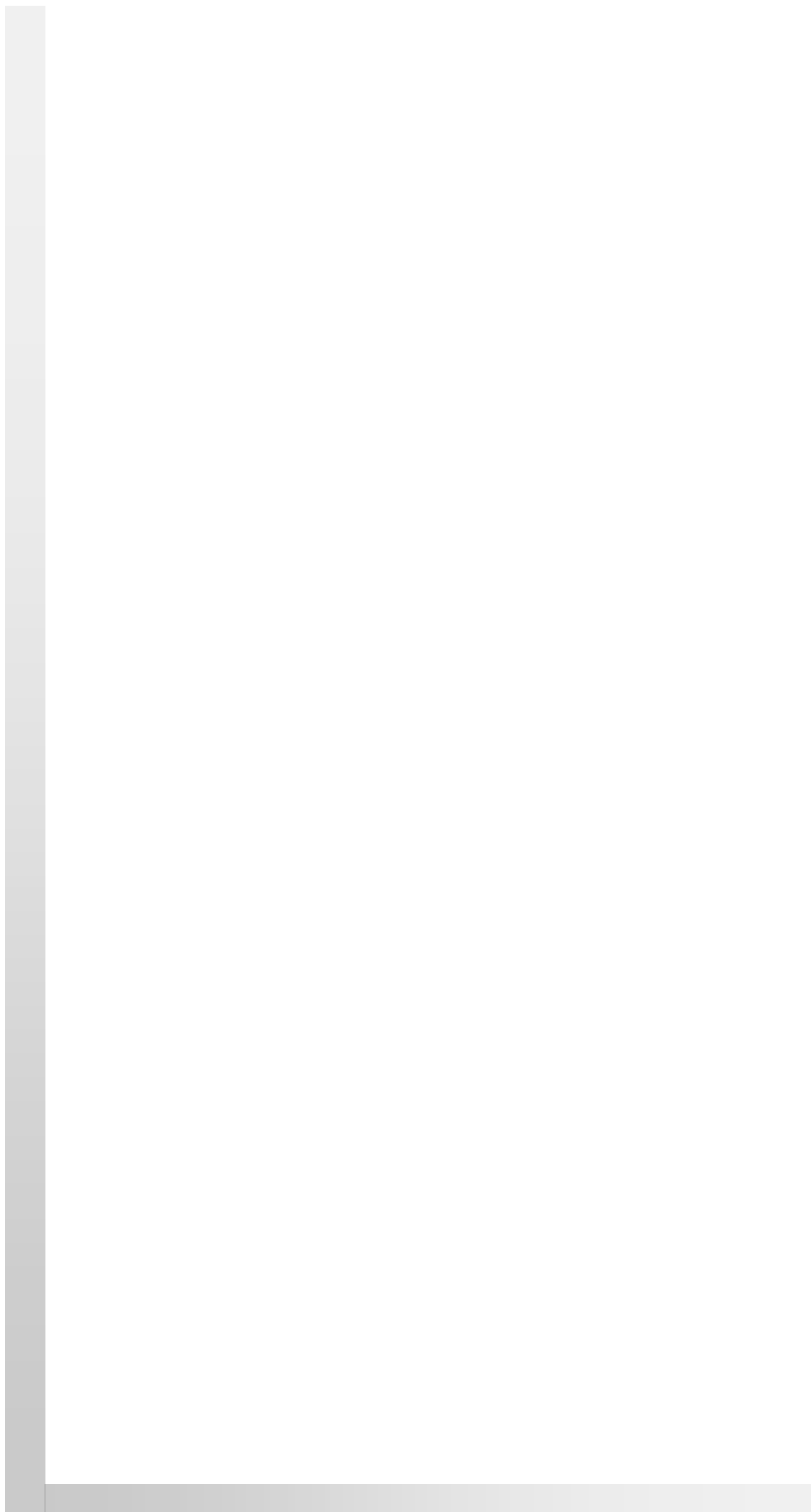


Figura 6. Localización de mutaciones asociadas a la virulencia y al rango de hospedador en la proteína 3A del VFA. Con flechas y recuadros sombreados de distinto color se indican las secuencias asociadas a mutaciones que alteran la virulencia del VFA en distintos hospedadores. Los aminoácidos se representan en distintos colores en función de sus características físico-químicas, según lo descrito en la Figura 4.



Objetivos

Objetivo general

Efectuar un análisis funcional de la proteína 3A del VFA mediante la construcción de una serie de ARNs conteniendo mutaciones de interés, y la caracterización de su capacidad para sintetizar ARN y proteínas virales, infectar productivamente líneas celulares susceptibles y producir letalidad en ratones lactantes.

Objetivos parciales

- Caracterizar el efecto de las siguientes mutaciones:

- 1 Deleción de la proteína 3A completa.
- 2 Sustitución de la proteína 3A del VFA por la homóloga de otro picornavirus relacionado.
- 3 Alteración de las secuencias diana para la actividad proteasa de la proteína 3C que flanquean a la proteína 3A.
- 4 Sustitución de la única cisteína presente en la proteína 3A.
- 5 Modificación de la carga electrostática de la posición 44 de la proteína 3A.
- 6 Introducción de una carga electrostática en las posiciones 38 y 41, ocupadas por aminoácidos hidrofóbicos y localizadas en la región que se predice implicada en interacciones intermoleculares de 3A.

- Analizar la posible complementación con la proteína 3A *wt* expresada en *trans*, empleando clones celulares que expresan establemente las proteínas 3A y 3ABBB.



Materiales y Métodos

M-1 Líneas celulares y virusLíneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en la presente Tesis Doctoral fueron:

BHK-21: línea celular derivada de fibroblastos de riñón de hámster (Stoker y MacPherson, 1964). Para el presente trabajo, se ha empleado una línea celular derivada de un clon aislado de células BHK-21 mediante dilución límite, susceptible al VFA (de la Torre *et al.*, 1988).

VERO: línea celular derivada de epitelio de riñón de mono verde africano, susceptible al VRE-A (ATCC).

Clones de células BHK-21, que expresan de forma estable las proteínas 3A y 3ABBB. Estos clones celulares, desarrollados en el laboratorio, se obtuvieron cotransfectando células BHK-21 con plásmidos derivados de pRSV que portan las secuencias de 3A y 3ABBB del aislado del VFA C-S8c1 (García-Briones *et al.*, 2006), junto con el plásmido pBSpacAP, portador del gen de la puromicina acetil transferasa (PAC) que confiere resistencia a puromicina (Pur) y cuya expresión se utilizó como marcador de la transfección (Rosas *et al.*, 2008). Los clones celulares empleados fueron:

- clon Pur104: clon celular resistente a puromicina, transfectado sólo con el plásmido pBSpacAP. Este clon celular se utilizó como control negativo de la expresión de las proteínas 3AB_(n) y como control positivo de la resistencia a puromicina.
- clon 3A242: clon celular resistente a puromicina que expresa la proteína 3A.
- clon 3AB₁B₂B₃209 (en la presente Tesis Doctoral referido como 3ABBB209): clon resistente a puromicina que expresa el precursor 3ABBB.

Virus

Los virus empleados fueron:

Virus de la fiebre aftosa (C-S8c1), obtenido a partir de la transfección de células BHK-21 con ARN transcrito *in vitro* a partir del clon infeccioso pMT28.

Virus de la rinitis equina A (NºGenbank L43052), cedido amablemente por la Dra C.A. Hartley (Centro de virología equina, Universidad de Melbourne. Australia).

Virus de la estomatitis vesicular (serotipo Indiana), cedido amablemente por el Dr. Esteban Domingo (CBMSO).

M-2 Clones infecciosos

Se han utilizado los siguientes clones infecciosos:

pMT28, amablemente cedido por la Dra. Cristina Escarmís (CBMSO), derivado del plásmido pGEM-1 que porta, bajo el control del promotor SP6, la secuencia nucleotídica completa del VFA C-S8c1 (N°Genbank AJ133357), conteniendo 35 residuos de citidina en la secuencia del poliC de la región RNC 5' y 25 adenosinas en la secuencia del poli-A de la región RNC 3' (García-Arriaza *et al.*, 2005). Dicho clon infeccioso se encuentra flanqueado en los extremos 5' y 3' por secuencias de promotores reconocidos por las ARN polimerasas SP6 y T7 respectivamente, así como por otras secuencias que son dianas únicas de restricción Nde I y Nhe I, empleadas en la linealización del plásmido (Figura 7). Esta disposición permite la síntesis *in vitro*, tanto de ARN+ v con la enzima ARN polimerasa SP6 (a partir del ADN linealizado con la enzima de restricción Nde I) como la síntesis de ARN- con la enzima ARN polimerasa T7 (a partir del ADN linealizado con Nhe I).

pC, derivado del plásmido pFMDV-YEP-polyC (Nuñez *et al.*, 2001) que porta, bajo el control del promotor SP6, la secuencia del VFA O1K (serotipo O, N°Genbank X00871), en el cual se sustituyó la secuencia nucleotídica entre las posiciones 3573 y 8115 por la correspondiente al VFA C-S8c1, de serotipo C (Figura 7).

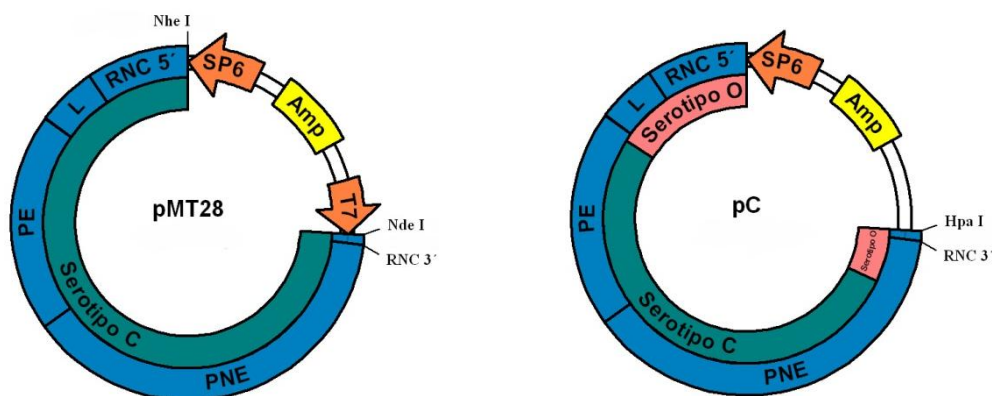


Figura 7. Clones infecciosos pMT28 y pC. Representación esquemática de los plásmidos infecciosos pMT28 y pC en donde se señalan los promotores de las ARN polimerasas SP6 y T7. También se indica la secuencia del gen que confiere resistencia a ampicilina y las posiciones de los sitios de restricción (Hpa I, Nde I y Nhe I).

pC-Δ3A, este plásmido fue generado con anterioridad en el laboratorio (Delgui L, sin publicar), partiendo del plásmido pC al cual se delecionó la secuencia codificante

de la proteína 3A, a excepción de la correspondiente a los 8 aminoácidos iniciales y finales de la proteína.

M-3 Anticuerpos

Los anticuerpos y sueros empleados para detectar las diferentes proteínas del VFA se indican a continuación:

Proteína 3A

- 2C2: anticuerpo monoclonal cedido amablemente por E. Brocchi (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia, Italy).
- 163: suero policlonal de conejo inmunizado en el laboratorio con la proteína 3A completa (R. Armas Portela, sin publicar).
- 346: suero policlonal de conejo inmunizado en el laboratorio con el fragmento carboxi terminal de la proteína 3A del VFA C-S8c1, expresado en *E.coli* (M. González-Magaldi, sin publicar).

Proteína 3D

- E56: anticuerpo policlonal de conejo, cedido amablemente por E. Beck (Universidad de Giessen, Alemania).

Proteína VP1

- SD6: anticuerpo monoclonal, cedido amablemente por M. García-Mateu (Mateu *et al.*, 1987). Este anticuerpo reconoce la secuencia del bucle G-H de esta proteína.

Suero hiperinmune de cerdo 1H8: suero que reconoce a la mayoría de las proteínas virales y que fue obtenido a partir de un cerdo hiperinmunizado (3 inmunizaciones) con VFA C-S8c1 inactivado (E. Blanco, sin publicar).

Se utilizó también el anticuerpo monoclonal J2 (Scicons), como marcador de los complejos de replicación virales.

Los anticuerpos empleados para identificar proteínas presentes en diferentes regiones del aparato de Golgi fueron:

- El anticuerpo monoclonal 25H8, que reconoce el marcador de cis-Golgi gp74 y el anticuerpo TGN38, marcador de trans-Golgi, amablemente cedidos por I.V. Sandoval (CBMSO).

Como anticuerpos secundarios para la técnica de *western-blot*, se emplearon los correspondientes sueros anti-inmunoglobulinas de ratón y de conejo acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) de Amersham.

Los anticuerpos de cabra que reconocen inmunoglobulinas de ratón o conejo acoplados a Alexa 594 ó Alexa 488 usados en las inmunofluorescencias fueron de Molecular Probes.

M-4 Cultivo de células

Las células se crecieron hasta confluencia en una atmósfera con 7% de CO₂ y 98% de humedad relativa en medio DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con un 5% de suero fetal bovino (Gibco-BRL), ampicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml. Una vez alcanzada la confluencia, las células se despegaron de la superficie de cultivo mediante tratamiento con una mezcla de tripsina 0,05 mg/ml (Difco) y EDTA 0,016% (Merck), y se subcultivaron realizando las diluciones apropiadas sin sobrepasar los 30 pases. Los clones celulares con expresión estable de las distintas PNE del VFA se subcultivaron de igual manera, en presencia de puromicina (2,5 µg/ml).

Las células se congelaron para su almacenamiento en nitrógeno líquido en una mezcla de 90% de suero fetal bovino y 10% de DMSO (Sigma).

M-5 Crecimiento de virus

Los virus se amplificaron por infección de monocapas celulares. Para ello se retiró el medio sobrenadante de las monocapas en estado de semiconfluencia, se lavaron dos veces con DMEM y se inocularon con la multiplicidad de infección (m.d.i.) determinada en cada experimento o, en el caso de los pases adicionales, con el volumen de sobrenadante de transfección o infección indicado en cada caso. Tras la aplicación del inóculo, las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera con 7% de CO₂ durante 1 h. agitándose en cruz cada 15 min. posteriormente, se retiró el inóculo y, tras dos lavados con DMEM, se añadió medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 5%. Las monocapas celulares se incubaron hasta la aparición de ECP. En ese momento, se sometieron a tres ciclos de congelación /descongelación para obtener tanto el virus extracelular como el intracelular.

M-6 Obtención de ADN plasmídico

Para la obtención el ADN plasmídico se crecieron bacterias de *E.coli* DH5 α portadoras del plásmido de interés, que en el presente trabajo siempre contaba con el gen de resistencia a ampicilina, en medio LB líquido con ampicilina (50 μ g/ml) durante 16 h. con agitación a 37°C. Las bacterias empleadas se obtuvieron a partir de colonias previamente aisladas en placas de agar suplementado con ampicilina mediante la metodología convencional (Sambrook *et al.*, 2001).

Para la obtención de bajas cantidades de ADN plasmídico se centrifugó una alícuota de 1 ml del cultivo bacteriano durante 5 min. a 13000 r.p.m. y temperatura ambiente. Después, se lisaron las bacterias y se extrajo su ADN plasmídico utilizando el kit de miniprep (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para la obtención de cantidades superiores de ADN se trataron volúmenes de hasta 500 ml de cultivo bacteriano con los reactivos del kit de maxiprep (Quiagen), según las indicaciones del fabricante. La solución conteniendo el ADN se purificó mediante una extracción con fenol y cloroformo (Sambrook *et al.*, 2001).

M-7 Extracción de ARN

Para extraer el ARN viral a partir de cultivos celulares o de tejidos de animales infectados se añadió 0,1 ml de sobrenadante celular o de macerado de tejido encefálico y muscular de ratón (ver M-18) a 1 ml de reactivo Tri-Reagent (Sigma), y se procedió siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARN se precipitó en presencia de acetato sódico 3M y etanol. El precipitado se resuspendió en 10 μ l de agua libre de nucleasas (tratada con DEPC).

M-8 Clonaje molecular: clones infecciosos de la proteína 3A

A continuación, se describen los clones infecciosos mutantes de la proteína 3A que se generaron durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral. El detalle de sus características se incluye en el subapartado M-8-1.

pMT28- Δ 3A Construcción obtenida a partir del clon infeccioso pMT28, en el que se eliminó la secuencia nucleotídica correspondiente a la proteína 3A. Se mantuvieron los nucleótidos codificantes de los primeros 4 aminoácidos del extremo amino terminal y los últimos 3 aminoácidos del extremo carboxi terminal de la proteína 3A. Entre ambos grupos de aminoácidos se introdujo el triplete que codifica una glicina (G), lo que permitió generar una diana para la enzima de restricción Xma I.

pMT28-▼G-3A-▼G Construcción derivada del mutante pMT28-Δ3A, en la cual se introdujo la secuencia nucleotídica de la proteína 3A. Las únicas alteraciones respecto a la secuencia nucleotídica de la 3A del clon infeccioso pMT28 fueron las inserciones de dos codones de glicina (G), en las posiciones de los aminoácidos 5 y 151 de la proteína 3A.

pMT28-▼G-3A Construcción derivada del mutante pMT28-▼G-3A-▼G, en la cual se eliminó el codón de glicina (G) situado en la posición 151 de la proteína 3A.

pMT28-3A-VRE-C Construcción derivada del mutante pMT28-▼G-3A, en la cual se sustituyó la secuencia nucleotídica delimitada por los tripletes codificantes de los residuos G5 y P151 de la proteína 3A del VFA por la secuencia nucleotídica completa de la proteína 3A del VRE-A .

pMT28-3A-VRE-I Construcción derivada del mutante pMT28-▼G-3A, en la cual se sustituyó la región de la secuencia nucleotídica delimitada por los tripletes de los residuos G5 y P151 de la proteína 3A del VFA por la secuencia nucleotídica de la proteína 3A del VRE-A, con la excepción de los codones correspondientes a los cuatro primeros aminoácidos del extremo amino terminal y los últimos 4 aminoácidos del extremo carboxi terminal de esta proteína.

pMT28-3A-VRE Construcción derivada del mutante pMT28-3A-VRE-C, en la cual se eliminó el triplete de nucleótidos que codifica el residuo G5 de la proteína 3A.

pMT28-Q44R Construcción derivada de pMT28 en la que el codón CAA, que codifica glutamina (Q) en la posición 44 de la proteína 3A del VFA, se sustituyó por el codón GAT, que codifica una arginina (R).

pMT28-Q44D Construcción derivada de pMT28 en la que el codón CAA, que codifica glutamina (Q) en la posición 44 de la proteína 3A del VFA, se sustituyó por el codón CGA, que codifica un ácido aspártico (D).

pMT28-L38E Construcción derivada de pMT28 en la que el codón CTC, que codifica leucina (L) en la posición 38 de la proteína 3A del VFA, se sustituyó por el codón GAG, que codifica un ácido glutámico (E).

pMT28-L41E Construcción derivada de pMT28 en la que el codón CTC, que codifica leucina (L) en la posición 41 de la proteína 3A del VFA, se sustituyó por el codón GAG, que codifica un ácido glutámico (E).

pMT28-C65S Construcción derivada de pMT28 en la que el codón TGC, que codifica cisteína (C) en la posición 65 de la proteína 3A del VFA, se sustituyó por el codón TCC, que codifica una serina (S).

M-8-1 Metodología empleada para la construcción de los clones infecciosos mutantes

A continuación, se detallan los procedimientos seguidos para obtener los clones infecciosos citados en el apartado M-8.

Para la purificación de ADN, reacciones de ligación o de digestión con enzimas de restricción, separación de fragmentos de ADN en gel de agarosa, aislamiento de dichos fragmentos mediante resinas de intercambio iónico y la mayoría de las técnicas comúnmente utilizadas en genética molecular e implicados en estos clonajes, se siguieron los protocolos descritos previamente (Sambrook *et al.*, 2001), respetando las recomendaciones de los fabricantes de los diferentes reactivos empleados. Las enzimas de restricción empleadas, en caso de no indicarse lo contrario, son de New England Biolabs (NEB).

La comprobación de la secuencia de los plásmidos mutantes se realizó con los oligonucleótidos, indicados en cada caso, en el servicio de genómica del Parque Científico de Madrid., utilizando un secuenciador multicapilar ABI Prism 3100, 3700 o 3730 (Applied Biosystems), con el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing (ABI Prism. Perkin Elmer).

M-8-1-1 Delección de la proteína 3A del VFA. Mutante pMT28- Δ 3A

Para la delección de la proteína 3A del VFA, se aprovecharon las dianas de restricción de corte único en pMT28 que flanquean la secuencia de 3A: la diana Bgl II, localizada en la secuencia codificante de la proteína 2C (posición 4197 de la secuencia nucleotídica del VFA) y la diana Rsr II, localizada en la secuencia codificante de la proteína 3B2 (posición 5846 de la secuencia nucleotídica del VFA), según se esquematiza en la Figura 8.

En un primer paso, se amplificó mediante PCR el fragmento de ADN comprendido entre el sitio de restricción Bgl II y la secuencia codificante del tercer aminoácido de la proteína 3A (PCR1 de la Figura 8). Para ello, siguiendo el protocolo descrito en el apartado M-16, se emplearon los oligonucleótidos 3AF y XmaR, que introduce un sitio de restricción Xma I en el extremo 3' del fragmento amplificado (Tabla III). En un segundo paso, se amplificó mediante la PCR 2 (ver Figura 8), el fragmento de ADN comprendido entre la secuencia codificante del aminoácido 151 de

la proteína 3A y la secuencia diana Rsr II. Para ello se emplearon, en las mismas condiciones que la amplificación anterior, los oligonucleótidos 3AR y XmaF, éste último que introdujo un sitio de restricción para la enzima Xma I en el extremo 5' del fragmento amplificado (Tabla III). Los fragmentos amplificados se ligaron de manera independiente en el vector pGEM-T (Promega), que permite la ligación directa de fragmentos amplificados por PCR. Tras comprobarse mediante digestión con distintas enzimas de restricción que la orientación de los insertos en el vector pGEM-T era la correcta, cada construcción se digirió con las enzimas Xma I y Nde I. Se aislaron los fragmentos de interés por separación en gel de agarosa y se ligaron con la ligasa del fago T4 (Promega) en un único vector pGEM-T a través del sitio Xma I compartido (ver Figura 8). Después de la comprobación de la unión correcta de ambos fragmentos en el nuevo vector pGEM-T, el plásmido se digirió con las enzimas Bgl II y Rsr II para obtener el fragmento con la secuencia de la proteína 3A delecionada. El fragmento aislado se sustituyó por el homólogo en el clon infeccioso pMT28 digerido previamente con las mismas enzimas (Figura 8).

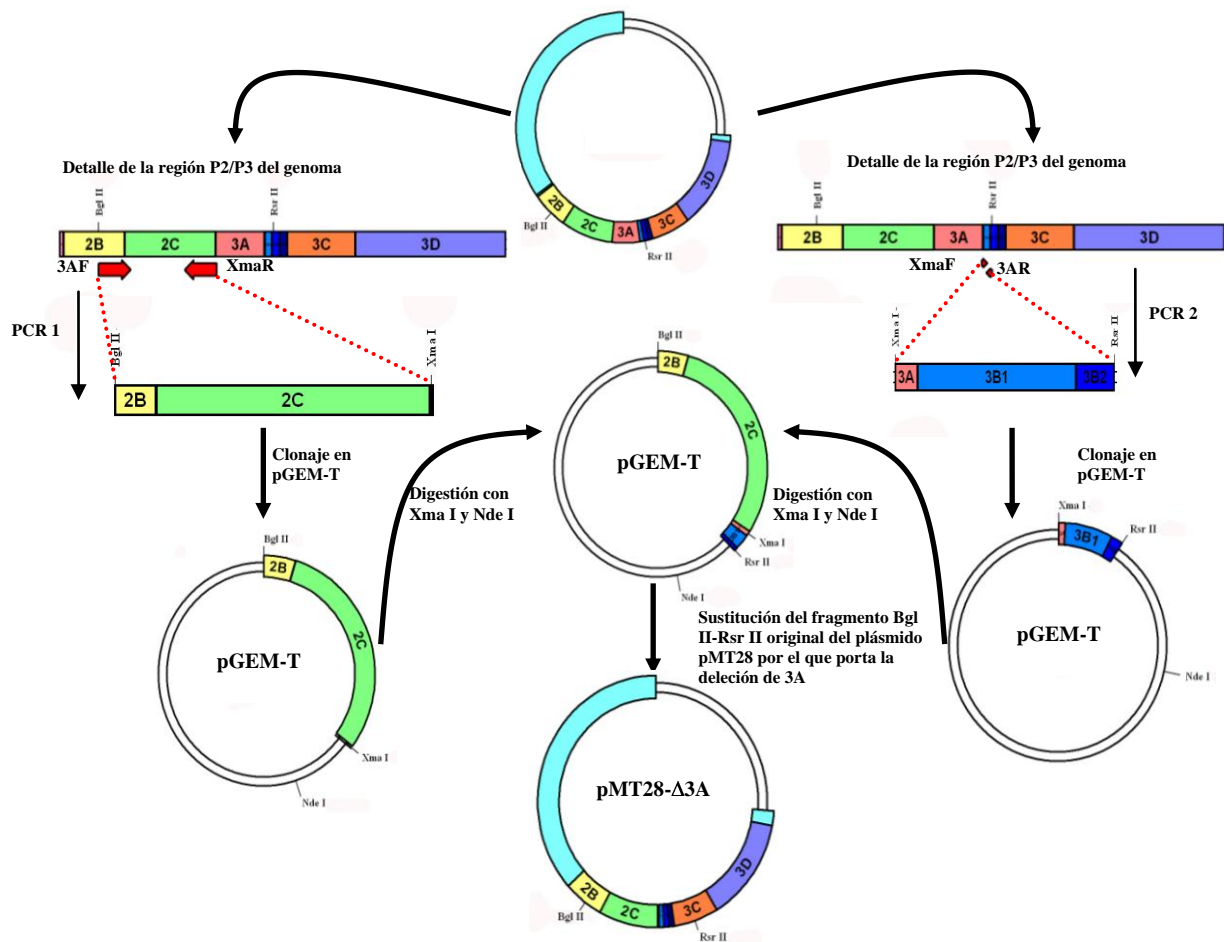


Figura 8. Esquema de la estrategia utilizada para la deleción de la proteína 3A del VFA.

M-8-1-2 Mutante de inserción pMT28-▼G-3A-▼G

Con la estrategia descrita en el apartado anterior, además de generar un clon infeccioso con la proteína 3A deletada (pMT28-Δ3A), se introdujo un sitio de restricción Xma I entre la secuencia correspondiente a los aminoácidos I3 y Q151 de la proteína 3A, que permitió generar posteriormente el mutante pMT28-▼G-3A-▼G. Para ello, en un primer paso, se amplificó mediante PCR la secuencia correspondiente a la región de 3A, comprendida entre los nucleótidos que codifican los aminoácidos 4 y 150, mediante el empleo de los oligonucleótidos 3AXmaF1 y 3AXmaR1 (Tabla III), que introdujeron sitios de restricción Xma I en ambos extremos del fragmento amplificado. A continuación, dicho fragmento se introdujo en el vector pGEM-T, se aisló y purificó mediante separación en gel de agarosa y se ligó con el ADN del mutante pMT28-Δ3A, previamente digerido con Xma I, según se esquematiza en la Figura 9.

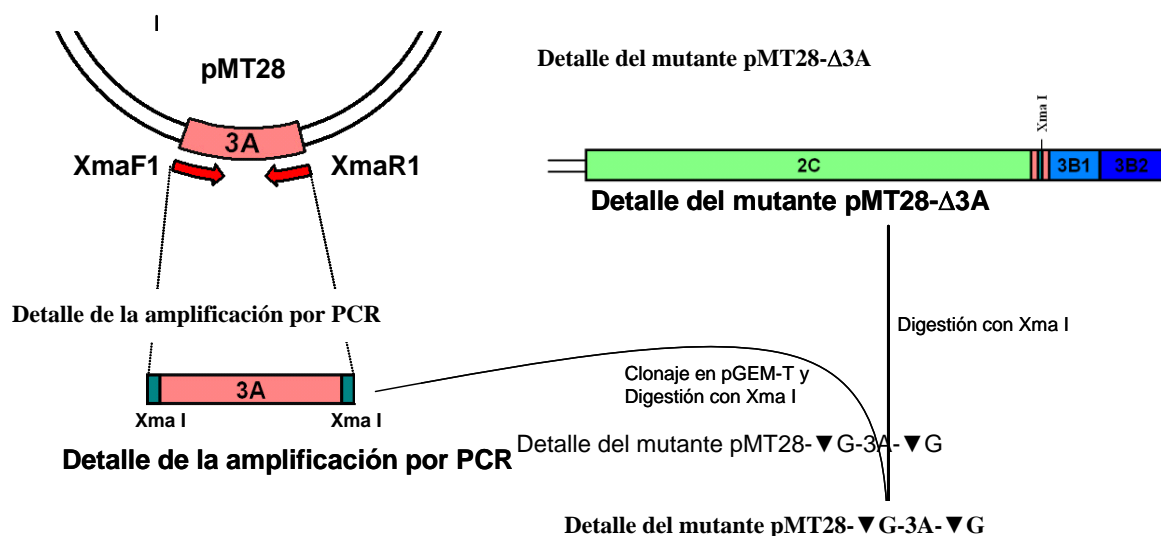


Figura 9. Esquema de la construcción del mutante pMT28-▼G-3A-▼G. A la izquierda se representa la región de 3A del plásmido pMT28 empleado como molde para la amplificación por PCR de 3A con la introducción de secuencias diana para la enzima de restricción Xma I en los extremos del fragmento amplificado. A la derecha se representa la región comprendida entre 2C y 3B2 del mutante pMT28-Δ3A (en Resultados se muestran los aminoácidos residuales de 3A, ver Figura 14), que se digirió con la enzima Xma I para la introducción del fragmento amplificado anteriormente por PCR. En la parte inferior se representa la misma región del plásmido pMT28-▼G-3A-▼G.

M-8-1-3 Mutante de inserción pMT28-▼G-3A

Con el objetivo de eliminar del mutante pMT28-▼G-3A-▼G el residuo de G introducido entre los aminoácidos 150 y 151 de la proteína 3A, se procedió de manera similar a la descrita en el apartado M-8-1-1, pero utilizando como molde para las PCR 1 y 2 (ver Figura 8) el ADN del mutante pMT28-▼G-3A-▼G. El fragmento de ADN que comprende desde la secuencia de la proteína 2C hasta el extremo 3' de la secuencia de la proteína 3A se amplificó mediante la PCR 1 empleando los oligonucleótidos 3AF (previamente descrito) y BsuR (Tabla III). Esta estrategia permitió la adición de una diana de la enzima Bsu36 I en el extremo 3' del fragmento amplificado, que no implicaba cambio de aminoácido en la secuencia *wt* del virus. Para la PCR 2 se emplearon los oligonucleótidos 3AR y BsuF (Tabla III), que permitieron amplificar el fragmento de ADN comprendido desde el extremo 3' de la secuencia de 3A hasta el final de la secuencia de la proteína 3B2, añadiendo un sitio de restricción Bsu36 I en el extremo 5' del fragmento. Cada uno de los fragmentos amplificados se clonaron independientemente en el vector pGEM-T y, tras comprobar su la correcta orientación por análisis con enzimas de restricción, ambos plásmidos se digirieron con las enzimas Bsu36 I y Nde I. Los fragmentos resultantes de interés se aislaron y se ligaron en pGEM-T utilizando el sitio Bsu36 I compartido. El plásmido resultante se digirió con las enzimas Bgl II y Rsr II, y el segmento conteniendo la secuencia de 3A se utilizó para reemplazar el homólogo en el plásmido pMT28 digerido con las mismas enzimas de restricción. En la Figura 10 se muestra un detalle de la región del plásmido pMT28-▼G-3A situada entre las dianas de restricción Bgl II y Rsr II.

M-8-1-4 Sustitución de la proteína 3A del VFA por su homóloga del VRE-A. Mutantes pMT28-3A-VRE-C y pMT28-3A-VRE-I

Como primer paso para disponer del ADN correspondiente a la proteína 3A del VRE-A, se infectaron con este virus células VERO, se extrajo su ARN (ver apartado M-7) y se amplificó la secuencia correspondiente a la proteína 3A por medio de una RT-PCR, según el protocolo descrito en el apartado M-16-1. Para ello se emplearon los oligonucleótidos VREA-C-F y VREA-C-R, que permiten la amplificación de la secuencia completa de 3A o los oligonucleótidos VREA-I-F y VREA-I-R para la amplificación de la secuencia de 3A, sin los primeros y últimos 4 aminoácidos. Dichos oligonucleótidos (Tabla III) fueron diseñados para introducir en el extremo 5' de los

fragmentos amplificados, una secuencia de restricción Xma I y en el extremo 3' una secuencia de restricción Bsu36 I, necesarias para sustituir estos fragmentos por el correspondiente a la proteína 3A del VFA en el mutante pMT28- ∇ G-3A (Figura 10).

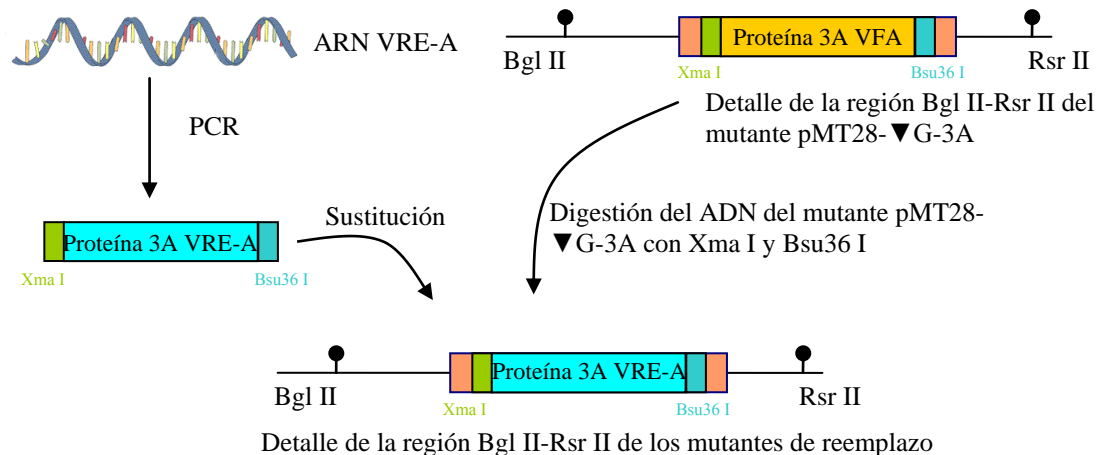


Figura 10. Esquema general de obtención de mutaciones de reemplazo de 3A.

M-8-1-5 Mutantes puntuales

Para generar los distintos clones infecciosos derivados de pMT28 con mutaciones puntuales en la secuencia de la proteína 3A analizados en esta Tesis Doctoral, se empleó la técnica de “*overlap extensión*” (Sambrook *et al.*, 2001).

Para ello, se diseñaron en cada caso parejas de oligonucleótidos genéricamente representados como oligonucleótido 2 y oligonucleótido 3 (Figura 11). Estos oligonucleótidos son solapantes en la mayor parte de su secuencia, compartiendo también el nucleótido o nucleótidos a sustituir, tal como se representa en la Figura 11.

Primero se realizaron dos amplificaciones mediante PCR, según el protocolo descrito en el apartado M-16. En la primera se empleó el oligonucleótido 3AF y el oligonucleótido 2, correspondiente a cada mutación a introducir (ver Figura 11 y Tabla I). Así se amplificó la secuencia comprendida entre la diana de restricción Bgl II en pMT28 (Figura 11) y los nucleótidos implicados en la mutación puntual. En la segunda amplificación por PCR se empleó el oligonucleótido 3AR y el oligonucleótido 3, correspondiente a cada mutación a introducir (ver Figura 11 y Tabla I). Esto permitió amplificar la secuencia comprendida entre los nucleótidos implicados en la mutación puntual y la diana de restricción Rsr II de pMT28. La cantidad de ADN amplificado se estimó mediante el método estándar de separación en gel de agarosa y comparación con

patrones de tamaño y concentración de ADN conocida (Sambrook *et al.*, 2001). Se mezclaron cantidades equimoleculares (~50 ng) de cada uno de los fragmentos amplificados que sirvieron de molde para la tercera PCR, realizada con los oligonucleótidos 3AF y 3AR según lo descrito en el apartado M-16, en la que se generó el fragmento completo (Bgl II – Rsr II) con la mutación introducida según representa la Figura 11. Este fragmento se empleó para reemplazar a su homólogo del plásmido pMT28, previamente digerido con las mismas enzimas.

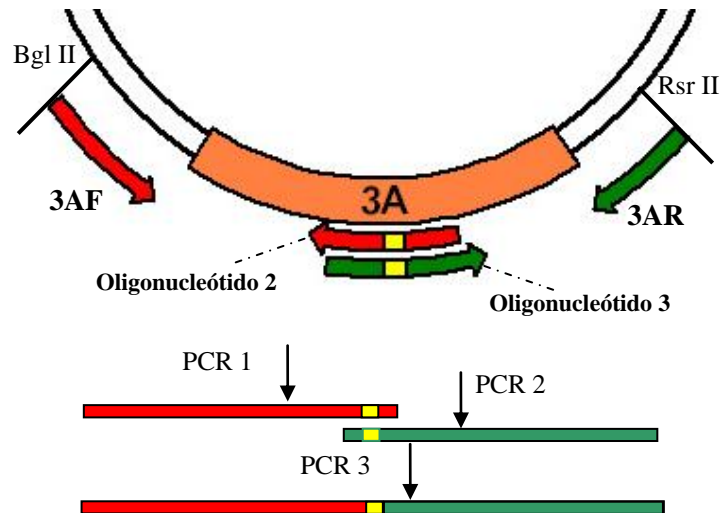


Figura 11. Esquema de introducción de mutaciones puntuales en la secuencia de la proteína 3A. En la parte superior de la figura se representa la región del plásmido pMT28 que codifica la proteína 3A. Mediante las flechas rojas se indican los oligonucleótidos empleados. Los rectángulos rojos simbolizan la secuencia amplificada en cada PCR. En amarillo se indica la mutación introducida en cada caso.

Mutantes puntuales generados

Mediante la técnica arriba descrita, se construyeron los mutantes pMT28-Q44R, pMT28-Q44D, pMT28-L38E, pMT28-L41E y pMT28-C65S. En la Tabla I se muestran la posición en la secuencia del genoma del VFA en la que hibrida cada oligonucleótido, el mutante generado con cada par de oligonucleótidos y los nucleótidos mutados respecto a la secuencia del clon infeccioso pMT28.

Para la generación del mutante pMT28-3A-VRE se eliminó la G introducida en la posición 4 de la proteína 3A del mutante pMT28-3A-VRE-C, mediante mutagénesis dirigida con los oligonucleótidos VREA-TOT-F y VREA-TOT-R.

Tabla I. Oligonucleótidos empleados para la construcción de mutantes puntuales en 3A.

Mutante	Oligonucleótido ^a	Secuencia (5' - 3') ^b	Posición ^c
pMT28-Q44R	2 Q44R-R	CACAAATGAAGTATCTTGGATGAGGGGC (T) (G)	5442
	3 Q44R-F	CCTCATCCAAGATACTTCATTTGTGAAACGTG (C) (A)	5418
pMT28-Q44D	2 Q44D-R	CACAAATGAAGTTCGTTGGATGAGGGGC (T)	5442
	3 Q44D-F	CCTCATCCAACGAACCTTCATTTGTGAAACGT (A)	5418
pMT28-L38E	2 L38E-R	GATGAGGGGCCGCTCTTCCTCCTTAATG (GAG)	5424
	3 L38E-F	CATTAAGGAGGAAGAGCGGCCCTCATC (CTC)	5397
pMT28-L41E	2 L41E-R	GTTTGTGGATCTCGGGCCGGAGTTC (GAG)	5432
	3 L41E-F	GAACTCCGGCCCCGAGATCCAACAAAC (CTC)	5407
pMT28-C65S	2 C65S-R	GCCAAAAGTGTTAGGGACAGTGCAACAATTC (C)	5517
	3 C65S-F	ATTGTTGCACTGTCCCTAACACTTTTGGCC (G)	5489
pMT28-3A-VRE	2 VREA-TOT-R	<u>GAACAAATCAGACCATGAGGGTATTGAGAT</u> VRE-A	5310
	3 VREA-TOT-F	CAAATCTCAATACCCTCATGGTCTGATTTG VRE-A	5296

^a La nomenclatura empleada (oligonucleótido 2 ò 3), hace referencia al esquema de la Figura 11. Los oligonucleótidos marcados con “-F” presentan la misma orientación que el ARN mensajero viral mientras que los marcados con “-R” presentan la orientación complementaria.

^b Los nucleótidos modificados respecto a la secuencia del VFA presente en el clon infeccioso pMT28 se indican en negrita (entre paréntesis se indica, debajo de cada posición alterada, el nucleótido presente en la secuencia de pMT28). Los nucleótidos correspondiente al VRE-A adyacentes a la secuencia codificante del residuo G5 de la proteína 3A del mutante pMT28-3A-VRE-C se indican subrayados.

^c La numeración se corresponde a la secuencia del VFA (Nº Genbank AJ133357) e indica la posición del primer nucleótido del VFA desde el extremo 5' de cada oligonucleótido.

M-9 Construcción de plásmidos derivados del pRSV portando versiones mutadas de la proteína 3A del VFA

La utilización del vector pRSV (de Wet *et al.*, 1987) ha permitido la expresión de proteínas heterólogas bajo el control del promotor fuerte LTR del virus del sarcoma de Rous. De este modo, se construyeron los plásmidos pRSV-3A-L38E y pRSV-3A-L41E, derivados del vector pRSV, que portan la secuencia nucleotídica de la proteína 3A mutada en los codones correspondientes a las posiciones 38 ó 41, respectivamente. Para ello, se amplificó por PCR la secuencia de la proteína 3A conteniendo las mutaciones de interés a partir de los plásmidos pMT28-L38E y pMT28-L41E, empleando los oligonucleótidos 3A-1 y 3A-2 (Tabla III). Estos oligonucleótidos introducen los sitios de restricción Hind III en el extremo 5' del fragmento amplificado y Kpn I en el extremo 3'. Tras un clonaje intermedio en el plásmido pGEM-T, el

fragmento Hind III - Kpn I de la proteína 3A mutada se clonó en el plásmido pRSV-3A (García-Briones, *et al.*, 2006), digeridos con las mismas enzimas, según se esquematiza en la Figura 12.

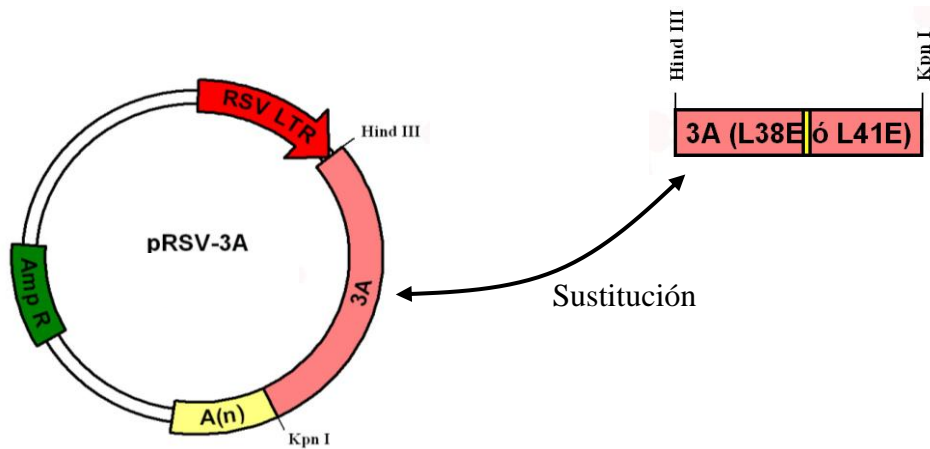


Figura 12. Esquema del clonaje de reemplazo para generar versiones mutadas de 3A en pRSV-3A. El plásmido pRSV-3A (García-Briones, *et al.*, 2006), porta la secuencia nucleotídica de la proteína 3A del VFA. Se señalan los sitios de restricción Hind III y Kpn I que permitieron la sustitución de la secuencia nucleotídica de la proteína 3A por la de las proteínas mutadas, según se detalla en M9. Se señalan, además, la ubicación de la señal de poliadenilación ($A_{(n)}$) derivada del virus SV40 y del gen que confiere resistencia a ampicilina (Amp R). En la parte derecha de la figura se representa un detalle del fragmento amplificado por PCR, a partir de los mutantes pMT28-L38E ó pMT28-L41E empleado para reemplazar la secuencia de 3A en pRSV-3A.

M-10 Transcripción *in vitro*

Para la realización de las transcripciones *in vitro*, se partió del ADN del plásmido a estudiar (pMT28, pC o de cualquiera de los mutantes en la proteína 3A derivados de ellos), linealizado mediante digestión con la enzima de restricción Nde I, que corta en el nucleótido posterior al último que corresponde a la secuencia del VFA (García-Arriaza *et al.*, 2004)

La transcripción se llevó a cabo en la siguiente mezcla de reacción: rNTPs (0,5 mM cada uno), DTT 10 mM, 40 U ARNsin (Promega), 20 U polimerasa SP6 (NEB) y 100ng de ADN molde linealizado, en un volumen final de 30 μ l del tampón recomendado para la polimerasa. En todo momento, se utilizó agua tratada con DEPC al 0,1%. La incubación se realizó a 37°C durante 3 h.. Al cabo de ese tiempo, se añadió a cada muestra 2U DNAsa RQ1 (Promega) incrementando el volumen final hasta 50 μ l con el mismo tampón de la polimerasa. Las muestras se incubaron durante 1 h. a 37°C.

El ARN se precipitó en etanol y en acetato sódico 3M y se resuspendió en el volumen deseado de agua libre de nucleasas. La integridad y la concentración del ARN sintetizado se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa comparando con patrones de ARN de concentración conocida (Invitrogen).

M-11 Transfección de cultivos celulares

M-11-1 Transfección con ARN

Diferentes cantidades de ARN transcrito *in vitro* a partir de los plásmidos infecciosos se emplearon para transfectar células BHK-21 empleando lipofectina (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras 4 h. de incubación a 37°C en una atmósfera con 7% CO₂, se eliminó el medio transfectante, se lavaron dos veces las monocapas celulares con medio DMEM y se añadió medio suplementado con SFB al 5%. Las células se mantuvieron en el incubador a 37°C en una atmósfera con 7% CO₂ el tiempo indicado en cada caso.

M-11-2 Transfección con ADN

La transfección de las células BHK-21 con ADN de los plásmidos pRSV-3A-L38E y pRSV-3A-L41E se realizó en placas de 35 mm Ø, empleando 1 µg de ADN y Lipofectamina Plus (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

M-12 Titulación de virus

La determinación del título viral de muestras de células transfectadas con el ARN de los diferentes clones infecciosos se llevó a cabo mediante la estimación de las unidades formadoras de placas de lisis por ml de muestra (UFP/ml). Para ello se emplearon células BHK-21 en estado de semiconfluencia (~80%), crecidas en placas de 35 mm Ø, a las que se les retiró el medio sobrenadante y se añadieron 200 µl/placa de las diluciones apropiadas de la muestra problema. Tras la aplicación del inóculo, las placas se incubaron a 37°C durante 1 h., agitándose en cruz cada 15 min. Posteriormente, se retiró el inóculo y, tras dos lavados con DMEM, se añadió medio semisólido de agar al 0,5 % en DMEM, suplementado con un 1 % de suero fetal bovino y DEAE-dextrano a una concentración de 0,05%. Las monocapas celulares se incubaron hasta la aparición de placas de lisis (24 h.). En ese momento, se añadió una solución de

formaldehído al 2% para fijar las células y se tiñeron con una mezcla de cristal violeta al 2% en formaldehído al 2%. Tras retirar el agar de las mismas, se contó el número de UFP producidas.

M-13 Determinación de la infectividad específica del ARN de los mutantes.

La infectividad específica del ARN (UFP/ng ARN) se determinó transfectando células BHK-21, según lo descrito en el apartado M-11-1, con distintas cantidades de ARN sintetizado *in vitro* (1, 10, 100 y 1000 ng ARN /superficie de cultivo de 35 mm Ø). Después de 4 h. de incubación con el medio transfectante, se eliminó el sobrenadante, las monocapas se lavaron dos veces con DMEM y se cubrieron con medio DMEM semisólido con agar al 0,5 % suplementado con SFB al 5 %. Las monocapas celulares así tratadas se incubaron a 37°C en una atmósfera con 7 % CO₂ hasta la aparición de placas visibles al microscopio (aproximadamente unas 24 h.), tras lo cual, se fijaron, tiñeron con cristal violeta y se determinó el número de UFP según lo descrito en el apartado M-12.

M-14 Traducción *in vitro*

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl, incluyendo 7µl de lisado de reticulocitos de conejo (Promega), 1µg de ARN molde sintetizado *in vitro* a partir de cada plásmido de interés, 1 µl de la mezcla de aminoácidos sin metionina y 14,3 µCi, en 1 µl, de una mezcla de metionina y cisteína marcadas con ³⁵S (Amersham). Cada reacción se incubó durante 1 h. a 30°C y posteriormente se trató con 1 µl de ARNasa A (50 mg/ml) durante 15 min. a temperatura ambiente para eliminar el molde de ARN. La radiactividad incorporada en la reacción se cuantificó según lo detallado en el apartado M-14-1.

M-14-1 Cuantificación de incorporación de radiactividad

Una alícuota de 1 µl de la reacción de traducción *in vitro* se precipitó añadiendo 25% TCA e incubando la mezcla durante 30 min. en hielo. Las proteínas precipitadas se filtraron por vacío a través de un papel Whatman 3MM que había sido previamente humedecido con 5% TCA frío. Los papeles se lavaron 3 veces con 5% TCA, se secaron a temperatura ambiente y se sumergieron en líquido de centelleo (Perkin Elmer). La

radiactividad incorporada (c.p.m.) correspondiente al ^{35}S se midió en un contador de centelleo LKB, Modelo 1209 Rackbeta.

M-14-2 Análisis de las proteínas marcadas con ^{35}S mediante electroforesis en gel de poliacrilamida

Alícuotas de las reacciones de traducción *in vitro*, con igual cantidad de radiactividad incorporada (apartado M-14-1), se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%, que se llevó a cabo en voltaje constante (100V) y a 4°C. Posteriormente, el gel se fijó en una mezcla de 10% metanol y 10% ácido acético durante 30 min. y se trató con salicilato sódico 1M o con Amplify (Amersham) durante 1 h. a temperatura ambiente en agitación para permitir la posterior fluorografía. El gel, así tratado, se secó en vacío durante 1 h. a 80°C y se expuso frente a una placa autoradiográfica Curix RP2 (AGFA) durante no menos de 24 h. a temperatura ambiente.

M-15 Ensayo de sensibilidad a brefeldina A (BFA)

Para los ensayos de sensibilidad viral a la BFA, la droga, disuelta en DMSO a una concentración final de 5 µg/ml, se añadió a las monocapas celulares 30 min. antes de la infección y se mantuvo durante todo el experimento. Las células así tratadas se infectaron con VRE-A a una m.d.i. de 1 UFP/célula. A las 7 h.p.i., se cuantificó el virus intra y extracelular producido (ver M-12). Células tratadas solo con DMSO fueron utilizadas como control negativo de tratamiento. Como control positivo de sensibilidad a BFA se emplearon células infectadas con VSV a una m.d.i. de 1 UFP/célula.

M-16 Condiciones empleadas en las amplificaciones por PCR

Todas las amplificaciones de ADN por PCR se realizaron en un volumen de 50 µl del tampón provisto por el fabricante suplementado con: 0,25 U por ensayo de la polimerasa BioTaq (Bioline), MgCl_2 2mM, dNTPs (1mM cada uno) y los oligonucleótidos (1 µM cada uno, Isogen) específicos para cada caso y referidos en las Tablas I y III.

Las temperaturas empleadas se describen en la Tabla II. Tras los cuarenta ciclos de amplificación, se analizaron los segmentos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa. En los casos en los que fue necesario, se purificaron los fragmentos de

ADN amplificados de los oligonucleotidos no incorporados a la reacción mediante el sistema PCR Clean (Promega).

Tabla II. Programa empleado para la amplificación de ADN.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	
Desnaturalización	94	2	
40 ciclos {	Desnaturalización	94	0,5
	Hibridación	Según oligos 60-65	1
	Elongación	72	0,5
	Elongación	72	7
	Enfriamiento	4	-

M-16-1 RT-PCR

Para amplificar muestras de ARN, se procedió según lo descrito en el apartado M-16, añadiendo un primer paso de síntesis de ADNc. Para ello, se añadieron a la misma mezcla de reacción descrita para la PCR, 25 U por ensayo de la retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina de Moloney (Applied Biosystems), incluyéndose un paso inicial de incubación a 48°C durante 40 min.

M-16-2 PCR en tiempo real

La cuantificación independiente del número de moléculas de ARN+ y ARN-virales producidas tras la transfección con el ARN sintetizado *in vitro* de las distintas construcciones, se realizó mediante PCR en tiempo real (Herrera *et al.*, 2008; Rodríguez-Pulido *et al.*, 2009). El ARN extraído a partir de las muestras problemas se copió a su ADNc mediante una retrotranscripción en 20 µl del tampón suministrado por el fabricante, suplementado con: 5 U de la enzima *Transcriptor RT* (Roche), 40 U de ARNsin (Promega), dNTPs 1mM y el oligonucleótido específico (10µg/µl), según lo detallado en la Figura 13. La reacción se incubó 30 min. a 55°C, seguidos de 5 min. a 85°C y un paso final de enfriamiento a 4°C. Para el desarrollo de la PCR a tiempo real propiamente dicha, se amplificaron 2 µl de la mezcla anterior conteniendo el ADNc, utilizando el kit Light Cycler FastStart ADN Master SYBR Green I (Roche) y el equipo LightCycler (Roche), según las instrucciones del fabricante.

La estrategia empleada para la cuantificación del ARN⁺ y ARN⁻ se esquematiza en la Figura 13, y los oligonucleótidos empleados en cada caso se describen en la Tabla III.

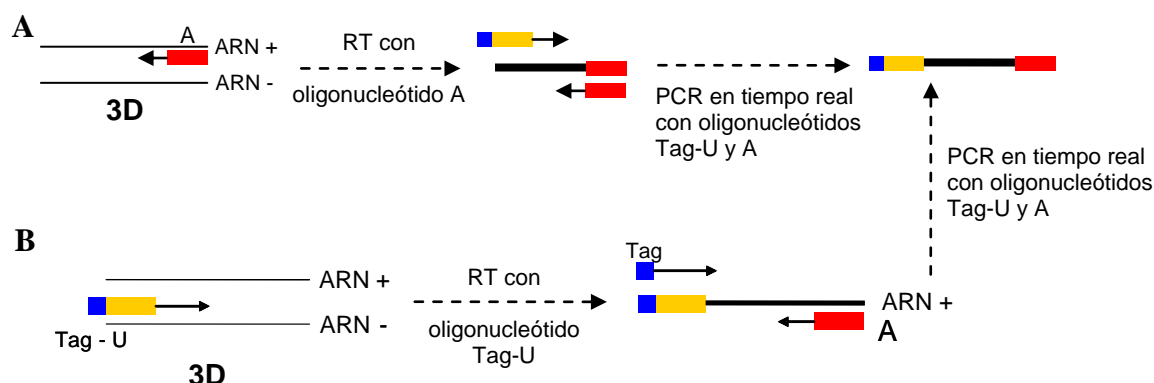


Figura 13. Esquema de la amplificación de ARN⁺ (A) o ARN⁻ (B) mediante PCR en tiempo real.

Para la amplificación de las moléculas de ARN⁺, la síntesis de ADNc se realizó con el oligonucleótido A y la PCR cuantitativa a tiempo real posterior con los oligonucleótidos A y Tag-U. En la amplificación del ADNc de las moléculas de ARN⁻, se utilizó el oligonucleótido Tag-U y, para la PCR a tiempo real, se emplearon los oligonucleótidos A y Tag. Todos los oligonucleótidos correspondieron a secuencias del gen de la proteína 3D, tal y como se detalla en la Tabla III.

M-17 Inmunoensayos

M-17-1 *Western-Blot*

La separación de las proteínas virales y celulares se realizó por SDS-PAGE; la identificación específica de las proteínas virales se hizo mediante *western-blot*. Para ello, tras retirar el medio de cultivo, las monocapas celulares (crecidas en placas de 35 mm Ø), fueron lavadas 2 veces con PBS y se lisaron por incubación durante 20 min. en hielo en tampón de lisis (Hepes pH 7,4 20mM, EDTA 10 mM, MgCl₂ 2,5 mM, NP40 1%), suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche) y fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 0,1M. La concentración de proteínas recuperadas se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Una alícuota de este lisado celular, conteniendo 100-200 ng de proteínas totales, se diluyó en 20 µl con tampón Laemli (SDS 2%, glicerol 11,6%, DTT 0,1 M, Tris-HCl pH 6,8 160mM y azul de bromofenol 0,033%), calentándose a 99°C durante 5 min. Las muestras así tratadas

se cargaron en un gel de SDS-PAGE a la concentración indicada en cada ensayo. La electroforesis se desarrolló a 180 V durante aproximadamente 45 min., utilizando el sistema MiniProtean 2 (Bio-Rad). Una vez finalizada, el gel se transfirió en medio líquido a una membrana de nitrocelulosa (Protran Whatman) durante 40 min. a 60 V. La reactividad inespecífica se bloqueó tratando la membrana con leche en polvo desnatada (Nestlé) al 3% en PBS durante 1 h. a temperatura ambiente en agitación. Para la realización del *western-blot* propiamente dicho, la membrana se trató con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en leche en polvo desnatada al 1% en PBS, y se incubó 1 h. a temperatura ambiente o 16 h. a 4°C. Transcurrido ese tiempo, las membranas se lavaron tres veces durante 5 min. con PBS-tween 20 0,5%, incubándose posteriormente durante 1 h. con el anticuerpo secundario adecuado acoplado a peroxidasa, con agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces durante 5 min. con PBS-Tween 20 0,5%. La presencia de proteína reactiva frente al anticuerpo primario se detectó mediante quimioluminiscencia, para lo cual, la membrana se trató con los reactivos del kit ECL (Perkin Elmer) siguiendo las indicaciones del fabricante, e inmediatamente se expuso sobre películas de revelado Curix RP2 (AGFA).

M-17-2 Inmunoprecipitación

Para inmunoprecipitar las proteínas virales sintetizadas en la reacción de traducción *in vitro*, el volumen correspondiente a una cantidad determinada de c.p.m. de cada muestra, cuantificada según el protocolo descrito en el apartado M-14-1, se llevó a un volumen final de 1,2 ml con una solución de inmunoprecipitación compuesto por inhibidores de proteasas 1x (Roche), 1mM PMSF y tampón de lisis, descrito en el apartado M-17-1. Alicuotas de 200 µl de esta mezcla se incubaron con 20 µl de proteína A sepharosa (Sigma) unida al anticuerpo primario utilizado en cada caso, durante 16 h. a 4°C. A continuación, la mezcla se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 5 min. a temperatura ambiente. El precipitado conteniendo la proteína A unida a las proteínas inmunoprecipitadas se lavó tres veces con PBS y dos veces más con Tris-HCl pH 7.4 50mM, centrifugando en cada lavado a 10000 r.p.m. durante 5 min. El precipitado final se resuspendió en tampón Laemli (ver M-17-1) y se almacenó a -20°C hasta su análisis.

Para preparar la proteína A unida al anticuerpo primario, se mezclaron 1 µl del anticuerpo primario correspondiente con 20 µl de proteína A sepharosa (Sigma) en presencia de BSA al 1% en PBS. La mezcla se incubó en agitación durante 16 h. a 4°C.

M-17-3 Inmunofluorescencia

Para los ensayos de inmunofluorescencia las células se crecieron y se transfectaron sobre cubreobjetos (ver M-11). Tras retirar el medio de cultivo, las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 min. a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron 2 veces con PBS y se permeabilizaron con BPTG (BSA 1%, Triton-X 100 0,1%, glicina 1M en PBS) durante 15 min. a temperatura ambiente. Las células así tratadas se incubaron durante 1 h. a temperatura ambiente en cámara húmeda, con los anticuerpos primarios correspondientes diluidos en BSA al 1% en PBS. Luego, se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente (según el apartado M-5) durante 30 min. a temperatura ambiente. Para teñir los núcleos celulares, las células se incubaron posteriormente con DAPI (1 µg/ml) durante 5 min., se lavaron otra vez con PBS y se montaron sobre portaobjetos con Fluoromount G (Southern Biotech Assoc, USA). Las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 acoplado a una cámara DP70 (Olympus). Las imágenes se adquirieron usando el programa informático Olympus DP controller y fueron procesadas usando el programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc.).

M-18 Ensayo de letalidad en ratón lactante

Los ensayos de letalidad en ratón lactante se realizaron en el animalario de nivel de bioseguridad 3 (BSL3) del Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), con el asesoramiento y apoyo de los Drs. Miguel Rodríguez-Pulido y Margarita Saiz. Para el ensayo, se utilizaron ratones Swiss de 7 a 9 días de edad. Los ratones fueron inoculados intraperitonealmente con la cantidad elegida de cada ARN en PBS, en un volumen final de 80 µl, que contenía 20 µl de lipofectina. Durante 7 días se realizó un seguimiento diario de los animales evaluando la aparición de síntomas de la enfermedad, muertes o desapariciones de los ratones. Los signos indicadores de la aparición de la enfermedad fueron la incapacidad o parálisis total de las extremidades inferiores y la presencia de temblores e incapacidad para incorporarse. Aquellos ratones que desarrollaron signos clínicos severos fueron sacrificados mediante dislocación cervical, para evitar su sufrimiento, guardándose congelados a -70°C. Para analizar la presencia del ARN del virus en estos animales se realizó un macerado de tejido encefálico y muscular, previamente congelados en nitrógeno líquido, en 0,6 ml de PBS. El macerado resultante se pasó a través de un filtro de 0,45 micras, se extrajo el ARN

total mediante el protocolo descrito previamente (ver M-7) y se realizó una RT-PCR para detectar la presencia de ARN viral con los oligonucleótidos 3Artpcr y 3AB-V (Tabla III).

M-19 Métodos estadísticos y tratamiento de datos

Los valores representados en las gráficas corresponden a la media de 3 determinaciones independientes \pm el valor de la desviación típica. Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza realizando un contraste de medias basado en la t de Student. Para ello, se empleó el programa informático SPSS (versión 15). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas, indicándose con un asterisco, cuando el *p*-valor calculado fue menor de 0.05.

M-20 Disoluciones y tampones

-**Tripsina-EDTA**: tripsina 0,5 mg/ml (Difco), EDTA 0,016%, rojo fenol 0,0015% y glucosa 1,12mM en PBS.

-**Tampón de electroforesis de ácidos nucleicos (TAE)**: Tris 40mM, acetato sódico pH 8.0 y EDTA 0,1mM.

-**Tampón de electroforesis de proteínas**: glicina 192mM, Tris 25mM, SDS 0,1%.

-**Tampón de transferencia de proteínas**: Tris 25mM, glicina 192mM, metanol 20%.

-**PBS**: K₂HPO₄ 1,5mM, Na₂HPO₄ 8,1mM, NaCl 137mM, KCl 2,7mM.

M-21 Oligonucleótidos

Tabla III. Oligonucleótidos empleados para las distintas amplificaciones de ADN o ARN.

Nombre	Secuencia (5' - 3') ^a	Polaridad ^b	Posición ^c
3AF	GAAGATCTCCGACTCGCTCTCCAG Bgl II	S	4197
3AR	ATCGGACCGGCGTAAGGTCCCTC Rsr II	A	5846
XmaR	TGCCCGGGTATTGAGATTTGCTTAAAAATTGGG Xma I	A	5308
XmaF	ATCCCGGGCAAGCTGAAGGACCC Xma I	S	5749
XmaF1	TATACCCGGGTCCCAAAAATCTGTGTTGTAC Xma I	S	5311
XmaR1	TATACCCGGGTTGCTCTTCAGTCGG Xma I	A	5745
BsuF	ATCCTCAGGCTGAAGGACCCTACGCC Bsu 36 I	S	5734
BsuR	TATACCTCAGGTTGCTCTTCAGTCGGC Bsu36 I	A	5745
VREA-C-F	TATACCCGGGTCATGGTCTGATTTGTTTCAG Xma I	S	1 ^d
VREA-C-R	TATACCTCAGGATGCTCGTCAGGAGTC Bsu36 I	A	285 ^d
VREA-I-F	TATACCCGGGTTGTTTCAGAAAGTGTACAACCTG Xma I	S	13 ^d
VREA-I-R	TATACCTCAGGAGTCTTAAAGAGCTGATACATAG Bsu36 I	A	273 ^d
3Artper	GCGAAGCTTTCTAGAATGGCAAATCTCAATACC	S	5295
3AB-V ^e	TCTAGAGGTACCTTACTCAGTGACAATCAA	A	5970
3A-1 ^e	GCGAAGCTTTCTAGAATGATCTAGAATGATCTCAATACCTTC C Hind III	S	5299
3A-2 ^e	TATAGTTCTGGTACCTTATTCAGCTTGCGGTTG Kpn I	A	5757
U ^f	GGATGCCATCTGGCTGT	S	7493
A ^f	AGGAGATCATGGTGTAGGTGTC	A	7615
U-tag ^f	AGTTTAAGAACCCTTCCCGCGGATGCCATCTGGCTGT	S	7493
tag ^f	AGTTTAAGAACCCTTCCCGC	S	

^a En letra cursiva se representan los nucleótidos adicionales a la secuencia del VFA o del VRE-A. Los nucleótidos correspondientes a los sitios de restricción aparecen subrayados con trazo discontinuo.

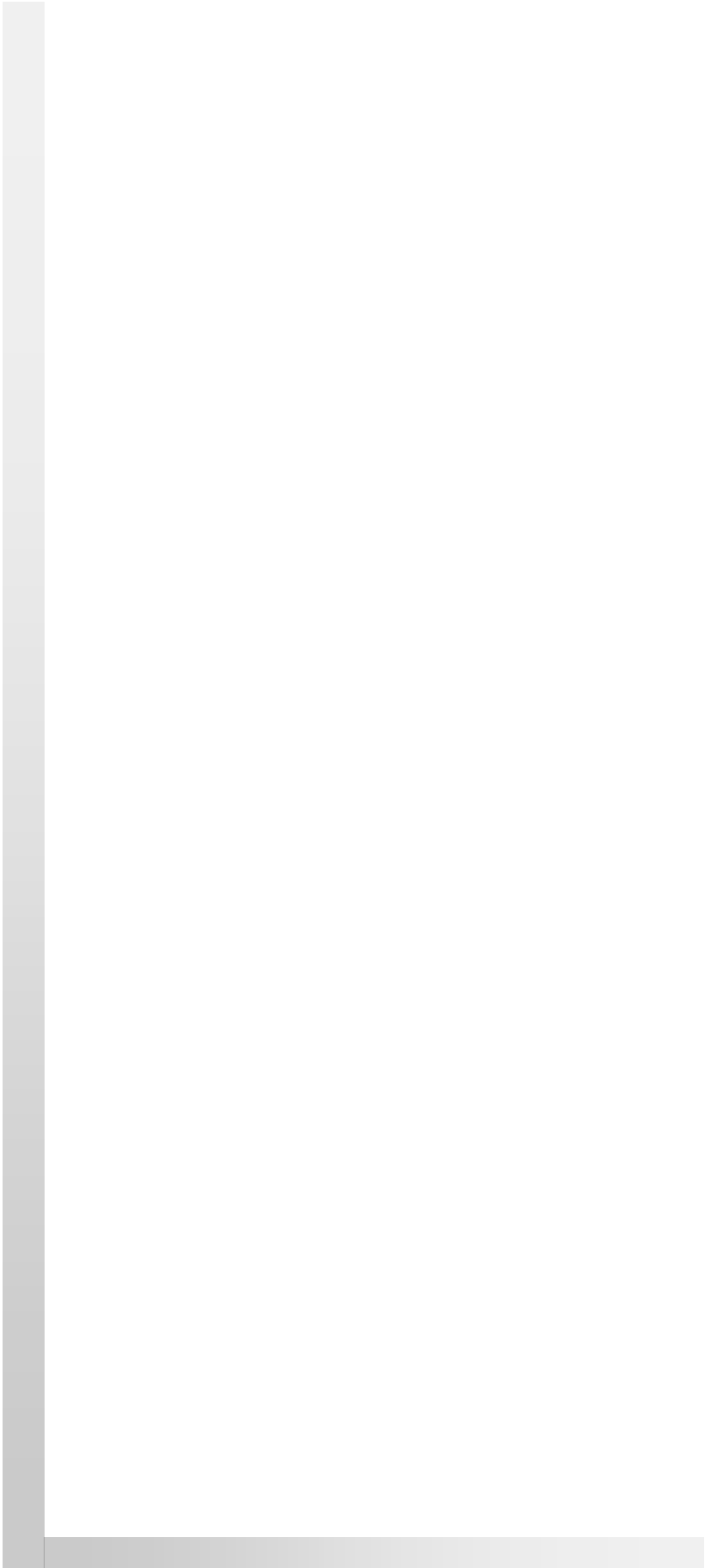
^b S: sentido; A: antisentido.

^c La numeración corresponde a la secuencia del VFA C-S8c1 (Nº Genbank AJ133357), excepto en los marcados con ^d

^d La numeración de los oligonucleótidos VREA-C-F, VREA-C-R, VREA-I-F y VREA-I-R se corresponde a la secuencia nucleotídica de la proteína 3A del VRE-A (Nº Genbank L43052).

^e García-Briones *et al.*, 2006.

^f Herrera *et al.*, 2008.



Resultados

R-1 Construcción de clones infecciosos del VFA para la obtención de virus mutantes en 3A

La proteína 3A de los picornavirus está implicada en diversas funciones relacionadas con la formación del complejo de replicación viral (Bienz *et al.*, 1987; Semler *et al.*, 1982) y con su capacidad para interactuar tanto con diferentes proteínas virales, modificando su distribución o funcionalidad dentro de la célula hospedadora (Lama *et al.*, 1995; Capozzo *et al.*, 2002), como con estructuras y componentes celulares, alterando el funcionamiento y la morfología de las mismas (Suhy *et al.*, 2000; Choe *et al.*, 2005; Xiang *et al.*, 1998; García-Briones *et al.*, 2006).

La mayoría de la información disponible sobre la proteína 3A de picornavirus se basa en los datos obtenidos para PV. Los escasos datos sobre la funcionalidad de la proteína 3A del VFA han permitido relacionar esta proteína con el grado de virulencia y el rango de hospedador del VFA (ver Introducción I-2-4-2; Pacheco *et al.*, 2003; Beard y Mason, 2000; Núñez *et al.*, 2001).

Con la intención de contribuir a clarificar diferentes aspectos funcionales de la proteína 3A del VFA, nos planteamos generar clones infecciosos portadores de diferentes mutaciones en esta proteína.

Con anterioridad al inicio del trabajo de esta Tesis Doctoral, se había generado en el laboratorio el mutante de delección total de la proteína 3A, denominado pC- Δ 3A (Figura 14, Delgui, sin publicar), a partir del clon infeccioso del VFA disponible, denominado pC (Núñez *et al.*, 2001). Este clon infeccioso es un plásmido quimérico de dos serotipos del VFA, que porta las secuencias de las RNC 5' y 3' del genoma viral de serotipo O y la de casi la totalidad de las proteínas estructurales y no estructurales del serotipo C (Figura 7). Sin embargo, se planteó la conveniencia de poder trabajar con mutantes derivados de un clon infeccioso de secuencia completa de serotipo C. Esta alternativa presentaba la ventaja de no añadir al efecto de las mutaciones introducidas en la proteína 3A los posibles efectos derivados del empleo de un genotipo quimérico. Por ello, para la construcción de los diversos mutantes empleados en los experimentos descritos en esta Tesis Doctoral, se partió del clon infeccioso pMT28, amablemente cedido por la Dra. Cristina Escarmís (CBMSO), que porta un ADN del genoma completo del VFA de serotipo C (Toja *et al.*, 1999), según se esquematiza en la Figura 7. En los siguientes apartados se describen las diferentes mutaciones introducidas en el plásmido pMT28, así como los datos previos que justifican su análisis.

R-1-1 Mutantes de delección

En estudios anteriores (Beard y Mason, 2000; Knowles *et al.*, 2001) se había descrito la presencia de delecciones severas en la porción carboxi terminal de la secuencia de la proteína 3A del VFA en virus aislados en los brotes que afectaron a países del sudeste asiático en 1997 (ver Figura 6). Estas delecciones provocaban un descenso en la infectividad del virus en el ganado vacuno y en la capacidad de replicación de su ARN en células de origen bovino, sin modificar ni la capacidad de replicación en células de origen porcino ni la infectividad del virus en cerdos, lo cual fue confirmado mediante la construcción y análisis de mutantes de delección de la porción carboxi terminal de 3A (Pacheco *et al.*, 2003). Estos datos sugerían una considerable flexibilidad en las secuencias de la región carboxi terminal de 3A esenciales para la viabilidad del virus.

Para analizar el efecto que supone para la viabilidad viral la falta total de la proteína 3A, se construyó un mutante de delección completa de dicha proteína (pMT28- Δ 3A). La estrategia utilizada consistió en realizar amplificaciones de la región del genoma del plásmido pMT28 comprendidas entre las secuencias diana para las enzimas de restricción BglII y RsrII, de localización única en este plásmido, que apropiadamente digeridas y ligadas, permitieron obtener el mutante pMT28- Δ 3A (Figura 8). En dicho mutante se generó un sitio de restricción Xma I mediante la inserción de un residuo aminoacídico de G (glicina) en la posición 5 de la secuencia aminoacídica de 3A (Figura 14), que permitió la delección y reemplazamiento de la proteína viral. En este mutante se mantuvieron los cuatro primeros aminoácidos del extremo amino terminal y los tres últimos aminoácidos del extremo carboxi terminal de 3A (ver Figura 14), con el objetivo de alterar lo mínimo posible las secuencias conservadas en los extremos de 3A entre aislados de distintos serotipos del VFA (Carrillo *et al.*, 2005), que flanquean el corte de la proteasa 3C (Ryan *et al.*, 1989).

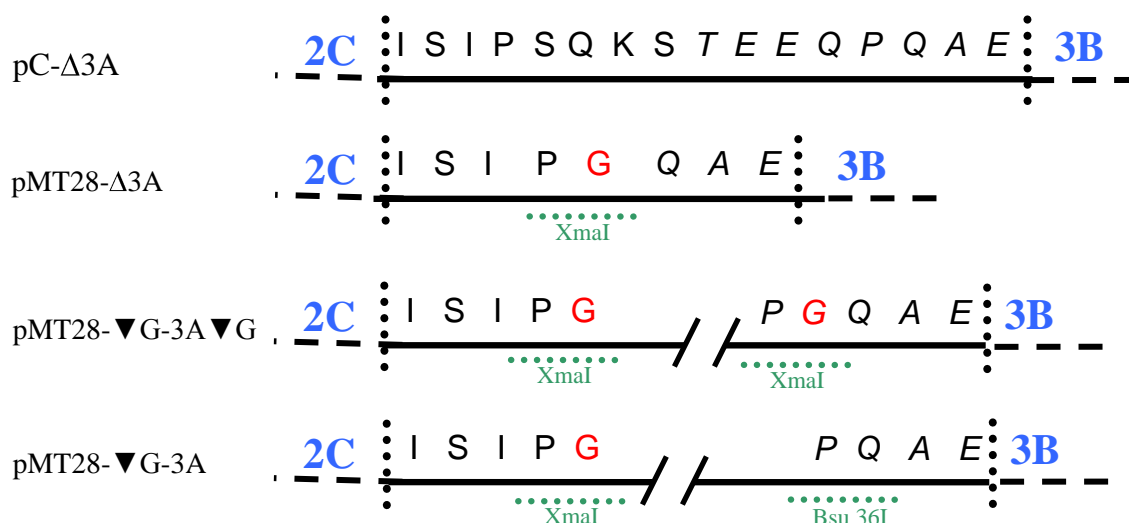


Figura 14. Aminoácidos de los extremos amino y carboxi terminal de mutantes de delección e inserción de la proteína 3A. Se indican los aminoácidos de 3A mantenidos en los plásmidos pMT28-Δ3A y pC-Δ3A y la secuencia de los extremos amino y carboxi terminal de los plásmidos pMT28-▼G-3A▼G y pMT28-▼G-3A. En letras en negro, se indican los aminoácidos de la porción amino terminal y en negro y cursiva, los aminoácidos correspondientes al extremo carboxi terminal de la proteína 3A. En verde se representan los sitios de restricción Xma I y Bsu36 I. En rojo se resalta el residuo de G introducido para la generación del sitio de restricción Xma I. En azul se representan las proteínas contiguas a 3A en el genoma del VFA.

R-1-2 Mutantes de inserción

De acuerdo con lo descrito para PV y para el virus de la Hepatitis A (VHA), algunas de las funciones en el ciclo viral atribuidas a 3A son en realidad desarrolladas por precursores de mayor peso molecular como 3AB o 3ABC (Lama *et al.*, 1995; Paul *et al.*, 1994; Kusov y Gauss-Muller, 1999). Se ha propuesto que los picornavirus deben mantener un cierto balance en la proporción entre los diferentes niveles de precursores de 3A y la propia proteína madura para ser capaces de mantener una replicación productiva (Kusov y Gauss-Muller, 1999). Por otro lado, existen evidencias de que el procesamiento de los precursores de la proteína 3A es altamente sensible a modificaciones de la secuencia consenso que flanquea a cada una de las proteínas implicadas y que son reconocidas por la proteasa viral 3C. La alteración de estas secuencias consenso, pero no de las secuencias contiguas a ellas, perturban la proteólisis normal de los precursores proteicos, efectuada por la proteasa viral 3C (Kusov y Gauss-Muller, 1999; Birtley *et al.*, 2005).

En el trabajo desarrollado durante esta Tesis Doctoral, la reintroducción de la secuencia de la proteína 3A en el mutante de delección pMT28- Δ 3A generó el nuevo mutante pMT28- ∇ G-3A- ∇ G, en el que se había insertado, respecto a la secuencia de pMT28, una G en la posición 5 y otra en la posición 151 de la proteína 3A, según se indica en la Figura 14. Como se detalla más adelante, la introducción de estas dos mutaciones tuvo efectos deletéreos sobre el procesamiento proteolítico de la poliproteína y la infectividad del ARN viral. Datos publicados con posterioridad a la construcción de este mutante (Birtley *et al.*, 2005) mostraron que la proteína 3C del VFA necesita, para llevar a cabo otro de sus cortes proteolíticos, la conservación de 4 aminoácidos a cada lado del sitio de corte. Esto sugería que la inserción de una glicina en la posición 5 de la proteína 3A no sería determinante para el correcto procesamiento proteolítico. Por ello, partiendo del plásmido mutante pMT28- ∇ G-3A- ∇ G se construyó el mutante pMT28- ∇ G-3A que contenía únicamente una G insertada en la posición 5 de la proteína 3A (Figura 14 y M-8-1-3).

R-1-3 Mutantes de reemplazo de 3A

La proteína 3A del VFA presenta una longitud mayor que la de los restantes picornavirus (Figura 4), que podría estar relacionada con diferencias en su funcionalidad, tales como su insensibilidad a la acción de la BFA. La proteína 3A del VRE-A (Li *et al.* 1996) es, junto con la recientemente descrita del VRB-2 (Hollister *et al.*, 2008), la que presenta mayor similitud con la 3A del VFA (ver I-2-4). No obstante, la proteína 3A del VRE-A presenta diferencias en tamaño e identidad de secuencia con la proteína 3A del VFA. Por ello, se decidió primeramente evaluar posibles analogías funcionales entre ambas proteínas caracterizando la sensibilidad del VRE-A a BFA.

El mecanismo de acción de la BFA se basa en la inhibición del tráfico de vesículas entre el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (ver I-2-4), impidiendo la unión de la proteína ARF a membranas (Donaldson y Doel, 1992; Belov *et al.*, 2008). La infección de muchos picornavirus como PV se inhibe por acción de la BFA (Irurzun *et al.*, 1992), pero no así la del VFA, ni la de distintos virus del género cardiovirus (O'Donnell *et al.*, 2001; Martín-Acebes *et al.*, 2008). Por otro lado, se sabe que la infección con VFA desensambla el aparato de Golgi de manera similar al efecto que produce la BFA aunque sin afectar a la replicación viral (O'Donnell *et al.*, 2001; García-Briones *et al.*, 2006).

Para determinar la sensibilidad del VRE-A al tratamiento con BFA, primero se comprobó el efecto de esta droga sobre las células VERO, susceptibles a la infección por este virus. En la Figura 15 se comparan los patrones de inmunofluorescencia de marcadores del *cis* y *trans* Golgi en presencia o ausencia de BFA. El aparato de Golgi apareció situado típicamente en la región perinuclear de las células VERO control, mientras que, tras el tratamiento con BFA, se observó una desestructuración específica del cis-Golgi al tiempo estudiado.

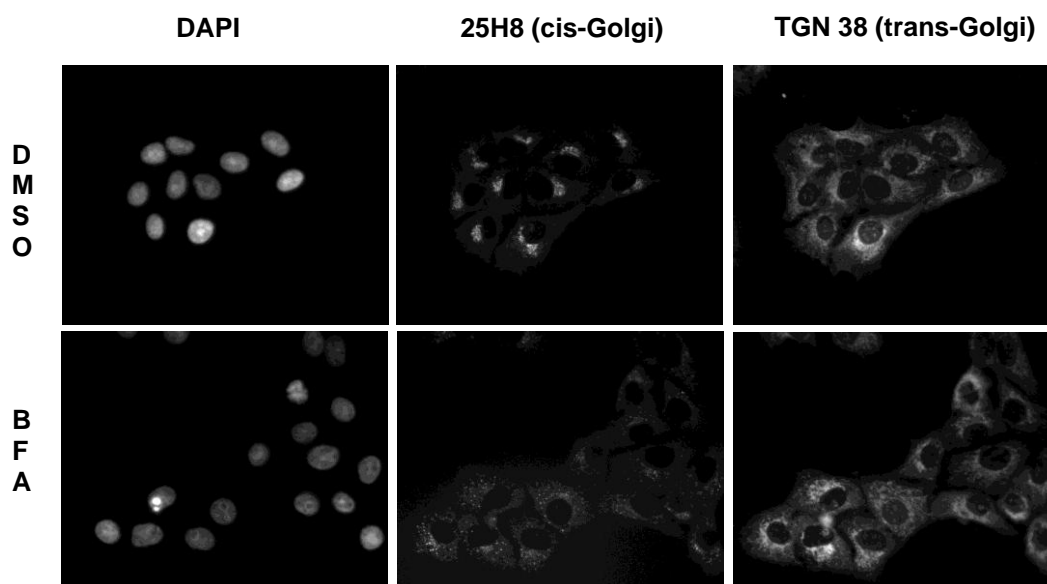


Figura 15. Inmunofluorescencia de células VERO tratadas con BFA. Monocapas de células VERO tratadas durante 30 min. con DMSO como control o con BFA-DMSO (5 μ g/ml). Inmediatamente después del tratamiento, las células se fijaron y se incubaron con los anticuerpos anti cis-Golgi (25H8) o anti trans-Golgi (TGN38). Los núcleos se tiñeron con DAPI.

A continuación, se infectaron células VERO, en presencia o ausencia de BFA, con VRE-A. Como control se empleó VSV, ya que este virus es capaz de crecer tanto en células VERO como en BHK-21 y su sensibilidad a BFA es conocida (Martín-Acebes *et al.*, 2008). A las 7 h.p.i., se tituló el virus total (presente en la monocapa celular y en el medio de cultivo), empleando para ello células VERO.

Los resultados obtenidos (Figura 16A) indican que mientras que el tratamiento con BFA no afectó significativamente el título del VRE-A recuperado, sí redujo el título de VSV en más de un logaritmo (Figura 16B). Estos resultados son similares a los obtenidos para el VFA y el VSV en células BHK-21 (Martín-Acebes *et al.*, 2008), y sugieren que el VRE-A y el VFA pueden emplear mecanismos alternativos de

reclutamiento de membranas celulares al empleado por otros miembros de la familia *Picornaviridae*, como el VSV.

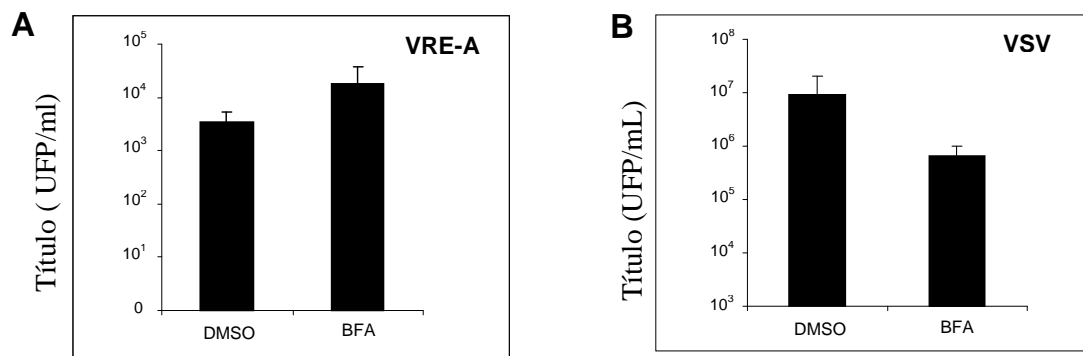


Figura 16. Sensibilidad del VRE-A a BFA. Representación logarítmica del título viral total recuperado tras 7 h.p.i. con VRE-A (m.d.i. = 1 UFP/célula), de células VERO tratadas durante 30 min. pre-infección con BFA (5 µg/ml) o con DMSO (A). Como control de sensibilidad a BFA, se emplearon células VERO tratadas de igual manera e infectadas con VSV (mdi = 1 UFP/célula) (B).

Así pues, a pesar de las diferencias de secuencia entre la 3A del VFA y la del VRE-A, la insensibilidad de ambos a BFA sugería la existencia de analogías funcionales que hicieron interesante el análisis de mutantes en los que la proteína 3A se reemplazó por la del VRE-A

Para ello, se construyeron inicialmente dos plásmidos mutantes en los que se sustituyó la secuencia de la proteína 3A del VFA situada entre los sitios de restricción Xma I y Bsu36 I del mutante pMT28-▼G-3A (ver M-8-1-3 y M-8-1-4), por la secuencia completa de la proteína 3A del VRE-A (mutante pMT28-3A-VRE-C), o bien por la secuencia de la proteína 3A del VRE-A sin los nucleótidos que codifican los cuatro aminoácidos del extremo amino y los cuatro aminoácidos del extremo carboxi (mutante pMT28-3A-VRE-I), según se indica en la Figura 17.

Como consecuencia de esta estrategia de clonaje, las construcciones resultantes contenían, además de los cuatro aminoácidos correspondientes a los extremos amino y carboxi terminal de la 3A del VFA - que flanquean la secuencia de 3A del VRE-A -, 3 nucleótidos insertados que codificaban una G en la posición +5 (respecto al primer aminoácido de la proteína 3A del VFA).

Posteriormente, se generó un tercer mutante a partir del plásmido pMT28-3A-VRE-C, en el que se eliminó la G introducida en la posición +5 de la proteína 3A (ver

M-8-1-5). Este mutante se diseñó para estudiar el efecto que, sobre la viabilidad viral, pudiera tener la inserción de este aminoácido (Figura 17).

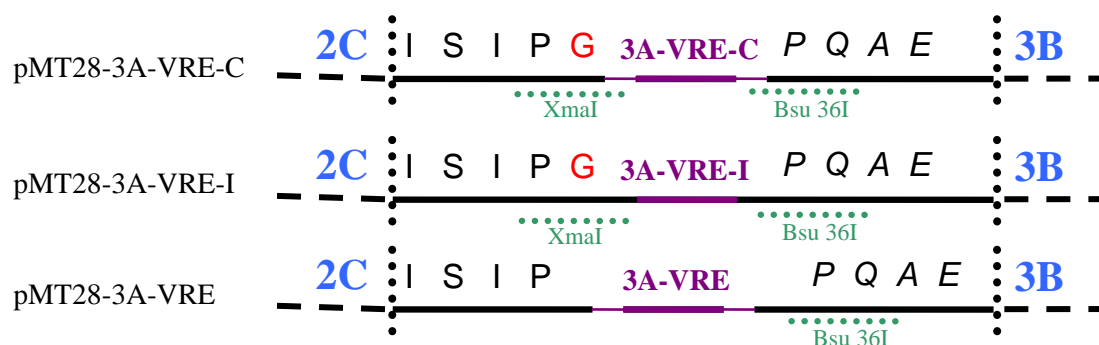


Figura 17. Aminoácidos de los extremos amino y carboxi terminal de los mutantes de reemplazo de la proteína 3A. Se representan mediante letras en negro los aminoácidos de la porción amino terminal y en negro y cursiva, los aminoácidos correspondientes al extremo carboxi terminal de la proteína 3A del VFA. La G introducida en los mutantes de inserción se indica en rojo. En violeta con extremos delgados se representa la secuencia de la proteína 3A completa del VRE-A y sin los extremos delgados, la proteína 3A del VRE-A con los primeros y últimos 4 aminoácidos deletados. En verde se representan los sitios de restricción empleados en el clonaje molecular (Xma I y Bsu36 I). En azul se representan las proteínas del VFA contiguas a 3A.

R-1-4 Mutantes puntuales

En este apartado se incluye la descripción de los mutantes puntuales en distintos residuos localizados en la región amino terminal de la proteína 3A del VFA. Estas mutaciones fueron diseñadas teniendo en cuenta datos experimentales previos y predicciones bioinformáticas realizadas a partir de información estructural disponible para PV.

Residuo 44 de 3A.

La sustitución Q44R en 3A es suficiente para adaptar el VFA C-S8c1 a cobaya, un hospedador no natural (Nuñez *et al.*, 2001). Para intentar determinar la importancia de la carga electrostática en dicha posición, además de esta mutación (pMT28-Q44R), que implica la sustitución de un residuo apolar por otro de carga positiva, se generó el mutante pMT28-Q44D, que introduce un cambio opuesto al anterior en la carga electrostática del aminoácido Q44R, que pasa a ser negativa.

Las predicciones bioinformáticas de la estructura de la proteína 3A del VFA, amablemente realizadas por Paulino Gómez-Puertas (CBMSO), basadas en los datos de la estructura tridimensional publicados para la proteína 3A de PV (Strauss *et al.*, 2003), han permitido disponer de un modelo para la estructura tridimensional de la porción

amino terminal de esta proteína. Este modelo corresponde a los aminoácidos 1 a 58 de 3A, este último solapante con la región hidrofóbica central (dominio transmembrana, ver Figura 19). Como se puede observar en la Figura 18A, el modelo predice la existencia de dos regiones próximas estructuradas en α -hélice flanqueadas por dos regiones de mayor tamaño no estructuradas. También se predice que las regiones de α -hélice podrían participar en interacciones intermoleculares, dando lugar a dímeros de 3A (Figura 18B).

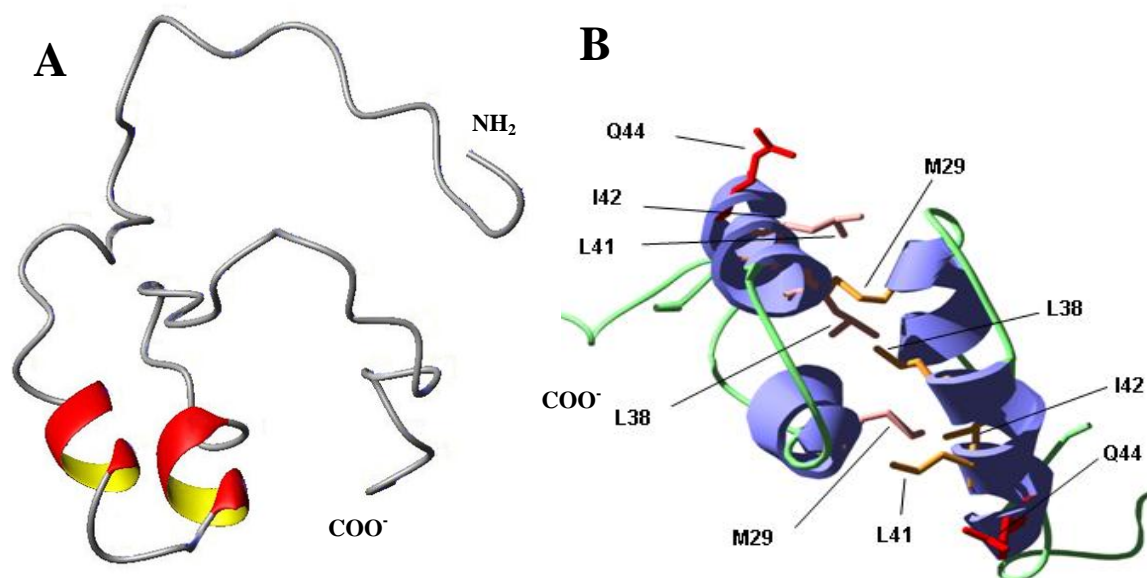


Figura 18. Modelado estructural de la proteína 3A. Predicción de la estructura de la región amino terminal de la proteína 3A (aminoácidos 1 a 58) (A) y del homodímero de la misma (B). Las cintas representan las regiones estructuradas en α -hélice. El modelo se realizó utilizando la información disponible sobre el dímero de la proteína 3A de PV (Strauss *et al.*, 2003) como referencia y refinando posteriormente la posición relativa de ambas subunidades mediante el programa "Hex" de docking macromolecular (Ritchie y Kemp, 2000), que tiene en cuenta tanto el radio y las interacciones de van der Waals como las electrostáticas.

Por otro lado, en este modelo se predice que los residuos L38 y L41, situados en una de las regiones estructuradas en α -hélice, se encuentran expuestos al exterior. Debido a su localización, estos residuos podrían ser relevantes para la funcionalidad de la proteína 3A, participando en estructuras secundarias de α -hélice de la proteína y en la dimerización de la misma (Figura 18B). Por ello, se planteó abordar la mutagénesis de ambos residuos apolares de L (leucina) - que por otra parte, se encuentran altamente conservados entre distintas secuencias de VFA analizadas (Carrillo *et al.*, 2005) - a aminoácidos con carga electrostática negativa (pMT28-L38E y pMT28-L41E), con la

intención de desestabilizar las posibles interacciones hidrofóbicas en las que pudieran participar.

Por otro lado, la proteína 3A del VFA presenta una única C (cisteína) en la posición 65 del dominio transmembrana (Figura 19). La presencia de una única C o de un número impar de estos residuos en la secuencia de una proteína puede ser indicio de la necesidad de este aminoácido para el establecimiento de enlaces intermoleculares mediante puentes disulfuro. Para investigar esta posibilidad, se sustituyó esta C65 por una S (serina) (pMT28-C65S). De esta forma, la mutación introducida evitaría el establecimiento de los posibles puentes disulfuro.

El resumen de la localización de las diferentes mutaciones introducidas en el clon infeccioso pMT28 se muestra en la Figura 19.

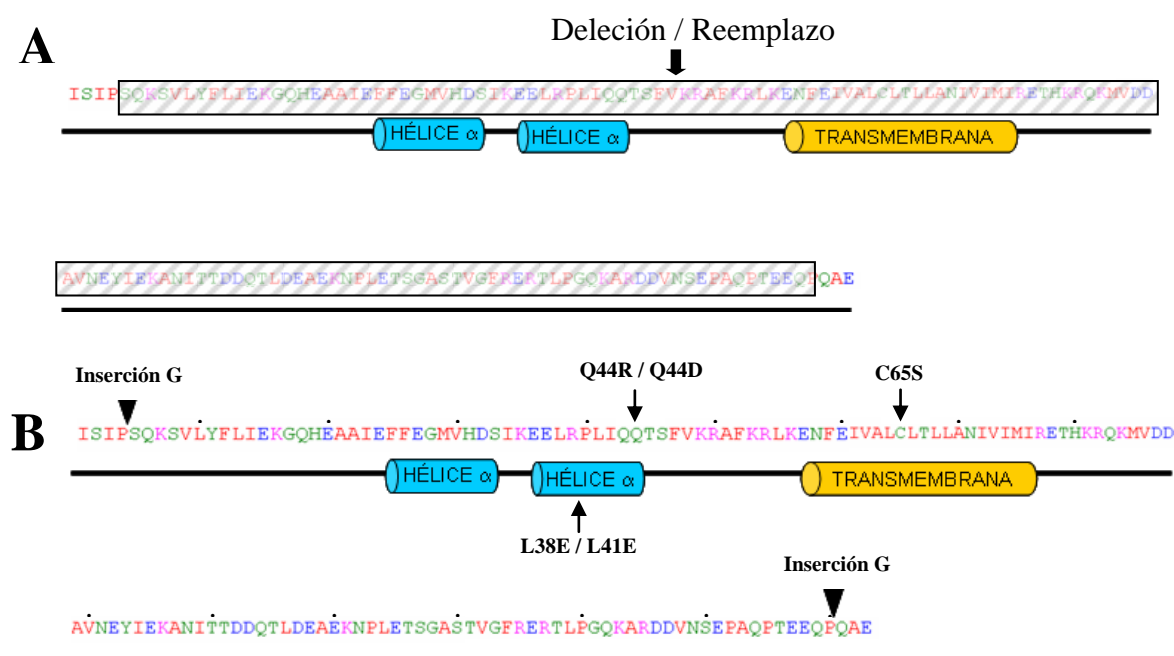


Figura 19. Localización de las diferentes mutaciones introducidas en la proteína 3A

de pMT28. Se representa la secuencia aminoacídica de la proteína 3A del VFA indicándose sobre la misma la posición y tipo de mutación introducida. En la parte superior (A), se representan los mutantes de delección y reemplazo (la secuencia introducida en el recuadro es la delecionada ó la sustituida por la proteína 3A del VRE-A según el mutante) y, en la inferior (B), los distintos mutantes puntuales. El código de colores presente en la secuencia de aminoácidos los identifica en función de su polaridad (rojo: apolar; verde: polar sin carga; rosa: carga electrostática positiva; azul: carga electrostática negativa). Los aminoácidos se representan en distintos colores en función de sus características físico-químicas, según lo descrito en la Figura 4.

R-2 Síntesis y procesamiento *in vitro* de la poliproteína viral de los distintos mutantes de 3A

El primer paso del ciclo viral tras la liberación del ARN al citoplasma celular es su traducción para originar una poliproteína que, posteriormente y mediante sucesivas actuaciones de las proteasas virales, dará lugar a los precursores y a las proteínas virales maduras (Ryan *et al.*, 2004).

Para evaluar las consecuencias de las mutaciones introducidas sobre la traducción y el patrón de procesamiento proteolítico del ARN, se realizaron ensayos de traducción *in vitro* (ver M-10), usando como molde ARN transcrito *in vitro* a partir de los distintos plásmidos mutantes (ver M-10). En las siguientes figuras se muestran los patrones de traducción/procesamiento de las proteínas marcadas con ^{35}S obtenidas en estos ensayos.

En la Figura 20A se muestran las proteínas expresadas a partir de ARN del clon infeccioso pMT28 y del mutante de delección pMT28- Δ 3A. Como se puede observar, al eliminar la secuencia nucleotídica que codifica la proteína 3A de pMT28, se produjo una alteración del patrón de procesamiento proteolítico, consistente en la desaparición de las proteínas correspondientes a los precursores en los que participa la proteína 3A, fundamentalmente 3ABBB y 3ABBBC (Figura 20A). Estos productos virales fueron identificados basándose en los datos de migración relativa previamente obtenidos (García-Briones *et al.*, 2006), así como en ensayos de inmunoprecipitación y de *western-blot*, descritos más adelante.

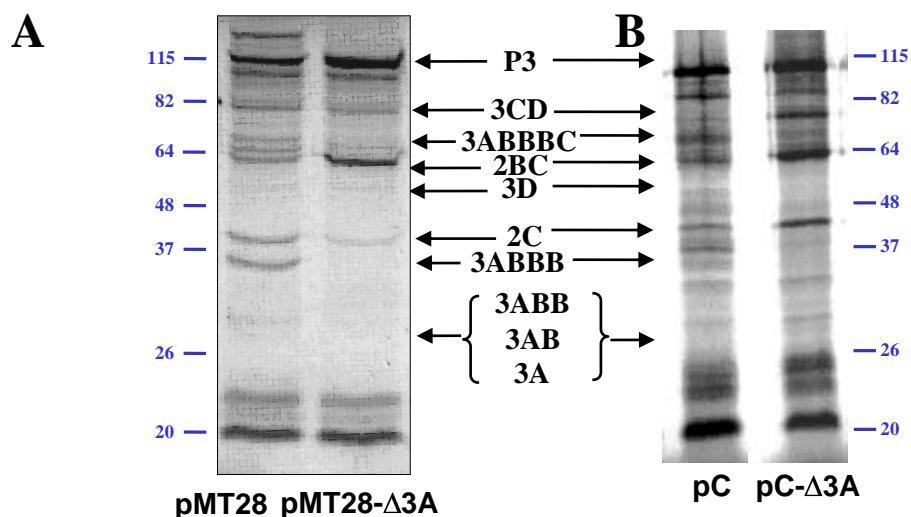


Figura 20. Proteínas del VFA sintetizadas *in vitro* a partir de ARN de los mutantes pMT- Δ 3A y pC- Δ 3A. Autorradiografía de SDS-PAGE 10% de muestras de proteínas marcadas con ^{35}S obtenidas a partir de ARN de pMT28 y pMT- Δ 3A (A), o de pC y pC- Δ 3A (B). La migración de los marcadores proteicos (en KDa) se indica mediante líneas azules. Las flechas indican las bandas cuya migración se corresponde con las diferentes proteínas virales indicadas.

En la Figura 20B se muestran las proteínas traducidas a partir de ARN del plásmido pC y del mutante de delección pC- Δ 3A. En este caso también se pudo observar que la delección de 3A provocaba la pérdida de una serie de bandas correspondientes a los distintos precursores en los que participa esta proteína,

Los ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo 346, que reconoce a la proteína 3A, han permitido asignar la identidad de las proteínas ausentes en los ensayos de traducción *in vitro* con el mutante pMT28- Δ 3A: 3A, 3AB, 3ABB, 3ABBB y 3ABBBC (Figura 21). Además, estos ensayos también permitieron asignar la identidad de las bandas, asociadas a distintos precursores de la proteína 3A, observadas en las traducciones *in vitro* del resto de mutantes (datos no mostrados). Los ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo E56, que reconoce a la proteína 3D, mostraron que la delección de 3A no provocó cambios que modificasen ni el procesamiento de 3D, ni su movilidad electroforética (Figura 21).

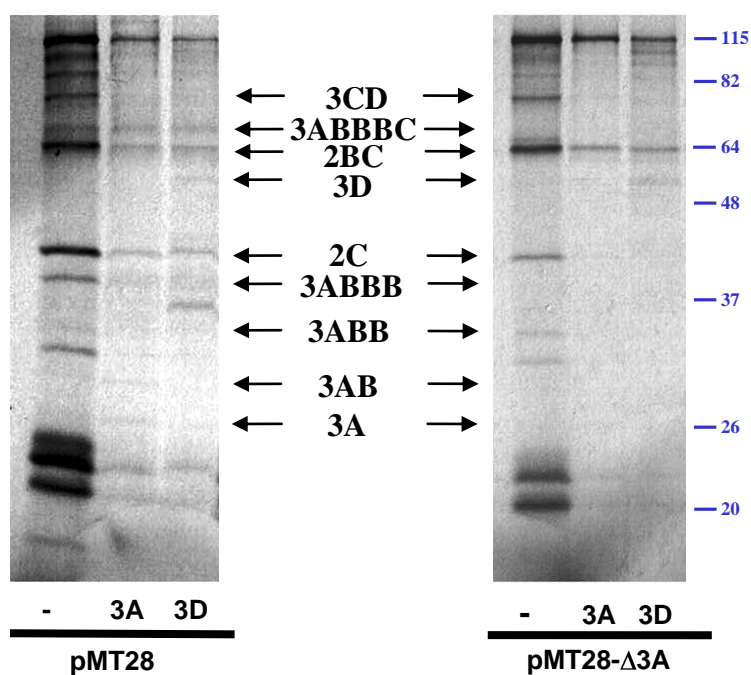


Figura 21. Inmunoprecipitación de proteínas del VFA sintetizadas en ensayos de traducción *in vitro*. Autoradiografía de SDS-PAGE 10% de proteínas inmunoprecipitadas con los anticuerpos 346 (3A) y E56 (3D), de los mutantes pMT28 y pMT28- Δ 3A. (-) Traducción *in vitro* sin inmunoprecipitar. La migración de los marcadores proteicos (en KDa) se indica mediante líneas azules. Las flechas indican las bandas cuya migración se corresponde con las diferentes proteínas virales indicadas.

Los resultados obtenidos al realizar la traducción *in vitro* de ARN de los mutantes de inserción pMT28- ∇ G-3A y pMT28- ∇ G-3A- ∇ G se muestran en la Figura 22. El patrón de procesamiento del mutante pMT28- ∇ G-3A fue similar al del pMT28.

Contrariamente, el patrón del mutante pMT28-▼G-3A-▼G presentó alteraciones, asemejándose más al del mutante pMT28-Δ3A que al del control pMT28, consistentes en la acumulación del precursor 3ABBB en detrimento de otros precursores como 3ABBBC.

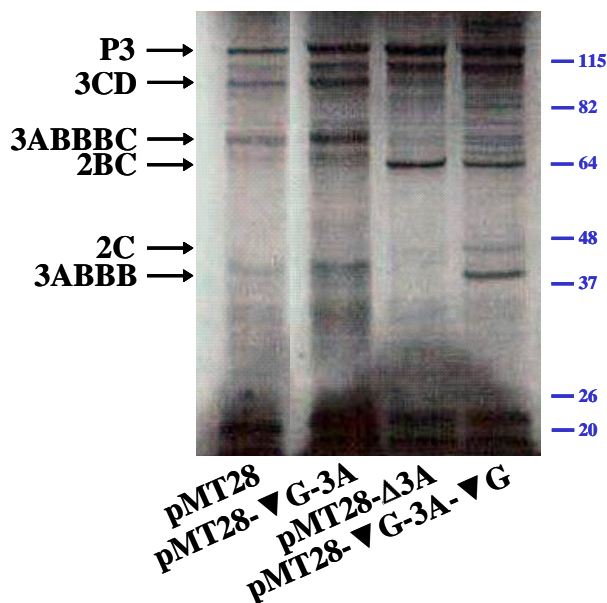


Figura 22 Proteínas del VFA sintetizadas *in vitro* a partir de ARN de pMT28-▼G-3A y pMT28-▼G-3A-▼G. Autorradiografía de SDS-PAGE 10% de muestras de proteínas marcadas con ^{35}S obtenidas a partir de ARN de pMT28-▼G-3A y pMT28-▼G-3A-▼G. Como control se muestran las proteínas sintetizadas a partir de ARN de pMT28 y pMT28-Δ3A. La migración de los marcadores proteicos (en KDa) se indica mediante líneas azules. Las flechas indican las bandas cuya migración se corresponde con las diferentes proteínas virales indicadas.

El patrón electroforético de las proteínas traducidas *in vitro* a partir de ARN de los mutantes puntuales pMT28-Q44R, pMT28-Q44D, pMT28-L38E, pMT28-L41E y pMT28-C65S, no mostró cambios apreciables respecto al del ARN de pMT28 (Figura 23).

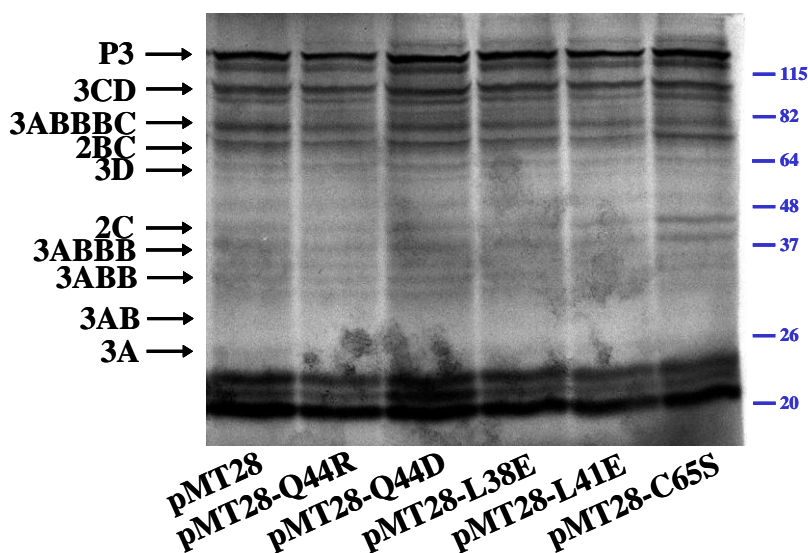


Figura 23 Proteínas del VFA sintetizadas *in vitro* a partir de ARN de mutantes puntuales de la proteína 3A. Autorradiografía de SDS-PAGE 10% de muestras de proteínas marcadas con ^{35}S obtenidas a partir de los ARNs indicados. La migración de los marcadores proteicos (en KDa) se indica mediante líneas azules y rojas. Las flechas indican las bandas cuya migración se corresponde con las diferentes proteínas virales indicadas.

La sustitución de la proteína 3A del VFA por la del VRE-A alteró, en distinto grado, el patrón de procesamiento de las proteínas virales, dependiendo del mutante analizado (Figura 24). En los mutantes pMT28-3A-VRE-C y pMT28-3A-VRE-I – que además de la sustitución de la proteína 3A del VFA por la del VRE-A portan la inserción de una glicina en el extremo amino terminal (ver Figura 17) – los cambios observados en el patrón de traducción, que se corresponden a modificaciones en la movilidad electroforética de proteínas como 3ABBB y 3ABBBC, son los esperados del menor tamaño de la proteína 3A del VRE-A (Figura 24 y dato no mostrado). Contrariamente, la traducción del ARN del mutante pMT28-3A-VRE produjo un efecto drástico con un acúmulo de proteínas de alto peso molecular y la desaparición de proteínas maduras de tamaño inferior (Figura 24).

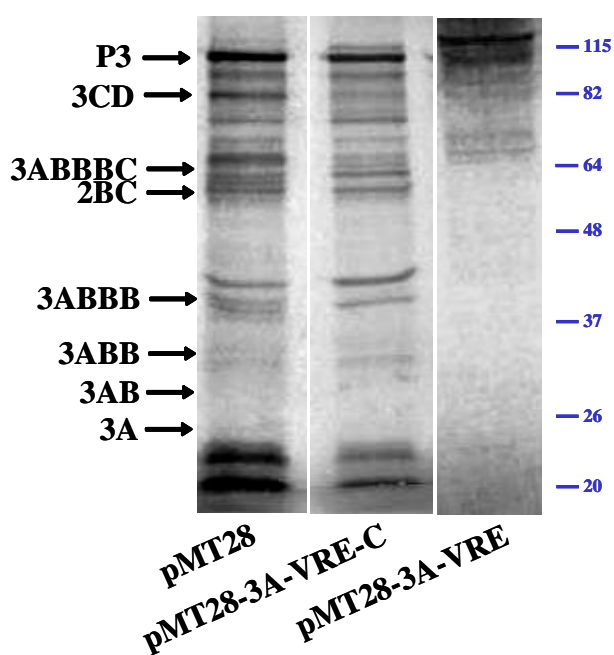


Figura 24. Proteínas del VFA sintetizadas *in vitro* a partir de ARN de los mutantes de reemplazo de la proteína 3A. Autorradiografía de SDS-PAGE 10% de muestras de proteínas marcadas con ³⁵S obtenidas a partir de ARN de los mutantes pMT28-3A-VRE-C y pMT28-3A-VRE. Como control se muestra la traducción de ARN de pMT28. La migración de los marcadores proteicos (en kDa) se indica mediante líneas azules y rojas. Las flechas indican las bandas cuya migración se corresponde con las diferentes proteínas virales indicadas.

En resumen, el análisis de los productos de traducción *in vitro* de los distintos mutantes mostró un patrón compatible con un procesamiento proteolítico similar al observado con pMT28, excepto para dos de estos mutantes: pMT28-▼G-3A-▼G, para el que se observó una alteración en los precursores de 3A y pMT28-3A-VRE, en el que se produjo un enriquecimiento en precursores de alto tamaño y no se detectaron bandas correspondientes a proteínas maduras.

R-3 Infectividad del ARN de mutantes de 3A en cultivos celulares

Para evaluar el efecto de las mutaciones introducidas en 3A en un contexto que permitiese la replicación y multiplicación del virus, se analizó primero la capacidad de los diferentes mutantes para producir efecto citopático (ECP) en células susceptibles.

R-3-1 Citopatogenicidad de mutantes de 3A en células BHK-21

Se caracterizó la capacidad de los ARNs estudiados para producir citopatogenicidad cuando se transfectaron en monocapas de células BHK-21 (ver detalles en M-11-1).

La aparición y, en su caso la evolución, del ECP en las monocapas fue estimada durante las 72 h. posteriores a la tranfección con los distintos ARNs, ya que a tiempos posteriores el envejecimiento celular provoca alteraciones difíciles de distinguir del ECP. Con aquellas transfecciones en las que no se observó ECP a las 72 h.p.t. (o en las que el ECP fue limitado), el medio sobrenadante se utilizó para realizar una infección adicional, con el objetivo de intentar la amplificación de virus que se hubieran podido producir en pequeña cantidad. En caso de ausencia de ECP en este primer pase, este proceso se repitió otra vez (segundo pase) antes de considerar un ARN como no infectivo.

Como se indica en la Tabla IV, La transfección con ARN de los clones infecciosos pMT28 y pC produjo la aparición de ECP a 24 h.p.t.. El ARN del virus producido fue secuenciado empleando los oligonucleóticos 3Artpr y 3AB-V (ver M-8-1 y Tabla III), comprobándose la ausencia de cambios en la zona flanqueante y en la región codificante de la proteína 3A

La transfección con el ARN de los mutantes de delección pMT28- Δ 3A y pC- Δ 3A no produjo ECP ni a las 72 h.p.t. ni tras los dos pases adicionales (Tabla IV), lo que indica la pérdida de la capacidad de estos mutantes para producir daño celular e infectar células BHK-21.

Al transfectar las células BHK-21 con el ARN de los mutantes de inserción en los que se había introducido un aminoácido (pMT28- ∇ G-3A), o dos aminoácidos (pMT28- ∇ G-3A- ∇ G) en los extremos de la proteína 3A, en ambos casos, y al igual que sucedió con la construcción pMT28- Δ 3A, no se observó ECP en ninguno de los tiempos post-transfección analizados, ni tras dos pases adicionales (Tabla IV). Estos

datos sugieren la necesidad de conservación de la integridad de la secuencia diana de la proteasa viral para el ciclo viral efectivo.

Tabla IV. ECP producido por mutantes de 3A en células BHK-21.

h.p.t. ARN transfectante	Transfección			Segundo pase		
	24	48	72	24	48	72
Ninguno	- ^a	-	-	-	-	-
pMT28	++++	†	†	++++	†	†
pC	++++	†	†	++++	†	†
pMT28-Δ3A	-	-	-	-	-	-
pC-Δ3A	-	-	-	-	-	-
pMT28-▼G-3A-▼G	-	-	-	-	-	-
pMT28-▼G-3A	-	-	-	-	-	-
pMT28-Q44R	++++	†	†	++++	†	†
pMT28-Q44D	-	-	+ ^b	++++	†	†
pMT28-L38E	-	-	+ ^b	++++	†	†
pMT28-L41E	-	-	+ ^b	++++	†	†
pMT28-C65S	++++	†	†	++++	†	†
pMT28-3A-VRE-C	-	-	-	-	-	-
pMT28-3A-VRE-I	-	-	-	-	-	-
pMT28-3A-VRE	-	-	-	-	-	-

^a Estimación mediante observación al microscopio óptico, del ECP producido en monocapas celulares (crecidas en placas de 35 mm Ø) transfectadas con 1 µg de los diferentes ARNs, a las h.p.t. indicadas. Sin aparición de ECP (-); ECP en menos del 25% de la superficie de la monocapa celular (+); ECP en menos del 50% de la superficie de la monocapa celular (++); ECP en menos del 75% de la superficie de la monocapa celular (+++); ECP en el 100% de la superficie de la monocapa celular (++++).

^b La secuencia del ARN del virus recuperado mostró la sustitución de la mutación introducida en el ARN mutante (ver Tabla III).

† El ECP fue completo a las 24 h.p.t..

Dentro de los mutantes puntuales, el ARN de pMT28-Q44R se comportó de forma semejante al de pMT28, produciendo ECP a las 24 h.p.t.. La secuenciación de la progenie viral obtenida mostró la conservación de la mutación introducida. Este resultado sugiere que la introducción de un aminoácido con carga electrostática positiva (R) en la posición 44 de 3A no tiene efecto drástico sobre la replicación del virus en células BHK-21.

El ECP producido por el ARN del mutante pMT28-Q44D solo fue observable, y de forma limitada, a las 72 h pt. Sin embargo, tras un pase adicional, su capacidad para producir ECP fue similar a la del ARN de pMT28 (Tabla IV). La secuencia del ARN

extraído de la progenie viral, tras 72 h.p.t. con el ARN de este mutante (Tabla IV), mostró la imposición de la sustitución D44E (Tabla V). Aunque este cambio mantuvo la carga electrostática introducida en el mutante pMT28-Q44D, el carácter ácido del residuo E es menor que el del residuo D, ya que el valor de pKa del grupo carboxi de su cadena lateral (4.02) es mayor que el correspondiente a D (3,90). La secuenciación del ARN extraído de las poblaciones virales en los pases posteriores confirmó la imposición de la sustitución D44E seleccionada. Este resultado sugiere un cierto nivel de tolerancia a cambios de carga electrostática en la posición 44 de la proteína 3A.

Tabla V. Cambios seleccionados tras el crecimiento de mutantes puntuales de 3A en células BHK-21.

Mutante	pMT28-Q44D		pMT28-L38E		pMT28-L41E	
	Aminoácido ^a	Carga / pKa	Aminoácido	Carga / pKa	Aminoácido	Carga / pKa
Mutación introducida	D (GAT)	negativa / 3.90	E (GAG)	negativa / 4.07	E (GAG)	negativa / 4.07
Mutación seleccionada	E (GA ^A ^b)	negativa / 4.07	V (GT ^b G)	neutra / -	A (GC ^b G)	neutra / -
pMT28	Q (CAA)	neutra / - ^d	L (CTC)	neutra / -	L (CTC)	neutra / -

^a Entre paréntesis se especifica el codón que codifica el aminoácido indicado.

^b En rojo se muestran las únicas sustituciones de nucleótido seleccionadas en la secuencia de la proteína 3A de los virus progenie detallados en la Tabla IV.

^c Se indica el valor de pKa para la cadena lateral de los aminoácidos con carga negativa.

^d Sin valor de pKa en la cadena lateral.

El ARN de los mutantes pMT28-L38E y pMT28-L41E mostró un comportamiento similar al de pMT28-Q44D (Tabla IV), seleccionándose, a tiempos tardíos postransfección, virus con sustituciones en los residuos mutados de estos ARNs (E38V y E41A, respectivamente; Tabla V), que se mantuvieron en los pases posteriores. En ambos casos, el aminoácido cargado negativamente (E) fue reemplazado por V (posición 38) o por A (posición 41), recuperando de esa forma, la hidrofobicidad original.

La capacidad de producir ECP del mutante pMT28-C65S fue similar a la del control pMT28. Ambos generaron un ECP severo a las 24 h.p.t. (Tabla IV). La secuenciación del ARN viral producido indicó que la mutación introducida se mantuvo en la progenie viral, tras los dos pases adicionales realizados.

Ninguno de los mutantes de sustitución de la proteína 3A del VFA por la del VRE-A (pMT28-3A-VRE, pMT28-3A-VRE-C y pMT28-3A-VRE) generó ECP a los

tiempos postransfección estudiados, ni tampoco tras los dos pases adicionales realizados. Esto sugiere la incapacidad de la proteína 3A del VRE-A para sustituir a la proteína 3A del VFA en el ciclo infeccioso viral.

R-3-2 Citopatogenicidad de mutantes de 3A en células VERO

Como se ha mencionado en la Introducción (I-2-4), la proteína 3A de los picornavirus está involucrada en la variación del rango de hospedador del virus (Núñez *et al.*, 2001; Lama *et al.*, 1998). Teniendo esto en cuenta, cabía la posibilidad de que alguno de los mutantes en los que la 3A del VFA había sido sustituida por la del VRE-A pudiera crecer en células VERO, permisivas para VRE-A, pero no para VFA. Así pues, se evaluó la capacidad del ARN de estos mutantes para producir ECP y estructuras de ARN de doble banda en células VERO. En estos ensayos se incluyeron los mutantes pMT28-Q44R y pMT28-Q44D, con cambios en un residuo implicado en el rango de hospedador del VFA (Núñez *et al.*, 2001). Estos experimentos se realizaron asumiendo que la incapacidad del VFA para infectar productivamente células VERO podía deberse a la falta en estas células de receptores para este virus.

El resultado de las transfecciones de células VERO con ARN de las construcciones analizadas se resume en la Tabla VI. Como control positivo de transfección se empleó ARN del VRE-A obtenido al crecer dicho virus durante 24 h. en células VERO, donde produjo un ECP severo. Los ARNs correspondientes a los mutantes que contenían las diversas versiones de la proteína 3A del VRE-A, incapaces de producir ECP en células BHK-21 (Tabla IV), no produjeron ECP en las células VERO. Por otra parte, los ARNs pMT28, pMT28-Q44R y pMT28-Q44D, que si habían producido ECP en células BHK-21, no fueron capaces de producir ECP sobre células VERO.

Para analizar el efecto de la posible falta de receptores específicos para VFA en las células VERO, se realizaron ensayos en inmunofluorescencia en los que se pudo observar que, aunque no se detectó señal correspondiente a ARN de doble banda, asociada a puntos de replicación activa del VFA (Martín-Acebes *et al.*, 2009), en células transfectadas con el ARN de los mutantes de reemplazo, si se detectó en células transfectadas con el ARN control pMT28, aunque en un porcentaje inferior al 2% de las células (dato no mostrado), lo que confirmó la falta de receptores específicos del VFA

en células VERO. Estos resultados indican también que no parece posible el reemplazamiento funcional entre las proteínas 3A del VFA y del VRE-A.

Tabla VI. ECP producido por ARN de mutantes de 3A en células VERO.

ARN transfectante	24 h.p.t.		48 h.p.t.		72 h.p.t.	
	BHK-21	VERO	BHK-21	VERO	BHK-21	VERO
-	- ^a	-	-	-	-	-
VRE-A ^b	-	++++	-	†	-	†
pMT28	++++	-	†	-	†	-
pMT28-3A-VRE-C	-	-	-	-	-	-
pMT28-3A-VRE-I	-	-	-	-	-	-
pMT28-3A-VRE	-	-	-	-	-	-
pMT28-Q44R	++++	-	†	-	†	-
pMT28-Q44D	-	-	-	-	+	-

^a Estimación por observación al microscopio óptico del ECP en monocapas de células VERO y BHK-21 transfectadas con 1µg de ARN de los mutantes indicados. La evaluación del ECP se realizó según lo descrito en la Tabla IV.

^b ARN extraído del VRE-A, empleado como control positivo.

† El ECP fue completo a las 24 h.p.t.

R-3-3 Producción de virus infecciosos a partir del ARN de los mutantes de la proteína 3A.

Los resultados obtenidos al transfectar el ARN de los distintos mutantes en cultivos celulares (R-3-1 y R-3-2) mostraron diferencias en su capacidad para producir ECP (Tabla IV y Tabla VI). Para confirmar que los ECP eran debidos a la producción de virus infecciosos, se llevaron a cabo ensayos de infectividad específica del ARN de los mutantes en células BHK-21. Por otra parte, se determinó el título viral producido tras su transfección en las células BHK-21 y tras cada uno de los dos pases adicionales dados a los sobrenadante de transfección.

R-3-3-1 Infectividad específica del ARN de los mutantes de 3A.

La infectividad específica del ARN se determinó transfectando monocapas de células BHK-21 con distintas cantidades de ARN, cuantificándose las placas de lisis producidas (ver M-13).

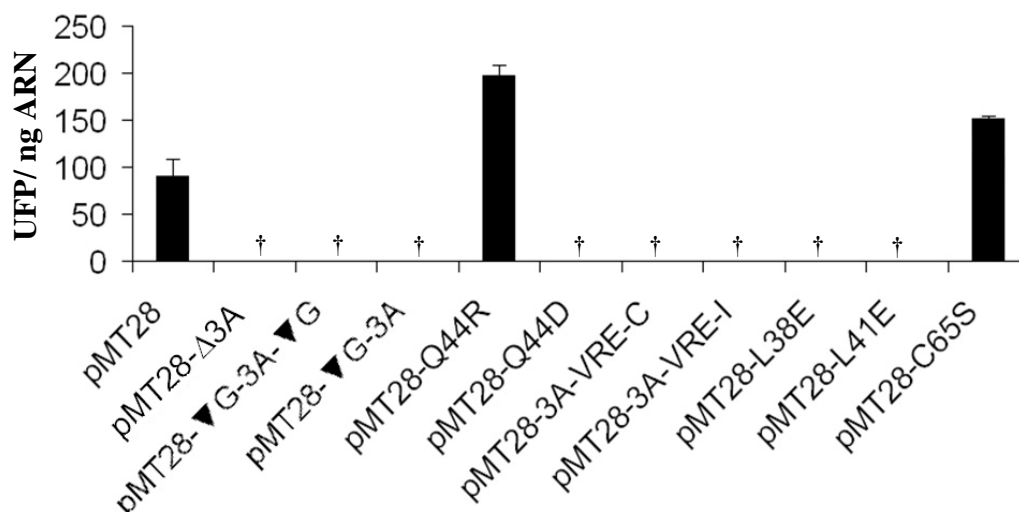


Figura 25. Infectividad específica del ARN de los mutantes de la proteína 3A.

Representación de la producción de UFP en células BHK-21 transfectadas con 1 ng de ARN de los mutantes de la proteína 3A indicados. Las células, crecidas en placas de 35 mm Ø, se incubaron en medio semisólido según se detalla en M-13. Para aquellos ARNs indicados con una †, las células fueron también transfectadas con cantidades crecientes de ARN viral de hasta 1 µg, no recuperándose, en ningún caso, UFPs. Los resultados son media de tres determinaciones independientes para cada mutante indicado.

Como se muestra en la Figura 25, la infectividad específica del ARN control pMT28 fue de 90 UFP/ng de ARN transfectante, valor similar al publicado previamente para ARNs transcritos *in vitro* del VFA de serotipo C (Saiz *et al.*, 2001). Los ARNs correspondientes al mutante de delección pMT28-Δ3A, a los mutantes de inserción (pMT28-▼G-3A y pMT28-▼G-3A-▼G) y a los mutantes de reemplazo (pMT28-3A-VRE-C y pMT28-3A-VRE-I) no produjeron placas de lisis en las monocapas de las células transfectadas, ni siquiera cuando se transfectaron con 1 µg de cada uno de ellos. Estos datos indican que la incapacidad de estos ARN para producir ECP cuando se transfectaron sobre monocapas celulares (Tabla IV) está asociada a una ausencia de producción viral o a una producción viral al menos 10^5 veces inferior a la del ARN control pMT28.

La infectividad específica del ARN de los mutantes pMT28-Q44R y pMT28-C65S fue similar a la producida por el ARN del plásmido infeccioso pMT28 control, lo que es consistente con la capacidad de estos mutantes de producir ECP sobre células en cultivo (Tabla IV). Sin embargo, el ARN de los mutantes pMT28-Q44D, pMT28-L38E y pMT28-L41E no produjo placas de lisis en las monocapas celulares transfectadas con

cantidades de hasta 1 μg (Figura 25). Estos mutantes habían presentado ECP incipiente a las 72 h.p.t. (Tabla IV), siendo necesario un pase adicional para que los virus recuperados mostraran una cinética de producción de ECP similar a la del virus recuperado de pMT28.

De esta forma, los ARN derivados de las construcciones generadas en esta Tesis Doctoral, salvo los de los mutantes pMT28-Q44R y pMT28-C65S, no fueron capaces de producir placas de lisis sobre células BHK-21, o lo hicieron con un nivel al menos 10^5 veces inferior al del ARN control pMT28.

R-3-3-2 Cuantificación de la producción viral de mutantes de la proteína 3A

Además de determinar la infectividad específica del ARN de los mutantes de la proteína 3A, se cuantificó su capacidad para producir virus viable en células BHK-21. Para ello, se transfectaron monocapas de células, crecidas en placas de 35 mm \varnothing , con 1 μg del ARN sintetizado *in vitro*, manteniéndolas posteriormente en medio líquido. El virus intra y extracelular obtenido a las 24, 48 o 72 h.p.t. (según la aparición de ECP máximo en cada caso, ver Tabla IV) se tituló (ver M-12) y se utilizó para infectar nuevas monocapas celulares (primer pase). A su vez, el sobrenadante del primer pase se tituló y se empleó para infectar nuevamente monocapas de células BHK-21 (segundo pase), titulándose también el sobrenadante obtenido.

Como se puede observar en la Figura 26, el título viral obtenido en el sobrenadante de la transfección con ARN de pMT28 fue de $3,3 \times 10^3$ UFP/ml a las 24 h.p.t., de 6×10^5 UFP/ml tras el primer pase, incrementándose hasta 2×10^6 UFP/ml en el segundo pase. Sin embargo, los resultados de las titulaciones mostraron que los mutantes de delección de la proteína 3A (pMT28- Δ 3A), de inserción (pMT28- ∇ G-3A y pMT28- ∇ G-3A- ∇ G) y de reemplazo por la proteína 3A del VRE-A (pMT28-3A-VRE-C y p;T28-3A-VRE-I) no produjeron virus viable ni a las 72 h.p.t. ni después de someter al sobrenadante postransfección a dos pases adicionales (Figura 26). Este resultado está en concordancia con la incapacidad de estos mutantes para producir ECP (Tabla IV) y UFP tras su transfección (Figura 25).

Por otro lado, los ARN de los mutantes pMT28-Q44R y pMT-C65S fueron capaces de producir virus infeccioso a las 24 h.p.t. (1×10^3 UFP/ml y $1,5 \times 10^3$ UFP/ml,

respectivamente). En ambos casos, el título se incrementó en los pases sucesivos hasta alcanzar valores de 10^6 UFP/ml, similares a los encontrados para el control pMT28 (Figura 26).

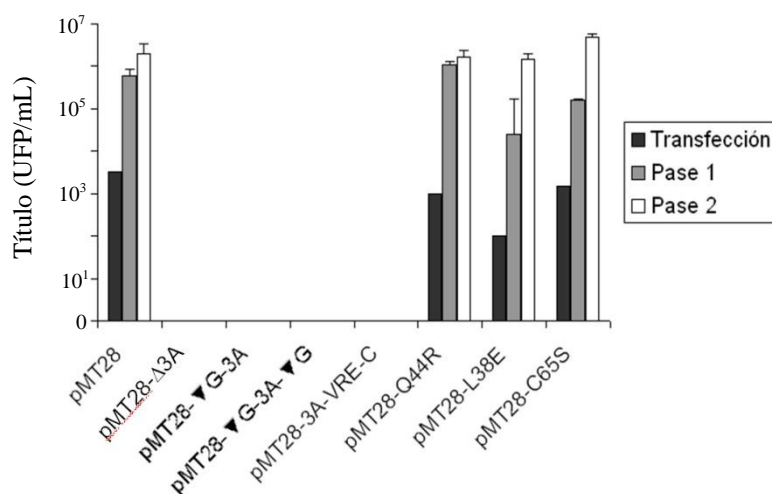


Figura 26. Producción viral en células BHK-21 de mutantes de la proteína 3A.

Representación del título de virus intra y extracelular obtenido a los tiempos a los que observó máximo ECP (Tabla IV). Se indican los títulos determinados tras la transfección y tras cada uno de los pases adicionales dados al sobrenadante postransfección. Los resultados son media de tres determinaciones independientes para cada mutante indicado.

Los mutantes pMT28-L38E, pMT28-L41E y pMT28-Q44D produjeron títulos virales similares tras la transfección y en los sucesivos pases, como se muestra para el mutante pMT28-L38E en la Figura 26. El título viral obtenido para estos mutantes a las 72 h.p.t. fue de, aproximadamente, 1×10^2 UFP/ml, un logaritmo menor que el título viral determinado a las 24 h.p.t. para el ARN control pMT28. A las 48 h.p.i. del primer pase, el título se incrementó a valores del orden de 1×10^4 UFP/ml, aún inferior en más de un logaritmo de magnitud al título observado para pMT28, mientras que, a las 24 h.p.i. del segundo pase, el título alcanzó niveles de 1×10^6 UFP/ml, valor comparable al resto de ARNs que produjeron virus infeccioso.

Los resultados expuestos en éste y en anteriores apartados indican que el ARN de los mutantes pMT28-L38E, pMT28-L41E y pMT28-Q44D produjo ECP y virus viable en células en cultivo, necesitando para ello tiempos mayores que el control pMT28 (al menos 72 h.p.t.). Esta aparición de ECP coincidió con la imposición en las poblaciones virales de los mutantes L38V, L41A y D44E respectivamente (Tabla V). La necesidad de selección de una variante viral para producir ECP explicaría la ausencia de infectividad del ARN de dichos mutantes (Figura 25), ya que ese tipo de ensayo en

medio semisólido limita la difusión viral y el tiempo de infección (24 h.p.t.) es menor que el del ensayo en medio líquido. Tras dos pases de los virus recuperados de la transfección con estos mutantes, los títulos observados fueron similares al del control pMT28, y la mutación seleccionada permaneció dominante en la población viral.

R-3-4 Expresión de proteínas virales de los mutantes de la proteína 3A en cultivos celulares

R-3-4-1 Análisis mediante *western-blot*

Los resultados antes descritos (R-3-1, R-3-2 y R-3-3) han permitido conocer la capacidad de los distintos clones infecciosos mutantes de la proteína 3A del VFA para producir virus y/o daño celular. Para aquellos mutantes en los que estos procesos estaban parcial o totalmente inhibidos, nos interesó intentar esclarecer las etapas del ciclo viral que se encontraban alteradas. Para ello, y como una primera aproximación, se analizó la expresión de proteínas virales en células BHK-21 transfectadas con ARNs de los distintos mutantes.

En la Figura 27 se muestran los resultados obtenidos al analizar mediante *western-blot* las proteínas de los extractos de células transfectadas con ARN de los mutantes de delección pMT28- Δ 3A y de inserción pMT28- ∇ G-3A y pMT28- ∇ G-3A- ∇ G. Para ello, se empleó un suero de cerdo hiperinmunizado con el VFA (1H8), que reconoce a la mayoría de las proteínas del virus. En los extractos de células transfectadas con ARN control pMT28 se pudo detectar a las 24 h.p.t síntesis de las proteínas virales, que no se detectó en células transfectadas con ARN de los mutantes pMT28- Δ 3A, pMT28- ∇ G-3A (Figura 27A) o pMT28- ∇ G-3A- ∇ G (Figura 27B) a ninguno de los tiempos analizados (24, 48 y 72 h.p.t.). En paralelo, se analizó la expresión de precursores polipeptídicos de 3A mediante el empleo de un anticuerpo específico frente a dicha proteína (2C2, ver M-3), observándose la proteína 3A y de sus precursores en las células transfectadas con el ARN control pMT28, pero no en las transfectadas con el ARN de los mutantes de delección o inserción (datos no mostrados).

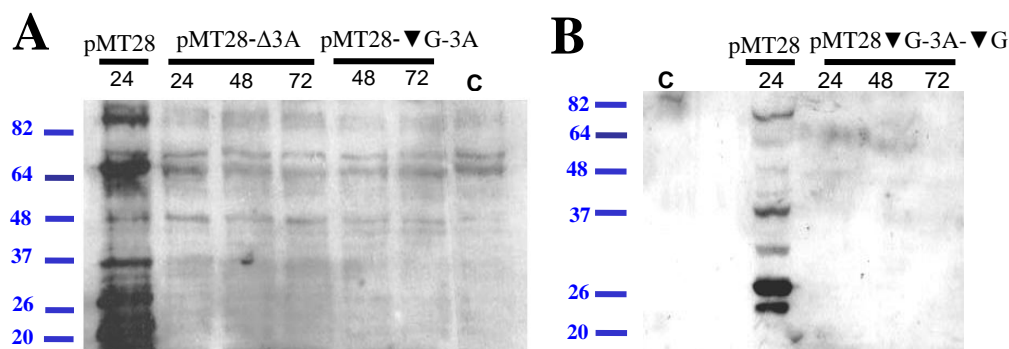


Figura 27. Expresión de proteínas de los mutantes pMT28-Δ3A, pMT28-▼G-3A y pMT28-▼G-3A-▼G. Western-blot de SDS-PAGE al 10% de extractos de monocapas de células BHK-21 (35 mm ϕ), transfectadas con 1 μ g de ARN de los mutantes pMT28-Δ3A y pMT28-▼G-3A (A) o del mutante pMT28-▼G-3A-▼G (B). Las células fueron incubadas a 37°C durante las horas indicadas. En cada caso se cargaron 200 ng de proteína total. Se empleó el suero de cerdo hiperinmune frente al VFA 1H8 como anticuerpo primario (ver M-11-1 y M-17-1). C (control): extracto de células transfectadas en ausencia de ARN. La migración de los marcadores proteicos (en KDa) se indica mediante líneas azules.

El mismo análisis se realizó con los mutantes de reemplazo de la proteína 3A del VFA por la del VRE-A (pMT28-3A-VRE-C y pMT28-3A-VRE-I). En este caso, para detectar la síntesis de proteínas virales, se empleó además del suero 1H8, el anticuerpo monoclonal SD6 que reconoce la proteína VP1 del VFA. Como se puede observar, no se detectó expresión de la proteína VP1 (Figura 28A) ni de ninguna otra proteína viral (Figura 28B), ni siquiera a las 72 h.p.t. En las células transfectadas con el ARN del clon infeccioso pMT28, tanto las proteínas virales como la proteína VP1 fueron detectadas de forma clara a las 24 h.p.t.. Se obtuvieron resultados similares empleando un anticuerpo frente a la proteína 3D (datos no mostrados).

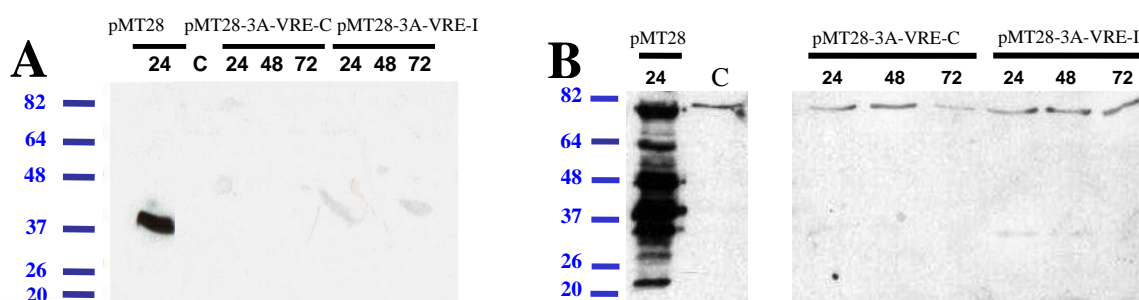


Figura 28 Expresión de proteínas de los mutantes pMT28-3A-VRE-C y pMT28-3A-VRE-I. Western-blot de SDS-PAGE al 10% de extractos de monocapas de células BHK-21 (35 mm ϕ) transfectadas con 1 μ g de ARN de pMT28, pM28-3A-VRE-C y pMT28-3A-VRE-I e incubadas a 37°C durante las horas indicadas. En cada caso se cargaron 200 ng de proteína total. Los anticuerpos primarios empleados fueron el anticuerpo SD6 que reconoce a la proteína VP1 (A) y el suero hiperinmune de cerdo 1H8 (B). La migración de los marcadores proteicos (en KDa) se indica mediante líneas azules.

En la Figura 29 se puede observar que, tras la transfección con el ARN del control pMT28, se detectaron niveles elevados de las proteínas a partir de las 8 h.p.t.. Estos niveles se mantuvieron hasta las 24 h.p.t, tiempo al que el ECP fue completo.

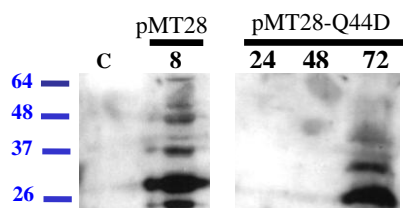


Figura 29. Expresión de proteínas del mutante pMT28-Q44D. *Western-blot* de SDS-PAGE al 10% de extractos de monocapas de células BHK-21 (35 mm ϕ) transfectadas con 1 μ g de ARN de cada uno de los mutantes e incubadas a 37°C durante el tiempo indicado en horas en cada calle. Cinética de expresión de proteínas virales con el suero hiperinmune de cerdo 1H8. En cada caso se cargaron 200 ng de proteína total. La migración de los marcadores proteicos (en KDa) se indica mediante líneas azules.

Por otra parte, el ARN del mutante pMT28-Q44D no produjo síntesis detectable de proteínas virales hasta 72 h.p.t (Figura 29). Este retraso en la síntesis proteica también se observó en células transfectadas con los ARNs de los mutantes pMT28-L38E y pMT28-L41E (Figura 30).

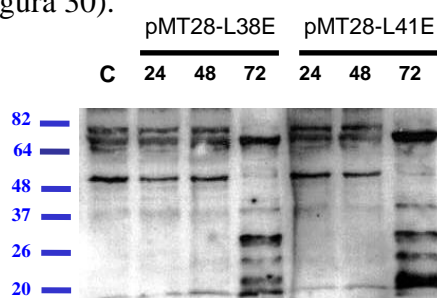


Figura 30. Expresión de proteínas de los mutantes pMT28-L38E y pMT28-L41E. *Western-blot* de SDS-PAGE al 10% de extractos de monocapas de células BHK-21 (35 mm ϕ) transfectadas con 1 μ g de ARN de los mutantes indicados e incubadas a 37°C las horas indicado. En cada caso se cargaron 200 ng de proteína total. Como anticuerpo primario se empleó el suero de cerdo hiperinmune frente al VFA 1H8. C (control): extracto de células transfectadas en ausencia de ARN. La migración de los marcadores proteicos (en KDa) se indica mediante líneas azules.

En conjunto, los resultados obtenidos indicarían que en los mutantes de delección (pMT28- Δ 3A), de inserción (pMT28- \blacktriangledown G-3A y pMT28- \blacktriangledown G-3A- \blacktriangledown G) y de reemplazo (pMT28-3A-VRE-C y pMT28-3A-VRE-I) de la proteína 3A, que no mostraron capacidad de producir virus ni ECP en cultivos celulares (Tabla IV, Figuras 24 y 25), la síntesis proteica se encuentra inhibida totalmente. Estos mutantes podrían tener alterados bien la primera ronda de traducción del ARN transfectado, o bien algún paso

del ciclo viral que impidiese la amplificación del ARN+ molde de la traducción masiva de proteínas virales, que es la única que podemos detectar con la metodología empleada. Por otro lado, en los mutantes puntuales de la proteína 3A pMT28-Q44D, pMT28-L38E y pMT28-L41E - asociados a la selección de virus con sustituciones de la mutación introducida, según se detalla en la Tabla V - la síntesis proteica mostró un retraso en el tiempo respecto al control pMT28. Este retraso fue similar al observado en los ensayos de producción de virus y aparición de ECP sobre células en cultivo (Tabla IV).

R-3-4-2 Análisis por inmunofluorescencia de productos virales en células transfectadas con ARN de mutantes de la proteína 3A.

Con la intención de determinar en células individuales los niveles de expresión y la localización intracelular de productos virales, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia sobre células BHK-21 transfectadas con ARN de distintos mutantes. Para ello, se utilizaron el suero 163, que reconoce a la proteína 3A y el anticuerpo J2, que reconoce estructuras de ARN de doble cadena (M-3).

Los resultados obtenidos muestran que la proteína 3A se sintetizó a niveles elevados en células transfectadas con el ARN control pMT28 a las 24 h.p.t., presentando una distribución homogénea y difusa en el citoplasma celular (Figura 31), como ya había sido publicado (García-Briones *et al.*, 2006). Por otro lado, se observó que la tinción correspondiente a los complejos de ARN de doble cadena (ver R-3-2), también se distribuyó homogéneamente por el citoplasma celular. La comparación de las imágenes de la Figura 31 muestra que la distribución de la proteína 3A y de las estructuras de doble cadena de ARN son similares, lo que sugiere la co-localización subcelular de la proteína 3A del VFA con la replicación del ARN viral.

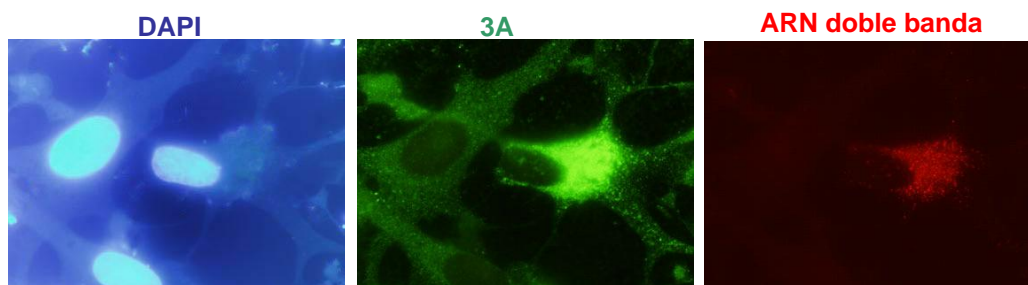


Figura 31. Inmunofluorescencia de la proteína 3A y de ARN de doble banda en células transfectadas con ARN de pMT28. Células BHK-21 transfectadas con 1 μ g ARN de pMT28 y fijadas a las 24 h.p.t.. La detección de la proteína 3A se realizó con el suero de conejo 163 y la de las estructuras de doble cadena de ARN con el anticuerpo J2. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (M-17-3).

Por otro lado, en células BHK-21 transfectadas con ARN de los mutantes de delección pMT28- Δ 3A, de inserción (pMT28- ∇ G-3A- ∇ G y pMT28- ∇ G-3A) o de sustitución por la proteína 3A del VRE-A (pMT28-3A-VRE-C y pMT28-3A-VRE-I), no se detectó ni expresión de la proteína 3A ni ARN de doble cadena, a ninguno de los tiempos estudiados: 24, 48 y 72 h.p.t. (datos no mostrados). La falta de expresión de proteínas de la cápsida viral en estos mutantes se confirmó empleando el anticuerpo SD6 frente a la proteína VP1 (Figura 32 y datos no mostrados). Estos resultados concuerdan con la ausencia de detección de proteínas virales en las infecciones con estos mutantes en células BHK-21 observada en los ensayos de *western-blot* (Figuras 26 y 27).

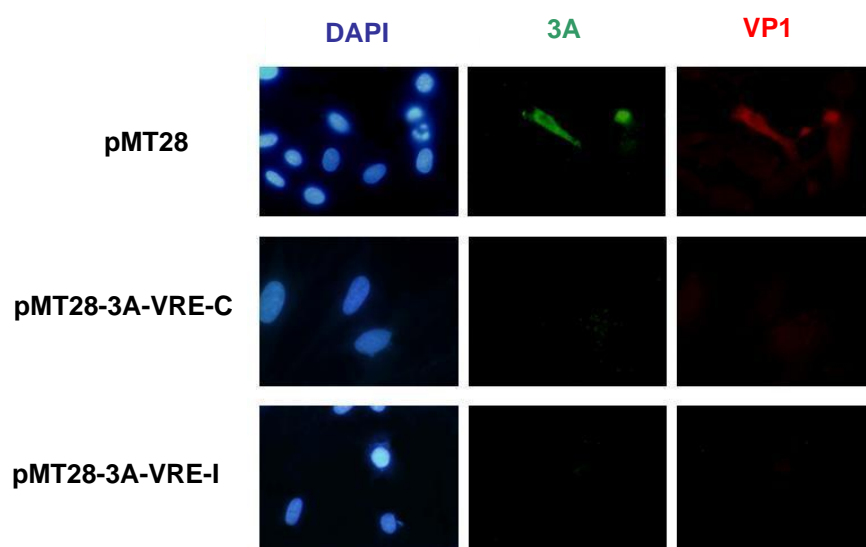


Figura 32. Inmunofluorescencia de las proteínas 3A y VP1 en células transfectadas con ARN de mutantes de reemplazamiento de 3A. Células BHK-21 transfectadas con 1 μ g ARN de la construcción indicada. Las células se fijaron a las 24 h.p.t.. La detección de la proteína 3A se realizó con el anticuerpo 163, y la de VP1 con el anticuerpo monoclonal SD6. Para el marcaje de núcleos celulares se utilizó DAPI.

La fluorescencia específica para 3A y para ARN de doble banda en células transfectadas con ARN del mutante pMT28-L41E (Figura 33C) sólo se detectó a las 48 h.p.t. y presentó una distribución similar a la observada con el ARN control pMT28 (Figura 33). Este retraso en la detección de fluorescencia viral se observó también para el ARN pMT28-L38E. En este caso, mientras que la mayoría de las células transfectadas mostraron una distribución subcelular homogénea y de aspecto punteado, en un bajo porcentaje inferior al 5% de las células transfectadas la proteína 3A se detectó formando pequeños agregados (Figura 33). Para ambos mutantes, no se

observaron diferencias en la distribución y apariencia de las estructuras con ARN de doble cadena respecto a las encontradas con el ARN control pMT28.

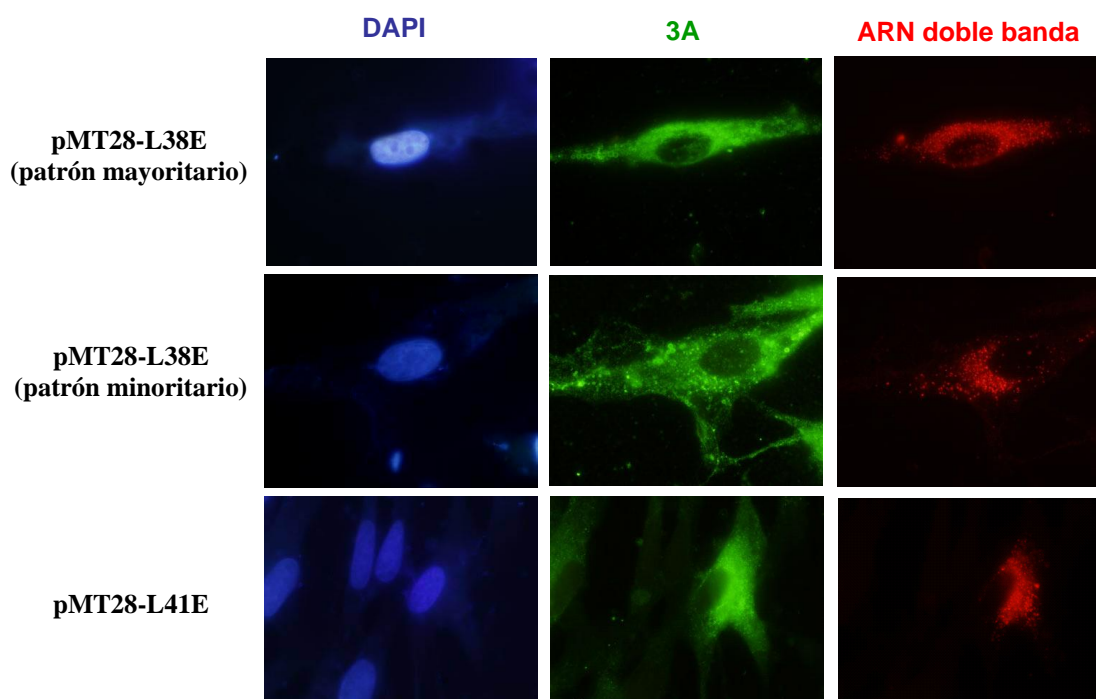


Figura 33. Inmunodetección de la proteína 3A y de ARN de doble banda en células transfectadas con ARN de pMT28-L38E y pMT28-L41E. Células BHK-21 transfectadas con 1 μg del ARN indicado. Se muestran ejemplos representativos de los patrones de fluorescencia mayoritario y minoritario observados en células transfectadas con ARN del mutante pMT28-L38E. Las células se fijaron a las 48 h.p.t.. Para la detección de la proteína 3A se empleó el anticuerpo 163, para la detección de ARN de cadena doble se empleó el anticuerpo J2. Como marcaje de núcleos celulares se utilizó DAPI.

Los resultados obtenidos con los mutantes pMT28-L38E y pMT28-L41E indicaban que el retraso en la aparición de ECP, solo detectable de manera incipiente a las 72 h.p.t., se asociaba a la selección de variantes virales que restauraban la hidrofobicidad del residuo mutado. Sin embargo, las imágenes de fluorescencia obtenidas mostraron para ambos mutantes una síntesis de proteínas virales y detección de estructuras de ARN de doble banda a las 48 h.p.t.. Por otra parte, la localización de la fluorescencia de la proteína 3A en algunas células transfectadas con el ARN del mutante pMT28-L38E, varió respecto al observado con el ARN control.

R-3-5 Estudio de la expresión transitoria de las proteínas mutadas en los residuos L38E y L41E

Los resultados de los ensayos de producción de ECP (Tabla IV), virus infeccioso (Figuras 24 y 25) y síntesis proteica (Figura 30) de los mutantes pMT28-L38E y pMT28-L41E en células BHK-21, junto con los datos de la secuencia nucleotídica de la progenie viral obtenida a distintos tiempos postransfección (Tabla V), indicaban que, para lograr la viabilidad viral es necesario restaurar el carácter hidrofóbico de los aminoácidos de las posiciones 38 y 41 de 3A. Por otro lado, la distribución subcelular de la proteína 3A del mutante pMT28-L38E fue, en un porcentaje en torno al 5% de las células transfectadas, diferente a la observada para el mutante pMT28-L41E y para pMT28 (Figura 33), lo que podría sugerir la existencia de una pequeña subpoblación de células que expresaban la proteína mutante L38E.

Para estudiar posibles diferencias en las interacciones celulares de estas proteínas 3A mutadas, las secuencias correspondientes fueron clonadas de forma independiente en un vector de expresión eucariótico (ver M-9). De esta manera, se pudo analizar su expresión y distribución independiente en un contexto diferente al de infección. Estas construcciones derivadas del plásmido pRSV, que portaban la secuencia de la proteína 3A original (pRSV-3A) o con las mutaciones L38E (pRSV-3A-L38E) o L41E (pRSV-3A-L41E), se utilizaron para transfectar células BHK-21 (M-11-2). Mediante ensayos de *western-blot* se pudo comprobar que las proteínas 3A mutadas 3A-L38E y 3A-L41E se expresaron a un nivel menor que el observado para la proteína 3A no mutada (Figura 34). La disminución de las proteínas 3A mutantes puede deberse a una menor eficiencia de transfección de los plásmidos, a una mayor toxicidad celular o a un menor reconocimiento de las proteínas mutadas respecto a la proteína original por parte del anticuerpo primario utilizado (2C2).

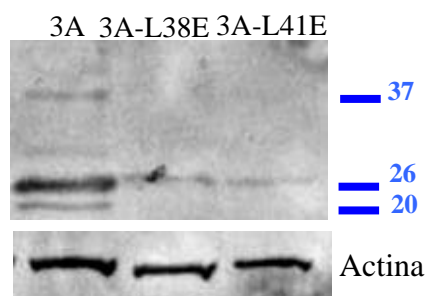


Figura 34. Expresión transitoria de la proteína 3A y de sus versiones mutadas 3A-L38E y 3A-L41E. *Western-Blot* de SDS-PAGE 10% de extracto de monocapas de 35mm Ø de células BHK-21 transfectadas con 1 µg de los plásmidos pRSV-3A, pRSV-3A-L38E o pRSV-L41E. Para reconocer la proteína 3A se empleó el anticuerpo 2C2. En el panel inferior se representa un control del nivel de carga de proteínas celulares.

Los ensayos de inmunofluorescencia de las células BHK-21 transfectadas con estas construcciones mostraron que la proteína 3A *wt* se distribuyó de una manera difusa por todo el citoplasma de las células BHK-21 (Figura 35, panel superior), como se había publicado anteriormente (García-Briones *et al.*, 2006). Por otra parte, la práctica totalidad de las células que expresaban las proteínas mutantes 3A-L38E y 3A-L41E presentaron una distribución no homogénea, con formación de agregados y concentrada en ciertas localizaciones del citoplasma celular (Figura 35, paneles inferiores), similar a la observada en algunas células tras la transfección con el ARN del mutante pMT28-L38E (Figura 33B).

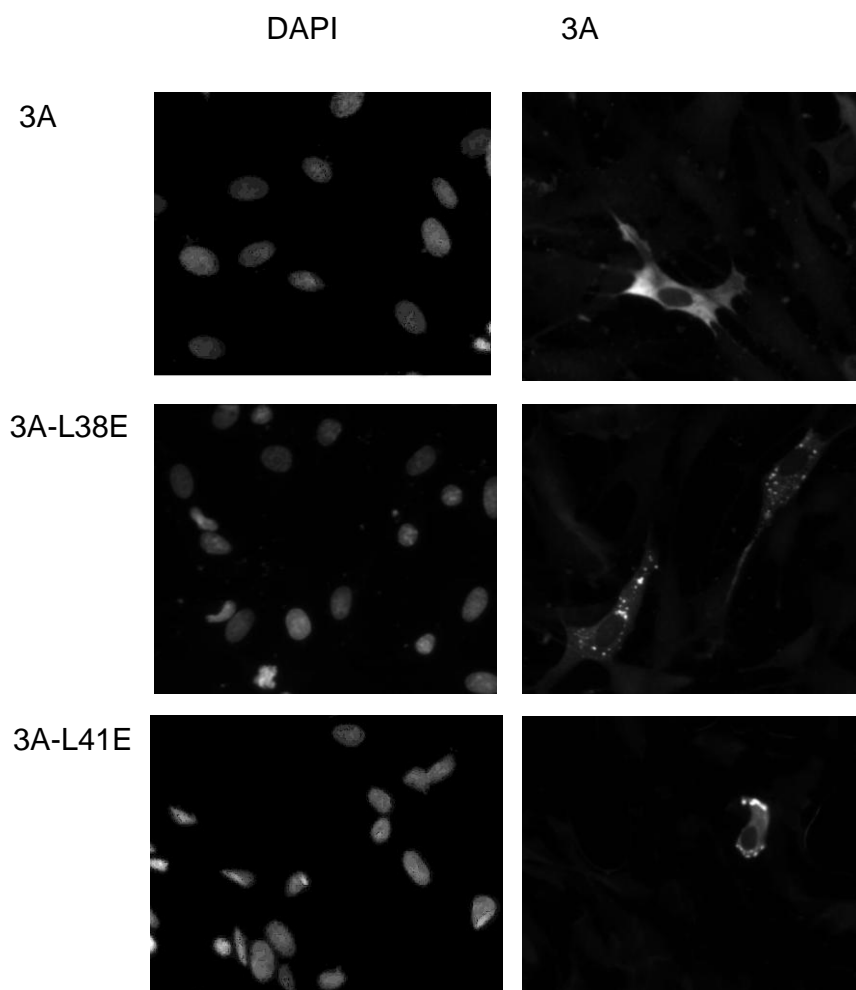


Figura 35. Distribución celular de la proteína 3A y de sus versiones mutadas 3A-L38E y 3A-L41E en ensayos de expresión transitoria. Inmunofluorescencias de células BHK-21 transfectadas con 1 μ g de los plásmidos pRSV-3A, pRSV-3A-L38E ó pRSV-3A-L41E e incubadas durante 24 h.p.t. a 37°C (M-17-3). La proteína 3A se detectó empleando el suero 163. Se utilizó DAPI como marcador del núcleo celular.

La diferente localización subcelular de las proteínas 3A-L38E y 3A-L41E sugiere que estas mutaciones pueden alterar la interacción de 3A con proteínas celulares y/o virales, lo que afectaría a la capacidad de estos mutantes para producir virus y ECP.

R-3-6 Análisis de la producción de ARN viral en células transfectadas con ARN de mutantes de 3A

Se ha descrito previamente que deleciones en la porción carboxi terminal de la proteína 3A son responsables de una reducción en el nivel de síntesis de ARN del VFA en células de origen bovino, pero no en células de origen porcino o en células BHK-21 (Pacheco *et al.*, 2003; Beard y Mason, 2000). Esta disminución en el nivel de síntesis de ARN sería responsable, a su vez, de las variaciones en el grado de virulencia de estos virus entre las distintas especies animales estudiadas (Pacheco *et al.*, 2003).

Para analizar el efecto de las mutaciones de la proteína 3A sobre la replicación viral se determinaron los niveles de ARN en células transfectadas mediante ensayos de RT-PCR semicuantitativa y PCR a tiempo real.

R-3-6-1 Detección de la producción de ARN viral por RT-PCR semicuantitativa

Para detectar la producción de ARN viral, se analizaron diluciones de extractos de ARN de monocapas de células BHK-21 a las 24 h.p.t. (M-11-1), mediante una RT-PCR semicuantitativa basada en la amplificación de la secuencia genómica (polaridad positiva) de la proteína 3A, empleando los oligonucleótidos 3ARTPCR y 3AB-V, complementarios a secuencias que flanquean externamente a 3A (Tabla III).

En estos ensayos se consideró como síntesis *de novo* de ARN viral cuando se detectaron amplicones en diluciones iguales o superiores a 1:1000 del extracto de ARN (dato no mostrado), asumiendo que la amplificación a partir de diluciones inferiores era debida al ARN empleado para la transfección.

En células transfectadas con ARN de pMT28 se obtuvieron amplificaciones a diluciones de 1:10000 del extracto de ARN (Figura 36). Sin embargo, para el mutante pMT28- Δ 3A únicamente se amplificó un segmento del tamaño correspondiente al esperado, al tener delecionada la casi totalidad de la secuencia de la proteína 3A, cuando se partió del extracto sin diluir.

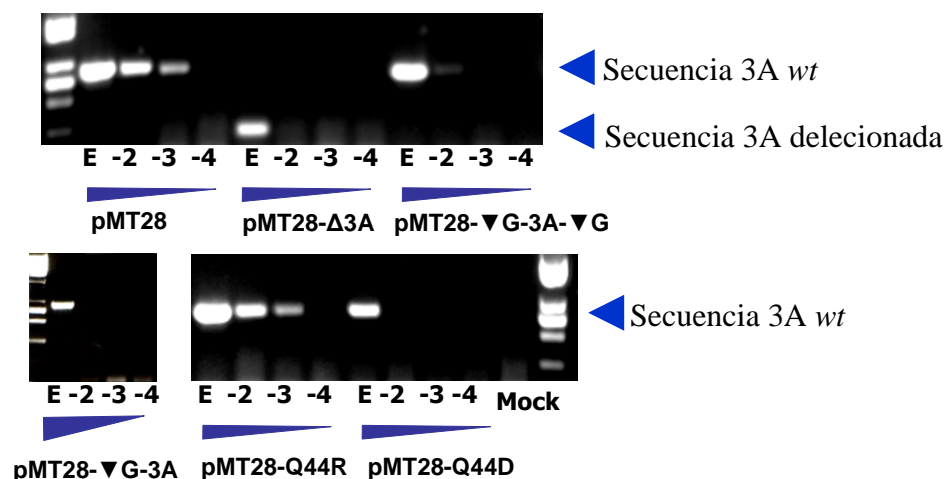


Figura 36. Amplificación semicuantitativa de ARN de mutantes de 3A. RT-PCR a partir de 1 μ l de las diluciones indicadas de extractos de ARN extraído de células BHK-21 (monocapa de 35 mm \varnothing) transfectadas con 1 μ g de ARN del mutante indicado. El ARN se extrajo a las 24 h.p.t. (E) Extracto de ARN sin diluir; (-2, -3 y -4) diluciones seriadas 1:100, 1:1000 y 1:10000 del extracto inicial. Se señalan los tamaños de los amplicones obtenidos con la secuencia de la proteína 3A completa y deletada.

Los mutantes con una o dos residuos de G insertados (pMT28-▼G-3A y pMT28-▼G-3A-▼G) en los extremos de la secuencia de la proteína 3A tampoco fueron capaces de sintetizar ARN viral en las condiciones ensayadas (Figura 36).

El mutante pMT28-Q44R fue capaz de sintetizar ARN viral a las 24 h.p.t. a niveles similares a los producidos por pMT28, mientras que el mutante pMT28-Q44D no mostró producción de ARN a las 24 h.p.t., ni siquiera a la dilución 1:100 del extracto inicial. El hecho de que no se logre detectar niveles apreciables de ARN mutante pMT28-Q44D a las 24 h.p.t. puede ser indicativo de un defecto en su replicación, anterior a la selección de los virus con la sustitución D44E, ya que a las 72 h.p.t. si generó virus (Figura 26), ECP (Tabla IV) y síntesis de proteínas virales en las células BHK-21 (Figura 29B).

R-3-6-2 RT-PCR a tiempo real

Algunos autores han demostrado la relación de la proteína 3A de PV con la replicación del ARN viral y, más concretamente, su implicación en la síntesis de ARN+ (Teterina *et al.*, 2003).

La cuantificación de la producción de ARN viral por RT-PCR semicuantitativa (ver Figura 36) había mostrado que, en los mutantes pMT28-Δ3A, pMT28-▼G-3A y

pMT28- ∇ G-3A- ∇ G, su síntesis se encontraba inhibida, pero no permitía conocer si el paso alterado era la síntesis de ARN+, si ésta decaía como consecuencia del descenso de la síntesis de ARN-, o si estaban afectadas ambas polaridades. Con la intención de ayudar a esclarecer este punto, se realizó una cuantificación independiente del nivel de síntesis de ARN+ y ARN- mediante una retrotranscripción seguida de una PCR a tiempo real (M-16-2) de los extractos de ARN totales obtenidos de células BHK-21 transfectadas con los ARN mutantes de los que no se pudo recuperar virus infeccioso. Como control del nivel basal de la amplificación inespecífica del ensayo se empleó ARN extraído de células en las que la transfección no incluyó ARN viral.

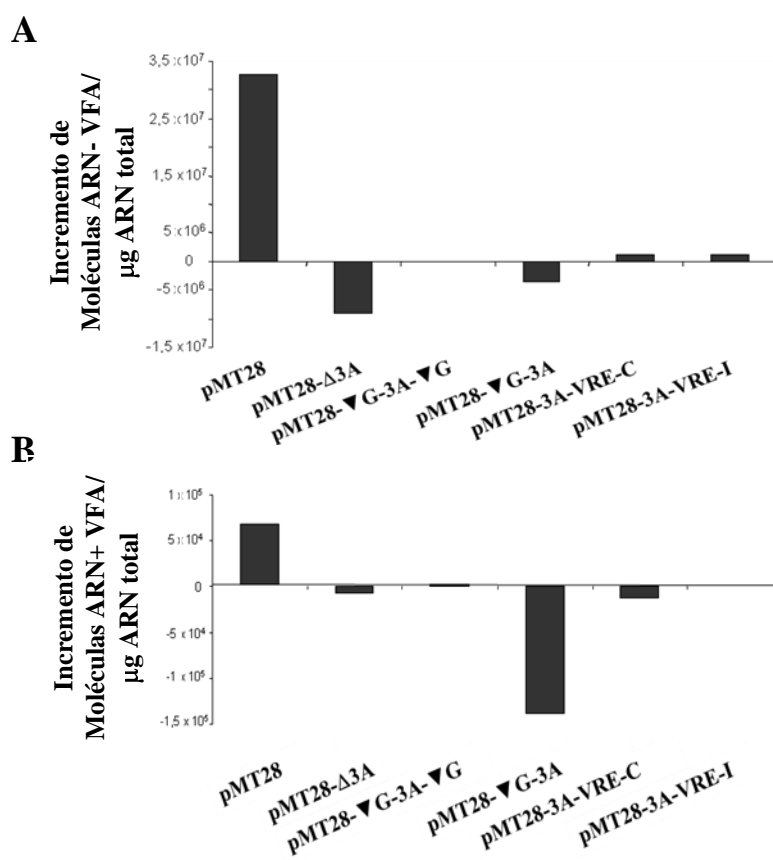


Figura 37. Cuantificación de ARN viral en células transfectadas con ARN de mutantes de 3A no viables. Representación del incremento, a las 12 h.p.t., del número de moléculas de ARN respecto al número observado a las 0 h.p.t. de las moléculas de ARN- (A) o ARN+ (B) de extractos de células BHK-21 (crecidas en placas de 35 mm Ø), transfectadas con 1μg del ARN del mutante indicado, e incubadas a 37°C durante 12 h.p.t.. La cuantificación del ARN+ y ARN- se llevó a cabo por RT-PCR a tiempo real, como se describe en M-16-2.

Como se muestra en la Figura 37A y B, la transfección con ARN de pMT28 produjo un incremento del orden de 10⁷ moléculas de ARN+ y de 10⁵ moléculas de ARN- /μg de ARN celular total, mientras el ARN del mutante pMT28-Δ3A no produjo

ARN de ninguna de las dos polaridades, en muestras recogidas a 12 h.p.t.. Del mismo modo, en células transfectadas con ARN de los mutantes pMT28-▼G-3A, pMT28-▼G-3A-▼G, pMT28-3A-VRE-C y pMT28-3A-VRE-I no se detectaron niveles significativos de síntesis de ARN de polaridad negativa o positiva (Figura 37A y B). Los resultados obtenidos sugieren que estos mutantes presentan un defecto severo en la replicación viral que justifica su pérdida de infectividad.

Para los mutantes puntuales pMT28-L38E y pMT28-L41E, en los que se observó una producción viral retrasada en el tiempo respecto al control pMT28, se encontró un incremento en la síntesis de ARN- a las 48 h.p.t. (dato no mostrado).

R-4 Evaluación de la posible complementación en *trans* de mutantes de la proteína 3A

Previamente habíamos generado en el laboratorio, con el objetivo de contar con otra herramienta para el estudio de las proteínas de la región 3ABBB (3AB_(n)), células BHK-21 que expresaban establemente las proteínas 3A, 3AB y 3ABBB. La cantidad de proteínas 3AB_(n) expresada en estas células es muy baja y no se observa en ellas modificaciones celulares al microscopio electrónico (Rosas *et al.*, 2008). Sin embargo, estas células producen, de una manera específica, mayores títulos virales cuando son infectadas con VFA C-S8c1 que los encontrados tras la infección de células BHK-21 control. Esta observación sugiere la posibilidad de una cooperación en *trans* de las proteínas 3A/3AB_(n) con la replicación viral (Rosas *et al.*, 2008). Por ello, se decidió evaluar la posibilidad de que estas proteínas expresadas en los clones celulares complementasen funcionalmente a mutantes de la proteína 3A generados en esta Tesis Doctoral.

Los clones de células BHK-21, que expresan las proteínas 3A/3AB_(n), habían sido seleccionados por su resistencia a puromicina (ver Material y Métodos). Para los experimentos de complementación se decidió emplear los clones que habían mostrado mayor capacidad de incrementar el título viral recuperado tras la infección viral (Rosas *et al.*, 2008). De esta manera, se utilizaron los clones denominados 3A242 (que expresa la proteína 3A) y 3ABBB209 (que expresa el precursor 3ABBB). Paralelamente, se empleó el clon Pur104 (resistente a puromicina) como control negativo de expresión de la proteína 3A. En la Figura 38 se puede observar la capacidad de estos clones para expresar las proteínas 3A y 3ABBB mediante un análisis por *western-blot*, utilizando

como controles positivos de expresión de la proteína 3A extractos de células BHK-21 transfectadas con los plásmidos pRSV-3A y pRSV-3ABBB.

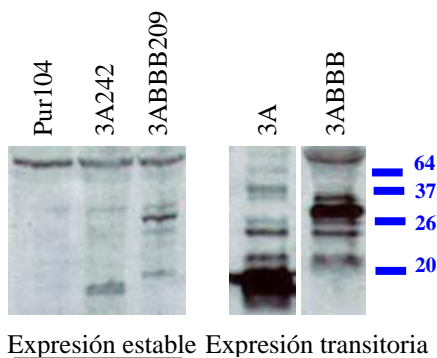


Figura 38. Expresión estable de 3A y 3ABBB en clones celulares empleados en los ensayos de complementación de mutantes de 3A. SDS-PAGE al 10% de extractos celulares de los clones Pur104, 3A242 y 3ABBB209 (panel de la izquierda) y de células BHK-21 que expresaban transitoriamente niveles elevados de las proteínas 3A y 3ABBB a las 24 h.p.t. con los plásmidos pRSV-3A y pRSV-3ABBB (panel de la derecha). Para el *western-blot*, se utilizó el anticuerpo monoclonal 2C2 que reconoce a la proteína 3A del VFA. La migración de los marcadores proteicos (en KDa) se indica mediante líneas azules.

R-4-1 Producción de ECP por ARN de mutantes de la proteína 3A en clones celulares que expresan 3A o 3ABBB

Los ensayos se realizaron transfectando 1 μ g de cada ARN sobre monocapas de los clones celulares y evaluando posteriormente la aparición de ECP. En un primer paso, el estudio se realizó sobre los mutantes no viables, incapaces de producir ECP sobre células BHK-21 (Tabla IV).

Tabla VII. ECP producido por el ARN de mutantes no viables de la proteína 3A en los clones de células BHK-21.

ARN transfectante	Clon celular ^a								
	Pur104			3A242			3ABBB209		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72
-	- ^b	-	-	-	-	-	-	-	-
pMT28	++++ ^c	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
pMT28- Δ 3A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pMT28- ∇ G-3A- ∇ G	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pMT28- ∇ G-3A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pMT28-3A-VRE-C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pMT28-3A-VRE-I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pMT28-3A-VRE	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Las monocapas transfectadas se crecieron en placas de 35 mm \emptyset .

^b Sin aparición de ECP.

^c ECP en el 100% de la superficie de la monocapa celular.

La transfección con el ARN control pMT28 produjo ECP avanzado a las 24 h.p.t., tanto en células Pur104 como en los clones 3A242 y 3ABBB209 (Tabla VII). La cinética de aparición de este ECP fue similar a la observada en células BHK-21 transfectadas con estos ARNs (Tabla IV).

La transfección con ARN del mutante de delección pMT28- Δ 3A no produjo ECP en ninguno de los clones celulares, ni siquiera a las 72 h.p.t. (Tabla VII). La capacidad de replicación de dicho mutante en los dos clones celulares se analizó mediante amplificación por RT-PCR de las secuencias que corresponden a la proteína 3A, no encontrándose amplificaciones significativas a diluciones 1:1000, lo que excluiría la posible producción de virus no citopático (ver R-3-6-1). En la Figura 39 se muestra la amplificación obtenida a partir de células del clon 3A242 transfectadas con el ARN del mutante pMT28- Δ 3A.

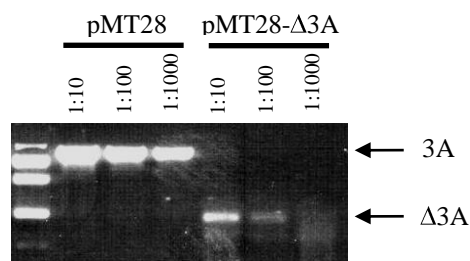


Figura 39. Amplificación del ARN viral en células del clon 3A242 transfectadas con ARN de pMT28- Δ 3A. Monocapas de células 3A242 (crecidas en placas de 35 mm \varnothing) se transfectaron con 1 μ g del ARN indicado. El ARN total se extrajo a las 24 h.p.t. (pMT28) o a las 72 h.p.t. (pMT28- Δ 3A). Se muestra el resultado de la amplificación de la secuencia que incluye a la proteína 3A con los oligonucleótidos 3Artpr y 3AB-V (ver M-16 y Tabla III), a partir de las diluciones indicadas del extracto de ARN total.

De manera similar, los ARNs de los mutantes pMT28- \blacktriangledown G-3A- \blacktriangledown G y pMT28- \blacktriangledown G-3A, al igual que las construcciones en las que se sustituyó la proteína 3A del VFA por la correspondiente al VRE-A, no generaron ECP en ninguno de los clones celulares a ninguno de los tiempos estudiados (Tabla VII), ni después de someter el sobrenadante de 72 h.p.t. a dos pases adicionales (datos no mostrados).

La Tabla VIII resume los resultados obtenidos con el ARN de los mutantes puntuales en la proteína 3A, que fueron capaces de producir ECP en células BHK-21, aunque de manera menos severa y más tardía en el tiempo que el ARN control pMT28 (Tabla IV). Como control positivo se utilizó ARN de pMT28 y como control negativo se empleó ARN del mutante pMT28-3A-VRE-C (Tabla VII). Los sobrenadantes de

estas transfecciones se sometieron a dos pases adicionales en los que se evaluó la aparición de ECP en las monocapas celulares.

La transfección de monocapas de los clones 3A242 y 3ABBB209 con ARN de los tres mutantes puntuales de 3A analizados produjo un adelanto en la aparición de ECP, respecto a las transfecciones en células control Pur104, tras los pases adicionales dados a partir del sobrenadante de transfección. De esta manera, el ECP completo (levantamiento de >95% de las células) se observó entre 24 y 48 h.p.i. tras el segundo pase adicional, siendo el mutante pMT28-Q44D el que mostró mayor adelanto (24 h.p.i. en el clon 3ABBB209, Tabla VIII). En células control Pur104 este mutante pMT28-Q44D sólo fue capaz de producir ECP completo a las 72 h.p.t. tras el segundo pase adicional. En concordancia con los resultados anteriores (Tabla VII), el mutante pMT28-3A-VRE-C no fue capaz de generar ECP ni tras la transfección ni en ninguno de los dos pases posteriores, mientras que el control pMT28 produjo ECP completo a las 24 h.p.t..

Tabla VIII. ECP producido por ARN de mutantes puntuales de la proteína 3A en clones que expresan 3A y 3ABBB.

Plásmido transfectante	Clon celular ^a								
	Pur104			3A242			3ABBB209		
	T	1 ^{er} Pase	2 ^o Pase	T	1 ^{er} Pase	2 ^o Pase	T	1 ^{er} Pase	2 ^o Pase
pMT28-Q44D			72			48			24
pMT28-L38E			b			48			48
pMT28-L41E			b			48			48
pMT28-3A-VRE-C			c			c			c
pMT28	24	†	†	24	†	†	24	†	†

^a Se indica el menor tiempo (h.p.t o h.p.i.) al cual se produjo ECP completo en monocapas celulares (35 mm Ø) de los clones indicados transfectados con 1 µg de ARN de cada mutante (T) y sometidos a dos pases sucesivos (1^{er} Pase y 2^oPase).

^b La monocapa presentó ECP en, aproximadamente, un 75% de su superficie.

^c No se observó ECP a ninguno de los tiempos analizados.

† El ECP fue completo a las 24 h.p.t. o 24 h.p.i..

Estos resultados sugieren que la expresión en *trans* de 3A y 3ABBB contribuye en cierta medida a la viabilidad de los mutantes puntuales de 3A, pMT28-Q44D, pMT28-L38E y pMT28-L41E.

R-4-2 Producción viral de mutantes de la proteína 3A en clones celulares que expresan 3A o 3ABBB.

Con la intención de comprobar si el adelanto del ECP producido por los mutantes puntuales de 3A en los clones 3A242 y 3ABBB209 se asociaba a una mayor producción viral, se tituló el virus recuperado tras la transfección con el ARN de los distintos mutantes, así como tras cada uno de los pases adicionales realizados con el sobrenadante de transfección.

En la Figura 40A se puede observar que la expresión en *trans* de las proteínas 3A o 3ABBB no tuvo un efecto significativo en el título viral recuperado tras la transfección con el ARN control pMT28. Sin embargo, tras el primer y el segundo pase, si se observó un aumento en los títulos, consistente con los datos previamente publicados (Rosas *et al.*, 2008), mostrando diferencias de título viral estadísticamente significativas respecto al obtenido en las células Pur104 (Figura 40B y C).

Donde si se encontraron diferencias significativas fue en los títulos recuperados a partir de ARN de los mutantes puntuales de 3A. En este caso, mientras que prácticamente no se detectó virus tras la transfección en células control del clon Pur104, se recuperaron títulos de 10^2 UFP/ml para las transfecciones con el ARN de pMT28-Q44D, pMT28-L38E y pMT28-L41E (Figura 40A). Tras el primer pase adicional, las diferencias de título viral respecto al recuperado de células del clon control Pur104 fueron cercanas a un logaritmo. Los títulos virales recuperados de los tres clones celulares estudiados se igualaron tras el segundo pase adicional (Figura 40B y C).

Como se esperaba, no se detectó virus infeccioso de la transfección con el ARN pMT28-3A-VRE-C y en los pases posteriores.

Estos datos indican que, a diferencia de lo observado para los mutantes no viables de 3A, la expresión en *trans* de 3A o 3ABBB acelera la recuperación de virus infeccioso.

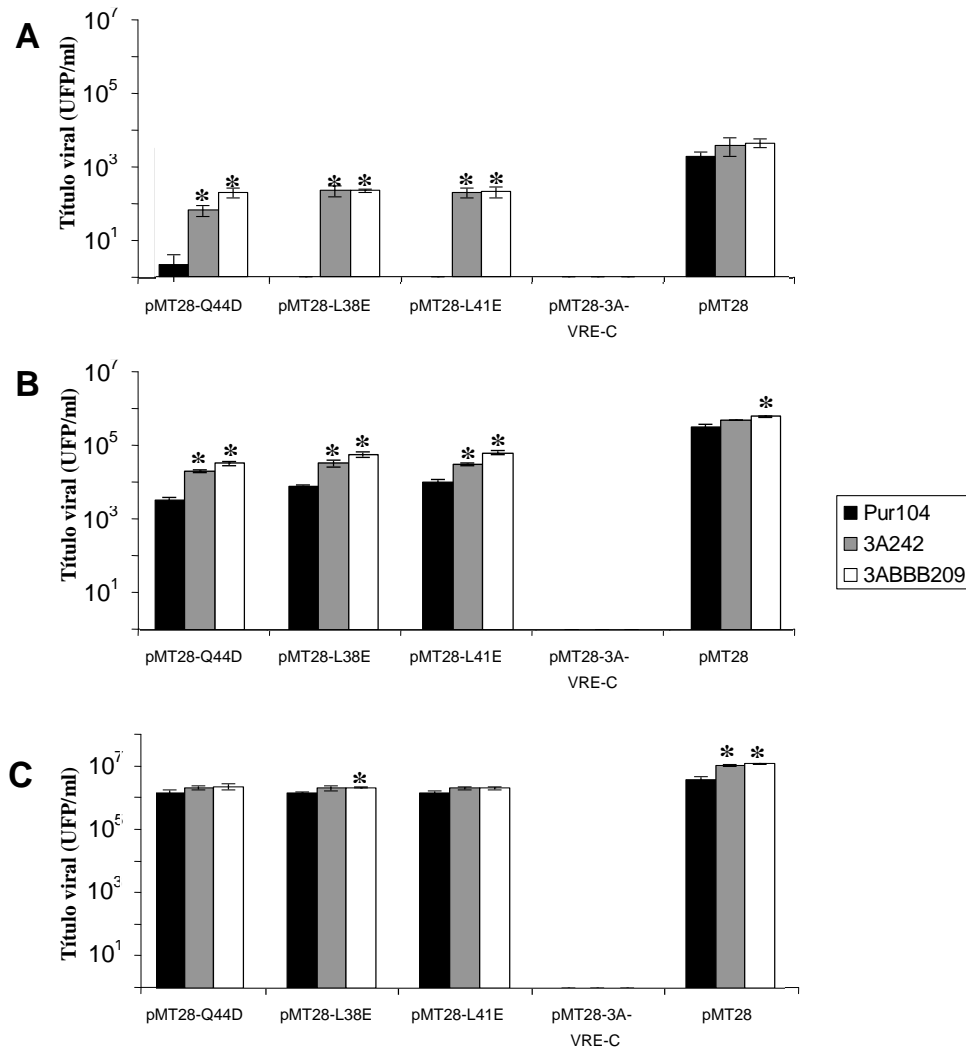


Figura 40. Producción viral de mutantes puntuales de la proteína 3A en clones que expresan 3A ó 3ABBB. Título viral (logaritmo del número de UFP/ml) correspondiente a tres determinaciones distintas de cada uno de dos experimentos independientes realizados con los ARNs indicados. Se representa el título encontrado en el tiempo postransfección o postinfección en el que se observó mayor ECP: 72 h.p.t., 72 h.p.i. del primer pase adicional y el tiempo indicado en la Tabla VIII del segundo pase, para los mutantes puntuales pMT28-Q44D, pMT28-L38E y pMT28L41E; 24 h.p.t. ó 24 h.p.i. (primer y segundo pase adicional) para el control pMT28. (A) sobrenadantes postransfección, (B) primer pase del sobrenadante de transfección y (C) segundo pase del sobrenadante de transfección. En barras grises, el título viral en el clon Pur104, en barras negras el título correspondiente al clon 3A242 y en barras blancas el correspondiente al clon 3ABBB209. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas de título respecto al obtenido en el clon Pur104 (p -valor < 0.05).

R-5 Patogenicidad de los ARNs de mutantes de 3A en ratón lactante

Para evaluar las consecuencias que las diversas mutaciones introducidas en la proteína 3A pudieran tener en la capacidad del virus para replicar y multiplicarse en animales, y como una aproximación más cercana a las condiciones de replicación viral en hospedadores naturales, se utilizó el método de inoculación de ARN en ratones lactantes (Baranowski *et al.*, 2003). Para ello, se determinó la letalidad producida tras la inoculación de ARN los distintos mutantes en ratones de la cepa Swiss de entre 7 a 9 días de edad (ver M-18). Los ratones Swiss adultos son clínicamente resistentes a la infección por el VFA C-S8c1, aunque es posible detectar viremia (Borrego *et al.*, 2006). Sin embargo, los ratones lactantes desarrollan, de manera dependiente de dosis, una serie de síntomas (parálisis de extremidades inferiores, temblores o incapacidad para incorporarse, entre otros) que les producen la muerte. El ratón lactante ha sido empleado como modelo para estimar la capacidad de multiplicación e infección de ARNs del VFA en animales (Baranowski *et al.*, 2003).

La Tabla IX resume la capacidad para producir letalidad en ratón lactante de ARN de los distintos mutantes de la proteína 3A. El ARN de pMT28 fue patogénico, produciendo una letalidad de 4/5 ratones a una dosis de 1×10^2 ng de ARN, valores similares a los publicados previamente (Baranowski *et al.*, 2003).

Ninguno de los ARNs correspondientes a los mutantes no viables en células BHK-21 con una o dos inserciones en los extremos de la proteína 3A (pMT28-▼G-3A y pMT28-▼G-3A-▼G), o de los mutantes de sustitución por la proteína 3A del VRE-A (pMT28-3A-VRE-C y pMT28-3A-VRE-I) provocaron la muerte de ratones a dosis de hasta 4×10^5 ng de ARN.

Por otro lado, el ARN de los mutantes pMT28-Q44D, pMT28-L38E y pMT28-L41E no produjo letalidad en los ratones lactantes inoculados con dosis de hasta 4×10^5 ng de ARN, a pesar de haberse recuperado previamente virus tras la transfección de células BHK-21 con dichos ARNs (Tabla V). En el caso de un ratón inoculado con el mutante pMT28-Q44D, se observaron síntomas que pudieran dar lugar a sospecha de presencia de infección al tercer día postinoculación. Sin embargo, a tiempos posteriores de observación este animal sufrió una mejoría de sus síntomas sin llegar a recaer en todo el periodo de estudio.

Tabla IX. Ensayo de letalidad en ratón lactante del ARN de mutantes de la proteína 3A.

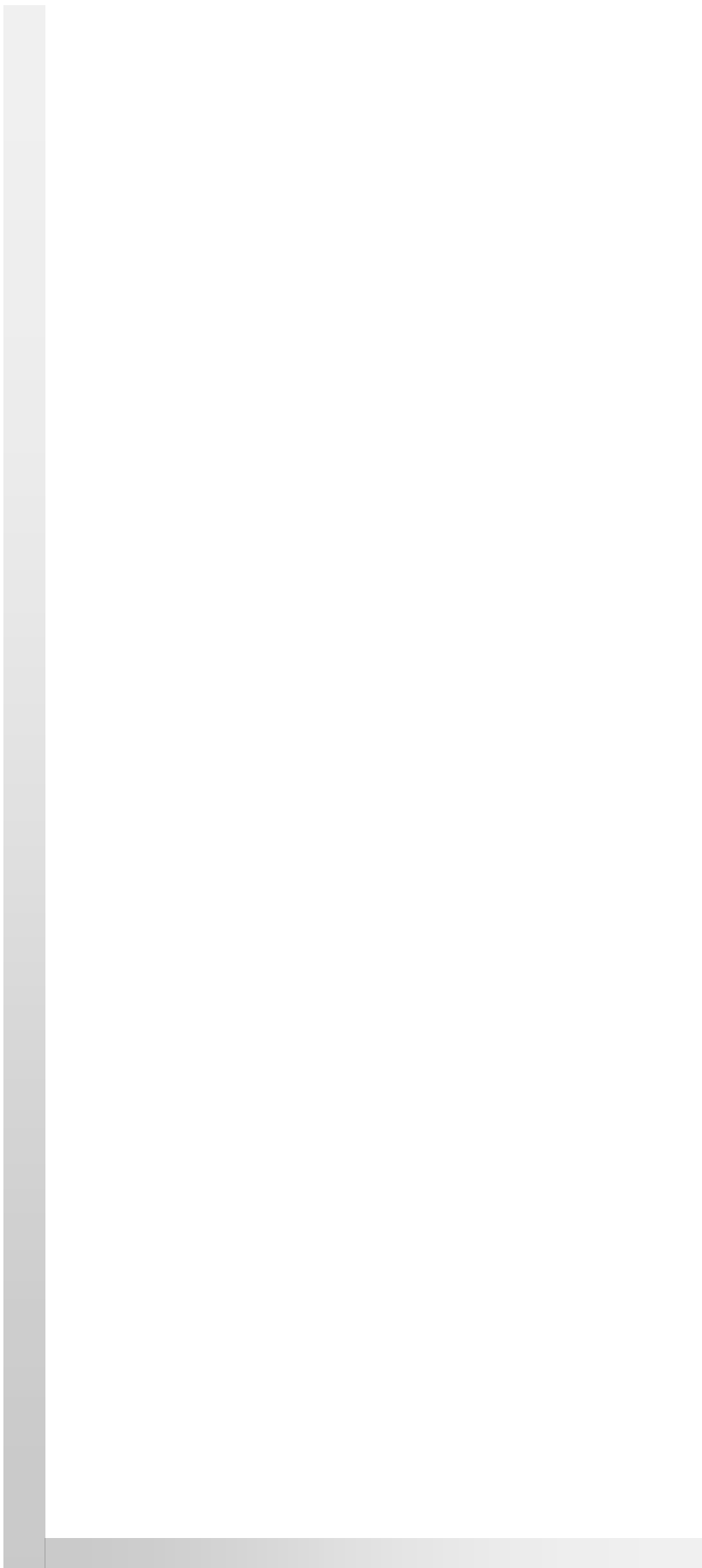
ARN	Dosis ARN (ng)	Letalidad
pMT28	1x10 ²	4/5
	1x10 ³	4/4
pMT28-Δ3A	2x10 ⁵	0/3
	4x10 ⁵	0/2
pMT28-▼G-3A	2x10 ⁵	0/3
	4x10 ⁵	0/2
pMT28-▼G-3A-▼G	1x10 ²	0/2
	1x10 ³	0/3
pMT28-3A-VRE-C	2x10 ⁵	0/3
	4x10 ⁵	0/2
pMT28-3A-VRE-I	2x10 ⁵	0/2
	4x10 ⁵	0/1
pMT28-L38E	1x10 ³	0/1
	1x10 ⁵	0/1
pMT28-L41E	2x10 ⁵	0/3
	4x10 ⁵	0/2
pMT28-Q44D	2x10 ⁵	0/3
	4x10 ⁵	0/1
pMT28-Q44R	1x10 ²	1/2
	1x10 ³	2/2
pMT28-C65S	1x10 ²	1/2
	1x10 ³	3/3

Como se puede observar en la Tabla IX, aquellos ARNs que habían generado ECP directo tras su transfección en células BHK-21 (Tabla IV), produjeron letalidad en ratón lactante, comportándose de manera semejante a la producida por la construcción pMT28. De esta manera, los rangos de letalidad de los mutantes pMT28-Q44R y pMT28-C65S a dosis de hasta 1x10³ ng de ARN fueron similares entre sí (2/2 y 3/3, respectivamente) y semejantes también al valor obtenido tras inocular a los ratones lactantes con el ARN control pMT28 (4/4).

Para excluir que la letalidad observada tras la inoculación de las construcciones pMT28-Q44R y pMT28-C65S fuese debida a alguna reversión a la secuencia *wt* de la proteína 3A, se extrajo ARN de tejidos cerebral y muscular de un ratón inoculado con el ARN de cada mutante. Mediante amplificación por RT-PCR y posterior secuenciación de la zona correspondiente a la secuencia de 3A con los oligonucleótidos 3A_{rt}pcr y 3AB-V (Tabla III), se pudo confirmar el mantenimiento de las mutaciones presentes en el ARN inoculado, sin aparición de otras mutaciones en la secuencia correspondiente a esta proteína.

Los resultados obtenidos en los ensayos de letalidad en los mutantes pMT28-Δ3A, pMT28-▼G-3A-▼G, pMT28-▼G-3A, pMT28-3A-VRE-C y pMT28-3A-VRE-I se correlacionan con los obtenidos al evaluar la capacidad de replicación viral en células BHK-21 (Tabla IV, Figuras 25 y 26). De manera que aquellos mutantes que no produjeron virus viable en células BHK-21 tampoco produjeron letalidad en ratón lactante. Por otro lado, los mutantes pMT28-Q44R y pMT28-C65S, que si produjeron virus viable en células en cultivo, mostraron una capacidad similar a la construcción pMT28 de producir letalidad en ratón lactante, manteniendo las mutaciones introducidas originalmente en su genoma.

Por otro lado, los mutantes pMT28-Q44D, pMT28-L38E y pMT28-L41E, no produjeron letalidad en ratón lactante a pesar de haber sido capaces de generar virus viable en células en cultivo tras la selección de variantes virales con sustituciones del aminoácido mutado en la secuencia de la proteína 3A. Este resultado sugiere que estos mutantes presentarían un defecto en su replicación/multiplicación que, aunque no impide la selección de virus viables en células en cultivo, si compromete seriamente la viabilidad del virus en el contexto de la infección de un hospedador animal.



Discusión

D Estudio funcional de la proteína 3A

Las PE de los virus normalmente poseen funciones bien definidas en el ciclo de replicación viral. Por el contrario, las PNE pueden estar implicadas en una mayor variedad de funciones, ya que intervienen en la replicación del genoma viral y son las responsables principales del conjunto de modificaciones de diferentes estructuras y procesos celulares necesarios para el progreso intracelular de la infección viral. Para el VFA se sabe que algunas de las PNE poseen más de una función. Esta multifuncionalidad, junto con la amplia red de interacciones en las que participan, ha complicado el esclarecimiento de sus funciones específicas.

La mayoría de la información que se tiene en la actualidad sobre la proteína 3A de los picornavirus se debe, en gran parte, a los estudios realizados con PV (Xiang *et al.*, 1995a; Lama *et al.*, 1995; Teterina *et al.*, 2003 y 2006; Choe *et al.*, 2005; Fujita *et al.*, 2007). Sin embargo, algunas de las funciones que realiza la proteína 3A del VFA, o las de alguno de los precursores proteolíticos de los que forma parte, parecen no coincidir con las descritas para otros picornavirus (Moffat *et al.*, 2005; O'Donnell *et al.*, 2001). Esto puede deberse, como previamente se ha comentado, a las importantes diferencias en la secuencia, fundamentalmente la longitud de la proteína 3A. Además, la presencia de tres copias de la proteína 3B, cuya expresión en células infectadas permite detectar los precursores 3AB, 3ABB y 3ABBB (García-Briones *et al.*, 2006), introduce un factor añadido de complejidad (revisado en Mason *et al.*, 2003).

Hasta la fecha, la mayoría de los datos obtenidos de estudios directos sobre la funcionalidad de la proteína 3A del VFA se derivan de análisis de mutantes seleccionados en la naturaleza o generados en el laboratorio, con cambios localizados en su región carboxi terminal (Giraudou *et al.*, 1990, Knowles *et al.*, 2001; Beard y Mason, 2000), como se resume en la Figura 6.

El diseño de mutantes para evaluar la funcionalidad de una proteína es una herramienta útil que se ha utilizado en el planteamiento experimental de esta Tesis en la que se ha realizado un análisis de la relevancia de diferentes dominios de la proteína 3A del VFA (Figura 19). Para ello, se han construido y analizado ARNs virales que incluyen la delección completa de 3A, su reemplazamiento por la proteína homóloga de otro picornavirus relacionado, así como mutaciones puntuales en residuos situados en su región amino terminal, que en otros picornavirus es esencial para diferentes funciones del ciclo viral (Wessels *et al.*, 2006).

Tabla X. Resumen de la funcionalidad de mutantes en la proteína 3A del VFA

Construcción	Traducción <i>in vitro</i> ¹	ECP BHK-21 ²	Síntesis proteínas ³	Síntesis ARN ⁴	Producción virus ⁵	Estabilidad secuencia	Complementación en <i>trans</i> ⁶	Letalidad en ratón lactante ⁷
pMT28	Normal	Normal (24 h.p.t.)	Si	Si	Si	Si	Si	Si
pMT28-Δ3A	Esperada ⁸	No	No	No	No	† ¹⁴	No	No
pMT28-▼G-3A	Normal	No	No	No	No	†	No	No
pMT28-▼G-3A-▼G	Alterada ⁹	No	No	No	No	†	No	No
pMT28-3A-VRE-C	Esperada	No ¹⁰	No	No	No	†	No	No
pMT28-3A-VRE-I	Esperada	No ¹⁰	No	No	No	†	No	No
pMT28-3A-VRE	Alterada	No ¹⁰	- ¹¹	-	No	-	-	-
pMT28-L38E	Normal	Retrasado	Si ¹²	Si	Si ¹³	Sustitución (E38V) ¹⁵	Si	No
pMT28-L41E	Normal	Retrasado	Si ¹²	Si	Si ¹³	Sustitución (E41A) ¹⁵	Si	No
pMT28-Q44D	Normal	Retrasado	Si	Si	Si ¹³	Sustitución(E44D) ¹⁵	Si	No
pMT28-Q44R	Normal	Normal	Si	Si	Si	Si	-	Si
pMT28-C65S	Normal	Normal	Si	Si	Si	Si	-	Si

¹ Figuras 19 a 23; ² Tabla IV; ³ Figuras 26 a 34; ⁴ Figuras 35 y 36; ⁵ Figuras 24 y 25; ⁶ Figuras 38 a 40; Tablas VII y VIII; ⁷ Tabla IX.

⁸ Las modificaciones observadas en la traducción *in vitro* se deben a la ausencia de la proteína deletionada o al distinto tamaño de la proteína 3A del VRE-A.

⁹ Se observan alteraciones en el patrón de traducción *in vitro* respecto al de pMT28 (Figuras 22 y 24).

¹⁰ ARN sin capacidad de producir ECP en células VERO (Tabla VI).

¹¹ No analizado.

¹² La expresión transitoria y aislada de la proteína 3A de los mutantes indicados presenta una distribución diferente de respecto a la de la proteína wt (Figura 35)

¹³ En los mutantes indicados, no se observaron placas de lisis al transferir monolayers de células BHK-21 con el ARN correspondiente, en presencia de medio semisólido (Figura 25).

¹⁴ No se detectó ARN viral (Figuras 35 y 36).

¹⁵ Se seleccionó la imposición de la sustitución del aminoácido indicado entre paréntesis (Tabla V).

D-1 Mutantes de delección de 3A

El reducido tamaño del genoma de los picornavirus, junto con el bajo número de proteínas virales maduras expresadas en células infectadas (15 en el caso del VFA), sugieren que los distintos precursores producidos durante el procesamiento de la poliproteína, que está estrictamente regulado tanto espacial como temporalmente (Kusov y Gauss-Muller, 1999), puedan realizar funciones diferentes a las de las proteínas maduras (Molla *et al.*, 1994). Además, una misma proteína madura podría ejercer funciones distintas dependiendo de la etapa del ciclo viral en que actúe y de las interacciones que establezca con otras proteínas o estructuras en la célula infectada. Este modelo de “economía de secuencia” sugiere que los picornavirus habrían evolucionado hacia una secuencia reducida en la que todas las regiones del genoma serían indispensables para la infectividad viral (revisado en Mason *et al.*, 2003). Sin embargo, ha sido posible recuperar virus viable a partir de un clon infeccioso del VFA en el que se eliminó la totalidad de la secuencia de la proteína L (Piccone *et al.*, 1995). Este virus mostró características de crecimiento en cultivos celulares similares a las del virus *wt*, aunque su grado de patogenicidad en vacas y cerdos fue mucho menor (Piccone *et al.*, 1995).

En el procesamiento de la poliproteína del VFA surgida de la traducción del ARN viral, la mayor parte de los cortes son llevados a cabo de una manera secuencial por la proteasa 3C, como se indica en la Figura 2. En otros picornavirus, 3C puede requerir la participación de otras PNE virales para el correcto procesamiento de la poliproteína viral (Molla *et al.*, 1994; Kusov y Gauss-Muller, 1999). Se ha descrito una estrecha relación de la proteína 3A de PV con la correcta expresión de proteínas maduras del genoma viral, ya que 3AB, uno de los precursores de 3A, tiene la capacidad de estimular la acción proteasa de 3CD (Molla *et al.*, 1994).

Teniendo esto en cuenta, el primer objetivo planteado fue estudiar el efecto de la eliminación de la secuencia de la proteína 3A del VFA sobre la síntesis y el patrón de procesamiento de la poliproteína viral, así como confirmar su esencialidad para el desarrollo del ciclo del virus. Para ello, se abordó la generación y el estudio de dos mutantes de delección de la proteína 3A, pC- Δ 3A y pMT28- Δ 3A. El diseño de estas delecciones se hizo basándose en la información de la que se disponía al comienzo de esta Tesis Doctoral, que indicaba la existencia de un alto grado de conservación en los residuos adyacentes a cada uno de los lados del sitio de corte de la proteasa 3C en las uniones 2C/3A y 3A/3B1 (Ryan *et al.*, 2004; Carrillo *et al.*, 2005). Pese a haberse

identificado el enlace peptídico diana de 3C entre las proteínas 2C/3A (Q/I) y 3A/3B1 (E/G), no se conocía el número de aminoácidos flanqueantes necesarios en cada caso para la correcta escisión de la proteína 3A. Sin embargo, se sabía que existían aislados virales de distintos serotipos que presentaban alteraciones respecto a la secuencia consenso de la región de corte de la proteasa 3C en el tercer aminoácido del extremo amino terminal y en el antepenúltimo del extremo carboxi terminal (Ryan *et al.*, 2004).

En el diseño de la construcción pMT28- Δ 3A se decidió mantener los 4 primeros y los 3 últimos aminoácidos de la proteína 3A (Figura 14), además de introducir un residuo adicional entre ambos grupos de aminoácidos, cuyo codón codificante generara un sitio de restricción que permitiese el reemplazamiento directo de 3A, según se indica en R-1-1. La introducción de este sitio de corte fue necesario dada la falta de dianas de restricción únicas en la secuencia de 3A del VFA C-S8c1 o en las secuencias flanqueantes próximas. Así, se insertó un sitio de corte Xma I, que únicamente implicaba la inserción de un aminoácido pequeño como G, para minimizar posibles efectos de su inserción sobre el resto de la proteína. El caso de que la secuencia de aminoácidos diana requerida por la proteasa 3C para la proteólisis de 3A fuera más extensa que la mantenida en el mutante pMT28- Δ 3A, ya se había contemplado en el diseño del mutante pC- Δ 3A. En este mutante, la delección de 3A no introducía ninguna secuencia adicional, conservándose 8 aminoácidos del extremo amino terminal y otros 8 aminoácidos del extremo carboxi terminal de la proteína. De esta manera se aseguraba que al menos uno de los mutantes de delección construidos presentara un correcto procesamiento de la unión 2C/ Δ 3A y Δ 3A/3B1.

Los resultados obtenidos muestran que la delección de la proteína 3A, ya sea en el contexto de secuencia completa de serotipo C del plásmido pMT28- Δ 3A o en el contexto quimérico del plásmido pC (pC- Δ 3A), únicamente provocó la desaparición de una serie de proteínas en los ensayos de traducción *in vitro* (Figura 20) que por inmunoprecipitación, se identificaron como 3A y sus precursores 3AB, 3ABB, 3ABBB y 3ABBBC (Figura 21). Este resultado indica que los cuatro aminoácidos correspondientes al extremo amino terminal y/o los tres aminoácidos correspondientes al extremo carboxi terminal de 3A mantenidos en el mutante pMT29- Δ 3A, serían suficientes para permitir la escisión entre 2C/3A y/o 3A/3B1 por la proteasa 3C. De no haberse producido ninguno de los dos cortes, se hubiera observado un cambio de movilidad electroforética de la proteína 2C, que se hubiera mantenido unida a 3B1.

Por otro lado, estos resultados también muestran que la falta de la proteína 3A y sus precursores no parece afectar al procesamiento del resto de las proteínas virales en las condiciones del ensayo de traducción *in vitro* empleado (Figura 20). Esto sugiere que en el VFA, 3A no estaría implicada en la maduración *in vitro* de la poliproteína viral, como si ocurre en otros picornavirus (Molla *et al.*, 1994; Kusov y Gauss-Muller, 1999). Conviene indicar que el patrón de proteólisis observado en sistemas *in vitro* no es directamente comparable con el producido *in vivo*, donde pueden influir otros factores tales como el nivel de exposición del sustrato, la presencia de cofactores de la proteasa viral o posibles modificaciones postraduccionales (Ryan y Flint, 1997; Blair *et al.*, 1993; Lama *et al.*, 1994). No obstante, aunque los resultados obtenidos con los mutantes pMT28- Δ 3A y pC- Δ 3A no permiten descartar la colaboración de 3A en el procesamiento proteolítico *in vivo*, sugieren que la proteasa 3C no necesita de 3A para realizarlo.

Como ya se mencionó previamente, el VFA puede mantener la viabilidad a pesar de la pérdida de una parte importante de la región carboxi terminal de la proteína 3A (Giraud *et al.*, 1990; Beard y Mason, 2000; Knowles *et al.*, 2001; Pacheco *et al.*, 2003). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que la delección de la proteína 3A completa eliminó la patogenicidad del ARN en células BHK-21 y resultó letal para el mismo en esta línea celular y en ratón lactante, a pesar de que no se observaron alteraciones en el procesamiento proteolítico *in vitro* adicionales a la esperada desaparición de 3A y sus precursores (Tabla X). Esto parece indicar que la proteína 3A es esencial para algún paso específico del ciclo viral, independiente del correcto procesamiento de la poliproteína. De hecho, en ninguno de los mutantes de delección de 3A se pudo detectar síntesis en cultivos celulares de proteínas y precursores proteicos virales (Figura 27), lo que sugiere que la falta de 3A estaría afectando a la primera ronda de traducción inmediatamente posterior a la transfección/liberación del ARN viral, o bien a un paso temprano de la posterior replicación viral.

Se ha descrito que la proteína 3A es necesaria para la replicación del ARN de picornavirus a diferentes niveles (Lama *et al.*, 1995; Towner *et al.*, 1996; Teterina *et al.*, 2003 y 2006). Así, el precursor 3AB de PV puede unirse de manera no específica al ARN viral y, por otra parte, establecer una interacción directa con 3D (Lama *et al.*, 1995; Paul *et al.*, 1994). Esta interacción es importante para la replicación del virus, ya que mutantes con la capacidad de interacción de 3AB con 3D alterada, sintetizaron un

90% menos de moléculas de ARN tanto de polaridad positiva como de negativa, lo que redujo drásticamente el título viral obtenido (Lama *et al.*, 1995).

Los resultados obtenidos mediante la cuantificación por *real-time* PCR han confirmado la incapacidad del mutante de delección pMT28- Δ 3A para sintetizar ARN, tanto de polaridad positiva como negativa (Figuras 36 y 37). Este defecto en la replicación del ARN viral explicaría la ausencia de síntesis protéica, de producción de virus y de citopatogenicidad observadas tras la transfección con el ARN de este mutante en cultivos celulares.

La ausencia de replicación del ARN de los mutantes de delección podría deberse a una incorrecta formación de los complejos de replicación. Tanto la proteína 3A del VFA como su precursor 3AB se asocian a membranas en las células infectadas (Moffat *et al.*, 2005; García-Briones *et al.*, 2006). La proteína 3B, por su carácter de proteína básica, tiene poca probabilidad de localizarse en membranas donde se forman los complejos de replicación, si no es en forma de su precursor 3AB_(n), (Semler *et al.*, 1982, Bienz *et al.*, 1987). La ausencia de la proteína 3A en los mutantes pMT28- Δ 3A y pC- Δ 3A impediría, por tanto, el reclutamiento de proteína 3B en membranas, donde su presencia es necesaria como cebador de la síntesis de ARN viral (ver I-2-3-3). Además, como se ha observado en PV, la falta de 3A podría alterar las interacciones entre proteínas que participan en el complejo de replicación, como 3CD, y el ARN viral.

Una estrategia interesante para caracterizar el efecto de este tipo de mutaciones es el estudio de su posible rescate cuando se aporta en *trans* la proteína *wt*. De hecho, el efecto de mutaciones letales en distintas PNE sobre la replicación de distintos picornavirus puede ser rescatado por la complementación en *trans* de las respectivas proteínas *wt* (Bernstein *et al.*, 1986; Charini *et al.*, 1991; Teterina *et al.*, 1995), incluyendo mutantes letales en la proteína 3B de PV, mediante la expresión en *trans* del precursor de proteólisis 3AB a partir de un ARN bicistrónico (Cao y Wimmer, 1995). La metodología empleada en estos casos abarcaba tanto la utilización de virus auxiliares como la transfección transitoria de las distintas PNE. Sin embargo, la expresión en *trans* de altos niveles de PNE produce efectos citotóxicos que complican la interpretación de los resultados de complementación. (García-Briones *et al.*, 2006).

Durante el desarrollo de esta Tesis, se ha contribuido a la caracterización de clones de células BHK-21 que expresan establemente las proteínas 3A y 3ABBB (Rosas *et al.*, 2008). Estos clones permiten disponer de una población homogénea de células

que expresan la proteína de interés a niveles inferiores a los producidos en su expresión transitoria, y no producen los efectos citotóxicos observados en ésta. Además, el título viral recuperado tras la infección de estos clones con VFA C-S8c1 es significativamente mayor que el recuperado de células BHK-21 (Rosas *et al.*, 2008). Por todo ello, dos de estos clones que expresaban 3A o 3ABBB fueron empleados para realizar transfecciones con el ARN de los distintos mutantes generados.

Los resultados obtenidos con el mutante pMT28- Δ 3A indican que las funciones de la proteína 3A del VFA no pueden ser complementadas en *trans* por la propia proteína madura o su precursor 3ABBB (Tabla VII). Sin embargo, no se puede descartar una posible complementación funcional de los mutantes de delección de 3A mediante la expresión en *trans* de otros precursores de la proteína 3A como 3ABBBC o P3, ya que datos previos para otros picornavirus sugieren que se necesitarían precursores de proteólisis mayores que 3ABBB aportados en *trans* para que pudieran participar en un ensamblaje funcional del complejo de replicación viral (Towner *et al.*, 1998).

D-2 Mutantes de sustitución por la proteína 3A del VRE-A

La construcción de virus quiméricos ha permitido demostrar la presencia, en distintos picornavirus, de dominios funcionales intercambiables en las regiones no codificantes del genoma y en las secuencias de diversas proteínas virales (Alexander *et al.*, 1994; Rohll *et al.*, 1994; Xiang *et al.*, 1995a; Ohlmann y Jackson, 1999; Paul y Michiels, 2006; Lu *et al.*, 1995).

La proteína 3A es una de las que más varían entre los distintos serotipos del VFA (Carrillo *et al.*, 2005). Además, como se explica en la Introducción (I-2-4), tiene marcadas diferencias de secuencia respecto a las proteínas 3A del resto de picornavirus, que podrían explicar las diferencias funcionales observadas (Moffat *et al.*, 2005, O'Donnell *et al.*, 2001). Esto condicionaba la elección de la proteína candidata para sustituir a la proteína 3A del VFA en los mutantes de sustitución que nos planteamos realizar.

Una de las funciones de la proteína 3A de los picornavirus, aunque con mecanismos distintos según el virus, es la de participar en la proliferación de membranas en el citoplasma de la célula infectada mediante el reclutamiento de diversos GEFs (ver I-2-4 “La proteína 3A de los picornavirus”). Para algunos picornavirus como PV se ha documentado que la BFA se une y bloquea a esos mismos GEFs, bloqueando la replicación viral al impedir la formación de vesículas donde tiene

lugar dicha etapa de la replicación viral (Wessels *et al.*, 2006; Belov *et al.*, 2008). Sin embargo, para otros picornavirus como el VFA, la BFA no inhibe la replicación viral (O'Donnell *et al.*, 2001; Martín-Acebes *et al.*, 2008). Este hecho es probablemente debido a la interacción de la proteína 3A del VFA con moléculas GEFs distintas a las que interaccionan con BFA. Así, el comportamiento de los picornavirus frente a la acción de la BFA indica analogías en el tipo de mecanismo de reclutamiento de endomembranas para la formación del complejo de replicación.

El virus VRE-A forma parte, junto con el VFA, del género *Aphthovirus*. Aunque ambos virus muestran diferencias en la secuencia de 3A, los datos obtenidos indican que el VRE-A no es sensible a la acción de la BFA (Figura 16), lo que supone una analogía funcional con la proteína 3A del VFA. Sin embargo, los distintos mutantes de sustitución de la proteína 3A del VFA por la proteína 3A del VRE-A (mutantes pMT28-3A-VRE, pMT28-3A-VRE-C y pMT28-3A-VRE-I), no fueron capaces de producir patogenicidad ni virus infectivo tanto en células BHK-21, como en ratón lactante (Tabla X).

En el caso concreto del mutante pMT28-3A-VRE, su falta de viabilidad podría deberse, entre otras causas, al procesamiento alterado de la poliproteína viral como indican los resultados de traducción *in vitro* (Figura 24). Por otro lado, en los mutantes pMT28-3A-VRE-C y pMT28-3A-VRE-I no se detectaron alteraciones en el procesamiento de la proteínas, salvo el esperado aumento en la movilidad de las proteínas que portaban la secuencia de 3A del VRE-A.

Una posible explicación para la alteración del procesamiento proteolítico en el mutante pMT28-3A-VRE es el hecho de que en la secuencia próxima a la diana del corte 2C/3A por la proteasa 3C se encuentran muy cercanos entre sí dos residuos de aminoácidos cíclicos (P4 en la secuencia del VFA y W7 en la secuencia del VRE-A) que podrían modificar la estructura tridimensional de la región, alterando el procesamiento canónico.

En cualquier caso, el comportamiento del ARN de los mutantes pMT28-3A-VRE-C y pMT28-3A-VRE-I, que no muestran modificaciones importantes en su patrón de procesamiento proteolítico, indica que este paso no parece ser el responsable de su falta de viabilidad. En este sentido, se ha descrito la generación de picornavirus quiméricos para distintas PNE en los que el procesamiento proteolítico *in vitro* no se vio alterado por la presencia de estos cambios, aunque la mayor parte de los mutantes fueron incapaces de replicar eficientemente (Van Kuppeveld *et al.*, 1997).

De hecho, ninguno de los ARNs de los mutantes de reemplazamiento estudiados fue capaz, cuando se transfectó en células BHK-21, de sintetizar proteínas virales (Figura 28), ARN+ y ARN- (Figura 37). El conjunto de los resultados sugiere que la proteína 3A del VRE-A no es capaz de realizar todas las funciones esenciales de la proteína 3A del VFA, que serían altamente dependientes de la secuencia de cada proteína. Como se ha comentado para los mutantes de delección, el motivo de la inviabilidad de los mutantes de sustitución pudiera deberse a un bloqueo severo en las primeras etapas de síntesis de ARN.

La posibilidad de que el ARN de los mutantes de reemplazamiento con la 3A del VRE-A pudiesen replicar y producir virus infeccioso en células VERO no era excluible, ya que la proteína 3A de picornavirus se ha implicado en el rango de hospedador celular (Lama *et al.*, 1998). El VRE-A es capaz de crecer en células VERO y no en BHK-21, mientras que el VFA C-S8c1 muestra el comportamiento contrario, no creciendo en células VERO. Aunque no existía ninguna publicación que explicara este comportamiento, la incapacidad del VFA para infectar células VERO podía deberse a la falta de receptores adecuados en esta línea celular. De hecho, los resultados obtenidos indican que, mientras que no se produjo ECP tras la transfección de células VERO con ARN de pMT28 y de los mutantes de reemplazamiento (Tabla VI), únicamente se observó fluorescencia frente a ARN de doble banda en un pequeño porcentaje de células transfectadas con el ARN de pMT28. Este resultado apoya la falta de receptores específicos para el VFA en células VERO y sugiere que los mutantes que portan la 3A del VRE-A, tampoco pueden replicar y expresar sus proteínas en células VERO.

El aporte de las proteínas 3A o 3ABBB en *trans* no permitió recuperar virus infeccioso a partir del ARN de los mutantes de reemplazamiento (Tabla X y Figura 40). Este dato concuerda con lo descrito para otros picornavirus (Towner *et al.*, 1998). Esta falta de complementación sugiere que, como se observó con el mutante de delección pMT28- Δ 3A, la expresión en *trans* de 3A o 3ABBB no fue capaz de rescatar el defecto del ARN de los mutantes de reemplazo.

D-3 Mutantes de inserción

En diferentes picornavirus, alteraciones en la escisión de la proteína 3A por la proteasa 3C, pueden afectar en distinto grado a la viabilidad viral (Kusov y Gauss-Muller, 1999; Hall y Palmenberg, 1996). Los resultados obtenidos al estudiar el procesamiento proteolítico del mutante pMT28- Δ 3A indicaban que, bien los cuatro

aminoácidos mantenidos en el extremo amino terminal y/o los 3 aminoácidos del extremo carboxi terminal de la proteína 3A residual, eran suficientes para mantener la estructura diana de proteólisis por parte de 3C. En este sentido, se ha descrito recientemente mediante el empleo de péptidos sintéticos, que la secuencia entre las proteínas VP1/2A necesita de al menos 4 aminoácidos a cada lado del sitio de corte Q/L para que éste sea procesado por la proteasa 3C del VFA (Birtley *et al.*, 2005).

La construcción de los mutantes pMT28-▼G-3A y pMT28-▼G-3A-▼G ha permitido estudiar las implicaciones de modificaciones en estas secuencias terminales de 3A en el correcto procesamiento de la proteína. Así pues, mientras que la poliproteína del mutante pMT28-▼G-3A fue capaz de procesarse correctamente, la del mutante pMT28-▼G-3A-▼G presentó un procesamiento alterado, similar al encontrado en el mutante pMT28-Δ3A, carente de 3A (Figura 22). Estas diferencias de comportamiento pueden explicarse atendiendo a la localización de las inserciones introducidas en la construcción de cada uno de estos mutantes. En el caso de pMT28-▼G-3A los datos fueron coherentes con los mutantes pMT28-3A-VRE-C y pMT28-3A-VRE-I, indicando que la inserción de un único residuo de G en la posición 5 de la secuencia de 3A, no altera el reconocimiento del sustrato por parte de la proteasa 3C. Sin embargo, para el mutante pMT28-▼G-3A-▼G – en el que la única modificación respecto al mutante pMT28-▼G-3A es la inserción de una segunda G en la posición 151 – la alteración observada en el patrón de traducción *in vitro* indica que la conservación de sólo tres aminoácidos del extremo carboxi terminal de 3A produce una acumulación del precursor 3ABBB (Figura 22). Dado que experimentalmente, no se pudo distinguir la proteína 3A de 3AB en estos análisis de SDS-PAGE, no se tiene evidencia directa de que la proteasa 3C no esté cortando la unión 3A/B. No obstante, se observó una alteración consistente en el acúmulo de 3ABBB antes descrito y el descenso de la proporción de otros precursores como 3ABBBC, que indicaría que, aunque este corte esté teniendo lugar, se produce una desregulación de los precursores proteicos producidos.

El ARN del mutante pMT28-▼G-3A-▼G no generó patogenicidad ni en los ensayos *in vitro* ni en ratón lactante (Tabla X). Además, tampoco se pudo complementar su defecto de infectividad mediante la expresión *in trans* con las proteínas 3A/3ABBB (Tabla VII).

En el virus de la Hepatitis A y en EMCV, los intentos de bloquear o de incrementar la eficiencia del procesamiento proteolítico dentro de la región P3 mediante

mutaciones puntuales en las dianas de reconocimiento de la proteasa 3C provocan un severo descenso en la infectividad *in vitro* de dichos mutantes (Kusov *et al.*, 1999; Hall y Palmenberg, 1996). En ambos casos se ha demostrado que el procesamiento anómalo de la región P3 tiene como consecuencia variaciones en la concentración de diversos precursores de proteólisis, algunos de los cuales están implicado en el proceso de replicación del ARN viral (3AB), mientras que otros (3ABC) pueden afectar al procesamiento proteolítico de las proteínas estructurales de la región P1 y participar en el proceso de encapsidación viral (Kusov y Gauss-Muller, 1999).

La falta de infectividad del mutante pMT28-▼G-3A-▼G y su incapacidad para replicar el ARN viral (Figuras 36 y 37) podría explicarse por algún fenómeno similar a lo anteriormente comentado, en el que la concentración de alguno de los precursores de proteólisis estuviera afectando algún paso del ciclo infectivo viral.

A pesar de su capacidad para producir y procesar correctamente la proteína viral *in vitro*, el ARN del mutante pMT28-▼G-3A se comportó igual que el de pMT28-▼G-3A-▼G en el resto de los ensayos, no siendo viable y no pudiendo ser complementado por la expresión en *trans* de 3A o 3ABBB (Tabla X). Por el momento, no se tiene una hipótesis clara de cómo la inserción de un único residuo no cargado, que parece no afectar a la traducción y procesamiento de la poliproteína viral, puede tener un efecto deletéreo en la replicación viral. El modelo estructural utilizado en esta Tesis (Figura 18) predice que la región amino terminal de 3A no presenta conformación estable, apareciendo como una región, en principio, desestructurada. Sin embargo, no es descartable que, desde un punto de vista funcional, requiera de un cierto grado de conformación que se impida con la inserción de una G en la posición 5. Por otra parte, la secuencia del extremo amino terminal, donde se localiza la inserción 5▼G, es la región más conservada de 3A entre los distintos serotipos del VFA (Carrillo *et al.*, 2005), lo que sugiere su relevancia para el virus. No existen evidencias previas que relacionen la región amino terminal de la proteína 3A del VFA con su funcionalidad. Sin embargo, los resultados obtenidos con el mutante pMT28-▼G-3A indican que la integridad de los 5 primeros residuos de 3A es esencial para la síntesis del ARN viral. Por otro lado, estudios realizados con la proteína 3A de PV han demostrado que la delección de los primeros 10 aminoácidos o la inserción de un aminoácido entre los residuos 15 y 16 tiene como consecuencia una alteración en la capacidad de esta proteína para inhibir el tráfico de proteínas celulares (Doedens *et al.*, 1997).

D-4 Mutante pMT28-C65S

Se ha descrito que la proteína 3A de PV (Lama *et al.*, 1994; Xiang *et al.*, 1998) y su precursor 3AB (Lyle *et al.*, 2002; Towner *et al.*, 1996; Xiang *et al.*, 1998), son capaces de formar estructuras de dímeros o multímeros, y de interaccionar con diversas proteínas virales maduras, intermedios de proteólisis y proteínas celulares para realizar diversas funciones en el ciclo de replicación del virus (Lama *et al.*, 1994; Belov *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 1998).

Algunos autores han descrito la relevancia de distintos residuos en el dominio hidrofóbico de la proteína 3A de PV para el establecimiento de uniones intermoleculares (Xiang *et al.*, 1998) y la correcta síntesis de ARN⁺ (Teterina *et al.*, 2003). Sin embargo, otros autores proponen que, en ausencia del dominio hidrofóbico, se mantiene la capacidad de dimerización de la proteína 3A (Strauss *et al.*, 2003).

Por otro lado, existen evidencias de la importancia de los residuos de C en el establecimiento de interacciones homo y heteroproteicas de diversas proteínas (Ray *et al.*, 1999). La única C presente en la secuencia aminoacídica de la proteína 3A del VFA C-S8c1 (C65) se localiza dentro del dominio hidrofóbico. Esta C podría participar en interacciones intermoleculares de importancia con otras proteínas durante el ciclo infectivo viral. Sin embargo, la mutación C65S presente en el mutante pMT28-C65S no afectó a la viabilidad viral y el grado de patogenicidad, tanto en ensayos *in vitro*, como *in vivo* (Tabla X), comportándose en todos los experimentos realizados como el control positivo pMT28. Este resultado sugiere que la proteína 3A del VFA no establecería interacciones esenciales para la replicación del virus con otras proteínas virales o celulares a través de uniones de ese residuo de C.

D-5 Mutantes pMT28-Q44R y pMT28-Q44D

La adaptación del VFA C-S8c1 a cobaya implica la selección de virus con tres mutaciones en su secuencia (L248T en 2C; L147P en VP1 y Q44R en 3A), siendo la mutación Q44R en la proteína 3A suficiente por sí misma para conferir la adaptación a esta especie (Núñez *et al.*, 2001). El residuo Q44 se encuentra muy conservado entre VFAs de diferentes serotipos (Carrillo *et al.*, 2005). Este residuo se localiza antes del dominio hidrofóbico y se encuentra inmediatamente adyacente a uno de los dos grupos de aminoácidos (posiciones 37-43) que se predice se estructuran en forma de α -hélice (Figura 19) y que, como se comentará en el siguiente apartado, podrían actuar como interfase de dimerización de 3A. Se ha descrito también una mutación en el mismo

residuo (Q44H), seleccionada en VFAs sometidos a pases en huevos embrionados, que es responsable de la atenuación del virus en ganado vacuno (Giraudou *et al.*, 1990). Además, la mutación de un residuo ubicado en una región equivalente de la proteína 3A de PV (I46T), elimina la capacidad del virus para generar ECP en algunas líneas celulares susceptibles (Lama *et al.*, 1998).

El mutante pMT28-Q44R analizado en esta Tesis Doctoral contiene la secuencia de nucleótidos correspondiente al VFA C-S8c1 adaptado a cobaya, cuya única diferencia respecto a la de pMT28 es la mutación responsable de la sustitución de un residuo de carga neutra (Q) por otro de carga positiva (R) en la posición 44 de 3A. El ARN de este mutante se comportó en todos los ensayos realizados de manera similar al de el control pMT28 (Tabla X), como ya había sido descrito para un ARN quimérico que contenía esta mutación en un contexto heterotípico de secuencia (Núñez *et al.*, 2001).

Con el objetivo de explorar la tolerancia al cambio de esta posición de 3A, se construyó el mutante pMT28-Q44D, en el que el la carga del aminoácido introducido (D) fue negativa. En cultivos celulares, este mutante fue capaz de crecer, de producir ECP y de sintetizar proteínas, aunque con un marcado retraso respecto a pMT28 y al mutante pMT28-Q44R (Tabla X). El virus recuperado a tiempos tardíos tras la transfección con el ARN del mutante pMT28-Q44D mostró la imposición en la secuencia de 3A de una única mutación responsable de la sustitución D44E (Tabla V). Este resultado indica que, aunque la sustitución Q44D afecta de manera importante a la replicación viral ya que solo se recuperó virus con la sustitución D44E, debe permitir un nivel de replicación que, aunque reducido, hace posible la generación y selección de mutantes con mayor capacidad de multiplicación (*fitness*). De hecho, el ARN de pMT28-Q44D fue capaz de expresar y procesar *in vitro* la poliproteína viral de forma similar a la del control pMT28 (Figura 23).

Por otra parte, el ARN de este mutante no fue capaz de infectar a ratones lactantes (Tabla IX), lo que sugiere que las condiciones para la replicación e infectividad de este mutante en ratón son mas restrictivas que las que impone el crecimiento en células BHK-21, no permitiendo un nivel de replicación suficiente para la generación y selección de variantes con mayor *fitness*.

La sustitución D44E encontrada en los virus recuperados de la transfección mantiene la carga electrostática, aunque introduciendo un aminoácido cuya estructura es más semejante a la del aminoácido presente en pMT28 (Q) y con un valor de pKa

correspondiente a su cadena lateral superior a la del residuo D presente en el mutante de partida pMT28-Q44D (Tabla V). La mutación presente en la sustitución D44E del virus recuperado supone una transversión (T→A) en el tercer nucleótido del codón correspondiente al residuo 44. Al analizar las posibles mutaciones puntuales en este codón que dieran como resultado un cambio de aminoácido, se observa que, aunque la modificación del tercer nucleótido provoca la inserción de un aminoácido de carácter ácido, la modificación del primer o del segundo nucleótido hubiera dado lugar a la introducción de aminoácidos (N entre otros) en principio más parecidos al residuo presente en pMT28 (Q). Por ello, no se puede descartar la presencia de mutaciones en otras zonas de la secuencia del virus recuperado con la mutación D44E, que pudieran compensar la introducción de un aminoácido cargado negativamente en esta posición, en detrimento de otros posibles aminoácidos. En cualquier caso, la selección de variantes con la sustitución D44E se observó en las tres transfecciones independientes realizadas con ARN de pMT28 -Q44D, lo que sugiere que esta es una solución biológica frecuente para el escape viral de la mutación Q44D.

El adelanto en la aparición de ECP tras la transfección y posteriores pases del ARN del mutante pMT28-Q44D en células de los clones 3A242 y 3ABBB209 (Tabla VIII y Figura 40) indica una aceleración del proceso de selección de variantes virales. Este resultado sugiere que, a diferencia de lo observado con los mutantes de delección, sustitución e inserción, la expresión en *trans* de 3A o 3ABBB puede complementar, en cierta medida, el defecto asociado a la sustitución Q44D de 3A

Todo ello indica que la posición 44 de la proteína 3A del VFA tolera cambios de aminoácido incluyendo sustituciones que implican cambio neto de carga electrostática como Q44R. Sin embargo, esta tolerancia es limitada, ya que la sustitución Q44D que provoca un cambio a un aminoácido cargado nativamente tuvo como efecto la incapacidad del ARN para infectar ratones lactantes, y solo permitió recuperar, tras su transfección en células BHK-21, virus con la sustitución D44E.

D-6 Mutantes pMT28-L38E y pMT28-L41E

Las estructuras de α -hélice ubicadas en la región amino terminal de la proteína 3A de los picornavirus parecen ser importantes para la capacidad de 3A para establecer interacciones proteína-proteína (Strauss *et al.*, 2003). En el VFA, por analogía con PV, se predice que los residuos comprendidos entre las posiciones 26-33 y 37-43 de 3A adoptan una estructura de α -hélice que puede mediar la dimerización intermolecular de

esta proteína (Figura 18). Los aminoácidos hidrofóbicos L38 y L41 se predicen como importantes para el establecimiento de interacciones intermoleculares de esta región y, como se ha comentado previamente (R-1-4 “Mutantes puntuales”), son los únicos residuos invariantes en esta región entre VFAs de diferente serotipo (Carrillo et al., 2005). Para estimar la contribución de los residuos L38 y L41 a la viabilidad del virus, se decidió introducir sustituciones que implicaran cambios drásticos en estas posiciones, con el objetivo principal de desestabilizar las interacciones intramoleculares en que pudieran estar implicados. Para ello se construyeron los mutantes pMT28-L38E y pMT28-L41E, en los que el correspondiente residuo apolar (L) fue sustituido por un aminoácido cargado negativamente (E).

El comportamiento de ambos mutantes fue similar al descrito para el mutante pMT28-Q44D. Así, aunque no se detectaron modificaciones en el procesamiento *in vitro* de la poliproteína viral, se observó un marcado retraso en la producción de ECP, de virus y de proteínas virales respecto al control pMT28 (Tabla X). Por otro lado, la introducción de un aminoácido de carga electrostática negativa ya sea en la posición L38 o en la L41, retrasó (pero no eliminó) la capacidad replicativa de los ARN generados, permitiendo la selección (Tabla IV y Tabla V) de variantes más ventajosas para el virus. El análisis de la secuencia correspondiente a la proteína 3A en las poblaciones de virus recuperadas de las tres trasfecciones realizadas con ARN de pMT28-L38E y pMT28-L41E, mostró la imposición de transversiones (A→T en el virus con la mutación E38V; A→C en el virus con la mutación E41A) en el segundo nucleótido de cada codón, responsables de la recuperación en cada mutante de un aminoácido de carácter hidrofóbico. Por tanto, el mantenimiento del carácter hidrofóbico de los aminoácidos en estas posiciones de la proteína 3A, aunque no es esencial para la replicación viral ya que su alteración permitió la selección de variantes virales, si es necesario para la producción de virus infeccioso en cultivos celulares.

De manera similar a lo observado con el mutante pMT28-Q44D, el ARN de los mutantes pMT28-L38E y pMT28-L41E no fue capaz de producir letalidad en ratón lactante (Tabla IX), sugiriendo que estas mutaciones, que permiten la recuperación de virus infeccioso en cultivos celulares a tiempos tardíos postransfección, son letales en un modelo animal como el ratón lactante.

Por otro lado, se comprobó que la expresión en *trans* de las proteínas 3A o 3ABBB *wt* fue capaz de producir un adelantamiento en la aparición de ECP y de virus infeccioso en clones celulares transfectados con ARN de los mutantes pMT28-L38E y

pMT28-L41E (Tabla VIII y Figura 40). Este resultado, junto con las observaciones similares realizadas para el mutante pMT28-Q44D, apoya la posibilidad de complementación de estas mutaciones por la expresión en *trans* de 3A *wt*. Esta complementación tendría únicamente lugar cuando las mutaciones introducidas en la secuencia de la proteína 3A no son letales para la viabilidad viral en células en cultivo (Tabla X).

La distribución celular de las proteínas 3A mutadas L38E y L41E fue diferente al de la proteína *wt* cuando se expresaron transitoriamente en células BHK-21 a partir de derivados del vector pRSV (Fig.35), apreciándose pequeños agregados compatibles con un patrón vesicular. Este patrón fue similar al encontrado en un pequeño porcentaje de las células tras 48 h.p.t. con ARN de la construcción pMT28-L38E (Figura 31 y 33), y podría corresponder a células en las que la expresión de la proteína mutada hubiese tenido lugar y fuera detectable. Estos resultados indican que la sustitución L38E puede modificar la localización subcelular de 3A cuando se expresa transitoriamente de forma individual y sugieren que esto podría ocurrir también en un estadio inicial de la infección observada tras la transfección de células BHK-21 con ARN del mutante pMT28-L38E. En este sentido, sería interesante determinar si este patrón alterado de localización subcelular se observa en mayor porcentaje a tiempos postransfección anteriores a 48 h.

El conjunto de estos resultados sugiere que las sustituciones L38E y L41E, localizadas en la interfaz hidrofóbica que se predice en la proteína 3A, pueden alterar la distribución subcelular de esta proteína, y que esta alteración se asocia con una drástica disminución de la capacidad replicativa del virus, lo que lleva a la selección de variantes con sustituciones en estas posiciones que restauran la viabilidad viral.

D-7 Consideraciones finales

El estudio de la relación estructura-función de las proteínas de picornavirus, y en particular de la proteína 3A del VFA, es complejo. Esto es debido, por una parte, al posible efecto de las mutaciones sobre el adecuado procesamiento de la poliproteína viral (en particular aquellas cercanas a los sitios de corte de la proteasa viral 3C) y, por otra, a la implicación de muchas de sus PNE en diferentes funciones dentro del ciclo viral.

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha constituido una primera aproximación al análisis del efecto de diferentes mutaciones en la proteína 3A sobre la

infectividad del VFA, cuyos resultados abren interesantes posibilidades para un análisis más detallado de esta proteína. Por una parte, se han obtenido evidencias que confirman, como inicialmente se esperaba, que la proteína 3A es esencial para la viabilidad del virus y que indican que alteraciones de los aminoácidos presentes en los extremos de 3A pueden ser letales para el mismo, aunque no afecten a la traducción in vitro de su ARN, como ocurre con la inserción 5▼G.

Por otra parte, el análisis de los mutantes en la región amino terminal ha permitido identificar posiciones en las que mutaciones drásticas que modifica la carga del aminoácido no son letales para el virus en cultivos celulares, donde se acaban seleccionando variantes en cultivos celulares en los que el cambio introducido es sustituido por una mutación menos drástica, y si lo son en un modelo animal como el ratón lactante. Estas mutaciones se localizan en la interfaz hidrofóbica que se predice entre los aminoácidos 23-43 y en la posición 44, por lo que esta región es una candidata interesante para llevar a cabo un análisis sistemático del efecto de mutaciones, no solo de naturaleza drástica como las empleadas en esta primera aproximación.

De esta manera, mientras que la mayor parte de la porción carboxi terminal de la proteína 3A del VFA puede ser prescindible para la viabilidad del VFA (Giraudó *et al.*, 1990; Knowles *et al.*, 2001; Pacheco *et al.*, 2003), los resultados obtenidos indican que los residuos de la región amino terminal, mucho más conservada entre distintos serotipos del VFA, contribuyen de manera esencial a la replicación y multiplicación del virus.



Conclusiones

1. La delección de la proteína 3A es letal para la infectividad en células BHK-21 del ARN del VFA C-S8c1, a pesar de que su ausencia no produce alteraciones del patrón de procesamiento proteolítico *in vitro* de la poliproteína viral.
2. La inserción de dos glicinas, una en la posición 5 y otra en la posición 151 de la proteína 3A, provoca un procesamiento anómalo de la poliproteína viral que posiblemente sea el causante de la falta de infectividad de este ARN en células BHK-21. Sin embargo, la inserción de una única glicina en la posición 5 de la proteína 3A no afecta al procesamiento de la poliproteína viral, aunque si produce inhibición en la síntesis de ARN⁺ y ARN⁻, sugiriendo que la inserción de esta glicina altera algún motivo esencial para la síntesis del ARN viral.
3. La sustitución de la proteína 3A del VFA por la del VRE-A es letal para la infectividad del ARN. Tanto con el mutante pMT28-3A-VRE, que presenta un procesamiento proteolítico alterado, como con los mutantes pMT28-3A-VRE-C y pMT28-3A-VRE-I, en los que este procesamiento no se encuentra alterado, se observa una inhibición en la síntesis de ARN⁺ y ARN⁻.
4. La sustitución de la única cisteína de la proteína 3A, presente en su dominio hidrofóbico, no afecta a la replicación e infectividad del virus, lo que sugiere que el residuo C65 de esta proteína no participa en interacciones esenciales para la replicación del virus.
5. La posición 44 de la proteína 3A es capaz de tolerar cambios de carga electrostática. La introducción de una carga positiva (Q44R) en esta posición no afecta a la replicación e infectividad del virus. Por otro lado, la introducción de una carga negativa (Q44D), aunque compromete la replicación retrasando la producción de virus infeccioso, permite recuperar virus con la sustitución D44E, en la que el aminoácido seleccionado tiene un menor carácter ácido y presenta similitud estructural con la glutamina presente en el VFA C-S8c1.
6. El mantenimiento del carácter hidrofóbico de los residuos presentes en las posiciones 38 y 41 de la proteína 3A, que se predice se localizan en una interfaz hidrofóbica potencialmente implicada en interacciones proteína-proteína, compromete, igualmente, la replicación e infectividad del virus. En este caso, tras la transfección con el ARN de los mutantes que incorporan un residuo de ácido glutámico en estas posiciones, se seleccionan virus con sustituciones que restauran el carácter hidrofóbico (E38A y E41V).
7. Las mutaciones L38A y L41V alteran la distribución subcelular de la proteína 3A, cuando ésta se expresa de forma independiente.
8. Solo el ARN de aquellos mutantes que no han perdido, o no tienen comprometida, su capacidad para replicar en células BHK-21 es capaz de producir letalidad en ratón lactante.
9. La expresión en *trans* de la proteína 3A o de su precursor 3ABBB acelera la selección de variantes viables tras la transfección con ARNs que contienen las sustituciones Q44D, L38E y L41E, no permitiendo el rescate de las mutaciones letales presentes en los mutantes de delección, de inserción o de reemplazamiento de 3A.



Bibliografía

- Agol, V. I., A. V. Paul, y E. Wimmer.** 1999. Paradoxes of the replication of picornaviral genomes. *Virus Res* **62**:129-47.
- Alexander, L., H. H. Lu, y E. Wimmer.** 1994. Polioviruses containing picornavirus type 1 and/or type 2 internal ribosomal entry site elements: genetic hybrids and the expression of a foreign gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:1406-10.
- Alexandersen, S., Z. Zhang, S. M. Reid, G. H. Hutchings, y A. I. Donaldson.** 2002. Quantities of infectious virus and viral RNA recovered from sheep and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus O UK 2001. *J Gen Virol* **83**:1915-23.
- Ambros, V., y D. Baltimore.** 1978. Protein is linked to the 5' end of poliovirus RNA by a phosphodiester linkage to tyrosine. *J Biol Chem* **253**:5263-6.
- Ambros, V., R. F. Pettersson, y D. Baltimore.** 1978. An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirion RNA and the 5' terminal protein. *Cell* **15**:1439-46.
- Andino, R., N. Boddeker, D. Silvera, y A. V. Gamarnik.** 1999. Intracellular determinants of picornavirus replication. *Trends Microbiol* **7**:76-82.
- Andino, R., G. E. Rieckhof, P. L. Achacoso, y D. Baltimore.** 1993. Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J* **12**:3587-98.
- Arnold, E., M. Luo, G. Vriend, M. G. Rossmann, A. C. Palmenberg, G. D. Parks, M. J. Nicklin, y E. Wimmer.** 1987. Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:21-5.
- Bachrach, H. L.** 1977. Foot-and-mouth disease virus, properties, molecular biology and immunogenicity, vol. I. *Virology in Agriculture*. Allanheld, Osmun, Montclair, N.J.
- Banerjee, R., W. Tsai, W. Kim, y A. Dasgupta.** 2001. Interaction of poliovirus-encoded 2C/2BC polypeptides with the 3' terminus negative-strand cloverleaf requires an intact stem-loop b. *Virology* **280**:41-51.
- Baranowski, E., N. Molina, J. I. Nunez, F. Sobrino, y M. Saiz.** 2003. Recovery of infectious foot-and-mouth disease virus from suckling mice after direct inoculation with in vitro-transcribed RNA. *J Virol* **77**:11290-5.
- Barclay, W., Q. Li, G. Hutchinson, D. Moon, A. Richardson, N. Percy, J. W. Almond, y D. J. Evans.** 1998. Encapsidation studies of poliovirus subgenomic replicons. *J Gen Virol* **79 (Pt 7)**:1725-34.
- Barco, A., y L. Carrasco.** 1995. A human virus protein, poliovirus protein 2BC, induces membrane proliferation and blocks the exocytic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **14**:3349-64.
- Barteling, S. J., y J. Vreeswijk.** 1991. Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* **9**:75-88.
- Barton, D. J., B. J. O'Donnell, y J. B. Flanagan.** 2001. 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *Embo J* **20**:1439-48.
- Beard, C. W., y P. W. Mason.** 2000. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **74**:987-91.

- Beck, E., S. Forss, K. Strebel, R. Cattaneo, y G. Feil.** 1983. Structure of the FMDV translation initiation site and of the structural proteins. *Nucleic Acids Res* **11**:7873-85.
- Belov, G. A., Q. Feng, K. Nikovics, C. L. Jackson, y E. Ehrenfeld.** 2008. A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication. *PLoS Pathog* **4**:e1000216.
- Belsham, G. J.** 1993. Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Prog Biophys Mol Biol* **60**:241-60.
- Belsham, G. J.** 1992. Dual initiation sites of protein synthesis on foot-and-mouth disease virus RNA are selected following internal entry and scanning of ribosomes in vivo. *Embo J* **11**:1105-10.
- Belsham, G. J., y C. J. Bostock.** 1988. Studies on the infectivity of foot-and-mouth disease virus RNA using microinjection. *J Gen Virol* **69 (Pt 2)**:265-74.
- Bernstein, H. D., P. Sarnow, y D. Baltimore.** 1986. Genetic complementation among poliovirus mutants derived from an infectious cDNA clone. *J Virol* **60**:1040-9.
- Berryman, S., S. Clark, P. Monaghan, y T. Jackson.** 2005. Early events in integrin alphavbeta6-mediated cell entry of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **79**:8519-34.
- Bienz, K., D. Egger, y L. Pasamontes.** 1987. Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* **160**:220-6.
- Bienz, K., D. Egger, y T. Pfister.** 1994. Characteristics of the poliovirus replication complex. *Arch Virol Suppl* **9**:147-57.
- Bienz, K., D. Egger, T. Pfister, y M. Troxler.** 1992. Structural and functional characterization of the poliovirus replication complex. *J Virol* **66**:2740-7.
- Bienz, K., D. Egger, Y. Rasser, y W. Bossart.** 1983. Intracellular distribution of poliovirus proteins and the induction of virus-specific cytoplasmic structures. *Virology* **131**:39-48.
- Bienz, K., D. Egger, M. Troxler, y L. Pasamontes.** 1990. Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J Virol* **64**:1156-63.
- Birtley, J. R., S. R. Knox, A. M. Jaulent, P. Brick, R. J. Leatherbarrow, y S. Curry.** 2005. Crystal structure of foot-and-mouth disease virus 3C protease. New insights into catalytic mechanism and cleavage specificity. *J Biol Chem* **280**:11520-7.
- Blair, W. S., X. Li, y B. L. Semler.** 1993. A cellular cofactor facilitates efficient 3CD cleavage of the poliovirus P1 precursor. *J Virol* **67**:2336-43.
- Blyn, L. B., J. S. Towner, B. L. Semler, y E. Ehrenfeld.** 1997. Requirement of poly(rC) binding protein 2 for translation of poliovirus RNA. *J Virol* **71**:6243-6.
- Bolten, R., D. Egger, R. Gosert, G. Schaub, L. Landmann, y K. Bienz.** 1998. Intracellular localization of poliovirus plus- and minus-strand RNA visualized by strand-specific fluorescent In situ hybridization. *J Virol* **72**:8578-85.

- Borrego, B., P. Fernandez-Pacheco, L. Ganges, N. Domenech, N. Fernandez-Borges, F. Sobrino, and F. Rodriguez.** 2006. DNA vaccines expressing B and T cell epitopes can protect mice from FMDV infection in the absence of specific humoral responses. *Vaccine* **24**:3889-99.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.
- Brooksby, J. B.** 1982. Portraits of viruses: foot-and-mouth disease virus. *Intervirology* **18**:1-23.
- Brown, F.** 1992. New approaches to vaccination against foot-and-mouth disease. *Vaccine* **10**:1022-6.
- Burrows, R., J. A. Mann, A. J. Garland, A. Greig, y D. Goodridge.** 1981. The pathogenesis of natural and simulated natural foot-and-mouth disease infection in cattle. *J Comp Pathol* **91**:599-609.
- Cao, X., y E. Wimmer.** 1995. Intragenomic complementation of a 3AB mutant in dicistronic polioviruses. *Virology* **209**:315-26.
- Capozzo, A. V., D. J. Burke, J. W. Fox, I. E. Bergmann, J. L. La Torre, y P. R. Grigera.** 2002. Expression of foot and mouth disease virus non-structural polypeptide 3ABC induces histone H3 cleavage in BHK21 cells. *Virus Res* **90**:91-9.
- Carrillo, C., E. R. Tulman, G. Delhon, Z. Lu, A. Carreno, A. Vagnozzi, G. F. Kutish, y D. L. Rock.** 2005. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **79**:6487-504.
- Charini, W. A., C. C. Burns, E. Ehrenfeld, y B. L. Semler.** 1991. trans rescue of a mutant poliovirus RNA polymerase function. *J Virol* **65**:2655-65.
- Chatterjee, N. K., H. L. Bachrach, y J. Polatnick.** 1976. Foot-and-mouth disease virus RNA. Presence of 3'-terminal polyriboadenylic acid and absence of amino acid binding ability. *Virology* **69**:369-77.
- Cho, M. W., N. Teterina, D. Egger, K. Bienz, y E. Ehrenfeld.** 1994. Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology* **202**:129-45.
- Choe, S. S., D. A. Dodd, y K. Kirkegaard.** 2005. Inhibition of cellular protein secretion by picornaviral 3A proteins. *Virology* **337**:18-29.
- Chow, M., J. F. Newman, D. Filman, J. M. Hogle, D. J. Rowlands, y F. Brown.** 1987. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature* **327**:482-6.
- Clarke, B. E., D. V. Sangar, J. N. Burroughs, S. E. Newton, A. R. Carroll, y D. J. Rowlands.** 1985. Two initiation sites for foot-and-mouth disease virus polyprotein in vivo. *J Gen Virol* **66 (Pt 12)**:2615-26.
- Collen, T.** 1994. Foot-and-mouth disease (aphthovirus): viral T cell epitopes. . *In* B. M. L. G. a. I. Morrison (ed.), *Cell mediated immunity in ruminants*. CRC Press Inc., Boca Raton.
- Crawford, N. M., y D. Baltimore.** 1983. Genome-linked protein VPg of poliovirus is present as free VPg and VPg-pUpU in poliovirus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:7452-5.
- Curry, S., C. C. Abrams, E. Fry, J. C. Crowther, G. J. Belsham, D. I. Stuart, y A. M. King.** 1995. Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *J Virol* **69**:430-8.
- De Diego, M., E. Brocchi, D. Mackay, y F. De Simone.** 1997. The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic

- antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch Virol* **142**:2021-33.
- de Felipe, P., L. E. Hughes, M. D. Ryan, y J. D. Brown.** 2003. Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *J Biol Chem* **278**:11441-8.
- de la Torre, J. C., E. Martinez-Salas, J. Diez, A. Villaverde, F. Gebauer, E. Rocha, M. Davila, y E. Domingo.** 1988. Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **62**:2050-8.
- de Wet, J. R., K. V. Wood, M. DeLuca, D. R. Helinski, y S. Subramani.** 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **7**:725-37.
- Deitz, S. B., D. A. Dodd, S. Cooper, P. Parham, y K. Kirkegaard.** 2000. MHC I-dependent antigen presentation is inhibited by poliovirus protein 3A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13790-5.
- Devaney, M. A., V. N. Vakharia, R. E. Lloyd, E. Ehrenfeld, y M. J. Grubman.** 1988. Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J Virol* **62**:4407-9.
- Doedens, J. R., T. H. Giddings, Jr., y K. Kirkegaard.** 1997. Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *J Virol* **71**:9054-64.
- Doedens, J. R., y K. Kirkegaard.** 1995. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *Embo J* **14**:894-907.
- Doel, T. R.** 1999. Optimisation of the immune response to foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* **17**:1767-71.
- Doel, T. R., L. Williams, y P. V. Barnett.** 1994. Emergency vaccination against foot-and-mouth disease: rate of development of immunity and its implications for the carrier state. *Vaccine* **12**:592-600.
- Domingo, E., V. Martin, C. Perales, A. Grande-Perez, J. Garcia-Arriaza, y . Arias.** 2006. Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol* **299**:51-82.
- Domingo, E., A. Mas, E. Yuste, N. Pariente, S. Sierra, M. Gutierrez-Riva, y L. Menendez-Arias.** 2001. Virus population dynamics, fitness variations and the control of viral disease: an update. *Prog Drug Res* **57**:77-115.
- Donaldson, A. I., y T. R. Doel.** 1992. Foot-and-mouth disease: the risk for Great Britain after 1992. *Vet Rec* **131**:114-20.
- Donaldson, A. I., C. F. Gibson, R. Oliver, C. Hamblin, y R. P. Kitching.** 1987. Infection of cattle by airborne foot-and-mouth disease virus: minimal doses with O1 and SAT 2 strains. *Res Vet Sci* **43**:339-46.
- Donnelly, M. L., L. E. Hughes, G. Luke, H. Mendoza, E. ten Dam, D. Gani, y M. D. Ryan.** 2001. The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *J Gen Virol* **82**:1027-41.
- Dunn, C. S., y A. I. Donaldson.** 1997. Natural adaption to pigs of a Taiwanese isolate of foot-and-mouth disease virus. *Vet Rec* **141**:174-5.
- Echeverri, A. C., y A. Dasgupta.** 1995. Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology* **208**:540-53.
- Ellard, F. M., J. Drew, W. E. Blakemore, D. I. Stuart, y A. M. King.** 1999. Evidence for the role of His-142 of protein 1C in the acid-induced

disassembly of foot-and-mouth disease virus capsids. *J Gen Virol* **80** (Pt 8):1911-8.

Falk, M. M., F. Sobrino, y E. Beck. 1992. VPg gene amplification correlates with infective particle formation in foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **66**:2251-60.

Ferrer-Orta, C., A. Arias, R. Agudo, R. Perez-Luque, C. Escarmis, E. Domingo, y N. Verdaguer. 2006. The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *EMBO J* **25**:880-8.

Ferrer-Orta, C., A. Arias, R. Perez-Luque, C. Escarmis, E. Domingo, y N. Verdaguer. 2004. Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J Biol Chem* **279**:47212-21.

Forss, S., y H. Schaller. 1982. A tandem repeat gene in a picornavirus. *Nucleic Acids Res* **10**:6441-50.

Forss, S., K. Strebel, E. Beck, y H. Schaller. 1984. Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res* **12**:6587-601.

Fujita, K., S. S. Krishnakumar, D. Franco, A. V. Paul, E. London, y E. Wimmer. 2007. Membrane topography of the hydrophobic anchor sequence of poliovirus 3A and 3AB proteins and the functional effect of 3A/3AB membrane association upon RNA replication. *Biochemistry* **46**:5185-99.

Gamarnik, A. V., y R. Andino. 1998. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* **12**:2293-304.

Garcia-Arriaza, J., E. Domingo, y C. Escarmis. 2005. A segmented form of foot-and-mouth disease virus interferes with standard virus: a link between interference and competitive fitness. *Virology* **335**:155-64.

Garcia-Briones, M., M. F. Rosas, M. Gonzalez-Magaldi, M. A. Martin-Acebes, F. Sobrino, y R. Armas-Portela. 2006. Differential distribution of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells. *Virology* **349**:409-21.

Giachetti, C., S. S. Hwang, y B. L. Semler. 1992. cis-acting lesions targeted to the hydrophobic domain of a poliovirus membrane protein involved in RNA replication. *J Virol* **66**:6045-57.

Giraud, A. T., E. Beck, K. Strebel, P. A. de Mello, J. L. La Torre, E. A. Scodeller, y I. E. Bergmann. 1990. Identification of a nucleotide deletion in parts of polypeptide 3A in two independent attenuated aphthovirus strains. *Virology* **177**:780-3.

Giraud, A. T., A. Sagedahl, I. E. Bergmann, J. L. La Torre, y E. A. Scodeller. 1987. Isolation and characterization of recombinants between attenuated and virulent aphthovirus strains. *J Virol* **61**:419-25.

Golini, F., B. L. Semler, A. J. Dorner, y E. Wimmer. 1980. Protein-linked RNA of poliovirus is competent to form an initiation complex of translation in vitro. *Nature* **287**:600-3.

Goodfellow, I., Y. Chaudhry, A. Richardson, J. Meredith, J. W. Almond, W. Barclay, y D. J. Evans. 2000. Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J Virol* **74**:4590-600.

Gorbalenya, A. E., A. P. Donchenko, V. M. Blinov, y E. V. Koonin. 1989. Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like

serine proteases. A distinct protein superfamily with a common structural fold. *FEBS Lett* **243**:103-14.

Grubman, M. J., y B. Baxt. 2004. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev* **17**:465-93.

Grubman, M. J. 1980. The 5' end of foot-and-mouth disease virion RNA contains a protein covalently linked to the nucleotide pUp. *Arch Virol* **63**:311-5.

Grubman, M. J., B. H. Robertson, D. O. Morgan, D. M. Moore, y D. Dowbenko. 1984. Biochemical map of polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **50**:579-86.

Guarne, A., J. Tormo, R. Kirchweger, D. Pfistermueller, I. Fita, y T. Skern. 1998. Structure of the foot-and-mouth disease virus leader protease: a papain-like fold adapted for self-processing and eIF4G recognition. *EMBO J* **17**:7469-79.

Hall, D. J., y A. C. Palmenberg. 1996. Cleavage site mutations in the encephalomyocarditis virus P3 region lethally abrogate the normal processing cascade. *J Virol* **70**:5954-61.

Harris, K. S., W. Xiang, L. Alexander, W. S. Lane, A. V. Paul, y E. Wimmer. 1994. Interaction of poliovirus polypeptide 3CDpro with the 5' and 3' termini of the poliovirus genome. Identification of viral and cellular cofactors needed for efficient binding. *J Biol Chem* **269**:27004-14.

Heinz, B. A., y L. M. Vance. 1995. The antiviral compound enviroxime targets the 3A coding region of rhinovirus and poliovirus. *J Virol* **69**:4189-97.

Herold, J., y R. Andino. 2000. Poliovirus requires a precise 5' end for efficient positive-strand RNA synthesis. *J Virol* **74**:6394-400.

Herold, J., y R. Andino. 2001. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell* **7**:581-91.

Herrera, M., A. Grande-Perez, C. Perales, y E. Domingo. 2008. Persistence of foot-and-mouth disease virus in cell culture revisited: implications for contingency in evolution. *J Gen Virol* **89**:232-44.

Hollister, J. R., A. Vagnozzi, N. J. Knowles, y E. Rieder. 2008. Molecular and phylogenetic analyses of bovine rhinovirus type 2 shows it is closely related to foot-and-mouth disease virus. *Virology* **373**:411-25.

Hope, D. A., S. E. Diamond, y K. Kirkegaard. 1997. Genetic dissection of interaction between poliovirus 3D polymerase and viral protein 3AB. *J Virol* **71**:9490-8.

Huang, C. C., M. H. Jong, y S. Y. Lin. 2000. Characteristics of foot and mouth disease virus in Taiwan. *J Vet Med Sci* **62**:677-9.

Hughes, G. J., V. Mioulet, R. P. Kitching, M. E. Woolhouse, S. Alexandersen, y A. I. Donaldson. 2002. Foot-and-mouth disease virus infection of sheep: implications for diagnosis and control. *Vet Rec* **150**:724-7.

Irurzun, A., L. Perez, y L. Carrasco. 1992. Involvement of membrane traffic in the replication of poliovirus genomes: effects of brefeldin A. *Virology* **191**:166-75.

Jackson, T., S. Clark, S. Berryman, A. Burman, S. Cambier, D. Mu, S. Nishimura, y A. M. King. 2004. Integrin alphavbeta8 functions as a receptor for foot-and-mouth disease virus: role of the beta-chain cytodomain in integrin-mediated infection. *J Virol* **78**:4533-40.

- Jackson, T., A. P. Mould, D. Sheppard, y A. M. King.** 2002. Integrin alphavbeta1 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **76**:935-41.
- Jackson, T., D. Sheppard, M. Denyer, W. Blakemore, y A. M. King.** 2000. The epithelial integrin alphavbeta6 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **74**:4949-56.
- Jacobson, M. F., y D. Baltimore.** 1968. Morphogenesis of poliovirus. I. Association of the viral RNA with coat protein. *J Mol Biol* **33**:369-78.
- Johnson, K. L., y P. Sarnow.** 1991. Three poliovirus 2B mutants exhibit noncomplementable defects in viral RNA amplification and display dosage-dependent dominance over wild-type poliovirus. *J Virol* **65**:4341-9.
- King, A. M., D. V. Sangar, T. J. Harris, y F. Brown.** 1980. Heterogeneity of the genome-linked protein of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **34**:627-34.
- Kitching, R. P.** 2002. Identification of foot and mouth disease virus carrier and subclinically infected animals and differentiation from vaccinated animals. *Rev Sci Tech* **21**:531-8.
- Kitching, R. P., y G. J. Hughes.** 2002b. Clinical variation in foot and mouth disease: sheep and goats. *Rev Sci Tech* **21**:505-12.
- Kitching, R. P.** 1998. A recent history of foot-and-mouth disease. *J Comp Pathol* **118**:89-108.
- Klump, W., O. Marquardt, y P. H. Hofschneider.** 1984. Biologically active protease of foot and mouth disease virus is expressed from cloned viral cDNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:3351-5.
- Knipe, T., E. Rieder, B. Baxt, G. Ward, y P. W. Mason.** 1997. Characterization of synthetic foot-and-mouth disease virus provirions separates acid-mediated disassembly from infectivity. *J Virol* **71**:2851-6.
- Knowles, N. J., P. R. Davies, T. Henry, V. O'Donnell, J. M. Pacheco, y P. W. Mason.** 2001. Emergence in Asia of foot-and-mouth disease viruses with altered host range: characterization of alterations in the 3A protein. *J Virol* **75**:1551-6.
- Knox, C., K. Moffat, S. Ali, M. Ryan, y T. Wileman.** 2005. Foot-and-mouth disease virus replication sites form next to the nucleus and close to the Golgi apparatus, but exclude marker proteins associated with host membrane compartments. *J Gen Virol* **86**:687-96.
- Kuhn, R., N. Luz, y E. Beck.** 1990. Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **64**:4625-31.
- Kusov, Y., y V. Gauss-Muller.** 1999. Improving proteolytic cleavage at the 3A/3B site of the hepatitis A virus polyprotein impairs processing and particle formation, and the impairment can be complemented in trans by 3AB and 3ABC. *J Virol* **73**:9867-78.
- Lama, J., A. V. Paul, K. S. Harris, y E. Wimmer.** 1994. Properties of purified recombinant poliovirus protein 3aB as substrate for viral proteinases and as co-factor for RNA polymerase 3Dpol. *J Biol Chem* **269**:66-70.
- Lama, J., M. A. Sanz, y L. Carrasco.** 1998. Genetic analysis of poliovirus protein 3A: characterization of a non-cytopathic mutant virus defective in killing Vero cells. *J Gen Virol* **79** (Pt 8):1911-21.
- Lama, J., M. A. Sanz, y P. L. Rodriguez.** 1995. A role for 3AB protein in poliovirus genome replication. *J Biol Chem* **270**:14430-8.

- Lea, S., J. Hernandez, W. Blakemore, E. Brocchi, S. Curry, E. Domingo, E. Fry, R. Abu-Ghazaleh, A. King, J. Newman, et al.** 1994. The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* **2**:123-39.
- Li, F., G. F. Browning, M. J. Studdert, y B. S. Crabb.** 1996. Equine rhinovirus 1 is more closely related to foot-and-mouth disease virus than to other picornaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:990-5.
- Liu, Y., D. Franco, A. V. Paul, y E. Wimmer.** 2007. Tyrosine 3 of poliovirus terminal peptide VPg(3B) has an essential function in RNA replication in the context of its precursor protein, 3AB. *J Virol* **81**:5669-84.
- Lu, H. H., X. Li, A. Cuconati, y E. Wimmer.** 1995. Analysis of picornavirus 2A(pro) proteins: separation of proteinase from translation and replication functions. *J Virol* **69**:7445-52.
- Luz, N., y E. Beck.** 1990. A cellular 57 kDa protein binds to two regions of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *FEBS Lett* **269**:311-4.
- Lyle, J. M., E. Bullitt, K. Bienz, y K. Kirkegaard.** 2002. Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* **296**:2218-22.
- Martin-Acebes, M. A., M. Gonzalez-Magaldi, K. Sandvig, F. Sobrino, y R. Armas-Portela.** 2007. Productive entry of type C foot-and-mouth disease virus into susceptible cultured cells requires clathrin and is dependent on the presence of plasma membrane cholesterol. *Virology* **369**:105-18.
- Martin-Acebes, M. A., M. Gonzalez-Magaldi, M. F. Rosas, B. Borrego, E. Brocchi, R. Armas-Portela, y F. Sobrino.** 2008. Subcellular distribution of swine vesicular disease virus proteins and alterations induced in infected cells: a comparative study with foot-and-mouth disease virus and vesicular stomatitis virus. *Virology* **374**:432-43.
- Martin-Acebes, M. A., M. Gonzalez-Magaldi, A. Vazquez-Calvo, R. Armas-Portela, y F. Sobrino.** 2009. Internalization of swine vesicular disease virus into cultured cells: a comparative study with foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **83**:4216-26.
- Martinez-Salas, E., S. Lopez de Quinto, R. Ramos, y O. Fernandez-Miragall.** 2002. IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochimie* **84**:755-63.
- Martinez-Salas, E., R. Ramos, E. Lafuente, y S. Lopez de Quinto.** 2001. Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *J Gen Virol* **82**:973-84.
- Mason, P. W., S. V. Bezborodova, y T. M. Henry.** 2002. Identification and characterization of a cis-acting replication element ("cre") adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **76**:9686-94.
- Mason, P. W., M. J. Grubman, and B. Baxt.** 2003. Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res* **91**:9-32.
- Mateu, M. G., E. Rocha, O. Vicente, F. Vayreda, C. Navalpotro, D. Andreu, E. Pedroso, E. Giralt, L. Enjuanes, y E. Domingo.** 1987. Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an episode of foot-and-mouth disease. *Virus Res* **8**:261-74.
- Maynell, L. A., K. Kirkegaard, y M. W. Klymkowsky.** 1992. Inhibition of poliovirus RNA synthesis by brefeldin A. *J Virol* **66**:1985-94.

- McInerney, G. M., A. M. King, N. Ross-Smith, y G. J. Belsham.** 2000. Replication-competent foot-and-mouth disease virus RNAs lacking capsid coding sequences. *J Gen Virol* **81**:1699-702.
- Medina, M., E. Domingo, J. K. Brangwyn, y G. J. Belsham.** 1993. The two species of the foot-and-mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities. *Virology* **194**:355-9.
- Moffat, K., G. Howell, C. Knox, G. J. Belsham, P. Monaghan, M. D. Ryan, y T. Wileman.** 2005. Effects of foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins on the structure and function of the early secretory pathway: 2BC but not 3A blocks endoplasmic reticulum-to-Golgi transport. *J Virol* **79**:4382-95.
- Molla, A., K. S. Harris, A. V. Paul, S. H. Shin, J. Mugavero, y E. Wimmer.** 1994. Stimulation of poliovirus proteinase 3Cpro-related proteolysis by the genome-linked protein VPg and its precursor 3AB. *J Biol Chem* **269**:27015-20.
- Monaghan, P., H. Cook, T. Jackson, M. Ryan, y T. Wileman.** 2004. The ultrastructure of the developing replication site in foot-and-mouth disease virus-infected BHK-38 cells. *J Gen Virol* **85**:933-46.
- Murray, K. E., y D. J. Barton.** 2003. Poliovirus "CRE"-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **77**:4739-50.
- Murray, K. E., A. W. Roberts, y D. J. Barton.** 2001. Poly(rC) binding proteins mediate poliovirus mRNA stability. *RNA* **7**:1126-41.
- Nayak, A., I. G. Goodfellow, y G. J. Belsham.** 2005. Factors required for the Uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) in vitro. *J Virol* **79**:7698-706.
- Neff, S., D. Sa-Carvalho, E. Rieder, P. W. Mason, S. D. Blystone, E. J. Brown, y B. Baxt.** 1998. Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin alpha(v)beta3 as its receptor. *J Virol* **72**:3587-94.
- Newman, J. F., B. Cartwright, T. R. Doel, y F. Brown.** 1979. Purification and identification of the RNA-dependent RNA polymerase of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol* **45**:497-507.
- Neznanov, N., A. Kondratova, K. M. Chumakov, B. Angres, B. Zhumabayeva, V. I. Agol, y A. V. Gudkov.** 2001. Poliovirus protein 3A inhibits tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis by eliminating the TNF receptor from the cell surface. *J Virol* **75**:10409-20.
- Nomoto, A., B. Detjen, R. Pozzatti, y E. Wimmer.** 1977. The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature* **268**:208-13.
- Novak, J. E., y K. Kirkegaard.** 1991. Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J Virol* **65**:3384-7.
- Nunez, J. I., E. Baranowski, N. Molina, C. M. Ruiz-Jarabo, C. Sanchez, E. Domingo, y F. Sobrino.** 2001. A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *J Virol* **75**:3977-83.
- O'Donnell, V. K., J. M. Pacheco, T. M. Henry, y P. W. Mason.** 2001. Subcellular distribution of the foot-and-mouth disease virus 3A protein in

cells infected with viruses encoding wild-type and bovine-attenuated forms of 3A. *Virology* **287**:151-62.

O'Donnell, V., M. LaRocco, H. Duque, y B. Baxt. 2005. Analysis of foot-and-mouth disease virus internalization events in cultured cells. *J Virol* **79**:8506-18.

O'Donnell, V., M. Larocco, y B. Baxt. 2008. Heparan sulfate-binding foot-and-mouth disease virus enters cells via caveola-mediated endocytosis. *J Virol* **82**:9075-85.

Ohlmann, T., y R. J. Jackson. 1999. The properties of chimeric picornavirus IRESes show that discrimination between internal translation initiation sites is influenced by the identity of the IRES and not just the context of the AUG codon. *RNA* **5**:764-78.

Pacheco, J. M., T. M. Henry, V. K. O'Donnell, J. B. Gregory, y P. W. Mason. 2003. Role of nonstructural proteins 3A and 3B in host range and pathogenicity of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **77**:13017-27.

Palmenberg, A. C. 1990. Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. *Annu Rev Microbiol* **44**:603-23.

Parsley, T. B., J. S. Towner, L. B. Blyn, E. Ehrenfeld, y B. L. Semler. 1997. Poly (rC) binding protein 2 forms a ternary complex with the 5'-terminal sequences of poliovirus RNA and the viral 3CD proteinase. *RNA* **3**:1124-34.

Pata, J. D., S. C. Schultz, y K. Kirkegaard. 1995. Functional oligomerization of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Rna* **1**:466-77.

Paul, A. V., X. Cao, K. S. Harris, J. Lama, y E. Wimmer. 1994. Studies with poliovirus polymerase 3Dpol. Stimulation of poly(U) synthesis in vitro by purified poliovirus protein 3AB. *J Biol Chem* **269**:29173-81.

Paul, A. V., E. Rieder, D. W. Kim, J. H. van Boom, y E. Wimmer. 2000. Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol* **74**:10359-70.

Paul, A. V., J. Peters, J. Mugavero, J. Yin, J. H. van Boom, y E. Wimmer. 2003. Biochemical and genetic studies of the VPg uridylylation reaction catalyzed by the RNA polymerase of poliovirus. *J Virol* **77**:891-904.

Paul, S., y T. Michiels. 2006. Cardiovirus leader proteins are functionally interchangeable and have evolved to adapt to virus replication fitness. *J Gen Virol* **87**:1237-46.

Pereira, H.G. 1981. Foot-and-mouth disease. In: Gibbs, E.P.J. (Ed.), *Virus Disease of Food Animals*, vol 2. Academic Press Inc, London.

Piccone, M. E., E. Rieder, P. W. Mason, y M. J. Grubman. 1995. The foot-and-mouth disease virus leader proteinase gene is not required for viral replication. *J Virol* **69**:5376-82.

Plotch, S. J., y O. Palant. 1995. Poliovirus protein 3AB forms a complex with and stimulates the activity of the viral RNA polymerase, 3Dpol. *J Virol* **69**:7169-79.

Plummer, G. 1962. An equine respiratory virus with enterovirus properties. *Nature* **195**:519-20.

Ray, K., B. C. Hauschild, P. J. Steinbach, P. K. Goldsmith, O. Hauache, y A. M. Spiegel. 1999. Identification of the cysteine residues in the amino-terminal extracellular domain of the human Ca(2+) receptor critical for

- dimerization. Implications for function of monomeric Ca(2+) receptor. *J Biol Chem* **274**:27642-50.
- Richards, O. C., J. F. Spagnolo, J. M. Lyle, S. E. Vleck, R. D. Kuchta, y K. Kirkegaard.** 2006. Intramolecular and intermolecular uridylylation by poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **80**:7405-15.
- Rieder, E., A. V. Paul, D. W. Kim, J. H. van Boom, y E. Wimmer.** 2000. Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element "cre" in relation to VPg uridylylation. *J Virol* **74**:10371-80.
- Ritchie, D. W., y G. J. Kemp.** 2000. Protein docking using spherical polar Fourier correlations. *Proteins* **39**:178-94.
- Robertson, B. H., D. M. Moore, M. J. Grubman, y D. G. Kleid.** 1983. Identification of an exposed region of the immunogenic capsid polypeptide VP1 on foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **46**:311-6.
- Rodriguez Pulido, M., F. Sobrino, B. Borrego, y M. Saiz.** 2009. Attenuated foot-and-mouth disease virus RNA carrying a deletion in the 3' noncoding region can elicit immunity in swine. *J Virol* **83**:3475-85.
- Rohll, J. B., N. Percy, R. Ley, D. J. Evans, J. W. Almond, y W. S. Barclay.** 1994. The 5'-untranslated regions of picornavirus RNAs contain independent functional domains essential for RNA replication and translation. *J Virol* **68**:4384-91.
- Rosas, M. F., Y. A. Vieira, R. Postigo, M. A. Martin-Acebes, R. Armas-Portela, E. Martinez-Salas, y F. Sobrino.** 2008. Susceptibility to viral infection is enhanced by stable expression of 3A or 3AB proteins from foot-and-mouth disease virus. *Virology* **380**:34-45.
- Rueckert, R. R.** 1996. Picornaviridae: The viruses and their replication In "Field's Virology" (B.N. Fields, D.M. Knipe and P. H. Howley, Eds), pp 609-654. Lippincott-Raven, Philadelphia / New York.
- Ryan, M. D., G. J. Belsham, y A. M. King.** 1989. Specificity of enzyme-substrate interactions in foot-and-mouth disease virus polyprotein processing. *Virology* **173**:35-45.
- Ryan, M. D., y J. Drew.** 1994. Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *Embo J* **13**:928-33.
- Ryan, M. D., y M. Flint.** 1997. Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. *J Gen Virol* **78 (Pt 4)**:699-723.
- Sa-Carvalho, D., E. Rieder, B. Baxt, R. Rodarte, A. Tanuri, y P. W. Mason.** 1997. Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J Virol* **71**:5115-23.
- Saiz, M., S. Gomez, E. Martinez-Salas, y F. Sobrino.** 2001. Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *J Gen Virol* **82**:93-101.
- Saleem, A., C. Blifield, S. A. Saleh, D. H. Yawn, M. L. Mace, M. Schwartz, y E. S. Crawford.** 1983. Viscoelastic measurement of clot formation: a new test of platelet function. *Ann Clin Lab Sci* **13**:115-24.
- Salt, J. S.** 1993. The carrier state in foot and mouth disease--an immunological review. *Br Vet J* **149**:207-23.
- Salt, J. S., P. V. Barnett, P. Dani, y L. Williams.** 1998. Emergency vaccination of pigs against foot-and-mouth disease: protection against disease and reduction in contact transmission. *Vaccine* **16**:746-54.

- Sambrook, J y Russell,** 2001. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3d Ed., Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandoval, I. V., y L. Carrasco.** 1997. Poliovirus infection and expression of the poliovirus protein 2B provoke the disassembly of the Golgi complex, the organelle target for the antipoliovirus drug Ro-090179. *J Virol* **71**:4679-93.
- Sangar, D. V., D. N. Black, D. J. Rowlands, y F. Brown.** 1977. Biochemical mapping of the foot-and-mouth disease virus genome. *J Gen Virol* **35**:281-97.
- Sasaki, J., y K. Taniguchi.** 2003. The 5'-end sequence of the genome of Aichi virus, a picornavirus, contains an element critical for viral RNA encapsidation. *J Virol* **77**:3542-8.
- Saunders, K., y A. M. King.** 1982. Guanidine-resistant mutants of aphthovirus induce the synthesis of an altered nonstructural polypeptide, P34. *J Virol* **42**:389-94.
- Schlegel, A., T. H. Giddings, Jr., M. S. Ladinsky, y K. Kirkegaard.** 1996. Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol* **70**:6576-88.
- Semler, B. L., C. W. Anderson, R. Hanecak, L. F. Dorner, y E. Wimmer.** 1982. A membrane-associated precursor to poliovirus VPg identified by immunoprecipitation with antibodies directed against a synthetic heptapeptide. *Cell* **28**:405-12.
- Serrano, P., M. R. Pulido, M. Saiz, y E. Martinez-Salas.** 2006. The 3' end of the foot-and-mouth disease virus genome establishes two distinct long-range RNA-RNA interactions with the 5' end region. *J Gen Virol* **87**:3013-22.
- Sierra, M., A. Airaksinen, C. Gonzalez-Lopez, R. Agudo, A. Arias, y E. Domingo.** 2007. Foot-and-mouth disease virus mutant with decreased sensitivity to ribavirin: implications for error catastrophe. *J Virol* **81**:2012-24.
- Sobrinho, F. y Domingo, E. (ed.).** 2004. Foot-and-mouth disease. Current perspectives. Horizon Bioscience, Norfolk, UK.
- Stoker, M., and I. Macpherson.** 1964. Syrian Hamster Fibroblast Cell Line BHK21 and Its Derivatives. *Nature* **203**:1355-7.
- Strauss, D. M., L. W. Glustrom, y D. S. Wuttke.** 2003. Towards an understanding of the poliovirus replication complex: the solution structure of the soluble domain of the poliovirus 3A protein. *J Mol Biol* **330**:225-34.
- Strebel, K., y E. Beck.** 1986. A second protease of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **58**:893-9.
- Suhy, D. A., T. H. Giddings, Jr., y K. Kirkegaard.** 2000. Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J Virol* **74**:8953-65.
- Sutmoller, P., S. S. Barteling, R. C. Olascoaga, y K. J. Sumption.** 2003. Control and eradication of foot-and-mouth disease. *Virus Res* **91**:101-44.
- Tamura, G., K. Ando, S. Suzuki, A. Takatsuki, y K. Arima.** 1968. Antiviral activity of brefeldin A and verrucaric acid. *J Antibiot (Tokyo)* **21**:160-1.
- Teterina, N. L., A. E. Gorbalenya, D. Egger, K. Bienz, y E. Ehrenfeld.** 1997. Poliovirus 2C protein determinants of membrane binding and rearrangements in mammalian cells. *J Virol* **71**:8962-72.
- Teterina, N. L., E. Levenson, M. S. Rinaudo, D. Egger, K. Bienz, A. E. Gorbalenya, y E. Ehrenfeld.** 2006. Evidence for functional protein interactions required for poliovirus RNA replication. *J Virol* **80**:5327-37.

- Teterina, N. L., M. S. Rinaudo, y E. Ehrenfeld.** 2003. Strand-specific RNA synthesis defects in a poliovirus with a mutation in protein 3A. *J Virol* **77**:12679-91.
- Teterina, N. L., W. D. Zhou, M. W. Cho, y E. Ehrenfeld.** 1995. Inefficient complementation activity of poliovirus 2C and 3D proteins for rescue of lethal mutations. *J Virol* **69**:4245-54.
- Thomson, G. R., W. Vosloo, y A. D. Bastos.** 2003. Foot and mouth disease in wildlife. *Virus Res* **91**:145-61.
- Toja, M., C. Escarmis, y E. Domingo.** 1999. Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res* **64**:161-71.
- Towner, J. S., T. V. Ho, y B. L. Semler.** 1996. Determinants of membrane association for poliovirus protein 3AB. *J Biol Chem* **271**:26810-8.
- Towner, J. S., M. M. Mazanet, y B. L. Semler.** 1998. Rescue of defective poliovirus RNA replication by 3AB-containing precursor polyproteins. *J Virol* **72**:7191-200.
- van Bekkum, J. G., P. J. Straver, P. H. Bool, y S. Frenkel.** 1966. Further information on the persistence of infective foot-and-mouth disease virus in cattle exposed to virulent virus strains. *Bull Off Int Epizoot* **65**:1949-65.
- van Kuppeveld, F. J., P. J. van den Hurk, W. van der Vliet, J. M. Galama, y W. J. Melchers.** 1997. Chimeric coxsackie B3 virus genomes that express hybrid coxsackievirus-poliovirus 2B proteins: functional dissection of structural domains involved in RNA replication. *J Gen Virol* **78 (Pt 8)**:1833-40.
- van Ooij, M. J., D. A. Vogt, A. Paul, C. Castro, J. Kuijpers, F. J. van Kuppeveld, C. E. Cameron, E. Wimmer, R. Andino, y W. J. Melchers.** 2006. Structural and functional characterization of the coxsackievirus B3 "CRE"(2C): role of "CRE"(2C) in negative- and positive-strand RNA synthesis. *J Gen Virol* **87**:103-13.
- van Vlijmen, H. W., S. Curry, M. Schaefer, y M. Karplus.** 1998. Titration calculations of foot-and-mouth disease virus capsids and their stabilities as a function of pH. *J Mol Biol* **275**:295-308.
- Wessels, E., D. Duijsings, K. H. Lanke, S. H. van Dooren, C. L. Jackson, W. J. Melchers, y F. J. van Kuppeveld.** 2006. Effects of picornavirus 3A Proteins on Protein Transport and GBF1-dependent COP-I recruitment. *J Virol* **80**:11852-60.
- Xiang, W., A. Cuconati, D. Hope, K. Kirkegaard, y E. Wimmer.** 1998. Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3Dpol with VPg and with genetic variants of 3AB. *J Virol* **72**:6732-41.
- Xiang, W., A. Cuconati, A. V. Paul, X. Cao, y E. Wimmer.** 1995a. Molecular dissection of the multifunctional poliovirus RNA-binding protein 3AB. *RNA* **1**:892-904.
- Xiang, W., K. S. Harris, L. Alexander, y E. Wimmer.** 1995b. Interaction between the 5'-terminal cloverleaf and 3AB/3CDpro of poliovirus is essential for RNA replication. *J Virol* **69**:3658-67.
- Yilma, T.** 1980. Morphogenesis of vesiculation in foot-and-mouth disease. *Am J Vet Res* **41**:1537-42.

Zibert, A., G. Maass, K. Strebel, M. M. Falk, y E. Beck. 1990. Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a cloned full-length cDNA. *J Virol* **64**:2467-73.