



FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**RELEVANCIA DEL MOTIVO DE UNIÓN A  
PDZ DE LA PROTEÍNA E DEL  
CORONAVIRUS CAUSANTE DEL SÍNDROME  
RESPIRATORIO AGUDO Y GRAVE EN  
PATOGENESIS**

JOSÉ MANUEL JIMÉNEZ GUARDEÑO

Madrid, Junio de 2015



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**RELEVANCIA DEL MOTIVO DE UNIÓN A  
PDZ DE LA PROTEÍNA E DEL  
CORONAVIRUS CAUSANTE DEL SÍNDROME  
RESPIRATORIO AGUDO Y GRAVE EN  
PATOGENESIS**

Memoria presentada por José Manuel Jiménez Guardado  
para optar al grado de Doctor en Ciencias por la  
Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, Junio de 2015







El trabajo que se describe en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la codirección de los Drs. Luis Enjuanes Sánchez y José Luis Nieto Torres.

Madrid, Junio de 2015

Fdo. Luis Enjuanes Sánchez

Fdo. José Luis Nieto Torres



## AGRADECIMIENTOS

Ahora que esta etapa de mi vida está a punto de finalizar, echo la vista atrás y veo que son muchas las personas que me han acompañado durante el desarrollo de esta tesis. A todos vosotros, muchas gracias.

En primer lugar, me gustaría agradecer los directores de este trabajo, el profesor de investigación Luis Enjuanes, por darme la oportunidad de trabajar contigo y confiar en mi en todo momento. Luis, muchas gracias por estar siempre disponible para guiarme con buenas palabras y consejos cuando lo he necesitado, tanto en cuestiones científicas como personales. Con tu apoyo he aprendido muchísimo y estoy seguro de que todo lo que haga a partir de ahora tendrá el sello del laboratorio de Coronavirus del CNB. José Luis, eres de las primeras personas que conocí al llegar al laboratorio y sin duda una de las más importantes, es difícil resumir todo lo que me has aportado estos años, así que gracias por todo y no cambies nunca.

El 114 ha sido sin duda un lugar fantástico para trabajar, combinando calidad científica de primer nivel con los mejores compañeros que se puedan tener, muchos de ellos convertidos en amigos. Gracias a los muchachos de la Zona A por tantos buenos ratos y risas: José Ángel (el anteriormente conocido como JAR), ha sido un placer compartir contigo estos años. Eres de las mejores personas que he conocido y un ejemplo dentro y fuera del laboratorio. Cualquier experimento ha sido mucho mejor compartiéndolo contigo, incluso a pesar de tus canciones. Charlie, gracias por tus locuras, no puedo hacer otra cosa que “quitarme el Charles”, dejamos todo nuestro legado en tus manos y confío en que descubras pronto la relación entre el canal iónico y el PDZ. Raúl, sin ti esta tesis todavía iría por la mitad. Gracias por tu profesionalidad y por ser tan buena persona, eres un fenómeno.

Isabel, gracias por tu amabilidad y disponibilidad ante cualquier duda. Sonia, gracias por el servicio 24 horas de consejos y ayuda sobre las cosas raras de citoquinas, estadística, informática, etc. Carlos mayor, gracias por aguantarnos con una sonrisa cada vez que rondamos tu zona de trabajo y porque la música rara hippie que pones no llega a mi sitio. Martina, compañera de tesis y máster, gracias por los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, eres una de las personas más inteligentes y buenas que conozco, aunque todavía no hayas batido mi record en medio maratón. Lucía, gracias por tu honestidad, alegría y los cruasanes de chocolate. Gracias Marga por tu amabilidad y por ayudarnos a todos, desde el primer momento que llegamos al laboratorio hasta el último día.

Me gustaría agradecer también a las últimas incorporaciones del laboratorio: Alejandro (o Pascual, como le gusta que le llamen), aunque tengas el pelo largo te hemos aceptado como uno más, nunca olvidaré tus 20 largos en 5 minutos ni las fiestas de Pascual, huehuehue. Ha sido un placer coincidir contigo durante mi última etapa aquí. Don Javier Cantón Bailón, el filósofo de la ciencia, no he visto a nadie teorizar a tantos niveles como tú. Si alguna vez tienes dudas durante esta tesis solo piensa en la sintenina y verás como todo se arregla. Eres un grande, ya veras como las becas Cantón se hacen realidad algún día. Javier (Paco), me encantan tus

camisetas y tu sentido del humor. Lo único que siento es no haber compartido más tiempo con vosotros, creo que nunca me había reído tanto.

Gracias también a todos aquellos que han pasado por el 114 pero ya no se encuentran aquí: Fernando, gracias por tu alegría y por tus consejos, sobre todo con los clonajes rebeldes. Silvia, gracias por tu naturalidad y tu ayuda siempre que lo he necesitado. Marta, socia fundadora de la Zona A, gracias por tu ayuda durante este tiempo. Jazmina, Lorena y Sarhay, gracias por vuestra amabilidad y por los buenos ratos pasados en el laboratorio, espero que os vaya genial. Gracias a Aitor y al joven Pedro Mateos por su simpatía y buena acogida en el laboratorio. Kike, gracias por enseñarme durante mis primeros meses científicos. Javier Ortego, gracias por ser el mejor anfitrión que se puede tener en el CISA y recibirnos siempre con una sonrisa.

No quisiera olvidar a las personas que he conocido durante mi estancia en Madrid: las chicas del 116 Sara, Lidia y Martina 2, las comidas con vosotras han sido más divertidas. Joan, te aprecio aunque seas del Barça y te gusten Matrix 2 y 3. Ianire, Vero, Laura y Christian, la vida fuera del laboratorio ha sido mucho mejor con vosotros, sobre todo por los cumpleaños. Añadir también a mis amigos y compañeros de facultad, especialmente a David y Laura. David, nunca olvidaré nuestro primer año en la carrera y lo bien que lo pasábamos. Mención especial a Juan Romero, profesor del instituto que me transmitió su pasión por la biología.

Un agradecimiento muy especial a toda mi familia, tanto de sangre como política, por recibirme siempre con los brazos abiertos y todo el cariño del mundo. Gracias a Ana, mi suegra favorita, por incluirme en tu familia como uno más y tratarme siempre tan bien. Paula y Dani, dos de los mejores biólogos del mundo, gracias por estar siempre ahí, compartiendo viajes y vivencias. Estoy seguro de que pronto os llegará vuestra oportunidad.

Ya solo me queda agradecer a las cuatro personas más importantes en mi vida y las que más quiero. Papá, gracias por tu cariño incondicional, esforzarte siempre en darme lo mejor y enseñarme que en la vida hay que ser buena persona. Eres un ejemplo para mí y de mayor quiero ser como tú. Mamá, eres posiblemente la persona que más ha sufrido esta tesis, por tenerme tan lejos y verme solo en fiestas. Gracias por ser como eres, la mejor madre del mundo, por quererme y apoyarme como solo tú sabes hacerlo y por haberme transmitido gran parte de tu forma de ser. Todo lo que consiga en la vida os lo debo a vosotros y solo espero que algún día os sintáis tan orgullosos de mí como yo lo estoy de vosotros. No puedo olvidarme de mi hermano Ale, gracias por estar siempre ahí y por ser como eres.

Por último agradecer a mi Anita, el motor de mi vida y la persona con la que he compartido tanto, buenos y malos momentos. Sin duda sabes sacar lo mejor de mí. Gracias por estar siempre a mi lado, por tu apoyo, cariño, alegría, inteligencia, determinación y comprensión. No sabes lo mucho que te agradezco todo, lo feliz que me hace haber pasado todo este tiempo contigo y lo que me ilusiona poder empezar otra nueva aventura junto a ti. Juntos podemos con todo.

***A mis padres y a Ana***



ACE2	Enzima convertidora de angiotensina 2
ALI	Daño pulmonar agudo
ARDS	Síndrome de dificultad respiratoria aguda
ATI	Célula alveolar de tipo I
ATII	Célula alveolar de tipo II
BAC	Cromosoma artificial de bacterias
BatCoV	Coronavirus de murciélagos
BCoV	Coronavirus bovino
BHK	Línea celular de riñón de hámster
CALCA	Calcitonina
Cap	7-metil-guanosina
CCL2	Quimioquina con motivo C-C 2
CCL3	Quimioquina con motivo C-C 3
CCL4	Quimioquina con motivo C-C 4
CCoV	Coronavirus canino
cdNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CMV	Citomegalovirus
CoV	Coronavirus
CRPV	Virus del papiloma del conejo de cola de algodón
CXCL1	Quimioquina con motivo C-X-C 1
CXCL5	Quimioquina con motivo C-X-C 5
CXCL9	Quimioquina con motivo C-X-C 9
CXCL10	Quimioquina con motivo C-X-C 10
DAPI	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
Ddi	Días después de la infección
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
DTM	Dominio transmembrana
DTT	1,4-Ditiotreitol
DV	Virus del Dengue
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etiléndiaminotetraacético
ERGIC	Compartimento intermedio entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi
FAK	Proteína quinasa de adhesión focal
FBS	Suero fetal bovino
FDR	Tasa de falsos descubrimientos
FeCoV	Coronavirus de la enteritis felina
FIPV	Virus de la peritonitis infecciosa felina
HA	Hemaglutinina
HBV	Virus de la hepatitis B
HCoV	Coronavirus humano
HCoV-299E	Coronavirus humano 299E
HCoV-4408	Coronavirus humano entérico 4408
HCoV-HKU1	Coronavirus humano Hong Kong University 1
HCoV-NL63	Coronavirus humano NL63
HCoV-OC43	Coronavirus humano OC43
Hdi	Horas después de la infección
Hdt	Horas después de la transfección
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónido
HEV	Virus de la hepatitis E
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HPV	Virus del papiloma humano
HRP	Peroxidasa del rábano picante
HTLV-I	Virus linfotrópico de células T humanas de tipo I
IBV	Virus de la bronquitis infecciosa aviar
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
IL1B	Interleuquina 1beta

IL6	Interleuquina 6
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
mdi	Multiplicidad de infección
MERS	Síndrome respiratorio de Oriente Medio
MHV	Virus de la hepatitis del ratón
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
nsp	Proteína no estructural
nt	Nucleótido
ORF	Fase de lectura abierta
ORM1	Proteína orosomucoide 1
p38 MAPK	Proteína quinasa p38 activada por mitógeno
PALS1	Proteína 1 asociada con <i>Caenorhabditis elegans</i> lin-7
PBM	Motivo de unión a dominios PDZ
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEDV	Virus de la diarrea epidémica porcina
PKC	Proteína quinasa C
poliA	Tramo de poliadeninas
PRCV	Coronavirus respiratorio porcino
PRRSV	Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino
RE	Retículo endoplasmático
RhPV	Virus del papiloma de monos Rhesus
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
RS	Sentido reverso
RSV	Virus respiratorio sincitial
RT	Transcripción reversa
SAA1	Suero amiloide A1
SAA2	Suero amiloide A2
SARS	Síndrome respiratorio agudo y grave
SARS-MA15	Virus SARS-CoV adaptado a ratón
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
sgmRNA	RNA mensajero subgenómico
SERCA	ATPasa de calcio del retículo sarco endoplásmico
SW1	Coronavirus de la ballena beluga
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
TBEV	Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas
TCoV	Coronavirus de los pavos
TGEV	Virus de la gastroenteritis porcina transmisible
Tm	Temperatura de fusión
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRS	Secuencia reguladora de la transcripción
ufp	Unidades formadoras de placas
UTR	Región no traducida
VDM	Vesícula de doble membrana
VS	Sentido viral
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
wt	Tipo nativo



# ÍNDICE



**I. ÍNDICE**

<b>II. RESUMEN EN INGLÉS</b> .....	1
<b>III. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS CORONAVIRUS .....	3
1.1. Taxonomía de los coronavirus .....	3
1.2. Epidemiología .....	4
1.3. Estructura del genoma y expresión génica en coronavirus .....	6
1.4. Estructura de la partícula viral .....	7
1.5. Ciclo infeccioso viral .....	9
2. GENÉTICA REVERSA EN CORONAVIRUS .....	11
3. LA PROTEÍNA E DE LOS CORONAVIRUS .....	12
3.1. Estructura y localización subcelular .....	12
3.2. Relevancia de la proteína E en la morfogénesis y crecimiento viral .....	14
3.3. Relevancia de la proteína E en virulencia .....	14
3.4. Dominios PDZ .....	15
3.5. Proteínas virales con motivos de unión a PDZ .....	17
4. EL SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO Y GRAVE .....	20
4.1. Transmisión del SARS-CoV .....	20
4.2. Patología asociada al SARS-CoV .....	20
4.3. Modelos animales .....	22
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	24
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	25
1. CÉLULAS EUCARIOTAS .....	26
1.1. Líneas celulares .....	26
1.2. Cultivo de células .....	26
2. BACTERIAS .....	26
2.1. Cepas .....	26
2.2. Cultivo de bacterias .....	27
2.3. Generación de bacterias competentes .....	27
2.4. Transformación de bacterias competentes .....	27
3. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA .....	28
3.1. Plásmidos .....	28
3.2. Purificación de plásmidos y fragmentos de DNA .....	28

---

3.3. Enzimas de restricción y ligación del DNA .....	29
3.4. Amplificación del DNA mediante PCR .....	29
3.5. Electroforesis del DNA en geles de agarosa .....	30
4. CONSTRUCCIÓN DE SARS-CoV RECOMBINANTES .....	30
4.1. Manipulación del SARS-CoV en cultivos celulares .....	30
4.2. Generación de los cDNAs infectivos .....	31
4.3. Transfección y rescate de los virus recombinantes .....	32
4.4. Titulación de los virus recombinantes .....	33
5. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA .....	33
5.1. Extracción del RNA total intracelular .....	33
5.2. Generación de cDNAs mediante RT-PCR .....	33
5.3. Cuantificación de RNAs mediante RT-PCR en tiempo real .....	34
5.4. Silenciamiento de la expresión génica .....	35
6. MANIPULACIÓN Y EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS .....	35
6.1. Generación de anticuerpos específicos para la proteína E del SARS-CoV ...	35
6.2. Inmunodetección de proteínas ( <i>Western blot</i> ) .....	36
6.3. Microscopía de inmunofluorescencia indirecta .....	37
6.4. Ensayos de coimmunoprecipitación .....	37
6.5. Fraccionamiento celular .....	38
6.6. Sistema de doble híbrido en levaduras .....	39
7. PATOGENESIS VIRAL EN RATÓN .....	39
7.1. Cepa de ratón utilizada, inoculación y manejo de ratones infectados .....	39
7.2. Seguimiento de la enfermedad y análisis de la virulencia .....	40
7.3. Producción viral en los pulmones de ratones infectados .....	40
7.4. Extracción de RNA y proteínas de pulmón .....	41
7.5. Histopatología de tejido pulmonar de ratón .....	41
7.6. Tratamiento con el inhibidor de la proteína p38 MAPK de ratones infectados con el SARS-CoV .....	41
8. ANÁLISIS DE TRANSCRIPTÓMICA .....	42
8.1. Análisis de la integridad del RNA .....	42
8.2. Análisis de <i>microarrays</i> .....	42
8.3. Análisis de datos .....	43
8.4. Selección de genes relevantes .....	44

8.5. Análisis funcional de los resultados .....	44
9. ESTABILIDAD DE LOS RECOMBINANTES GENERADOS .....	44
9.1. Estabilidad en cultivos celulares de los recombinantes generados .....	44
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	47
1. RELEVANCIA DEL MOTIVO DE UNIÓN A PDZ DE LA PROTEÍNA E DEL SARS-CoV EN VIRULENCIA .....	47
1.1. Generación y crecimiento de SARS-CoVs recombinantes con el motivo de unión a PDZ de la proteína E mutado o deleciónado .....	47
1.2. Relevancia del PBM de la proteína E en la patogénesis y crecimiento del SARS-CoV en ratón .....	49
1.3. Patología pulmonar ocasionada por el SARS-CoV en presencia y ausencia del PBM de la proteína E .....	52
2. EFECTO DEL PBM DE LA PROTEÍNA E EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL HUÉSPED DURANTE LA INFECCIÓN CON SARS-CoV .....	55
2.1. Análisis de la expresión génica en pulmones de ratones infectados con SARS-CoV en ausencia y presencia del PBM de la proteína E .....	55
2.2. Análisis funcional de los genes diferencialmente expresados .....	56
3. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES QUE INTERACCIONAN CON LA PROTEÍNA E DEL SARS-CoV .....	59
3.1. Sistema de doble híbrido en levaduras usando el extremo carboxilo terminal de la proteína E .....	59
3.2. Interacción de la proteína E del SARS-CoV con la proteína sintenina .....	61
3.3. Colocalización de la proteína E del SARS-CoV y la proteína celular sintenina en células infectadas o transfectadas .....	63
4. MECANISMOS MOLECULARES RESPONSABLES DEL EFECTO DEL PBM DE LA PROTEÍNA E DEL SARS-CoV EN VIRULENCIA .....	66
4.1. Activación de la proteína p38 MAPK en pulmones de ratones infectados con los SARS-CoV en presencia y ausencia del PBM de la proteína E .....	66
4.2. Relevancia de la proteína sintenina en la activación de la proteína p38 MAPK mediada por el PBM de la proteína E durante la infección con el SARS-CoV .....	70
4.3. Efecto de inhibición de la proteína p38 MAPK sobre la supervivencia de ratones BALB/c infectados con el SARS-CoV .....	74

---

5. RELEVANCIA DEL PBM DE LA PROTEÍNA E EN LA INFECCIÓN CON EL SARS-CoV .....	77
5.1. Estabilidad de los SARS-CoV recombinantes con y sin PBM de la proteína E después de 16 pases seriados en células .....	77
5.2. Análisis de la expresión del sgmRNA de los genes M quiméricos .....	79
5.3. Expresión de las proteínas M quiméricas durante la infección .....	81
5.4. Cinéticas de crecimiento en cultivos celulares de los SARS-CoV-ΔE que expresan las proteínas M quiméricas .....	84
5.5. Virulencia y crecimiento en ratón de los SARS-CoV-ΔE que contienen proteínas M quiméricas generadas en cultivos celulares .....	86
5.6. Relevancia del PBM de la proteína E en la generación de la proteína M quimérica .....	91
<b>VII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>95</b>
1. RELEVANCIA DEL PBM DE LA PROTEÍNA E DEL SARS-CoV EN VIRULENCIA .....	96
2. EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DURANTE LA INFECCIÓN CON EL SARS-CoV CON Y SIN PBM EN LA PROTEÍNA E .....	98
3. INTERACCIÓN DEL PBM DE LA PROTEÍNA E DEL SARS-CoV CON PROTEÍNAS DEL HUÉSPED Y SU IMPLICACIÓN EN VIRULENCIA .....	99
4. ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE UN NUEVO GEN PARA COMPENSAR LA DELECCIÓN DEL GEN E EN EL GENOMA DEL SARS-CoV .....	104
<b>VIII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>107</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>109</b>
<b>X. ANEXO .....</b>	<b>127</b>

**ÍNDICE DE FIGURAS**

1. Taxonomía del orden <i>Nidovirales</i> .....	3
2. Expresión génica en el SARS-CoV .....	7
3. Estructura del virión del SARS-CoV .....	8
4. Ciclo infeccioso de los coronavirus .....	10
5. Secuencia y motivos estructurales y funcionales de la proteína E del SARS-CoV. 13	
6. Estructura del dominio PDZ .....	16
7. Patología asociada al SARS-CoV .....	22
8. Generación de SARS-CoVs recombinantes con el PBM de la proteína E mutado o delecionado .....	47
9. Crecimiento en cultivos celulares de los virus recombinantes generados .....	49
10. Patogénesis causada por los rSARS-CoV-E-PBMs en ratones BALB/c .....	50
11. Efecto del PBM de la proteína E del SARS-CoV en la producción viral en pulmones de ratones BALB/c .....	51
12. Patología en pulmones de ratones infectados con los virus rSARS-CoV-E-PBMs .... .....	52
13. Patología pulmonar asociada al PBM de la proteína E del SARS-CoV .....	54
14. Análisis de la expresión génica en pulmones de ratones BALB/c sin infectar o infectados con los virus nativo y mutPBM .....	56
15. Grupos biológicos a los que pertenecen los genes diferencialmente reprimidos en la infección con el SARS-CoV-E-mutPBM .....	57
16. Expresión en pulmón de genes celulares durante la infección de ratones BALB/c con los virus recombinantes generados .....	58
17. Secuencia de la proteína E del SARS-CoV utilizada como cebo en el ensayo con doble híbrido .....	60
18. Dominios de la proteína celular sintenina .....	61
19. . Interacción entre la proteína celular sintenina y la proteína E del SARS-CoV en el contexto de la infección .....	62
20. Localización subcelular de la proteína E del SARS-CoV y la proteína sintenina en células infectadas .....	64
21. Localización subcelular de la proteína E del SARS-CoV y la proteína sintenina en células transfectadas .....	65

<b>22.</b> Porcentaje de células que mostraban acumulación citoplasmática de sintenina.....	66
<b>23.</b> Modelo postulado de la activación de la respuesta inflamatoria mediada por sintenina y p38 MAPK .....	67
<b>24.</b> Activación de la proteína p38 MAPK en ratones BALB/c infectados con los SARS-CoV con y sin PBM en la proteína E .....	68
<b>25.</b> Activación de la proteína p38 MAPK en células Vero E6 infectados con los SARS-CoV con y sin PBM en la proteína E .....	69
<b>26.</b> Papel de la sintenina en la activación de la proteína p38 MAPK durante la infección .....	72
<b>27.</b> Efecto del silenciamiento de la sintenina sobre la activación de la proteína p38 en células infectadas .....	73
<b>28.</b> Efecto del inhibidor de la proteína p38 MAPK sobre la supervivencia de ratones BALB/c infectados con el SARS-CoV .....	75
<b>29.</b> Efecto del compuesto SB203580 sobre la inhibición de la proteína p38 MAPK durante la infección de ratones BALB/c con el SARS-CoV .....	76
<b>30.</b> Generación de nuevos genes M quiméricos en SARS-CoV que carecen de la proteína E después de 16 pases seriados .....	78
<b>31.</b> Secuencia de aminoácidos de las proteínas M quiméricas generadas.....	79
<b>32.</b> Expresión de los sgRNAs correspondientes a las M quiméricas durante la infección .....	80
<b>33.</b> Anticuerpos policlonales generados específicos para las distintas proteínas M .....	82
<b>34.</b> Análisis de las proteínas M expresadas durante la infección con SARS-CoVs recombinantes .....	83
<b>35.</b> Crecimiento en cultivos celulares de los virus SARS-CoV- $\Delta$ E que han generado proteínas M quiméricas .....	85
<b>36.</b> Patogénesis causada por los virus recombinantes con o sin proteína M quimérica .....	86
<b>37.</b> Efecto de las proteínas M quiméricas generadas en cultivos celulares en la producción viral en pulmones de ratones BALB/c .....	87
<b>38.</b> Patología en pulmones de ratones infectados con los SARS-CoV recombinantes con y sin proteína M quimérica .....	89



<b>39.</b> Patología pulmonar asociada a los SARS-CoV- $\Delta$ E con y sin proteína M quimérica . .....	90
<b>40.</b> Identificación del dominio de la proteína E del SARS-CoV implicado en la generación de la proteína M quimérica .....	93
<b>41.</b> Presencia de PBMs en la proteína E de otros coronavirus .....	103

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>I.</b> Proteínas virales con motivos de unión a PDZ .....	18
<b>II.</b> Consecuencias de la interacción de proteínas virales con proteínas con dominios PDZ .....	19
<b>III.</b> Oligonucleótidos utilizados para la generación de los SARS-CoV recombinantes con el PBM de la proteína E deletado o mutado .....	33
<b>IV.</b> Ensayos <i>Taqman</i> utilizados para analizar la expresión de genes celulares mediante RT-PCR .....	35
<b>V.</b> Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del último tercio del genoma viral .....	46
<b>VI.</b> Genes reprimidos durante la infección con mutPBM respecto a wt y representados en los grupos biológicos más relevantes .....	57
<b>VII.</b> Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de los sgRNAs correspondientes a los genes quiméricos .....	81

## **RESUMEN EN INGLÉS**



Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) is the etiological agent of a worldwide epidemic infecting 8000 people with a mortality of about 10%. A recombinant SARS-CoV lacking the multifunctional envelope (E) protein generated in our laboratory was attenuated *in vivo*, being a promising vaccine candidate. In this thesis, we have combined multidisciplinary approaches to characterize E protein as a virulence factor. Here we report that E protein contains a PDZ-binding motif (PBM), a domain potentially involved in the interaction with more than 400 cellular proteins, is a major determinant of SARS-CoV virulence. Removal of SARS-CoV E protein PBM using reverse genetics, caused a reduction in the deleterious exacerbation of the immune response triggered during infection with the parental virus, drastically diminishing lung damage and leading to virus attenuation.

Cellular protein syntenin was identified to bind the E protein PBM during SARS-CoV infection by using three complementary strategies, yeast two-hybrid platform, reciprocal coimmunoprecipitation and confocal microscopy assays. In addition, syntenin redistributed from the nucleus to the cell cytoplasm colocalizing with E protein during infection with viruses containing the E protein PBM, activating p38 MAPK and leading to the overexpression of inflammatory cytokines. In fact, silencing of syntenin using siRNAs led to a decrease in p38 MAPK activation in SARS-CoV infected cells, further reinforcing their functional relationship. Furthermore, active p38 MAPK was reduced in the lungs of mice infected with SARS-CoVs lacking E protein PBM as compared with those infected with the parental virus, leading to a decreased expression of inflammatory cytokines and to virus attenuation. Interestingly, administration of a p38 MAPK inhibitor increased mice survival up to 80% after infection with SARS-CoV. The relevance of the E protein PBM in SARS-CoV infection was reinforced by showing that recombinant viruses lacking the E protein (SARS-CoV- $\Delta$ E) incorporated, after serial passages, novel chimeric proteins containing a PBM at the end of the carboxy-terminal domain.

Overall, the results indicated that the PBM of E protein is a virulence factor that increases virus fitness and activates immunopathology preferentially by using syntenin as a mediator of p38 MAPK induced inflammation



# **INTRODUCCIÓN**

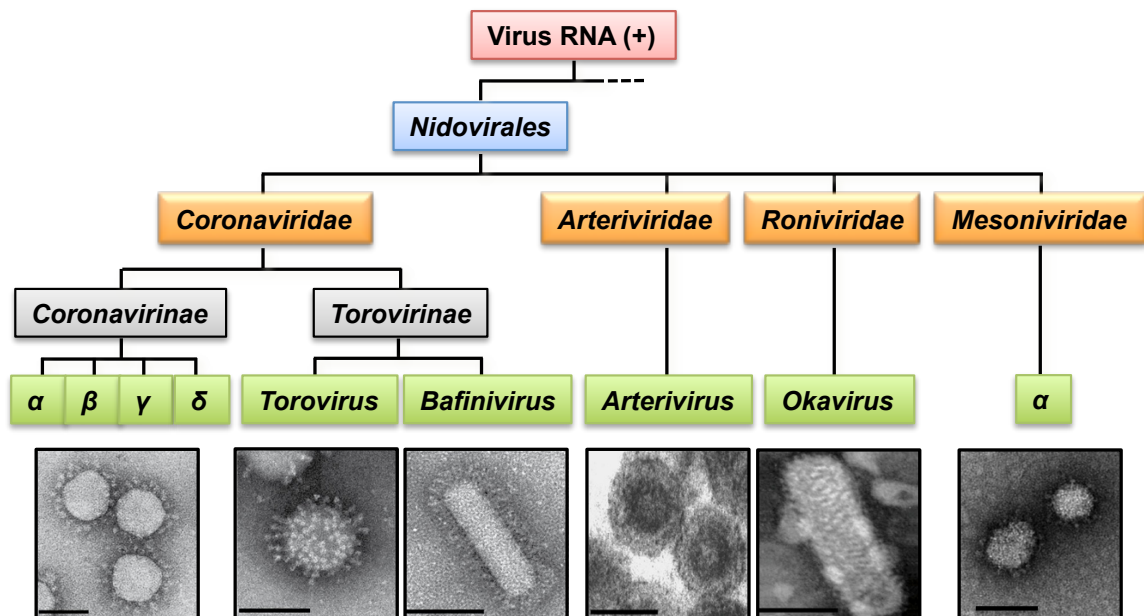




## 1. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS CORONAVIRUS

### 1.1. Taxonomía de los coronavirus

Los coronavirus (CoVs) son virus con envuelta, que contienen un genoma RNA no segmentado, de polaridad positiva, pertenecientes a la familia *Coronaviridae*. Esta, junto a las familias *Arteriviridae*, *Roniviridae* y la recientemente propuesta familia *Mesoniviridae*, componen el orden *Nidovirales* (Figura 1).



**Figura 1. Taxonomía del orden *Nidovirales*.** La figura muestra las familias (rectángulos naranja), subfamilias (rectángulos grises) y géneros (rectángulos verdes) que componen el orden *Nidovirales*. En la parte inferior se muestran micrografías electrónicas de virus representativos de los distintos géneros. Barra 100 nm.

El orden de los *Nidovirales* hace referencia a la producción, en las células infectadas, de mRNAs subgenómicos 3' coterminales o anidados (Carstens, 2010; de Groot et al, 2012; Enjuanes et al, 2008a). Los nidovirus afectan a un amplio rango de hospedadores, desde vertebrados hasta invertebrados. La familia *Coronaviridae* incluye a las subfamilias *Coronavirinae*, formada por los géneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y un cuarto género provisional denominado *Deltacoronavirus* y la subfamilia *Torovirinae*, compuesta a su vez por los géneros

*Torovirus* y *Bafinivirus* (de Groot et al, 2012). La familia *Arteriviridae*, constituida por el género *Arterivirus*, incluye virus que afectan a mamíferos, como el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) (Lunney et al, 2010; Snijder & Spaan, 1995). Las familias *Roniviridae* y *Mesoniviridae* afectan a organismos invertebrados, como gambas y mosquitos, respetivamente (Lauber et al, 2012; Walker et al, 2005).

## **1.2. Epidemiología**

Los coronavirus son patógenos que infectan a animales vertebrados, ocasionando principalmente patologías respiratorias y entéricas de diversa consideración (Enjuanes et al, 2008a), causando, en muchos casos, importantes pérdidas humanas y económicas. El ganado porcino está especialmente afectado por diferentes *alphacoronavirus*, como el responsable de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV) y el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) (Huang et al, 2013; Saif & Wesley, 1999). Además, el coronavirus bovino (BCoV) y el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), afectan también a explotaciones bovinas y aviares, respectivamente (Cavanagh, 2005; Fukutomi et al, 1999). Estos virus también puede causar enfermedades severas en animales de experimentación (CoVs murinos) y animales de compañía (CoVs felino y canino) (Perlman & Netland, 2009). Los coronavirus humanos, clasificados dentro de los géneros  $\alpha$  y  $\beta$ , son responsables del 10-20% de los catarros comunes y de enfermedades pulmonares más graves en recién nacidos, personas mayores o individuos inmunodeprimidos (Garbino et al, 2006; McIntosh et al, 1969). El género  $\alpha$  incluye el coronavirus humano HCoV-229E, asociado con catarros comunes y el coronavirus HCoV-NL63, causante de enfermedades respiratorias más graves (Fouchier et al, 2004). El género  $\beta$  incluye el coronavirus HCoV-OC43, causante de catarros comunes, el HCoV-HKU1, identificado en adultos con neumonía (Woo et al, 2005), el coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo y grave (SARS-CoV) (Drosten et al, 2003; Rota et al, 2003) y el recientemente identificado coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) (Assiri et al, 2013).

El SARS-CoV apareció a finales de 2002 en Foshan, un pueblo situado en el estado de Guandong, al sureste de China (Drosten et al, 2003; Rota et al, 2003; Zhao,

2007). La enfermedad se extendió rápidamente, afectando a numerosas personas, incluido personal sanitario de varios hospitales. Entre el personal afectado se encontraba un médico que viajó a Hong Kong, contagiando a numerosos huéspedes de diferentes nacionalidades, diseminando la enfermedad a más de 30 países. El establecimiento de programas de vigilancia médica efectivos y medidas de cuarentena y aislamiento de los infectados permitieron declarar el fin de la epidemia el 5 de julio de 2003. Finalmente, el coronavirus del SARS dejó un balance de 8273 personas infectadas y 775 muertes (<http://www.who.int/csr/sars/en/>). Durante la búsqueda del posible reservorio animal del virus se identificaron coronavirus muy similares al SARS-CoV en tejones chinos (*Melogale moschata*), mapaches (*Nyctereutes procyonoides*), y especialmente en civetas (*Paguma larvata*), que se comercializaban en los mercados de Guandong donde se desarrolló la epidemia. Sin embargo, no se detectaron coronavirus similares al SARS-CoV en ejemplares silvestres, y además, el análisis de los aislados virales indicaba que el virus todavía se estaba adaptando a las civetas (Kan et al, 2005; Song et al, 2005), sugiriendo que estos animales podrían ser un reservorio intermedio y no el reservorio natural del virus. En 2005 se identificaron en murciélagos virus similares al SARS-CoV detectado en civetas y humanos (Lau et al, 2005; Li et al, 2005), postulándose que el virus habría pasado desde los murciélagos al hombre directamente o a través de las civetas. La identificación posterior de otros virus similares a los coronavirus causantes de otras patologías humanas o animales, en muestras de murciélagos distribuidos por todo el planeta, sugirió que los coronavirus de murciélagos serían los ancestros de los coronavirus pertenecientes a los géneros  $\alpha$  y  $\beta$  (Annan et al, 2013; Chu et al, 2008; Drexler et al, 2010; Falcon et al, 2011; Graham et al, 2013; Muller et al, 2007; Quan et al, 2010).

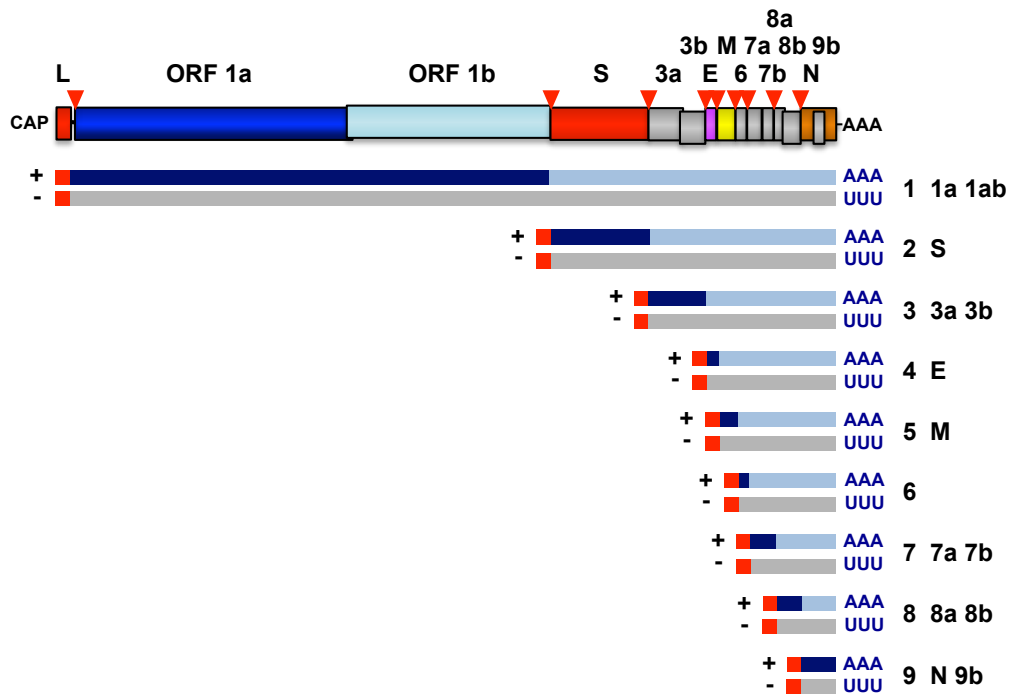
Los murciélagos, con más de 1100 especies repartidas por todo el planeta, constituyen el reservorio fundamental para estos coronavirus, teniendo especial relevancia por la transmisión potencial de estos virus a otros animales o a humanos, dando lugar a nuevos virus potencialmente peligrosos. De hecho, en septiembre de 2012 se identificó en Arabia Saudí un nuevo coronavirus (MERS-CoV) que emergió de los murciélagos (Annan et al, 2013), infectando a humanos y causando neumonías graves acompañadas ocasionalmente de patología renal (Assiri et al, 2013). Desde entonces, el MERS-CoV ha infectado a 1030 personas en distintos

países, causando la muerte de 381 ([http://www.who.int/csr/disease/coronavirus\\_infections/en/](http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/en/)). Por ello, el estudio de los mecanismos implicados en la virulencia de estos virus y el desarrollo de terapias efectivas para combatir la enfermedad son de alta importancia.

### **1.3. Estructura del genoma y expresión génica en coronavirus**

El genoma de los coronavirus consiste en una cadena de RNA de polaridad positiva de aproximadamente 30 kb de longitud, representando el genoma viral de RNA de mayor tamaño conocido (de Groot et al, 2012; Enjuanes et al, 2008b). La estructura del genoma de los coronavirus es muy similar a los mRNAs eucariotas, dado que posee una estructura 7-metil-guanosina (cap) en el extremo 5' (Page et al, 1990), presenta una cola de poliadeninas (poliA) en el extremo 3' (Jacobs et al, 1986) y contiene regiones no traducidas en ambos extremos (5'UTR y 3'UTR) con una longitud de entre 210 y 530 nucleótidos (**Figura 2**). Los dos primeros tercios del genoma de coronavirus codifican la replicasa viral, constituida por dos fases abiertas de lectura (ORF) solapantes ORF 1a y ORF 1b, que se traducen directamente a partir del RNA genómico al comienzo de la infección, dando lugar a dos poliproteínas de gran tamaño (pp1a y pp1ab). Las poliproteínas pp1a y pp1ab se procesan proteolíticamente para generar entre 15 y 16 (16 en el caso del SARS-CoV) proteínas no estructurales (nsps) implicadas en la replicación el genoma y en la transcripción de los RNAs mensajeros subgenómicos (sgmRNAs) (Gorbalenya et al, 1989; Ziebuhr, 2005; Ziebuhr et al, 2000). El último tercio del genoma codifica las proteínas estructurales S, E, M y N y un conjunto de proteínas accesorias, cuyo número y secuencia varía en función del virus, siendo SARS-CoV el que presenta un mayor número: 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, y 9b (Narayanan et al, 2008). Los coronavirus se replican en el citoplasma, generando para los genes situados en el extremo 3' del genoma, un conjunto de sgmRNAs coterminales en sus extremos 5' y 3' de distintos tamaños, estructuralmente policistrónicos pero funcionalmente monocistrónicos. Por norma general, únicamente se traduce la ORF situada más cerca del extremo 5' del RNA (**Figura 2**). Todos estos sgmRNAs presentan en el extremo 5' una secuencia líder de 72 nucleótidos en el caso del SARS-CoV. Esta secuencia líder también se encuentra en el extremo 5' del genoma viral, y se incorpora a los sgmRNAs por un

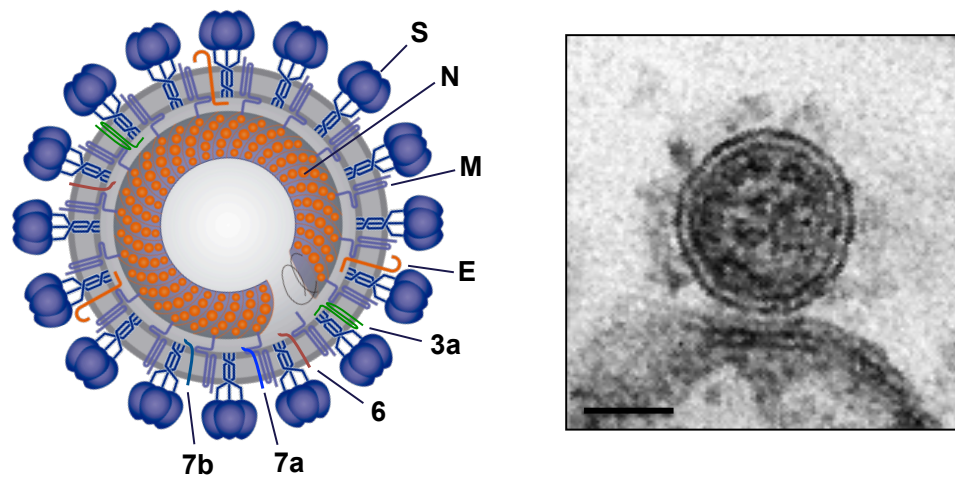
proceso de síntesis discontinua de RNA, en el que se generan moléculas intermediarias de polaridad negativa. Este proceso está dirigido por las secuencias reguladoras de la transcripción (TRS), que se encuentran al final de la secuencia líder y precediendo a cada uno de los genes (Enjuanes et al, 2006; Sola et al, 2005; Zuñiga et al, 2004).



**Figura 2. Expresión génica en el SARS-CoV.** Esquema del genoma del SARS-CoV (parte superior) en el que se indican la estructura cap (CAP), la secuencia líder (L), los genes virales (ORF 1a, ORF 1b, S, 3a, 3b, E, M, 6, 7a, 7b, 8a, 8b, N y 9b), el poliA (AAA) y la posición de las secuencias reguladoras de la transcripción o TRS (triángulos rojos invertidos). La polimerasa viral genera durante el ciclo infeccioso una serie de RNAs virales (parte inferior), numerados del 1 al 9, de polaridad positiva (+) y otros complementarios de polaridad negativa (-). En cada caso se indican los genes que codifican, las secuencias líder y antilíder (rojo), la secuencia codificante traducida (azul oscuro) y la secuencia codificante no traducida (azul claro).

#### 1.4. Estructura de la partícula viral

Los coronavirus son virus esféricos de entre 70 y 120 nm de diámetro (de Groot et al, 2012) con una envuelta lipídica. En la envuelta viral se insertan las proteínas estructurales comunes a todos los coronavirus (S, M y E) y, en ciertos casos, otras proteínas exclusivas de especie (**Figura 3**).



**Figura 3. Estructura del virión del SARS-CoV.** (A) Modelo de un virión del SARS-CoV en el que se muestra la envuelta lipídica, donde se integran las proteínas S, M y E, comunes en todos los coronavirus y además las proteínas específicas del SARS-CoV 3a, 6, 7a y 7b. En el interior del virus se representa la nucleocápsida, una estructura helicoidal formada por el genoma del virus asociado a la proteína N. (B) Micrografía electrónica de un virión del SARS-CoV. La barra negra representa una escala de 50 nm.

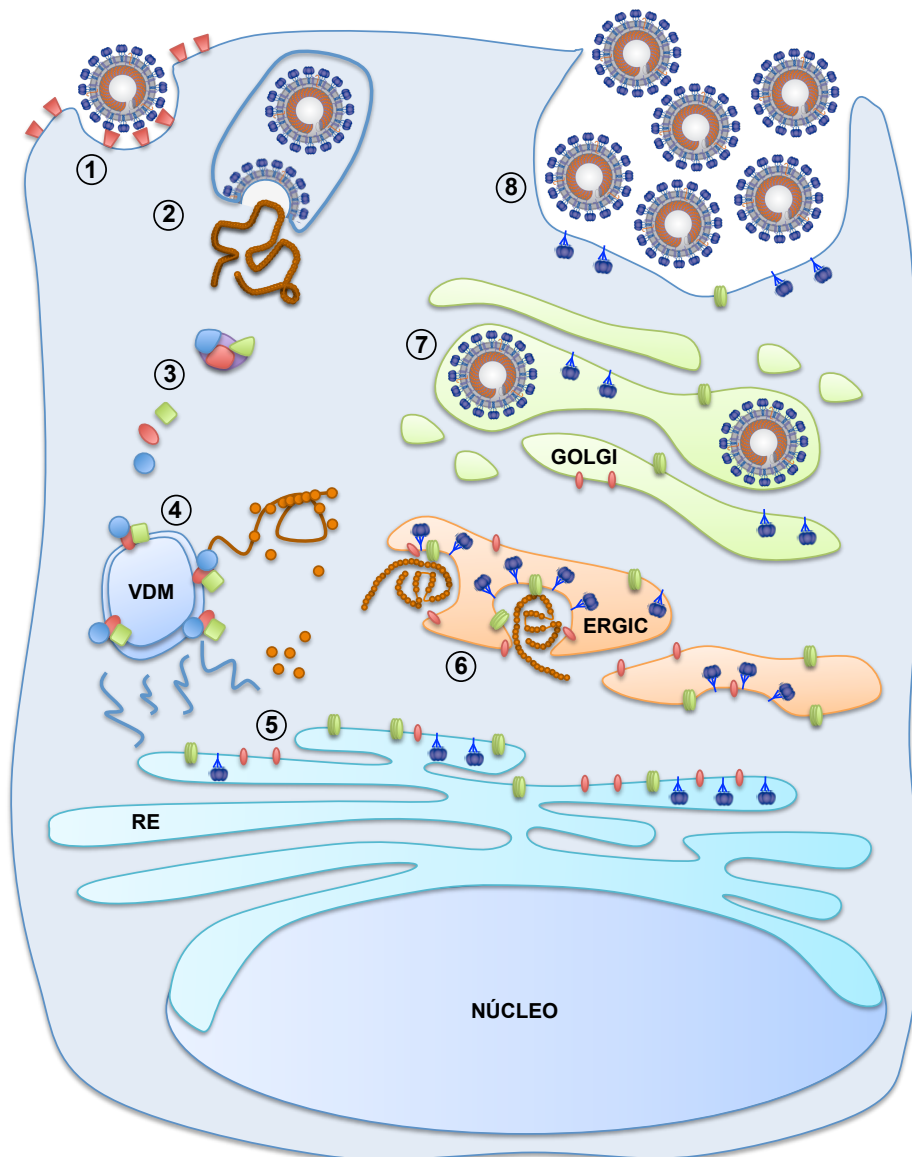
La proteína S, o proteína de las espículas, se localiza en la envuelta del virión, su forma funcional es un trímero, confiriendo a la partícula viral apariencia de corona, lo que da nombre a la familia (Delmas & Laude, 1990). La proteína S es una glicoproteína de membrana de tipo I, tiene una masa molecular de 200 kDa y es la encargada de mediar la unión del virus al receptor celular e inducir la fusión de las membranas celular y viral, permitiendo la entrada del virus en la célula (Gallagher & Buchmeier, 2001). De hecho, esta proteína es la que determina la especificidad de especie y de tejido, siendo además el principal inductor de anticuerpos neutralizantes (Gallagher & Buchmeier, 2001; Jimenez et al, 1986; Sui et al, 2004). La glicoproteína M, o de la membrana, es el componente estructural más abundante en la envuelta viral. Es una proteína con una masa molecular de 29 kDa en SARS-CoV y contiene tres dominios transmembrana. La proteína M es fundamental en los procesos de morfogénesis y ensamblaje en coronavirus (Nguyen & Hogue, 1997), y también induce la producción de anticuerpos neutralizantes, aunque en menor

grado que lo observado para la proteína S (Escors et al, 2001). La proteína E, o de la envuelta, es una proteína transmembrana de pequeño tamaño que está presente en los viriones en un número bajo de copias (20 moléculas / virión), pero se expresa abundantemente durante la infección donde participa, junto a la proteína M, en el ensamblaje y liberación de los virus (Nguyen & Hogue, 1997; Ruch & Machamer, 2012a). En el caso del SARS-CoV, en la envuelta del virus se encuentran además las proteínas 3a, 6, 7a, y 7b (Huang et al, 2006; Schaecher et al, 2007; Shen et al, 2005). El interior del virión contiene una cápsida helicoidal formada por el genoma del virus y la nucleoproteína (N). La proteína N es una fosfoproteína de 40 kDa muy abundante en células infectadas (Rota et al, 2003) que se une al RNA genómico, promoviendo su encapsidación. Además, la proteína N participa activamente en la síntesis de RNAs virales, actúa como antagonista de la respuesta viral mediada por interferón (IFN) de tipo I y posee actividad chaperona de RNA (Almazan et al, 2004; Lu et al, 2011; Thiel et al, 2003; Ye et al, 2007b; Zuñiga et al, 2007) (**Figura 3**).

### **1.5. Ciclo infeccioso viral**

Los coronavirus infectan principalmente células del tracto respiratorio y entérico (Miura & Holmes, 2009). El ciclo infeccioso se inicia con la unión de la proteína S del virus, que se encuentra en la superficie viral, al receptor celular, que en el caso del SARS-CoV es la enzima convertidora de angiotensina 2 humana (hACE-2) (Li et al, 2003; Wong et al, 2004), facilitando la entrada del virus en la célula mediante endocitosis (**Figura 4**). A continuación, la membrana del virus se fusiona con la membrana del endosoma, liberando la nucleocápsida al citoplasma de la célula infectada. El RNA genómico actúa como mRNA a partir del cual se traducen las ORFs 1a y 1b, generándose las poliproteínas pp1a y pp1ab, que serán procesadas principalmente por proteasas virales, produciendo las proteínas del complejo de replicación-transcripción (Ziebuhr, 2005). Este complejo se ensambla en vesículas de doble membrana originadas a partir del retículo endoplasmático celular (RE) (Knoops et al, 2008) y lleva a cabo la replicación del genoma viral y la síntesis de los sgRNAs, a través de moléculas de RNA intermediarias de polaridad negativa de tamaños genómico y subgenómico, respectivamente (Enjuanes et al, 2006; Sawicki & Sawicki, 1990). Las proteínas de la envuelta S, E y M se insertan en la membrana del

RE. La proteína M recluta a la proteína S en su transporte hacia el compartimento intermedio celular entre el RE y el aparato de Golgi (ERGIC), y además se une a la proteína E (de Haan et al, 1999; Lim & Liu, 2001; Nguyen & Hogue, 1997). Paralelamente, la proteína N se asocia al RNA genómico viral, formando la nucleocápsida, que se incorpora en los viriones por interacción con la proteína M en las membranas del ERGIC (Narayanan et al, 2000). Finalmente, los viriones ya ensamblados se acumulan en vesículas y maduran conforme progresan a través de la ruta secretora. La progenie viral es liberada al medio extracelular mediante la fusión de las vesículas que la contienen con la membrana plasmática (Tooze et al, 1987) (Figura 4).





**Figura 4. Ciclo infeccioso de los coronavirus.** Esquema de la infección de una célula por el SARS-CoV en el que se señalan los siguientes pasos: (1) Interacción del virión con el receptor celular y endocitosis. (2) Fusión de las membranas viral y celular y liberación de la nucleocápsida al citoplasma. (3) Traducción y procesamiento proteolítico de las poliproteínas pp1a y p1ab. (4) Asociación de los componentes de la replicasa viral en vesículas de doble membrana (VDM) y síntesis de RNAs virales. (5) Traducción de los RNAs virales y generación, entre otras proteínas, de las proteínas M (elipses verdes), S (estructura azul) y E (elipse roja), que se insertan en el RE, y de la proteína N (círculos naranjas), asociada al genoma viral. (6) Gemación del virus en el ERGIC. (7) Maduración de los viriones a través de la ruta secretora. (8) Liberación de la progenie viral mediante la fusión de las vesículas con la membrana plasmática.

## **2. GENÉTICA REVERSA EN CORONAVIRUS**

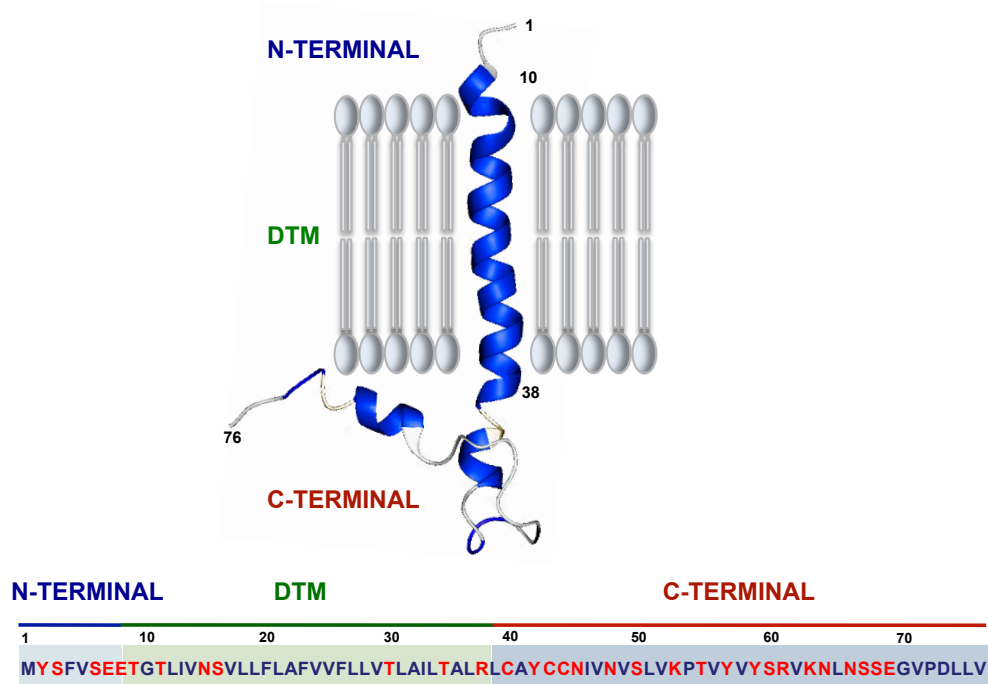
La manipulación del genoma de coronavirus mediante genética reversa ha estado limitada durante mucho tiempo debido al gran tamaño de su genoma. Además, la existencia de regiones tóxicas en el gen de la replicasa impedían la clonación y crecimiento en bacterias de un DNA complementario (cDNA) infeccioso. Por ello, los estudios iniciales se centraron en el análisis de RNAs defectivos y mutantes termosensibles (Méndez et al, 1995; Méndez et al, 1996; Repass & Makino, 1998). El primer clon infeccioso construido para un coronavirus fue el del TGEV, desarrollado en nuestro laboratorio (Almazan et al, 2000). Este clon infeccioso fue ensamblado usando un cromosoma artificial de bacteria (BAC), que posibilita el clonaje de secuencias de DNA de hasta 300 kb, debido a su bajo número de copias (1 o 2), reduciendo su toxicidad y permitiendo su amplificación en bacterias de forma eficiente y estable. Después de transfectar las células con el clon infeccioso, el BAC entra en núcleo y la RNA polimerasa II celular transcribe el RNA genómico viral, situado bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV). Seguidamente, el RNA genómico viral se transloca al citoplasma iniciando el ciclo infeccioso del virus. Esta estrategia se ha utilizado posteriormente en nuestro laboratorio para generar clones infecciosos para el SARS-CoV (Almazan et al, 2006; Fett et al, 2013), MERS-CoV (Almazan et al, 2013), HCoV-OC43 (St-Jean et al, 2006) y el virus responsable de la peritonitis infecciosa felina (FIPV) (Balint et al, 2012). Otra estrategia alternativa utilizada para la generación de clones infecciosos de coronavirus consiste en la ligación *in vitro* del cDNA de longitud completa bajo el control del promotor del fago T7. El cDNA ensamblado se inserta finalmente en el genoma del virus *Vaccinia* para

su propagación, o alternativamente, se transcribe *in vitro* para generar el RNA infeccioso viral. Este sistema se ha utilizado para la construcción de clones infecciosos de los virus HCoV-229E (Thiel et al, 2001), MHV (Coley et al, 2005; Yount et al, 2002), IBV (Casais et al, 2001), SARS-CoV (Yount et al, 2003), HCoV-NL63 (Donaldson et al, 2008) y MERS-CoV (Scobey et al, 2013).

### **3. LA PROTEÍNA E DE LOS CORONAVIRUS**

#### **3.1. Estructura y localización subcelular**

La proteína E de los coronavirus es una proteína transmembrana con un tamaño que varía desde los 76 aminoácidos, en el caso del SARS-CoV, hasta los 109 aminoácidos en otros coronavirus (Ruch & Machamer, 2012a). Las secuencias de la proteína E de las distintas especies de coronavirus no presentan un alto grado de homología, sin embargo, se encuentran regiones estructurales de características similares: un dominio amino terminal hidrofílico y de pequeño tamaño, formado por 7 a 12 aminoácidos, una región transmembrana de 21 a 29 aminoácidos principalmente hidrofóbicos y un extremo carboxilo terminal hidrofílico de mayor tamaño (**Figura 5**). La proteína E de los distintos coronavirus se localiza principalmente entre las membranas del RE y del aparato de Golgi, donde participa en el proceso de ensamblaje y gemación viral (Lim & Liu, 2001; Nal et al, 2005; Raamsman et al, 2000; Ruch & Machamer, 2012a). De hecho, se ha descrito en nuestro laboratorio que la proteína E del SARS-CoV se localiza principalmente en el ERGIC, tanto cuando se expresa aisladamente, como en el contexto de la infección por el virus (Nieto-Torres et al, 2011).



**Figura 5. Secuencia y motivos estructurales y funcionales de la proteína E del SARS-CoV.** Modelo de la proteína E del SARS-CoV insertada en una membrana lipídica (parte superior). En la figura se indican los dominios amino terminal (N-terminal), transmembrana (DTM), carboxilo terminal (C-terminal) y los aminoácidos que los forman. En la parte inferior se muestran los 76 aminoácidos que conforman la proteína E y los distintos dominios. Los aminoácidos apolares se representan con letras azules y los polares en rojo.

Se han descrito diferentes topologías para la proteína E en coronavirus dependiendo de su especie: las proteínas E del SARS-CoV y TGEV establecen un único paso transmembrana, localizando su extremo amino terminal hacia el lumen de membranas intracelulares, y el dominio carboxilo terminal hacia el citosol (Godet et al, 1992; Nieto-Torres et al, 2011). En la proteína E del coronavirus IBV la topología no está clara, se ha descrito que la proteína podría adoptar distintas orientaciones durante la infección (Corse & Machamer, 2000; Ruch & Machamer, 2012b). En el caso de la proteína E de MHV, los dos dominios, amino y carboxilo terminal, se encuentran orientados hacia el citoplasma (Raamsman et al, 2000), aunque esta topología requeriría confirmación.

### **3.2. Relevancia de la proteína E en la morfogénesis y crecimiento viral**

Se ha descrito que la proteína E de los coronavirus participa activamente en la producción viral, aunque su requerimiento varía en función de la especie de coronavirus. La eliminación de la proteína E de los coronavirus TGEV y MERS-CoV genera virus competentes en replicación y deficientes en propagación, siendo esencial para la maduración y secreción de virus infecciosos (Almazan et al, 2013; Ortego et al, 2007; Ortego et al, 2002). Por el contrario, la proteína E de MHV y SARS-CoV no es esencial para la propagación, ya que su eliminación permite la liberación de virus infecciosos, aunque causa una disminución en el título viral. La delección de la proteína E en MHV reduce el título viral 1000 veces (Kuo & Masters, 2003), mientras que en SARS-CoV da lugar a una reducción en el título viral de entre 20 y 200 veces, dependiendo del tipo celular infectado (DeDiego et al, 2007).

El efecto de la proteína E en la producción viral podría ser consecuencia de su papel durante la morfogénesis del virus. Se ha descrito que la proteína E, junto a las proteínas M y N son importantes para el ensamblaje y liberación de los coronavirus (de Haan & Rottier, 2005; Masters, 2006). Para algunos coronavirus, como TGEV, IBV y MHV, la expresión ectópica de las proteínas M y E tiene como resultado la producción de pseudoviriones (Baudoux et al, 1998; Corse & Machamer, 2000; Maeda et al, 1999; Vennema et al, 1996). Sin embargo, en el caso del SARS-CoV no están claras las proteínas necesarias para la formación de pseudopartículas, hay resultados contradictorios en función del tipo celular utilizado (Hatakeyama et al, 2008; Ho et al, 2004).

### **3.3. Relevancia de la proteína E en virulencia**

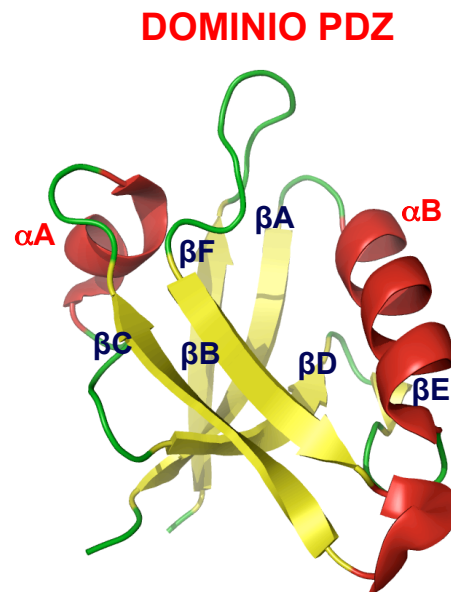
Se ha descrito por nuestro laboratorio que la proteína E es un factor de virulencia, dado que virus recombinantes que carecen de esta proteína (rSARS-CoV- $\Delta$ E) están atenuados en tres modelos animales distintos, y además, protegen frente a la infección con el virus nativo (DeDiego et al, 2007; DeDiego et al, 2008; Fett et al, 2013; Lamirande et al, 2008; Netland et al, 2010). Estudios posteriores usando el SARS-CoV que carece de la proteína E han permitido identificar algunos de los mecanismos moleculares responsables de la alta virulencia observada cuando esta

proteína está presente. El análisis de la expresión génica diferencial en células infectadas con el virus sin proteína E, respecto al virus nativo, mostró la sobreexpresión de genes implicados en la respuestas de estrés celular y proteínas mal plegadas, dando lugar a un aumento en la apoptosis (DeDiego et al, 2011). Además, la sobreexpresión de la proteína E disminuye el estrés celular provocado por otros virus, como el virus respiratorio sincitial (RSV), o por drogas que inducen estrés celular como la taspigargina, que inhibe la actividad de la ATPasa de  $Ca^{2+}$  en el retículo sarco endoplásmico (SERCA), o la tunicamicina, que inhibe la glicosilación de proteínas (DeDiego et al, 2011). Además, la eliminación de la proteína E provoca una disminución en la respuesta inflamatoria deletérea inducida por SARS-CoV mediada principalmente por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, cuya inhibición farmacológica aumenta la supervivencia en animales infectados (DeDiego et al, 2014). La atenuación observada en el virus que carece de la proteína E nos llevó a identificar los distintos dominios de la proteína implicados en esta notable disminución en la virulencia. Para localizar estas regiones se han generado virus recombinantes con deleciones o mutaciones puntuales en el dominio amino terminal y distintas regiones del dominio carboxilo terminal (Regla-Nava et al, 2015). Estudios en profundidad del dominio transmembrana de la proteína E usando mutantes puntuales, permitieron identificar que esta proteína forma un canal iónico en membranas lipídicas artificiales, actividad que le confiere una ventaja selectiva al virus. Además, esta función canal iónico es un nuevo determinante de la patogénesis viral, contribuyendo a la inducción de una respuesta inflamatoria exacerbada en el parénquima pulmonar de ratones infectados (Nieto-Torres et al, 2014). Otra característica de la proteína E, de gran relevancia en virulencia, es que posee un motivo de unión a dominios PDZ (PBM) en su extremo carboxilo terminal, elemento estudiado ampliamente durante el desarrollo de esta tesis.

### **3.4. Dominios PDZ**

Los dominios PDZ son secuencias de interacción proteína-proteína, consistentes en 80-90 aminoácidos que forman una estructura compuesta por seis láminas  $\beta$  y dos hélices  $\alpha$  (**Figura 6**) (Gerek et al, 2009). Estos dominios se unen a secuencias específicas llamadas motivos de unión a PDZ (PBM), normalmente localizadas en el

extremo carboxilo terminal de las proteínas (Gerek et al, 2009; Hung & Sheng, 2002; Munz et al, 2012), aunque en algunos casos, el PBM puede tener una localización interna (Melik et al, 2012). El termino PDZ es un acrónimo formado por los nombres de las tres primeras proteínas donde se identificó este dominio: proteína de densidad postsináptica (PSD95), proteína supresora de tumores en *Drosophila* (DlgA) y la proteína de la zónula ocludens-1 (ZO-1) (Kennedy, 1995). Las proteínas que contienen dominios PDZ se encuentran normalmente en el citoplasma celular o en asociación con la membrana plasmática, y están implicadas en múltiples procesos biológicos, como la formación de uniones celulares, regulación de la polaridad celular, transporte y organización de proteínas y rutas de transducción de señales (Javier & Rice, 2011). Los dominios PDZ se encuentran en cientos de proteínas, tanto en células eucariotas como en eubacterias (Ponting, 1997). Solo en el genoma humano se han descrito más de 900 dominios PDZ englobados en alrededor de 400 proteínas diferentes (Spaller, 2006).



**Figura 6. Estructura del dominio PDZ.** Modelo de la estructura molecular de un dominio PDZ. En la figura se indican las dos hélices  $\alpha$  en rojo ( $\alpha A$  y  $\alpha B$ ) y las 6 láminas  $\beta$  en amarillo ( $\beta A$ ,  $\beta B$ ,  $\beta C$ ,  $\beta D$ ,  $\beta E$  y  $\beta F$ ).

Los PBM suelen ser secuencias específicas formadas por los últimos cuatro aminoácidos de la proteína que los contiene. Aunque existe controversia al respecto,

los dominios PDZ pueden clasificarse en tres grupos diferentes, según la secuencia del PBM que reconocen: los dominios PDZ de clase I reconocen el motivo X-S/T-X-Φ-COOH (donde X es cualquier aminoácido y Φ es un aminoácido hidrofóbico (normalmente V, I o L)). Los dominios de clase II reconocen el motivo X-Φ-X-Φ-COOH y los dominios PDZ de clase III reconocen el motivo X-D/E-X-Φ-COOH. Existen otros dominios PDZ que no se engloban en ninguno de estos grupos (Harris & Lim, 2001).

Las primeras evidencias de la presencia de un PBM en la proteína E del SARS-CoV se obtuvieron al expresarla en células, donde se identificó su interacción con la proteína 1 asociada con *Caenorhabditis elegans* lin-7 (PALS1), una proteína celular implicada en la formación de las uniones estrechas y que contiene un dominio PDZ (Teoh et al, 2010). Estos estudios demostraron que los últimos cuatro aminoácidos de la proteína E forman un PBM que se une al dominio PDZ de la proteína PALS1. Sin embargo, la relevancia de este motivo durante la infección no fue estudiada. Por ello, en esta tesis se han generado virus recombinantes con y sin PBM de la proteína E, y se ha estudiado su papel en el contexto de una infección viral y su impacto en virulencia *in vivo*.

### 3.5. Proteínas virales con motivos de unión a PDZ

Los primeros PBMs virales se identificaron hace una década en oncoproteínas virales, como la proteína E6 de papilomavirus o la proteína tax del virus linfotrópico de células T humanas de tipo I (HTLV-1) (Kiyono et al, 1997; Rousset et al, 1998). Sin embargo, recientemente se han descubierto proteínas con PBMs en virus no oncogénicos, como el virus de la gripe o el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) (Jackson et al, 2008; Melik et al, 2012), que permiten la interacción de proteínas virales con proteínas celulares que contienen dominios PDZ durante el transcurso de la infección (Javier & Rice, 2011) (**Tabla I**).

**Tabla I. Proteínas virales con motivos de unión a PDZ.**

FAMILIA	VIRUS	PROTEÍNA VIRAL	PROTEÍNA DIANA
<i>Adenoviridae</i>	Adenovirus humano	E4-ORF1	Dlg1, MAGI-1, MUPP1, PATJ, ZO-2
<i>Hepadnaviridae</i>	HBV	Core	TIP-2/GIPC
<i>Orthomyxoviridae</i>	Gripe A	NS1	Dlg1, MAGI-1, MAGI-2, MAGI-3, Scribble, PDLIM2
<i>Papillomaviridae</i>	HPV	E6	GAL/GOPC, Dlg1, Dlg4, MAGI-1, MAGI-2, MAGI-3, MUPP1, PATJ, PTPN3, PTPN13, Scribble, TIP-1, TIP-2/GIPC
	RhPV	E7	Par3
	CRPV	LE6, SE6	Dlg1
<i>Retroviridae</i>	HTLV I	Tax	$\beta$ 1-syntrophin, Dlg1, Dlg4, Erbin, MAGI-3, pro-IL-16, Scribble, TIP-1, TIP2/GIPC, PDLIM2
	HIV	Gag	Dlg1, PDZD8
<i>Flaviviridae</i>	TBEV	NS5	RIMS2, Scribble, ZO-1
	DV	NS5	ZO-1
<i>Rhabdoviridae</i>	Rabia	G	Dlg1, MAST2, MUPP1, PTPN4
<i>Coronaviridae</i>	SARS-CoV	E	PALS1

La interacción de proteínas virales que contienen PBMs con proteínas celulares con dominios PDZ puede tener diversas consecuencias en el hospedador, afectando a una variedad de procesos celulares de alta relevancia para los virus, modulando la replicación viral, la diseminación en el huésped y la patogénesis (Javier & Rice, 2011) (**Tabla II**).



**Tabla II. Consecuencias de la interacción de proteínas virales con proteínas con dominios PDZ.**

VIRUS	CONSECUENCIAS
Adenovirus	Alteración de las uniones estrechas entre células epiteliales, pérdida de polaridad celular, activación de PI3K, replicación viral, transformación oncogénica
HPV	Alteración de las uniones estrechas entre células epiteliales, movilidad celular, bloqueo de la apoptosis y señalización por TGF- $\beta$ , transformación oncogénica
CRPV	Formación de papiloma
RhPV	Transformación oncogénica
HTLV-1	Activación de NFAT, inhibición de pro-IL-16, persistencia viral, transformación oncogénica
HIV	Infectividad del virión
Rabia	Bloqueo de la apoptosis, virulencia
Gripe A	Bloqueo de la apoptosis, alteración de las uniones estrechas entre células epiteliales, replicación viral, virulencia
TEBV	Inhibición de la respuesta inmune innata
SARS-CoV	Retraso en la formación de las uniones estrechas entre células epiteliales y establecimiento de la polaridad celular

En el caso de los coronavirus, la única proteína viral descrita con un PBM funcional ha sido la proteína E del SARS-CoV, la cual se une a la proteína PALS1 mediante su PBM. PALS1 es un componente clave en el establecimiento de la polaridad celular y el control de las uniones estrechas entre células epiteliales. En células epiteliales infectadas por el SARS-CoV, la proteína E redistribuye PALS1 al ERGIC, alterando su localización y retrasando la formación de las uniones estrechas entre las células epiteliales y el establecimiento de la polaridad celular. Estos datos indican un posible papel de esta interacción en la patología observada en pulmones de pacientes infectados con SARS-CoV (Teoh et al, 2010).

## **4. EL SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO Y GRAVE**

### **4.1. Transmisión del SARS-CoV**

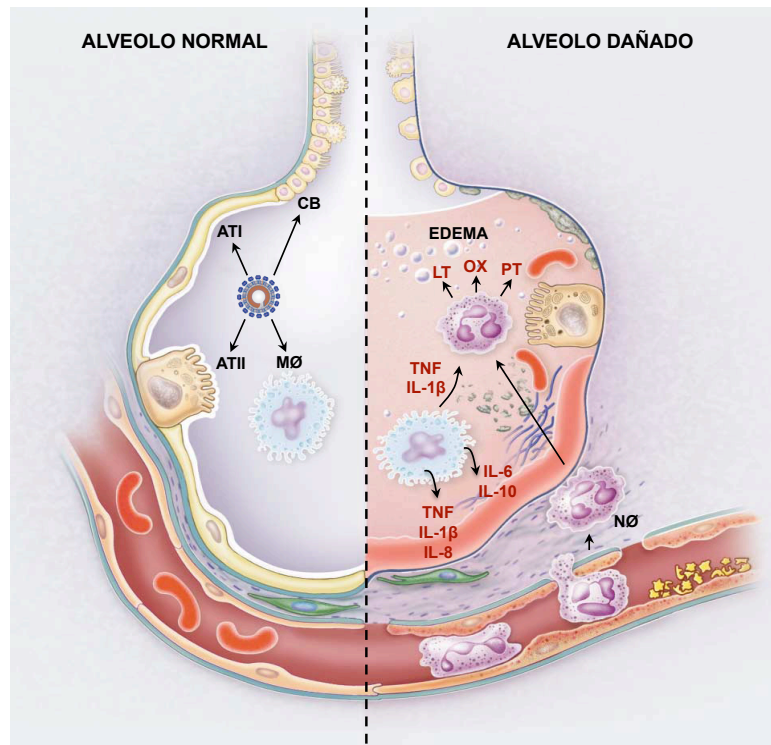
El SARS-CoV es un virus con transmisibilidad intermedia entre el virus de la gripe y el virus respiratorio sincitial, produciendo en torno a tres infecciones secundarias por paciente (Riley et al, 2003). Esta moderada transmisibilidad es debida a que el virus replica fundamentalmente en el tracto respiratorio inferior, alcanzando la máxima carga viral en el tracto respiratorio superior a los 10 días después de la infección, cuando los síntomas de la enfermedad son más evidentes (Peiris et al, 2003). La transmisión del virus se produce predominantemente por aerosoles que se generan durante la respiración (Dwosh et al, 2003). Además, se ha descrito que el contacto directo o indirecto con secreciones respiratorias, heces o animales portadores puede llevar al contagio en ciertas circunstancias (Ng, 2003; Tsang et al, 2003). Estudios sobre la estabilidad del SARS-CoV indican que es más estable a temperatura ambiente que otros coronavirus (Sizun et al, 2000), manteniendo su infectividad durante dos días en superficies plásticas y cuatro días en heces. El SARS-CoV se puede detectar mediante RT-PCR y se puede aislar a partir de secreciones respiratorias, heces, orina y muestras de pulmón de pacientes infectados (Chan et al, 2004; Peiris et al, 2003).

### **4.2. Patología asociada al SARS-CoV**

El SARS-CoV causa una neumonía atípica que puede dar lugar a fallo respiratorio, alcanzando una tasa de mortalidad del 10% de los individuos infectados y superior al 50% en personas mayores de 65 años (Donnelly et al, 2003). La enfermedad en los pacientes infectados cursa inicialmente con fiebre, mialgia, malestar general, estornudos y escalofríos. Además, en algunos pacientes se ha descrito diarrea durante las fase tardía de la enfermedad (Zhao et al, 2003). La aparición de linfopenia es frecuente y se ha detectado una bajada del número de plaquetas en algunos de los pacientes. En general, un tercio de los pacientes infectados se recuperaban, sufriendo el resto fiebres persistentes, taquipnea e hipoxemia, requiriendo en muchos de los casos su internamiento en unidades de cuidados

intensivos y respiración asistida (Peiris et al, 2003). Los casos más graves van acompañados de fallo respiratorio, fallo multiorgánico y sepsis, conduciendo finalmente a la muerte del paciente.

El análisis patológico de muestras de pulmón de paciente fallecidos por SARS reveló la presencia de daño alveolar difuso, infiltrados inflamatorios, descamación de los epitelios pulmonares, formación de membranas hialinas y acumulación de edema (Franks et al, 2003; Nicholls et al, 2003). Estos rasgos son característicos de las patologías conocidas como daño pulmonar agudo (ALI) y su forma más grave, el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS). El ARDS puede estar ocasionado entre otras cosas por infecciones virales, y causa tasas de mortalidad de alrededor del 40% (Matthay & Zemans, 2011). Esta enfermedad se origina por la acumulación de edema en las vías respiratorias, desencadenada por la salida de líquido hacia los espacios aéreos, impidiendo el correcto intercambio gaseoso y dando lugar a la muerte del paciente. El SARS-CoV infecta células bronquiales y bronquiolares, células alveolares de tipo I y II y, de forma menos eficiente, macrófagos alveolares (Frieman et al, 2008; Hsiao et al, 2005; Shieh et al, 2005; Ye et al, 2007a). En los epitelios pulmonares infectados se dispara una respuesta inflamatoria, amplificada por los macrófagos y mediada por la producción de citoquinas. Las citoquinas atraen quimiotácticamente células leucocitarias, principalmente neutrófilos, que liberan compuestos oxidantes, proteasas, leucotrienos y otras moléculas proinflamatorias, dañando los vasos sanguíneos y permitiendo la salida de líquido hacia el epitelio pulmonar (Matthay & Zemans, 2011). Durante la infección con SARS-CoV tiene lugar la destrucción de las células del epitelio pulmonar, siendo este incapaz de eliminar el exceso de líquido y restos celulares de los espacios aéreos, impidiendo el intercambio gaseoso (**Figura 7**).



**Figura 7. Patología asociada al SARS-CoV.** Representación gráfica de las vías aéreas antes y después de la infección con SARS-CoV. El virus infecta las células bronquiales (CB), células alveolares de tipo I (ATI), encargadas del intercambio gaseoso y las de tipo II (ATII), encargadas de la secreción del surfactante pulmonar y de amplificarse para reemplazar los epitelios dañados, y macrófagos alveolares (MØ), los cuales participan en la defensa frente a sustancias extrañas. Durante la infección tiene lugar la destrucción de los epitelios pulmonares y se promueve una respuesta inflamatoria amplificada por los macrófagos alveolares. Como resultado, los neutrófilos (NØ) se extravasaban desde los capilares sanguíneos a los espacios aéreos, liberando leucotrienos (LT), compuestos oxidantes (OX) y proteasas (PT), potenciando la respuesta inflamatoria. El aumento de la permeabilidad de los epitelios y endotelios causa la acumulación de edema en las vías aéreas.

### 4.3. Modelos animales

Se ha descrito que el SARS-CoV puede replicar de forma eficiente en diferentes cepas de ratón (BALB/c, C57BL/6, 129 S), hurones, hámsteres, gatos, civetas y primates (Subbarao & Roberts, 2006). Sin embargo, estos modelos animales solo reproducen parcialmente la enfermedad y los síntomas clínicos que se dan en humanos.

El modelo de ratón tiene múltiples ventajas sobre otros modelos debido a su pequeño tamaño, bajo coste, susceptibilidad de ser manipulados genéticamente y la

disponibilidad de reactivos inmunológicos. El SARS-CoV replica en ratón porque además de utilizar el receptor humano ACE2, también es capaz de usar de una forma bastante eficiente el ACE2 murino (Graham et al, 2013). La replicación del SARS-CoV en ratones convencionales no es muy eficiente, dando lugar a síntomas de la enfermedad muy moderados, observando una patología respiratoria bastante pobre y una pérdida de peso muy limitada (<5%). Sin embargo, el uso de este modelo ha permitido desarrollar modelos mejorados, como por ejemplo el uso de ratones transgénicos que expresaban el receptor humano hACE2, haciéndolos más susceptibles a la infección. Este modelo reproduce la patología pulmonar y la diseminación pulmonar observada en humanos. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en humanos, se produce una infección muy intensa en el cerebro, característica solo observada en algunos pacientes y de forma mucho más leve (Ding et al, 2004; Gu et al, 2005; McCray et al, 2007; Tseng et al, 2007; Xu et al, 2005).

En la actualidad, el modelo más usado y que mejor reproduce los síntomas de la enfermedad se basa en la utilización de ratones convencionales con un SARS-CoV que ha sido adaptado a crecer en ratón. Para conseguir este virus adaptado a ratón se realizaron pases seriados de la cepa Urbani del SARS-CoV en pulmones de ratones BALB/c, obteniendo una serie de variantes evolucionadas: SARS-CoV-MA15, SARS-CoV-MA20 y SARS-CoV-v2163 (Day et al, 2009; Nagata et al, 2008; Roberts et al, 2007). Durante el desarrollo de esta tesis se ha utilizado como modelo experimental el virus SARS-CoV-MA15 y ratones BALB/c. Este virus adaptado a ratón posee seis mutaciones puntuales en su genoma, afectando a las proteínas nsp5 (dos mutaciones), nsp9, nsp13, S y M (Roberts et al, 2007). El uso de este modelo reproduce la patología observada en pacientes, causando una enfermedad respiratoria grave y afectando de manera más severa a animales de edad avanzada, ocasionando la muerte de la mayoría de los ratones infectados (Roberts et al, 2007).



## **OBJETIVOS**





Los coronavirus son importantes patógenos humanos y animales, siendo el SARS-CoV y MERS-CoV los más patogénicos que se conocen para el hombre. Otros virus causantes de enfermedades graves codifican proteínas con motivos de unión a PDZ (PBM), al igual que los coronavirus. El objetivo principal de esta tesis es el análisis de la relevancia del PBM de la proteína E del SARS-CoV en la patogénesis viral y en la interacción con el huésped. Los objetivos específicos que se estudian en este trabajo son:

1. Análisis de la relevancia del PBM de la proteína E del SARS-CoV en producción viral y virulencia.
2. Estudio del papel del PBM de la proteína E del SARS-CoV en la expresión génica diferencial durante la infección.
3. Análisis de la interacción del PBM de la proteína E del SARS-CoV con las proteínas del huésped y su implicación en virulencia.
4. Relevancia del PBM de la proteína E en la infección con el SARS-CoV.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. CÉLULAS EUCARIOTAS

### 1.1. Líneas celulares

Las células Vero E6, derivadas de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), se obtuvieron del laboratorio del doctor Eric Snijder (Centro Médico de la Universidad de Leiden, Holanda). Las células BHK-21, derivadas de riñón de hámster, fueron cedidas por el doctor Huber Laude (Unidad de Virología e Inmunología Molecular, Jouy-en-Josas, Francia). Las células DBT, derivadas de astrocitoma de ratón, fueron cedidas por el doctor Thomas Gallagher (Centro Médico de la Universidad de Loyola, Chicago, USA). La línea celular DBT-mACE2, derivada de la anterior que expresan el receptor para el SARS-CoV en ratón, la enzima convertidora de angiotensina 2 murina (mACE2), fue generada en nuestro laboratorio (Regla-Nava et al, 2013).

### 1.2. Cultivo de células

En todos los casos las células se crecieron a 37°C en una atmósfera con una humedad del 98% en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO) suplementado con 25 mM HEPES, 50 µg/ml de gentamicina (Sigma), 2 mM de L-glutamina (Sigma), aminoácidos no esenciales al 1% (Sigma) y 10% de suero bovino fetal (FBS, Biowhittaker, Verviers, Belgium).

Para su almacenamiento, las líneas celulares se congelaron en nitrógeno líquido a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma) al 10% en FBS.

## 2. BACTERIAS

### 2.1. Cepas

Las células *Escherichia coli* DH10B [ $F^-$  *mcr* A  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcr-BC*)  $\emptyset$ 80*dlacZ*  $\Delta$ M15 $\Delta$ *lacX74deoRrecA1endA1araD139(ara,leu)7697galUgalK $\lambda$ -rpsLnupG*] que se utilizaron para el clonaje de los plásmidos se obtuvieron de GIBCO/BRL.

## **2.2. Cultivos de bacterias**

Las bacterias utilizadas se crecieron en medio líquido Luria-Bertani (LB) (Sambrook & Russell, 2001) a 30 o 37°C, y en placas de LB-agar para el aislamiento de colonias. El medio, líquido o sólido, se suplementó con antibióticos (150 µg/ml de ampicilina o 12.5 µg/ml de cloranfenicol) para la selección de bacterias, cuando fue necesario.

## **2.3 Generación de bacterias competentes**

Para la generación de bacterias competentes, se partió de bacterias procedentes de una colonia de bacterias DH10B crecida en medio sólido, se crecieron a 37°C en 2 litros de medio SOB (20 g/l triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 0.5 g/l NaCl y 0.18 g/l KCl) hasta alcanzar una densidad óptica a 550 nm ( $DO_{550}$ ) de 0.7. A continuación, las bacterias se sedimentaron por centrifugación a 4000xg durante 15 minutos, y se lavaron tres veces con una solución de glicerol al 10% previamente enfriada a 4°C, utilizando un volumen igual al del cultivo inicial para el primer lavado, y la mitad en los lavados sucesivos (2 l, 1 l y 0.5 l, respectivamente). Entre cada lavado, las bacterias se como se ha indicado anteriormente. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 6 ml de glicerol al 10% y las alícuotas se congelaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

## **2.4. Transformación de bacterias competentes**

Para la transformación de bacterias DH10B mediante electroporación se mezclaron 50 µl de bacterias con 50 µl de agua destilada y el DNA a transformar. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0.2 cm (Bio-Rad) y se aplicó un pulso eléctrico de 25 µF, 2.5 kV y 200 Ω usando un electroporador *GenePulser* (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la electroporación, las bacterias se resuspendieron en 1 ml de medio LB y se incubaron durante 45 minutos a 37°C en agitación. Finalmente, las bacterias se sembraron en placas de LB-agar suplementadas con el antibiótico apropiado para la selección de colonias.

### 3. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA

#### 3.1. Plásmidos

El plásmido pcDNA3 utilizado para expresar la proteína E del SARS-CoV se obtuvo de Life Technologies. Este plásmido tiene un tamaño de 5446 nucleótidos y contiene genes de resistencia a ampicilina y neomicina. A partir de la secuencia codificante de la proteína E, se introdujo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) una secuencia Kozak (GCCGCCATG) (Kozak, 1987) adyacente al codón inicial de la misma con el objetivo de potenciar la expresión de la proteína, utilizando los oligonucleótidos: SARSE\_1\_22\_EcoRI VS (GCGCGAATTCGCCGCCATGTAATTCGTTTCGGAAG) y pcDNA3\_1597\_1616 RS (CCAGTTTGGAAACAAGAGTCC). El fragmento de DNA generado se clonó en el vector usando los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI*. La construcción se comprobó mediante secuenciación de los plásmidos purificados. El plásmido pMT2-HA utilizado para expresar la proteína celular sintenina fusionada a una etiqueta HA en su extremo amino terminal fue cedido por el doctor Paul Coffey (Centro Médico Universitario, Utrecht, Países Bajos) (Boukerche et al, 2010).

El plásmido pBeloBAC11 (pBAC) (Wang et al, 1997) se utilizó para clonar el cDNA del SARS-CoV adaptado a ratón (MA15) (Fett et al, 2013) y sus variantes mutantes. Este plásmido tiene un tamaño de 7.5 kb y contiene el origen de replicación del factor F de *Escherichia coli* (*oriS*), una serie de genes necesarios para mantener una copia única del plásmido por célula bacteriana (*sopA*, *sopB*, *sopC* y *repE*) y un gen de resistencia a cloranfenicol (*cat*).

#### 3.2 Purificación de plásmidos y fragmentos de DNA

Para la purificación de plásmidos a partir de cultivos bacterianos se crecieron las bacterias a 37°C en medio LB suplementado con 50µg/ml de ampicilina y se utilizaron, en función del volumen inicial, los siguientes reactivos *Plasmid mini kit* (2 ml), *Plasmid midi kit* (100 ml) o *Plasmid maxi kit* (400 ml) (QIAGEN) según el protocolo del fabricante.

Para la purificación de plásmidos basados en pBAC se partió de cultivos bacterianos crecidos a 30°C en 500 ml de medio LB suplementado con 12.5µg/ml de cloranfenicol y utilizó el reactivo *Large-Construct kit* (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la purificación de DNAs amplificados a partir de PCR y fragmentos de DNA extraídos de geles de agarosa se utilizó el reactivo *QIAquick gel extraction kit* (QIAGEN) o el reactivo *QIAEX II* (QIAGEN) en el caso de fragmentos de DNA mayores de 10 kb, siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

### **3.3 Enzimas de restricción y ligación del DNA**

Las enzimas de restricción usadas en la manipulación de DNA se adquirieron de New England Biolabs y Roche. Para la ligación de moléculas de DNA se utilizó la enzima DNA ligasa del fago T4 (Roche). Todas estas reacciones enzimáticas se realizaron siguiendo protocolos previamente descritos (Sambrook & Russell, 2001).

### **3.4 Amplificación del DNA mediante PCR**

La amplificación del DNA mediante PCR se realizó utilizando 2.5 U de la enzima *Amplitaq DNA polymerasa* (Applied Biosystem) para fines analíticos o la enzima *Vent polymerasa* (New England Biolabs) para generar los fragmentos de DNA utilizados en los clonajes o que luego se iban a secuenciar. La enzima *Vent polymerasa*, a diferencia de la *Amplitaq DNA polymerasa*, posee una mayor fidelidad debido a su actividad exonucleasa correctora de errores 3'-5'. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems) utilizando un volumen de 50 µl en presencia de 20 pmoles de los oligonucleótidos correspondientes (Sigma), una mezcla de deoxinucleótidos trifosfato (Roche) a una concentración final de 0.25 mM, 1.25 mM de MgCl<sub>2</sub> para *Amplitaq DNA polymerasa* o MgSO<sub>4</sub> para *Vent polymerasa*, sus correspondientes tampones de reacción y entre 25 y 50 ng de DNA molde por reacción. La temperatura de fusión de los oligonucleótidos (T<sub>m</sub>) y la longitud del fragmento a amplificar determinaron la temperatura de anillamiento (entre 5 y



10°C inferior a la menor T<sub>m</sub> de los oligonucleótidos empleados) y el tiempo de elongación (aproximadamente 1 kb de DNA por minuto a 72°C), respectivamente. En todas las reacciones se utilizaron entre 25 y 35 ciclos de amplificación.

### **3.5 Electroforesis del DNA en geles de agarosa**

Para la separación de fragmentos de DNA en estudios analíticos y su purificación, se utilizaron geles de agarosa D-1 *Media EEO* (Pronadisa) a concentraciones que variaban del 0.7% al 1.2%, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar, disuelta en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA). Las electroforesis se realizaron a 120 V y se utilizó *SYBR® Safe DNA gel stain 1x* (Life Technologies) para visualizar las bandas de DNA utilizando el captador de imágenes *ChemiDoc™* (Biorad).

## **4. CONSTRUCCIÓN DE SARS-CoV RECOMBINANTES**

### **4.1. Manipulación del SARS-CoV en cultivos celulares**

Todo el trabajo realizado con virus infecciosos ha sido aprobado por el Ministerio de Medio Ambiente (resolución 001/36438). La manipulación del virus en cultivos celulares se realizó en un laboratorio de bioseguridad con nivel de contención 3 (CNB, CSIC). El laboratorio está equipado con los medios e infraestructuras necesarias, incluyendo un sistema de inactivación biológica de efluentes líquidos y de tratamiento de aire. El operador está permanente protegido con una vestimenta adecuada, compuesta por monos y calzas de protección (Tyvek) y varios pares de guantes, además de un sistema de filtración de aire *HEPA Airmate* (3M).

Los virus recombinantes basados en las cepas virales adaptadas a ratón (rSARS-CoV-MA15 y rSARS-CoV-MA15-ΔE, respectivamente) utilizados en los experimentos de esta tesis, se generaron y rescataron previamente en el laboratorio (DeDiego et al, 2007; DeDiego et al, 2014).

## 4.2. Generación de los cDNAs infectivos

El cDNA del SARS-CoV-MA15 ensamblado en el pBAC (pBAC-SARS-CoV-MA15) (Fett et al, 2013) se utilizó como base para introducir las mutaciones o deleciones en el PBM de la proteína E del SARS-CoV. El plásmido intermedio psl1190+BamHI/SacII-SARS-CoV contiene un fragmento del cDNA de SARS-CoV desde los nucleótidos 26045-30091 (Almazan et al, 2006) y ha sido generado usando el plásmido psl1190 (Pharmacia).

La deleción de los últimos 9 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la proteína E (pBAC-SARS-CoV-E- $\Delta$ PBM) y la mutación de 4 aminoácidos a alanina (pBAC-SARS-CoV-E-potPBM), se llevó a cabo mediante PCR solapante usando el pBAC-SARS-CoV-MA15 como molde y oligonucleótidos específicos (**Tabla III**). Los oligonucleótidos SARS-25871-VS y SARS- $\Delta$ PBM-RS o SARS-potPBM-RS se utilizaron para generar dos productos de PCR con las deleciones o mutaciones deseadas, respectivamente. Los oligonucleótidos SARS-26325-VS y SARS-28136-RS se utilizaron para generar un producto de PCR desde los nucleótidos 26325 a 28136 del genoma de SARS-CoV. Cada producto de PCR, con la deleción o mutación, se añadió por separado al producto de PCR generado por los oligonucleótidos SARS-26325-VS y SARS-28136-RS y esta mezcla se utilizó como molde para otras dos amplificaciones basadas en los oligonucleótidos SARS-25871-VS y SARS-28136-RS. El DNA amplificado se digirió con las enzimas de restricción *BamHI* y *MfeI* y se introdujo en el plásmido intermedio psl1190+BamHI/SacII-SARS-CoV para generar los plásmidos psl1190-E- $\Delta$ PBM y psl1190-E-potPBM. Estas construcciones se digirieron con las enzimas *BamHI* y *SacII* y se introdujeron en el plásmido pBAC-SARS-CoV- $\Delta$ E-MA15 para generar los correspondientes clones infectivos.

Para generar el mutante con los últimos 4 aminoácidos de la proteína E mutados a glicina (pBAC-SARS-CoV-E-mutPBM), se generó un fragmento de DNA que incluía los nucleótidos correspondientes a los últimos 12 aminoácidos de la proteína E y las mutaciones deseadas (LNSSEGVPGGG), flanqueados por los sitios de restricción *BamHI* y *MfeI*, mediante síntesis química (Bio Basic Inc). Los fragmentos que contenían estas mutaciones se digirieron con las enzimas de restricción previamente descritas. Paralelamente, se digirió el pBAC-SARS-CoV-

MA15 con las enzimas *MfeI* y *SacII* obteniéndose un fragmento de DNA, contiguo en secuencia con el anterior, que representaba los nucleótidos 26780-30093. Finalmente, este último fragmento junto con el que llevaba las mutaciones en el gen E, se introdujeron simultáneamente en un pBAC-SARS-CoV-ΔE-MA15 digerido con los sitios de clonaje únicos *BamHI* y *SacII*, para generar los correspondientes clones infectivos. La integridad del DNA clonado se verificó mediante análisis de restricción con la enzima *HindIII* y secuenciación.

**Tabla III. Oligonucleótidos utilizados para la generación de los SARS-CoV recombinantes con el PBM de la proteína E deletado o mutado.**

Virus	Oligonucleótido	Secuencia
<b>ΔPBM</b>	SARS-25871-VS	CGTTGTACATGGCTATTTACCG
	SARS-ΔPBM-RS	TTAGACCAGAAGATCAGGAACTCCTTAAGAGTTCAGATTTTTAACACGC
	SARS-26325-VS	GGAGTTCCTGATCTTCTGGTCTAA
	SARS-28136-RS	GGGCACTACGTTGGTTTGATTGGGG
<b>potPBM</b>	SARS-25871-VS	CGTTGTACATGGCTATTTACCG
	SARS-potPBM-RS	AGAAGATCAGGAACTCCTTAGACTGCAAGAGCAGGAGCTCCTGCAGAAG AGTTCAGATTTTTAACACGCG
	SARS-26325-VS	GGAGTTCCTGATCTTCTGGTCTAA
	SARS-28136-RS	GGGCACTACGTTGGTTTGATTGGGG

### 4.3. Transfección y rescate de los virus recombinantes

Células BHK se crecieron hasta una confluencia del 95% en frascos de 12.5 cm<sup>2</sup> y se transfectaron con 6 μg del cDNA de los clones infectivos y 18 μl de *Lipofectamine 2000* (Life technologies), siguiendo las instrucciones del proveedor. Después de un periodo de incubación de 6 horas, se tripsinizaron las células BHK y se añadieron sobre una monocapa confluyente de células Vero E6 crecidas en frascos 12.5 cm<sup>2</sup>, sensibles a la infección, y se incubaron durante 72 horas a 37°C. A continuación se recogieron los sobrenadantes de las células y se pasaron una vez más en células Vero E6. Los virus recuperados se clonaron mediante tres pasos de purificación en placas de lisis en medio DMEM semi-sólido que contenía 0.6% de agarosa de bajo punto de electroendosmosis (Pronadisa, Madrid). Los virus clonados se amplificaron en células Vero E6 usando frascos de 75 cm<sup>2</sup> y se titularon mediante formación de placas de lisis en medio semi-sólido.

#### **4.4. Titulación de los virus recombinantes**

Los virus recombinantes del SARS-CoV se titularon por el método de formación de placas de lisis en medio semi-sólido utilizando monocapas confluentes de células Vero E6 crecidas en placas de 6 o 12 pocillos. Se infectaron células Vero E6 con los virus recombinantes, realizando una adsorción de 45 minutos a 37°C. Después de la adsorción se retiró el medio y se añadió medio DMEM suplementado con 2% de FBS y agarosa al 0.6%. 72 horas después de la infección (ddi), las células se fijaron con formaldehído al 10% en tampón fosfato salino (PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación las placas de lisis se visualizaron mediante tinción con cristal violeta, teniendo la técnica un límite de sensibilidad de 20 unidades formadoras de placas (ufp) por ml.

### **5. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA**

#### **5.1. Extracción del RNA total intracelular**

El RNA total de las células infectadas se extrajo utilizando el reactivo *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN), según las instrucciones del fabricante. El RNA purificado se cuantificó mediante espectrometría utilizando un *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, USA) y se almacenó a -80°C hasta su uso.

#### **5.2. Generación de cDNAs mediante RT-PCR**

Se llevó a cabo una reacción de retrotranscripción (RT) utilizando el reactivo *High Capacity cDNA RT kit* (Applied Biosystems) para generar cDNAs a partir de los RNAs previamente purificados. La reacción se realizó en un volumen de 20 µl utilizando 100 ng de RNA como molde y hexanucleótidos al azar proporcionados en el kit. La reacción se mantuvo durante 10 minutos a 25°C y 120 minutos a 37°C. La enzima se inactivó incubando a 85°C durante 5 segundos y los cDNAs generados se almacenaron a 20°C.

La secuencia de las mutaciones introducidas en el genoma viral se verificaron utilizando 2 µl del cDNA generado en la reacción de RT como molde en una

reacción de PCR utilizando la enzima *Vent Polimerasa*, como se ha descrito previamente.

### 5.3. Cuantificación de RNAs mediante RT-PCR en tiempo real

Para analizar la expresión diferencial de genes celulares durante la infección, se utilizaron 2 µl de la reacción correspondiente de RT, el reactivo *Taqman Universal PCR Master mix* y ensayos Taqman específicos (Applied Biosystems) para los genes seleccionados (**Tabla IV**), en un volumen de reacción de 20 µl de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El análisis se realizó utilizando un equipo ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) utilizando los siguiente parámetros de reacción: (A) 50°C, 2 minutos; 95°C, 10 minutos; (B) 40 ciclos de 95°C, 15 segundos; 60°C, 1 minuto. Se realizaron tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas de las anteriores para aumentar la fiabilidad del análisis. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el programa *ABI PRISM 7000 SDS, vs 1.2.3* (Applied Biosystems). Los valores correspondientes a las medias de los números de los ciclos de corte (Ct) de cada variable experimental se usaron para calcular los valores de expresión relativos utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . El RNA ribosomal (rRNA) 18S se utilizó como control, dado que previamente se había demostrado que su expresión no variaba durante la infección con SARS-CoV (Frieman et al, 2010; Sheahan et al, 2008).

**Tabla IV. Ensayos *Taqman* utilizados para analizar la expresión de genes celulares mediante RT-PCR.**

Gen	Ensayo <i>Taqman</i>
CXCL10/IP-10	Mm00445235-m1
CCL2/MCP-1	Mm00441242-m1
IL-6	Mm00446190-m1
18S	Mm03928990-g1
SDCBP (sinténina)	Hs01045460-g1

#### 5.4. Silenciamiento de la expresión génica

Para el silenciamiento de la expresión génica de la proteína sintenina, las células Vero E6 se transfectaron mediante transfección reversa con el siRNA correspondiente. Para ello, se sembraron  $5 \times 10^4$  células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se incubaron en suspensión con 25 nM de cada siRNA *Silencer select siRNA* (Ambion) específico para la proteína celular sintenina (siRNA 1: s12641 y siRNA 2: s224582) y 2  $\mu$ l de *siPORT amine* (Ambion) diluido en 50  $\mu$ l de *OPTIMEM I reduced serum medium* (GibcoBRL-Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control negativo se añadió un siRNA irrelevante previamente validado (Ambion, referencia 4390843). Las células se incubaron a 37°C durante 24 horas y se transfectaron de nuevo usando 25 nM de cada siRNA 24 horas después de la primera transfección. 48 después de la segunda transfección, las células se infectaron con los virus indicados y, 24 después de la infección, el RNA total, proteínas y sobrenadante se recogieron para su análisis posterior.

### 6. MANIPULACIÓN Y EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS

#### 6.1 Generación de anticuerpos específicos para la proteína E del SARS-CoV

Para obtener anticuerpos policlonales de conejo específicos para el extremo carboxilo terminal de la proteína E del SARS-CoV pero que no reconocieran el PBM, se sintetizó un péptido que correspondía a los aminoácidos 49-64 de la proteína E (VSLVKPTVYVYSRVKN) junto con un residuo de cisteína que permitió su conjugación a una molécula de poli-lisina con 8 brazos, para generar antígenos peptídicos múltiples. Se inmunizaron dos conejos por la empresa Biogenes (Berlín), siguiendo su protocolo estándar y se obtuvieron los correspondientes sueros inmunes. Los sueros inmunes obtenidos se analizaron por inmunofluorescencia e inmunodetección (*Western blot*) utilizando células infectadas con los distintos recombinantes de SARS-CoV.

## 6.2 Inmunodetección de proteínas (*Western blot*)

Los extractos de proteínas se obtuvieron a partir de células infectadas incubándolas con tampón de lisis de proteínas (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL, inhibidor de proteasas *Complete* (Roche), pH 8) durante 15 minutos a 4°C. Cuando se analizaron los niveles de fosforilación de distintas proteínas, se añadió a la solución de extracción una mezcla de inhibidores de fosfatasas (*PhosSTO<sup>®</sup>P*, Roche), siguiendo las recomendaciones del proveedor. A continuación, los lisados celulares se centrifugaron a 10000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a 4°C, quedando el extracto de proteínas en el sobrenadante. Los extractos de proteínas se analizaron en geles desnaturizantes de acrilamida-SDS de gradiente *NuPAGE<sup>®</sup> Novex 4-12% Bis/Tris Precast Gels* (Life technologies) utilizando el tampón de carga *NuPAGE<sup>®</sup> LDS* suplementado con 1 mM DTT. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Hybond-ECL*, GE Healthcare) mediante el sistema *Mini Protean II* (BioRad) utilizando un tampón de transferencia que contenía 25 mM Tris/HCl, 192 mM glicina y 20% metanol pH 8.3 durante 70 minutos a 110 V. Las membranas se bloquearon durante 1 hora con leche al 5% en tampón TTBS (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) y se incubaron con anticuerpos monoclonales específicos para la forma activa de la p38 MAPK (dilución 1:500, Cell signaling), p38 MAPK total (dilución 1:500, Cell signaling), etiqueta HA ((dilución 1:10000, Sigma), sintenina (dilución 1:1000, Abcam), forma activa de HSP27 (dilución 1:1000, Cell signaling) y actina (dilución 1:10000, Abcam). Los anticuerpos policlonales específicos para la proteína E (dilución 1:1000), HSP27 total (dilución 1:1000, Cell signaling) y la histona H3 (dilución 1:5000, Active motif) también fueron usados. Los anticuerpos unidos se detectaron usando anticuerpos secundarios conjugados a la peroxidasa del rábano picante (HRP), específicos para las distintas especies (dilución 1:30000, Sigma), y usando como sustrato quimioluminiscente el *Immobilon Western* (Millipore).

### **6.3. Microscopía de inmunofluorescencia indirecta**

Se crecieron las células Vero E6 hasta una confluencia del 90% en placas de 24 pocillos sobre cristales de 12 mm de diámetro y se transfectaron o infectaron según el experimento indicado. 24 horas después de la transfección (hdt) o infección (hdi) las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron usando paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación se lavaron las células dos veces con PBS y se permeabilizaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con Triton X-100 al 0.1% en PBS. Las incubaciones con los anticuerpos primarios se realizaron en PBS suplementado con 10% FBS durante 90 minutos a temperatura ambiente usando anticuerpos monoclonales específicos para las proteínas E (dilución 1:3000) y N (dilución 1:500) de SARS-CoV, y anticuerpos policlonales específicos para la proteína celular sintenina (dilución 1:200, Abcam). Después de la incubación las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados a los fluoróforos *Alexa 488* o *Alexa 546* (dilución 1:500, Life technologies). Los núcleos se tiñeron durante 20 minutos usando el reactivo de tinción DAPI (dilución 1:200, Sigma). Los cristales se lavaron cinco veces con PBS y se montaron sobre los portas utilizando el reactivo *Prolong Gold anti-fade reagent* (Life technologies) y las muestras se examinaron mediante microscopía confocal usando un microscopio *Leica SP5* (Leica Microsystems).

### **6.4. Ensayos de coimmunoprecipitación**

Se crecieron células Vero E6 al 90% de confluencia en frascos de 175 cm<sup>2</sup> y se transfectaron con el plásmido que expresaba la proteína celular sintenina unida a una etiqueta HA. 24 horas después de la transfección, las células infectaron con los distintos virus recombinantes a una multiplicidad de infección (mdi) de 0.3 y, 24 horas después de la infección, se obtuvieron los extractos celulares como se ha descrito previamente. Para inmunoprecipitar la proteína sintenina y las proteínas asociadas, los extractos celulares se mezclaron con 75 µl de agarosa conjugada al anticuerpo monoclonal contra el péptido marcador HA (Sigma), previamente lavada cinco veces con PBS. Las muestras se incubaron con la resina durante 24



horas en agitación a 4°C. A continuación, las muestras se lavaron cuatro veces con PBS frío y, tras el último lavado, se añadieron 20 µl de tampón de carga *NuPAGE*<sup>®</sup> *LDS* suplementado con 1 mM DTT y se hirvieron durante 3 minutos a 95°C. Después de hervir las muestras, se centrifugaron durante 5 minutos a 10000 rpm para eliminar la agarosa, guardando el sobrenadante a -20°C para su posterior utilización.

Para inmunoprecipitar la proteína E de SARS-CoV y las proteínas asociadas, las células se transfectaron e infectaron como se ha descrito anteriormente y la inmunoprecipitación se llevó a cabo utilizando el *Protein A/G Plate IP Kit* (Pierce). Se añadieron anticuerpos específicos para el extremo amino terminal de la proteína E previamente generados en el laboratorio (Nieto-Torres et al, 2011) (dilución 1:20) a los pocillos del kit, conjugados a proteínas A y G y previamente lavados tres veces usando 200 µl de tampón de inmunoprecipitación (Triton X-100 al 1% en PBS). Se incubó el anticuerpo en los pocillos durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, se lavaron los pocillos cinco veces y se añadieron los extractos de proteínas previamente obtenidos, incubando en agitación durante 24 horas a 4°C. A continuación, se lavaron los pocillos cinco veces y se añadió tampón de elución durante 30 segundos, pasando posteriormente las muestras a otros pocillos en los que previamente se ha añadido tampón de neutralización y tampón de carga. Las muestras se desnaturalizaron durante 3 minutos a 95°C y se guardaron a -20°C hasta su utilización.

La presencia de la proteína E de SARS-CoV y de la proteína celular sintenina fue analizada mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos para cada proteína.

## **6.5. Fraccionamiento celular**

Para realizar el fraccionamiento celular de las fracciones citoplasmática y nuclear en células en cultivo, células Vero E6 previamente infectadas se lavaron dos veces con PBS y se levantaron de la placa usando una espátula estéril. Las células levantadas se centrifugaron a baja velocidad (2000 rpm) durante 2 minutos, eliminando el sobrenadante y posteriormente lisando las células con ayuda de la micropipeta y un tampón de lisis compuesto por 150 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 20

mM Tris/HCl (pH 7.5), 2 mM DTT e IGEPAL al 0.5%. El lisado celular se incubó durante 5 minutos en hielo y se centrifugó durante 2 minutos a 3000 rpm, guardando el sobrenadante (fracción citosólica) y el sedimento (fracción nuclear) a -20°C hasta su utilización.

## **6.6. Sistema de doble híbrido en levaduras**

Para identificar proteínas que interaccionaran con la proteína E del SARS-CoV se realizó un sistema de doble híbrido (Hybrigenics, France). Como cebo se utilizaron los aminoácidos del 36 al 76 del extremo carboxilo terminal de la proteína E (E<sub>CT</sub>). En el escrutinio se ha utilizado una genoteca de 10 millones de clones de DNA complementarios (cDNAs) independientes, elaborada a partir pulmón humano. El dominio E<sub>CT</sub> se clonó en el vector pB27, permitiendo su unión al dominio de unión a LexA. La construcción con la proteína cebo se transformó en la cepa de levaduras L40ΔGAL4 (Fromont-Racine et al, 1997) y después se cruzó con la cepa Y187, previamente transformada con la librería de cDNAs. Se analizaron 80.3 millones de interacciones. Las bacterias se seleccionaron en un medio sin leucina, triptófano e histidina y se seleccionaron 268 clones positivos, identificando los anzuelos usando PCR y secuenciación. Posteriormente, las secuencias se filtraron y compararon con la base de datos de *GenBank* y usando el programa *BLASTn* (NCBI). A cada interacción se le asignó un valor de predicción biológica (PBS) según la fiabilidad del resultado (Formstecher et al, 2005).

## **7. PATOGÉNESIS VIRAL EN RATÓN**

### **7.1. Cepa de ratón utilizada, inoculación y manejo de ratones infectados**

Todos los protocolos de trabajo fueron aprobados por el Comité de Ética del centro de trabajo CISA-INIA (números de permiso: 2011-009 y 2011-09) de acuerdo con el Real Decreto Español (RD 1201/2005) y las normas internacionales de la Unión Europea 2010/63/UE y la ley española 32/2007 sobre la protección y el manejo de los animales de experimentación. Para los experimentos con animales infectados por SARS-CoV se utilizaron ratones hembras libres de patógenos específicos

BALB/c OlaHsD (Harlan) de 16 semanas de edad. Para la inoculación con los virus recombinantes, los ratones se anestesiaron previamente usando isofluorano y se inocularon utilizando 100000 ufp del virus correspondiente en un volumen de 50 µl de DMEM suplementado con 2% de FBS. La manipulación de ratones infectados con SARS-CoV tuvo lugar en un laboratorio de nivel 3 de bioseguridad del Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA) equipado con un sistema de inactivación biológica de efluentes líquidos y de tratamiento de aire, vestimenta adecuada para el operador, compuesta por monos y calzas de protección (Tyvek) y varios pares de guantes, además de un sistema de filtración de aire *HEPA Airmate* (3M) y un rack ventilado *Animal transport unit-Bio containment unit* (Harvard) para mantener a los animales durante el desarrollo del experimento.

## **7.2. Seguimiento de la enfermedad y análisis de la virulencia**

Con el objetivo de analizar la virulencia de los virus recombinantes el peso, síntomas de enfermedad y supervivencia de los ratones inoculados se monitorizó diariamente, durante un periodo de 10 días. Los ratones que durante el experimento alcanzaron pérdidas de peso superiores al 25% fueron sacrificados de acuerdo con los protocolos de eutanasia establecidos.

## **7.3. Producción viral en los pulmones de ratones infectados**

Para analizar el título viral en los ratones inoculados, los pulmones de los ratones se recogieron a 2 y 4 días después de la inoculación. El pulmón derecho se homogenizó usando 2 ml de PBS suplementado con 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 50 µg/ml de gentamicina y 0.25 µg/ml de anfotericina B y un homogeneizador *gentleMACS Dissociator* (Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se centrifugaron a 3000xg durante 10 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante para su posterior titulación.

#### **7.4. Extracción de RNA y proteínas de pulmón**

Para obtener el RNA total, los pulmones se recogieron a 2 y 4 días después de la inoculación y se incubaron con el reactivo *RNAlater* (Ambion) durante 48 horas a 4°C y después a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Los pulmones se homogeneizaron usando 2 ml de tampón *RLT lysis buffer* (QIAGEN) suplementado con  $\beta$ -mercaptoetanol al 1% y el sistema *gentleMACS Dissociator* (Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se centrifugaron a 3000xg durante 10 minutos y el RNA se purificó a partir de los sobrenadantes utilizando el reactivo *RNeasy mini kit* (QIAGEN) como se ha descrito previamente.

Para realizar los extractos de proteínas a partir de los pulmones de ratones infectados, muestras a los 2 días después de la infección se recogieron y se homogeneizaron usando el kit nuclear extract (Active Motif, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante para separar las fracciones citoplasmáticas y nuclear. La fracción citoplasmática se utilizó para evaluar la expresión de las proteínas de interés mediante *Western blot*.

#### **7.5. Histopatología de tejido pulmonar de ratón**

Los pulmones izquierdos de los ratones inoculados se recogieron a 2 y 4 días después de la infección y se fijaron con formalina de zinc al 10% durante 24 horas a 4°C. Los pulmones fijados se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 5  $\mu$ m utilizando un microtomo. Para analizar la histopatología las muestras se tiñeron usando hematoxilina y eosina y se analizaron usando un microscopio. Se evaluó el grado de daño en pulmón dando una puntuación de 0 a 3 según la cantidad de edema e infiltrados celulares observados, siendo 0, casi inexistente, y 3, los espacios aéreos totalmente colapsados.

#### **7.6. Tratamiento con el inhibidor de la proteína p38 MAPK de ratones BALB/c infectados con el SARS-CoV.**

Para evaluar el efecto del compuesto SB203580, un inhibidor de la proteína p38 MAPK, ratones hembra BALB/c de 16 semanas se inocularon intranasalmente con

100000 ufp del virus nativo. 4 horas después de la inoculación y cada 12 horas a partir de ese momento, desde el día 1 hasta el día 8, los ratones se trataron intraperitonealmente con SB203580 (*Millipore*) a una concentración de 6 mg/kg de peso corporal y día usando un solvente con PBS al 2% de dimetil sulfóxido (DMSO). Se analizó la supervivencia de los ratones tratados con el inhibidor o solo con el solvente en tres experimentos independientes y usando 5 ratones por variable. Para analizar la inhibición de la proteína p38 MAPK, se sacrificaron ratones 2 días después de la inoculación y se analizaron mediante *Western blot* los niveles de la proteína de choque térmico 27 (HSP27) total y fosforilada en pulmones homogeneizados usando anticuerpos específicos. La cantidad de proteína HSP27 total y fosforilada se cuantificó mediante análisis densitométricos usando el programa *Quantity One*, versión 4.5.1 (*Bio-Rad*). En todos los casos, los niveles de HSP27 fosforilada se normalizaron con los niveles de proteína HSP27 total. Se usaron tres experimentos diferentes en todos los casos, obteniendo resultados similares. Además, se analizaron diferentes niveles de exposición de los geles dentro del mismo experimento para asegurar que los datos obtenidos se encontraban dentro de un rango lineal.

## **8. ANÁLISIS DE TRANSCRIPTÓMICA**

### **8.1. Análisis de la integridad del RNA**

La integridad del RNA extraído a 2 días después de la infección de pulmones de los ratones inoculados fue evaluada con un *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies) siguiendo las especificaciones del fabricante. Los datos fueron analizados usando el programa informático *2100 Expert* (Agilent Technologies).

### **8.2. Análisis de *microarrays***

La expresión génica en pulmones de ratones sin infectar o infectados con el virus con y sin PBM de la proteína E se analizó usando micromatrices de oligonucleótidos (*microarrays*) *Sure Print G3 Agilent 8x60K* de ratón (G4852A-028005). El RNA se obtuvo como se ha descrito previamente, se amplificaron 200

ng de RNA usando el *One Color Low Input Quick Amp Labeling Kit* (Agilent Technologies) y se purificó usando el *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La preparación e hibridación de las sondas se llevó a cabo como se describe en el *One-Color Microarray Based Gene Expression Analysis Manual Ver. 6.5* (Agilent Technologies). Brevemente, por cada hibridación se mezclaron 600 ng de sondas Cy3 y se añadieron 5  $\mu$ l de agente bloqueante 10x, 1  $\mu$ l de tampón de fragmentación 25x agua libre de nucleasas hasta un volumen total de 25  $\mu$ l. Las muestras se incubaron a 60°C durante 30 minutos para fragmentar el RNA y la reacción se detuvo añadiendo 25  $\mu$ l de tampón de hibridación 2x. Las muestras se pasaron a hielo y rápidamente se cargaron en las micromatrices durante 17 horas a 65°C para permitir la hibridación. Después de la hibridación las muestras se lavaron durante 1 minuto usando el tampón de lavado GE 1 a temperatura ambiente durante 1 minuto y el tampón de lavado GE 2 a 37°C durante otro minuto. Posteriormente, las micromatrices de oligonucleótidos se centrifugaron a 2000 rpm durante 2 minutos y se cuantificaron usando el escáner *Agilent Microarray Scanner* y el programa *Feature Extraction Software* (Agilent Technologies).

### **8.3. Análisis de datos**

El análisis de los datos se realizó utilizando métodos de modelo lineal para determinar los genes diferencialmente expresados. Se analizó cada sonda para ver los cambios en la expresión usando métodos bayesianos empíricos (Benjamini & Hochberg, 1995). Se estimó la significación estadística de la expresión diferencial de los genes, expresada como valores p, con el método LIMMA (Smyth, 2004), una variante del t-test clásico, optimizado para datos de *microarrays* con pocas réplicas. Para compensar la sobreestimación de la significación estadística que se produce cuando se aplica cualquier test estadístico numerosas veces, los valores p se ajustaron por el método que controla la tasa de falsos descubrimientos (FDR) (Benjamini & Hochberg, 1995).

#### **8.4. Selección de genes relevantes**

Se seleccionaron como genes candidatos aquellos con un FDR menor que 0.01. Además, solo los genes con una tasa de cambio mayor que 2 o menor que -2 fueron considerados para el estudio posterior. Se utilizó el sistema *FIESTA viewer* (Oliveros et al, 2007) para la evaluación del efecto de la aplicación de filtros estadísticos a los resultados.

#### **8.5. Análisis funcional de los resultados**

El programa *DAVID* (Huang da et al, 2009a; Huang da et al, 2009b) se utilizó para estimar el análisis funcional de los resultados obtenidos y como fuente de anotaciones se usaron los procesos biológicos descritos en *Gene-Ontology* (Ashburner et al, 2000).

### **9. ESTABILIDAD DE LOS RECOMBINANTES GENERADOS**

#### **9.1 Estabilidad en cultivos celulares de los recombinantes generados**

La estabilidad de los distintos virus recombinantes se analizó pasando los virus 16 veces en células Vero E6 y DBT-mACE2. Para ello, un tercio del sobrenadante de las células infectadas con los distintos virus se pasó sobre células Vero E6 y DBT-mACE2 cada 24 horas después de la infección, recogiendo muestra para analizar el RNA a los pases 1, 8 y 16. Se analizó la secuencia comprendida entre el gen S y el gen 9b del genoma. Para ello se hicieron RT-PCRs usando oligonucleótidos específicos (**Tabla V**), los productos amplificados se purificaron en geles de agarosa al 0.8% usando el reactivo *QIAquick gel extraction kit* (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante y se mandaron a secuenciar.

**Tabla V. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del último tercio del genoma viral.**

Producto de PCR	Oligonucleótido	Secuencia	Longitud (nt)	Tamaño del producto de PCR (pb)
1	S1-VS	ATGTTTATTTTCTTATTATTTC	22	1210
	S1210-RS	CACCAGTTTGTCTGGCGC	19	
2	S1002-VS	CCCTTCTGTCTATGCATGGG	20	1242
	S2243-RS	CGACGATTTAGTTGTGTGC	19	
3	S1943-VS	GCGACATTCCTATTGGAGCTGGC	23	855
	S2797-RS	CGTCTTGCAGCTTGCCCAATGC	22	
4	S2500-VS	GCGCAGAAGTTCAATGGAC	19	1269
	S3768-RS	TTATGTGTAATGTAATTTGACACCC	25	
5	S3581-VS	GGCCTTGGTATGTTTGGCTCGGC	23	1275
	E231-RS	TTAGACCAGAAGATCAGGAACTCC	24	
6	E-VS	CTCTTCAGGAGTTGCTAATCCAGCAA	29	1228
	27244-RS	TGGGGTTCTTCATCATGTAACTCCG	22	
7	27024-VS	CGCCGGTAGCAACGACAATATTGC	24	1374
	28397-RS	GGGTAGCTCTTCGGTAGTAGCC	22	
8	N1-VS	ATGTCTGATAATGGACCCC	19	1269
	N1269-RS	TTATGCCTGAGTTGAATCTGC	21	
9	N611-VS	GGGGAAATTCTCCTGCTCG	19	875
	3'-end-RS	GTCATTCTCCTAAGAAGCTATTAAAA	30	

TCAC



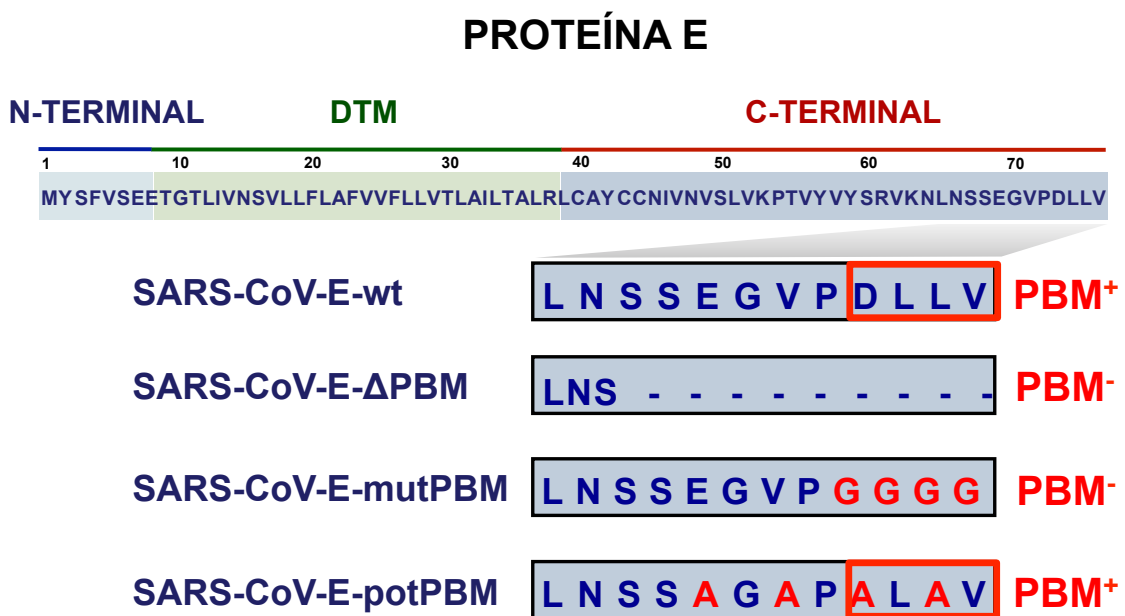
## **RESULTADOS**



## 1. RELEVANCIA DEL MOTIVO DE UNIÓN A PDZ DE LA PROTEÍNA E DEL SARS-CoV EN VIRULENCIA

### 1.1. Generación y crecimiento de SARS-CoVs recombinantes con el motivo de unión a PDZ de la proteína E mutado o deletado

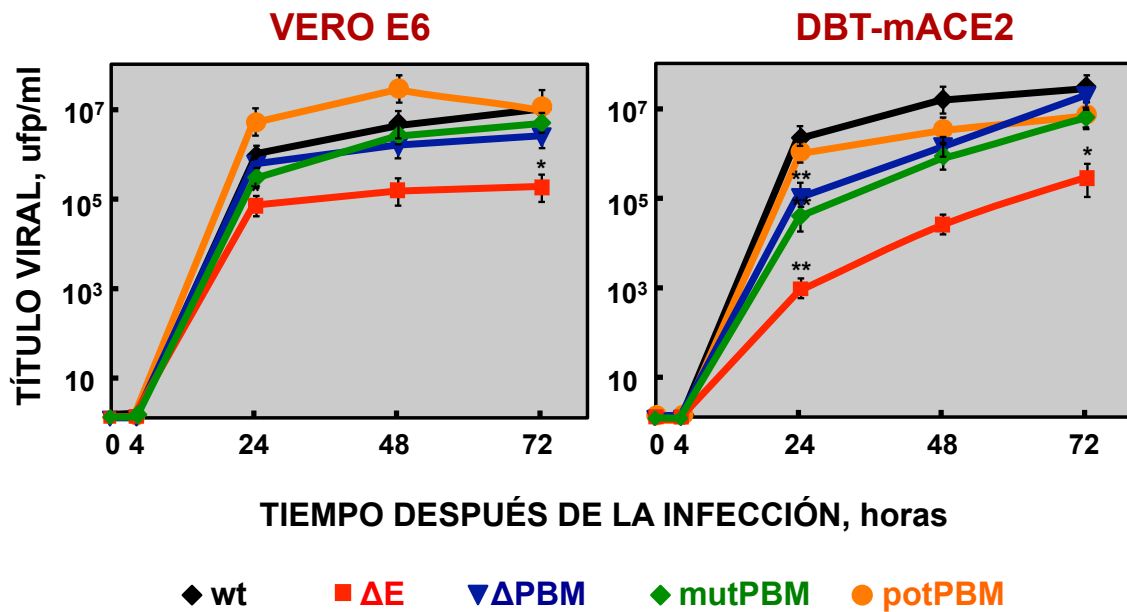
Para evaluar el papel del motivo de unión a PDZ de la proteína E del SARS-CoV en la patogénesis del virus, se generaron tres virus recombinantes con el PBM de la proteína E mutado o deletado (SARS-CoV-E-PBMs) (**Figura 8**).



**Figura 8. Generación de SARS-CoVs recombinantes con el PBM de la proteína E mutado o deletado.** La parte superior de la figura representa la secuencia de aminoácidos de la proteína E del SARS-CoV y sus distintos dominios: amino terminal (N-terminal), transmembrana (DTM) y carboxilo terminal (C-terminal). Las regiones expandidas muestran los últimos doce aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la proteína E para los diferentes virus generados. SARS-CoV-E-wt representa la secuencia nativa. En el SARS-CoV-E-ΔPBM y el SARS-CoV-E-mutPBM, se eliminó el PBM de la proteína E mediante delección o mutaciones puntuales, reduciendo o manteniendo el tamaño de la proteína E, respectivamente. En el SARS-CoV-E-potPBM, se mutaron cuatro aminoácidos a alanina, modificando el extremo carboxilo terminal y manteniendo el PBM. Los aminoácidos mutados se muestran en rojo y los recuadros rojos indican la presencia (PBM<sup>+</sup>) o ausencia (PBM<sup>-</sup>) de un PBM.

Los mutantes sin PBM se construyeron utilizando un SARS-CoV adaptado al crecimiento en ratón (MA15), dado que la infección de ratones convencionales con el virus adaptado a ratón reproduce una patología similar a la observada en humanos (Fett et al, 2013; Roberts et al, 2007). En el virus SARS-CoV-E- $\Delta$ PBM ( $\Delta$ PBM), se eliminaron los últimos nueve aminoácidos de la proteína E, truncando el extremo carboxilo terminal y eliminando el PBM. En el SARS-CoV-E-mutPBM (mutPBM), se eliminó el PBM de la proteína E mutando los últimos cuatro aminoácidos a glicina, manteniendo el tamaño original de la proteína E. Por último, en el recombinante SARS-CoV-E-potPBM (potPBM), se mutaron cuatro aminoácidos del extremo terminal de la proteína E a alanina, modificando la secuencia del extremo carboxilo terminal y manteniendo un PBM potencial (**Figura 8**). Los virus mutantes se rescataron eficientemente, se clonaron y se confirmó su secuencia (datos no mostrados).

Para analizar si la eliminación del PBM de la proteína E del SARS-CoV altera la producción de virus, se realizaron cinéticas de crecimiento de los distintos virus recombinantes usando células de mono Vero E6 y células de ratón DBT-mACE2 (**Figura 9**). A pesar de que se observó un menor título viral en los virus  $\Delta$ PBM y mutPBM en células DBT-mACE2 a 24 hdi, todos los virus, incluyendo el que contiene la proteína E nativa (wt) y los recombinantes generados sin ( $\Delta$ PBM y mutPBM) o con (potPBM) PBM, alcanzaron títulos similares a 72 hdi en ambos tipos celulares. Por el contrario, el título viral del virus sin proteína E ( $\Delta$ E) se redujo alrededor de 50 veces (**Figura 9**). Este resultado indicó que el PBM de la proteína E no es esencial para el crecimiento eficiente del SARS-CoV en células Vero E6 y DBT-mACE2, al menos a tiempos tardíos después de la infección.

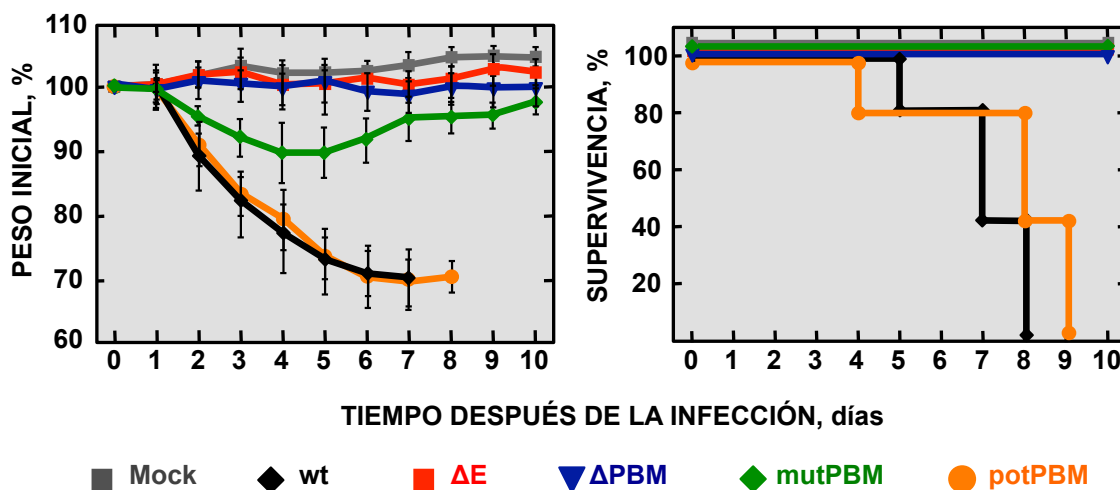


**Figura 9. Crecimiento en cultivos celulares de los virus recombinantes generados.** Se infectaron células Vero E6 y DBT-mACE2 a una mdi de 0.05 con el virus nativo (wt), virus sin proteína E ( $\Delta E$ ) y los virus recombinantes generados sin ( $\Delta PBM$  y  $mutPBM$ ) y con ( $potPBM$ ) PBM en la proteína E. Los sobrenadantes se recolectaron a 4, 24, 48 y 72 hdi y la progenie viral se tituló mediante formación de placas de lisis en medio semi-sólido. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres experimentos independientes. Los datos estadísticamente significativos se indican con uno (t de Student p-valor <0.05) o dos (t de Student p-valor <0.01) asteriscos.

## 1.2. Relevancia del PBM de la proteína E en la patogénesis y crecimiento del SARS-CoV en ratón

Para analizar el papel del PBM de la proteína E del SARS-CoV en la virulencia, ratones BALB/c se inocularon intranasalmente con los distintos virus recombinantes, con o sin PBM en la proteína E, y se monitorizó diariamente durante 10 días la pérdida de peso y la mortalidad (**Figura 10**). Los ratones sin infectar (Mock) y los ratones infectados con el virus que carece de la proteína E ( $\Delta E$ ) no perdieron peso y presentaron una supervivencia del 100%. Sin embargo, los ratones inoculados con los virus que presentaban un PBM en la proteína E, ya sea el nativo (wt) u otro modificado ( $potPBM$ ), presentaron una importante pérdida de peso y mostraron síntomas de la enfermedad, tales como una movilidad reducida y presencia de pelo erizado (datos no mostrados), resultando en una

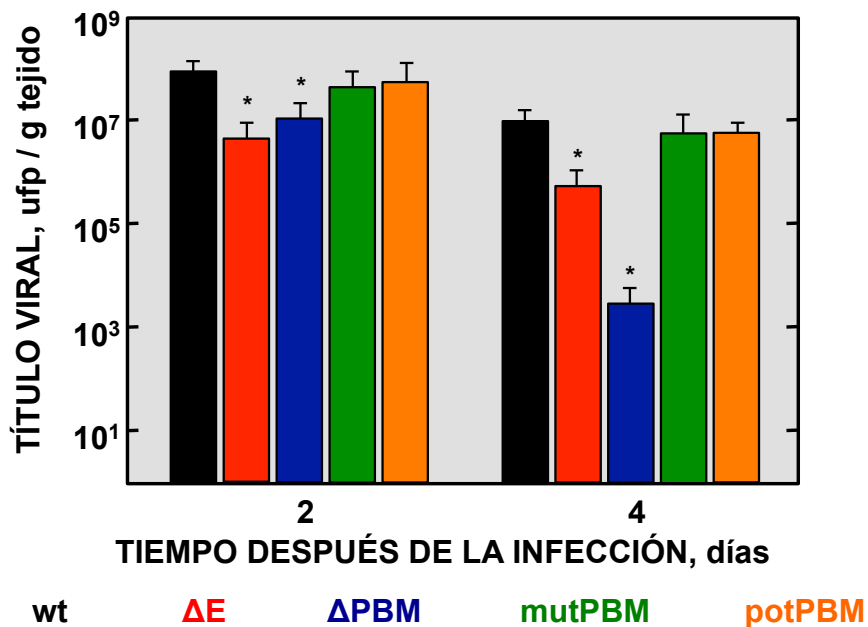
mortalidad del 100%. Por el contrario, los ratones infectados con los virus recombinantes sin PBM en la proteína E, por delección de los últimos nueve aminoácidos ( $\Delta$ PBM) o por mutación de los últimos cuatro (mutPBM), no presentaron pérdida de peso, o solo una moderada pérdida, respectivamente, y una supervivencia del 100% (**Figura 10**). El hecho de que el mutante  $\Delta$ PBM se encontrara más atenuado que el mutPBM, podría ser debido a la presencia de secuencias, en el extremo carboxilo terminal de la proteína E, además del PBM, que también contribuyan a la patogénesis viral. Los datos obtenidos indicaron que la eliminación del PBM de la proteína E da lugar a un fenotipo atenuado *in vivo*, y que la presencia de un PBM funcional es necesaria para la virulencia del SARS-CoV.



**Figura 10. Patogénesis causada por los rSARS-CoV-E-PBMs en ratones BALB/c.** Grupos de cinco ratones BALB/c de 16 semanas de edad se inocularon usando 100000 ufp de los distintos virus recombinantes. Se determinaron las pérdidas de peso medias (gráfica de la izquierda) y el porcentaje de supervivencia (gráfica de la derecha) durante 10 días. Las barras de error representan la desviación estándar del peso de los ratones en cada evaluación.

El PBM de la proteína E no es esencial para el crecimiento del SARS-CoV en cultivos celulares. Para evaluar si este motivo afecta a la producción viral en ratón y si la atenuación observada *in vivo* se debía a una disminución en el crecimiento viral, se inocularon intranasalmente ratones BALB/c con los distintos virus recombinantes y, a días 2 y 4 después de la infección, se recogieron los pulmones, se homogeneizaron y se determinó el título viral (**Figura 11**). Los virus  $\Delta$ E y  $\Delta$ PBM mostraron un menor título en los pulmones de los ratones infectados a 2 y 4 días

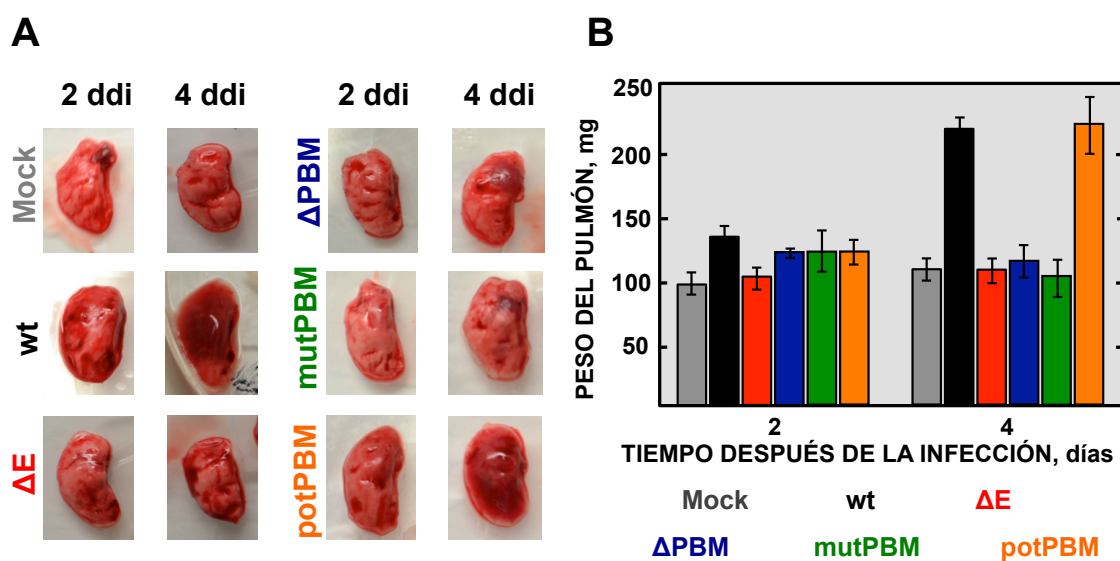
después de la inoculación, en comparación con el título obtenido con los virus wt y potPBM, en los cuales el PBM de la proteína E está presente. El mutante  $\Delta E$  mostró un título viral mayor que el virus  $\Delta PBM$  4 días después de la infección, sugiriendo que la proteína E del virus  $\Delta PBM$  podría inducir un estado antiviral durante la infección. El virus mutPBM, que carece del PBM de la proteína E pero mantiene el tamaño completo de la proteína, creció a niveles similares a los del virus nativo a los días 2 y 4 después de la inoculación. Estos resultados indicaron que un virus sin PBM en la proteína E, pero que mantiene el mismo tamaño que la proteína E nativa, replica eficientemente *in vivo* y además se encuentra atenuado, lo que implica que el nivel de replicación del SARS-CoV no está asociado necesariamente a su virulencia (**Figura 11**).



**Figura 11.** Efecto del PBM de la proteína E del SARS-CoV en la producción viral en pulmones de ratones BALB/c. Grupos de seis ratones BALB/c de 16 semanas de edad se inocularon con 100000 ufp de cada virus recombinante. A los días 2 y 4 después de la infección tres ratones de cada grupo se sacrificaron y se determinó el título en pulmón. Las barras de error representan la desviación estándar de los títulos obtenidos en los pulmones de los tres ratones utilizados por cada variable experimental. Los datos estadísticamente significativos se indican con un asterisco (t de Student p-valor <0.05).

### 1.3. Patología pulmonar ocasionada por el SARS-CoV en presencia y ausencia del PBM de la proteína E

Para determinar los mecanismos por los cuales el PBM de la proteína E confiere virulencia *in vivo*, la patología pulmonar en ratones BALB/c infectados con los diferentes virus recombinantes se analizó a 2 y 4 días después de la infección. Los pulmones de los ratones infectados se recogieron a los días señalados y se analizaron las características macroscópicas y su peso (**Figura 12**).



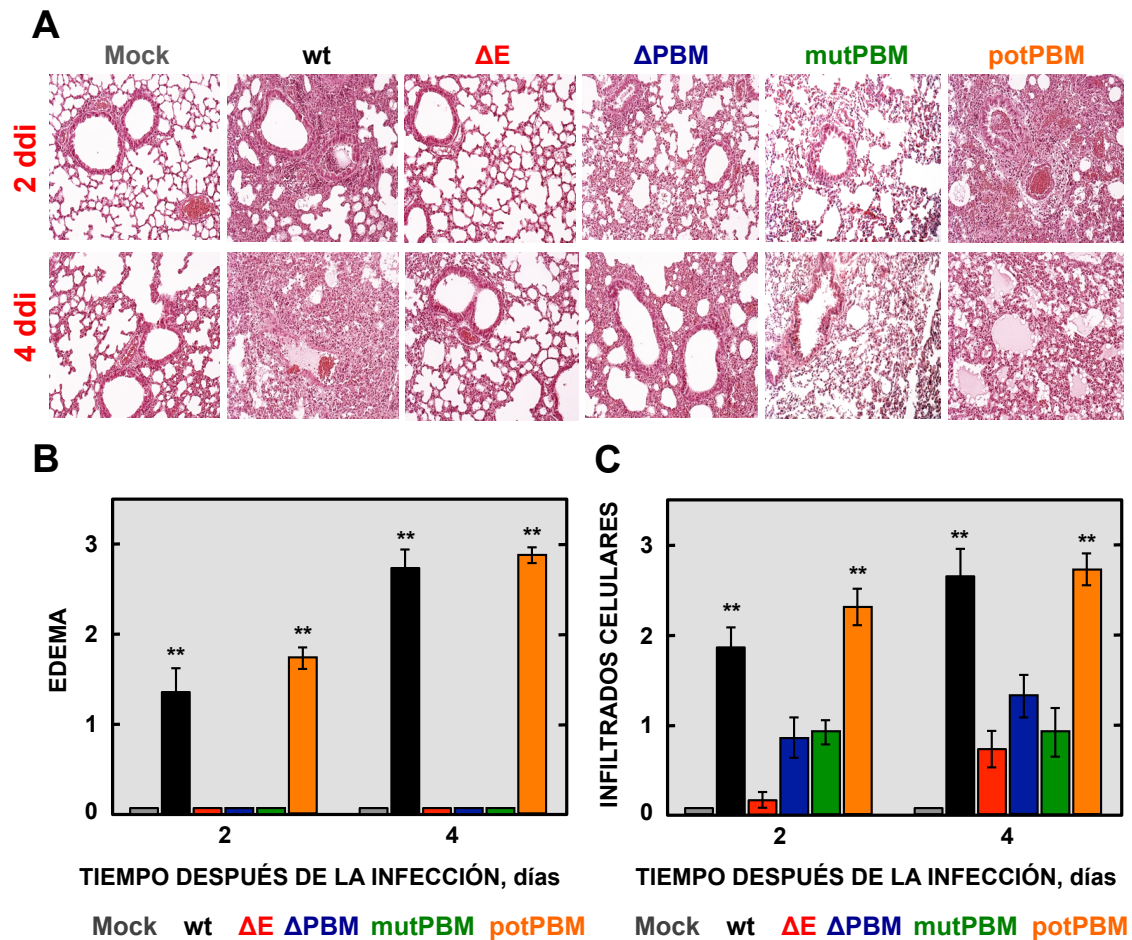
**Figura 12. Patología en pulmones de ratones infectados con los virus rSARS-CoV-E-PBMs.** Grupos de seis ratones BALB/c de 16 semanas de edad se inocularon con 100000 ufp de los virus recombinantes y a los 2 y 4 días después de la infección (ddi) se sacrificaron tres ratones de cada grupo y se recogieron sus pulmones. **(A)** Patología macroscópica de los pulmones obtenidos de ratones infectados con los virus recombinantes. **(B)** Peso de los pulmones recogidos a 2 y 4 ddi. Las barras de error representan la desviación estándar de los pesos de los pulmones de los tres ratones utilizados en cada evaluación.

No se observaron lesiones importantes ni cambios en el peso de los pulmones de los ratones sin infectar (Mock) o de los ratones infectados con los virus que carecen de un PBM funcional en la proteína E ( $\Delta E$ ,  $\Delta PBM$  y *mutPBM*). Por el contrario, los pulmones de los ratones infectados con virus que contienen el PBM de la proteína E (*wt* y *potPBM*) se encontraban altamente edematosos, con amplias áreas hemorrágicas, especialmente al cuarto día después de la infección. Además,



los pulmones de los ratones infectados con los virus virulentos aumentaron considerablemente su peso, posiblemente debido a la acumulación de edema y a la infiltración celular (**Figura 12**).

Para caracterizar con más detalle la patología pulmonar asociada a la presencia del PBM de la proteína E del SARS-CoV, se obtuvieron microsecciones de los pulmones de los ratones recogidos a los 2 y 4 días después de la inoculación. Las muestras se tiñeron usando hematoxilina y eosina (**Figura 13A**), se analizaron los cambios histopatológicos y se evaluó el grado de daño pulmonar determinando la presencia de edema pulmonar e infiltrados celulares (**Figura 13B y 13C**). El análisis histopatológico de los ratones infectados se realizó a los 2 y 4 días después de la infección, dado que previamente se había demostrado que la patología pulmonar es mayor a estos tiempos (Fett et al, 2013; Roberts et al, 2005). Los animales no infectados (Mock) o infectados con el virus sin proteína E ( $\Delta E$ ) no presentaron evidencias de daño pulmonar, mostrando las vías aéreas (alveolos y bronquiolos) despejadas y ausencia de infiltrados celulares a 2 y 4 días después de la inoculación. Sin embargo, los pulmones de ratones infectados con los virus recombinantes que incluían un PBM en la proteína E (wt y potPBM), mostraron engrosamiento de los epitelios alveolares, presencia de infiltraciones leucocitarias y edema en las zonas infectadas en los dos tiempos evaluados. En contraste, los ratones infectados con virus que incluían una proteína E sin un PBM funcional ( $\Delta PBM$  y mutPBM), mostraron mínimas evidencias de daño epitelial o edema y solo una pequeña cantidad de infiltrados celulares a los 4 días después de la infección, mostrando las vías aéreas pulmonares libres (**Figura 13**).



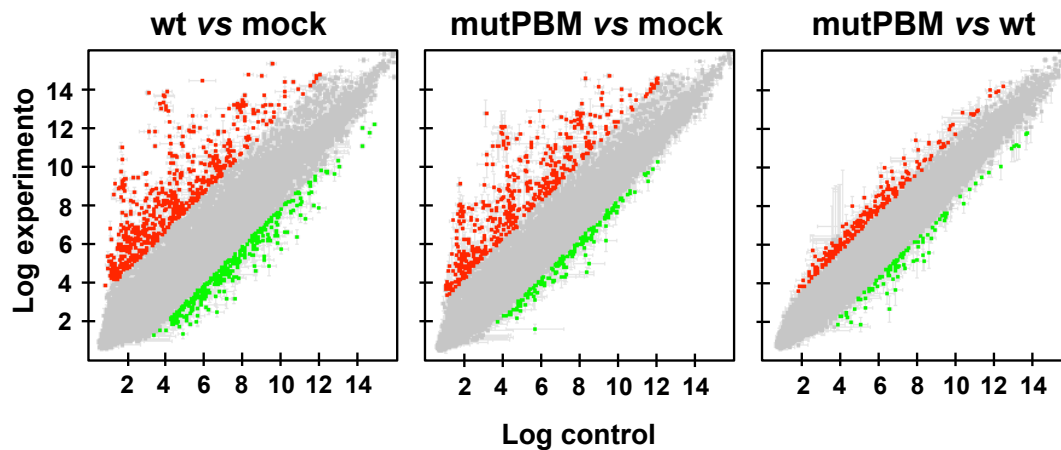
**Figura 13. Patología pulmonar asociada al PBM de la proteína E del SARS-CoV.** Grupos de seis ratones BALB/c de 16 semanas de edad se inocularon con 100000 ufp de los virus recombinantes. A los 2 y 4 días después de la infección (ddi) tres ratones de cada grupo se sacrificaron y se recogieron sus pulmones. **(A)** Los pulmones se fijaron con formalina con zinc, se incluyeron en parafina, y se cortaron y tiñeron con hematoxilina y eosina. El aumento original de las microfotografías fue 20x. **(B y C)** Se evaluó el grado de daño en pulmón dando una puntuación de 0 a 3 según la cantidad de edema **(B)** e infiltrados celulares **(C)**, siendo 0, casi inexistente, y 3, los espacios aéreos totalmente colapsados. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos obtenidos en los pulmones de los tres ratones utilizados por cada variable experimental. Los datos estadísticamente significativos se indican con dos asteriscos (t de Student p-valor <0.01).

La patología pulmonar causada por los virus que incluían el PBM de la proteína E (wt y potPBM) se caracterizó por la presencia de infiltrados celulares y espacios aéreos colapsados por la presencia de edema pulmonar **(Figura 13)**, causando ARDS y conduciendo finalmente a la muerte de los ratones infectados. Estos resultados indicaron que la atenuación observada para los virus que carecen del PBM de la proteína E, correlaciona con una disminución del daño pulmonar.

## 2. EFECTO DEL PBM DE LA PROTEÍNA E EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL HUÉSPED DURANTE LA INFECCIÓN CON SARS-CoV

### 2.1. Análisis de la expresión génica en pulmones de ratones infectados con SARS-CoV en ausencia y presencia del PBM de la proteína E

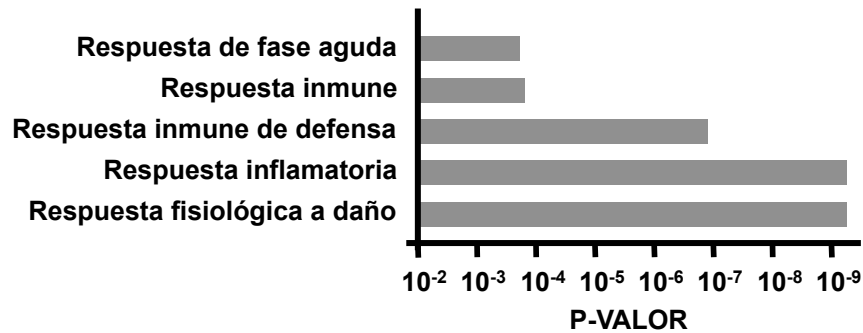
Para analizar el efecto del PBM de la proteína E en la expresión génica del huésped durante la infección con SARS-CoV *in vivo*, los genes diferencialmente expresados en pulmones de ratones infectados con virus con y sin PBM en la proteína E se analizaron usando micromatrices de oligonucleótidos (*microarrays*). Para ello, se utilizaron ratones sin infectar o infectados con 100000 ufp del virus nativo (wt), el cual contiene el PBM de la proteína E, o del virus con proteína E de longitud completa con el PBM mutado (mutPBM). Los pulmones de tres ratones por variable se recogieron dos días después de la inoculación. El RNA total se extrajo de los pulmones y los niveles de expresión de los genes celulares se estudiaron utilizando un *microarray* murino de *Agilent*. Se identificó un total de 922 y 640 genes celulares diferencialmente expresados con valores estadísticamente significativos en pulmones de ratones infectados con SARS-CoV con (wt) y sin (mutPBM) PBM en la proteína E, respectivamente, en comparación con los genes expresados en los ratones sin infectar (**Figura 14**). Asimismo, se encontraron 319 genes diferencialmente expresados en ratones infectados con el virus mutPBM en comparación con los observados en ratones infectados con el virus nativo, a pesar de haber únicamente cuatro aminoácidos de diferencia entre los dos virus. De los 319 genes diferencialmente expresados durante la infección con los virus sin y con PBM en la proteína E, 218 genes aumentaron su expresión y 101 la disminuyeron (**Figura 14**). Los cambios en la expresión génica se analizaron aplicando umbrales mínimos con tasas de cambio superiores a 2, o menores que -2, y una tasa de falsos descubrimientos (FDR) menor de 0.01.



**Figura 14. Análisis de la expresión génica en pulmones de ratones BALB/c sin infectar o infectados con los virus nativo y mutPBM.** El esquema muestra los genes diferencialmente expresados en ratones infectados con el virus nativo frente a ratones sin infectar (wt vs Mock), ratones infectados con el virus sin PBM en la proteína E frente a ratones sin infectar (mutPBM vs Mock), y ratones infectados con el virus sin PBM en la proteína E frente a ratones infectados con el virus nativo (mutPBM vs wt). Los puntos rojos, verdes y grises indican genes sobreexpresados, genes que están reprimidos y genes cuya expresión no se ve significativamente alterada, respectivamente. Solo se han considerado como diferencialmente expresados los genes cuya expresión génica cambia al menos dos veces con respecto al control. Solo se representan los genes con valores de FDR menores de 0.01.

## 2.2. Análisis funcional de los genes diferencialmente expresados

Los genes diferencialmente expresados durante la infección con el virus sin PBM en la proteína E (mutPBM), respecto a los expresados durante la infección con el virus nativo (wt), incluyendo la proteína E nativa, se clasificaron funcionalmente utilizando el programa DAVID (Huang da et al, 2009b). Como referencia para las anotaciones se usaron los procesos biológicos descritos en *Gene-Ontology* (Ashburner et al, 2000). Los genes sobreexpresados durante la infección con mutPBM frente a los expresados durante la infección con el virus nativo se englobaron en genes responsables de la adhesión, migración y morfogénesis celular (datos no mostrados). Por otro lado, la mayoría de los genes reprimidos correspondían a genes de respuesta a daño y genes implicados en la respuesta inflamatoria e inmune (**Figura 15**).



**Figura 15. Grupos biológicos a los que pertenecen los genes diferencialmente reprimidos en la infección con el SARS-CoV-E-mutPBM respecto a la infección por el virus nativo.** Agrupación de los genes que estaban diferencialmente expresados 2 días después de la infección de ratones con el SARS-CoV-E-mutPBM, en comparación con los ratones infectados con el virus nativo. La agrupación de genes está basada en los términos de procesos biológicos definidos en *Gene Ontology*. Los valores del eje de abscisas indican los valores de FDR obtenidos con el programa DAVID.

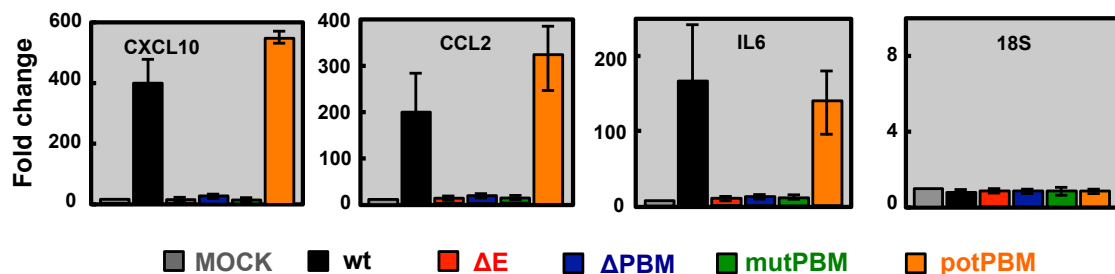
Los genes más significativos identificados al menos en uno de los grupos biológicos descritos fueron principalmente citoquinas inflamatorias: SAA2, CCL3, CXCL1, CXCL5, CALCA, SAA1, CXCL10, CCL2, IL1B, ORM1, IL6, CCL4 y CXCL9 (**Tabla VI**).

**Tabla VI. Genes reprimidos durante la infección con mutPBM respecto a wt y representados en los grupos biológicos más relevantes.**

Gen	Número de veces que cambia el gen	Función
SAA2	-5.72	Reclutamiento de células inmunes a sitios de inflamación
CCL3	-5.13	Reclutamiento y activación de leucocitos
CXCL1	-4.62	Actividad quimioatrayente de neutrófilos
CXCL5	-4.50	Quimiotaxis de neutrófilos
CALCA	-4.35	Reducción de los niveles de calcio sanguíneo
SAA1	-3.77	Reclutamiento de células inmunes a sitios de inflamación
CXCL10	-3.56	Quimioatrayente de monocitos/macrófagos, células T, NK y dendríticas
CCL2	-3.55	Quimioatrayente de monocitos
IL1B	-3.23	Mediador de la respuesta inflamatoria
ORM1	-3.04	Modulador de la actividad del sistema inmune

IL6	-2.96	Producción de inmunoglobulinas, diferenciación de infocitos B y activación de los linfocitos T citotóxicos y células plasmáticas
CCL4	-2.96	Quimioatrayente de células NK, monocitos y otras células inmunes
CXCL9	-2.93	Reclutamiento de leucocitos

La expresión diferencial de un grupo de citoquinas inflamatorias identificadas en el *microarray* (CXCL10, CCL2 y IL6) se confirmó mediante RT-qPCR. Para ello se evaluó el RNA de pulmones de ratones BALB/c infectados con los recombinantes generados y sacrificados 2 días después de la inoculación. Los niveles de expresión de los genes elegidos se analizaron utilizando ensayos *TaqMan* específicos para genes murinos, en relación con los niveles presentes en el RNA obtenido de ratones sin infectar. El RNA ribosomal 18S (rRNA) se utilizó para normalizar los datos (Frieman et al, 2010; Sheahan et al, 2008). El gen 18S no cambió su nivel de expresión durante la infección con el SARS-CoV nativo o con los SARS-CoV recombinantes generados (**Figura 16**).



**Figura 16. Expresión en pulmón de genes celulares durante la infección de ratones BALB/c con los virus recombinantes generados.** Cuantificación del mRNA de citoquinas inflamatorias diferencialmente expresadas en la infección con SARS-CoVs recombinantes, con y sin PBM en la proteína E. Las evaluaciones se obtuvieron mediante RT-qPCR utilizando ensayos *TaqMan* específicos. Los resultados se representaron en relación a los obtenidos en ratones sin infectar. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos obtenidos en los pulmones de los tres ratones utilizados por cada variable experimental.

Los resultados obtenidos mediante los ensayos de RT-qPCR se complementaron con los obtenidos usando *microarrays*. Estos resultados mostraron una disminución en la expresión de las citoquinas inflamatorias

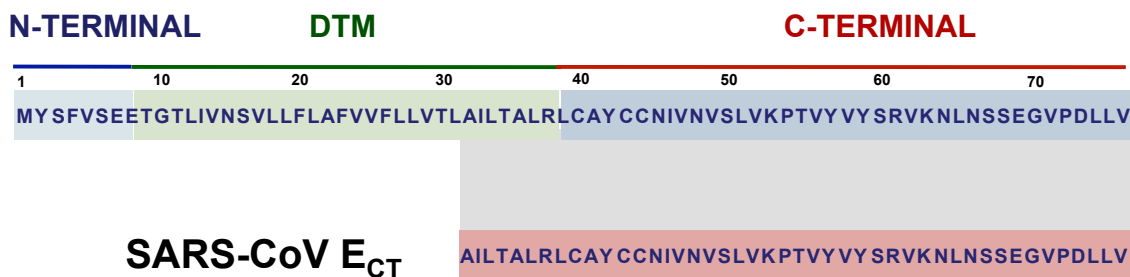
CXCL10, CCL2 y IL6 durante la infección con los virus sin PBM en la proteína E ( $\Delta E$ ,  $\Delta PBM$  y  $mutPBM$ ), en comparación con la infección con los virus con este motivo (wt y  $potPBM$ ), donde se produce un aumento en la expresión de los genes analizados. Estos resultados validan la expresión génica diferencial observada durante la infección de ratones con SARS-CoV con o sin el PBM en la proteína E. La eliminación del PBM da lugar a una disminución en la expresión de citoquinas inflamatorias. Estos resultados indicaron que la respuesta inmune exacerbada observada en el huésped durante la infección con SARS-CoV se redujo en ausencia del PBM en la proteína E, lo que podría explicar el fenotipo atenuado de este virus.

### **3. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES QUE INTERACCIONAN CON LA PROTEÍNA E DEL SARS-CoV**

#### **3.1. Sistema de doble híbrido en levaduras usando el extremo carboxilo terminal de la proteína E**

Recombinantes del SARS-CoV que carecen del PBM de la proteína E mostraron un fenotipo atenuado que se asoció con una disminución en la respuesta inflamatoria. Dado que el PBM es un motivo de interacción entre proteínas, su ausencia en la proteína E, en principio debería dar lugar a cambios en los patrones de interacción con proteínas celulares. Con el fin de identificar posibles factores celulares asociados con la presencia del PBM en la proteína E e implicados en la virulencia del SARS-CoV, se realizó una evaluación por doble híbrido en levaduras (**Figura 17**) usando el dominio carboxilo terminal de la proteína E como cebo. En este estudio se analizó la unión a los aminoácidos 36 al 76 de la proteína E ( $E_{CT}$ ) para evitar la inclusión del dominio transmembrana de la proteína, dado que este técnica solo analiza interacciones que puedan ir al núcleo celular. Este tipo de ensayo permite identificar proteínas que se asocian físicamente en un sistema *in vivo* y está basado en la activación transcripcional de genes identificables.

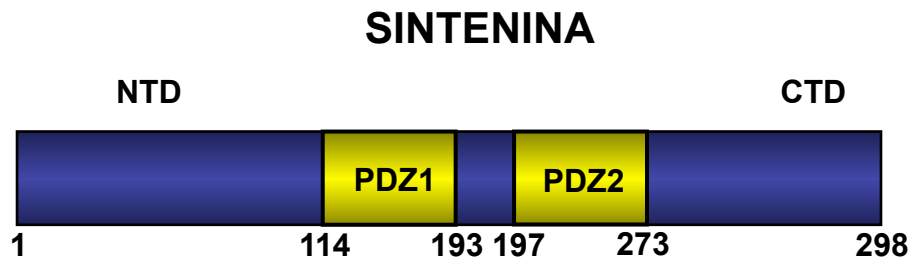
## PROTEÍNA E DEL SARS-CoV



**Figura 17. Secuencia de la proteína E del SARS-CoV utilizada como cebo en el ensayo con doble híbrido.** La parte superior de la figura muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína E nativa junto a los dominios amino terminal (N-terminal), transmembrana (DTM) y carboxilo terminal (C-terminal). La parte inferior muestra en el recuadro rosa la secuencia de aminoácidos de la proteína E utilizada como cebo (SARS-CoV E<sub>CT</sub>) en el ensayo con doble híbrido en levaduras.

Para identificar proteínas celulares que interaccionaran con la proteína E del SARS-CoV se utilizó una librería de cDNAs de pulmón humano. Se observó que la proteína celular sintenina (Número de acceso en *GeneBank* NM\_005625.3) interaccionó con el extremo carboxilo de la proteína E del SARS-CoV, dando lugar a 13 clones positivos en esta interacción con un nivel de fiabilidad de B, de la escala de niveles A, B, C, D y E, en la que los primeros implican mayor confianza en la interacción, tal como se ha descrito previamente (Formstecher et al, 2005). La proteína celular sintenina tiene una masa molecular de 32 kDa, incluye un extremo amino terminal (NTD), con 113 aminoácidos sin ningún motivo estructural descrito, seguido por dos dominios PDZ consecutivos (PDZ1 y PDZ2) y un pequeño dominio carboxilo terminal (CTD) compuesto por 24 aminoácidos (**Figura 18**) (Koroll et al, 2001). Todos los clones identificados en el ensayo por doble híbrido incluían ambos dominios PDZ, sugiriendo que la interacción entre estas proteínas podría estar mediada por estos dominios.



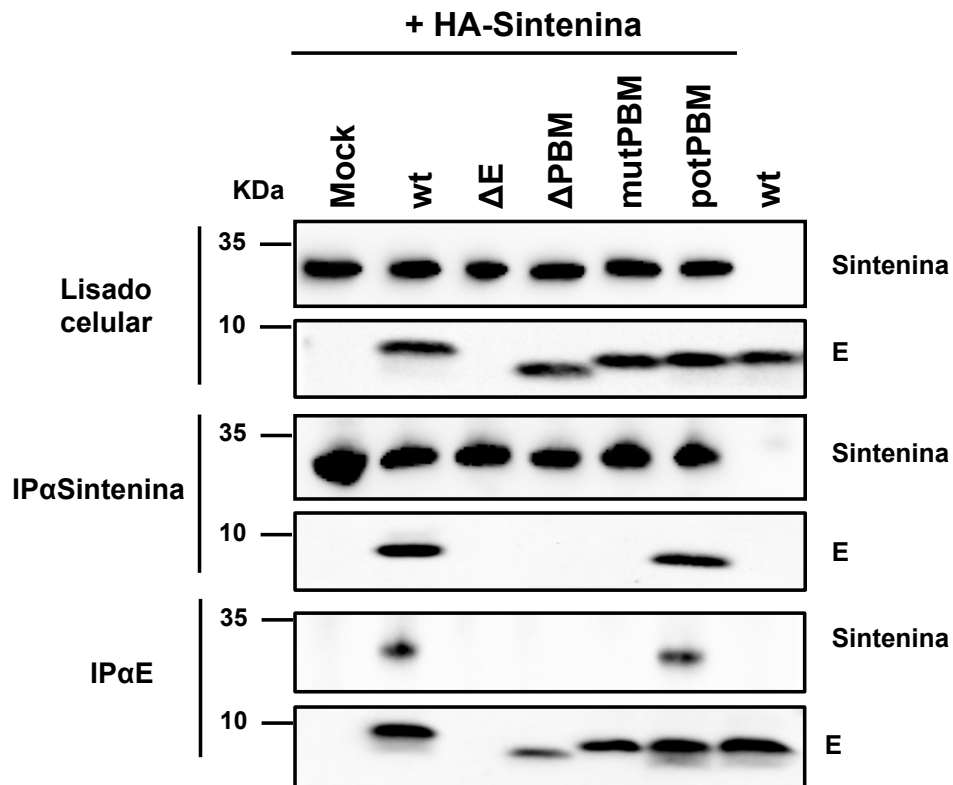


**Figura 18. Dominios de la proteína celular sintenina.** Representación esquemática de la proteína celular sintenina. Se muestra el dominio amino terminal (NTD), los dos dominios PDZ en amarillo (1 y 2) y el extremo carboxilo terminal (CTD). Los números en la parte inferior indican los aminoácidos al principio y final de cada uno de los dominios.

### 3.2. Interacción de la proteína E del SARS-CoV con la proteína sintenina

Para determinar si la interacción de la proteína E del SARS-CoV con la proteína celular sintenina tiene lugar durante el transcurso de la infección y si esta interacción está mediada por el PBM de la proteína E, se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación. Para ello, células Vero E6 se transfectaron con un plásmido que expresaba la proteína sintenina unida a un péptido marcador HA en el extremo amino. 24 horas después de la transfección, las células transfectadas se infectaron con los virus recombinantes con y sin PBM en la proteína E. Como control se utilizaron células sin transfectar con plásmidos que expresasen la proteína HA-sintenina e infectadas con el virus nativo. Las células se recogieron 24 horas después de la infección en tampón de lisis y se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación usando anticuerpos monoclonales específicos para el marcador HA o anticuerpos policlonales para la proteína E. La presencia de ambas proteínas se determinó por inmunodetección (*Western blot*) con los anticuerpos indicados (**Figura 19**). La inmunodetección mostró la presencia de la proteína sintenina en los extractos de las células transfectadas y la expresión de la proteína E en células infectadas con los virus recombinantes que expresaban la proteína E nativa o versiones mutadas de la misma. La inmunoprecipitación de la proteína sintenina (IP $\alpha$ Sintenina) usando anticuerpos específicos para el péptido HA, coprecipitó la proteína E exclusivamente en las células infectadas con virus recombinantes que contenían la proteína E con un PBM. Por el contrario, la proteína E no coimmunoprecipitó en células infectadas con los virus que

expresaban una proteína E sin el PBM. Asimismo, ensayos de coimmunoprecipitación con anticuerpos específicos para la proteína E (IP $\alpha$ E) mostraron que la coimmunoprecipitación también funcionó en el sentido opuesto, reforzando la interacción de las proteínas sintenina y E en el interior de la célula (Figura 19).

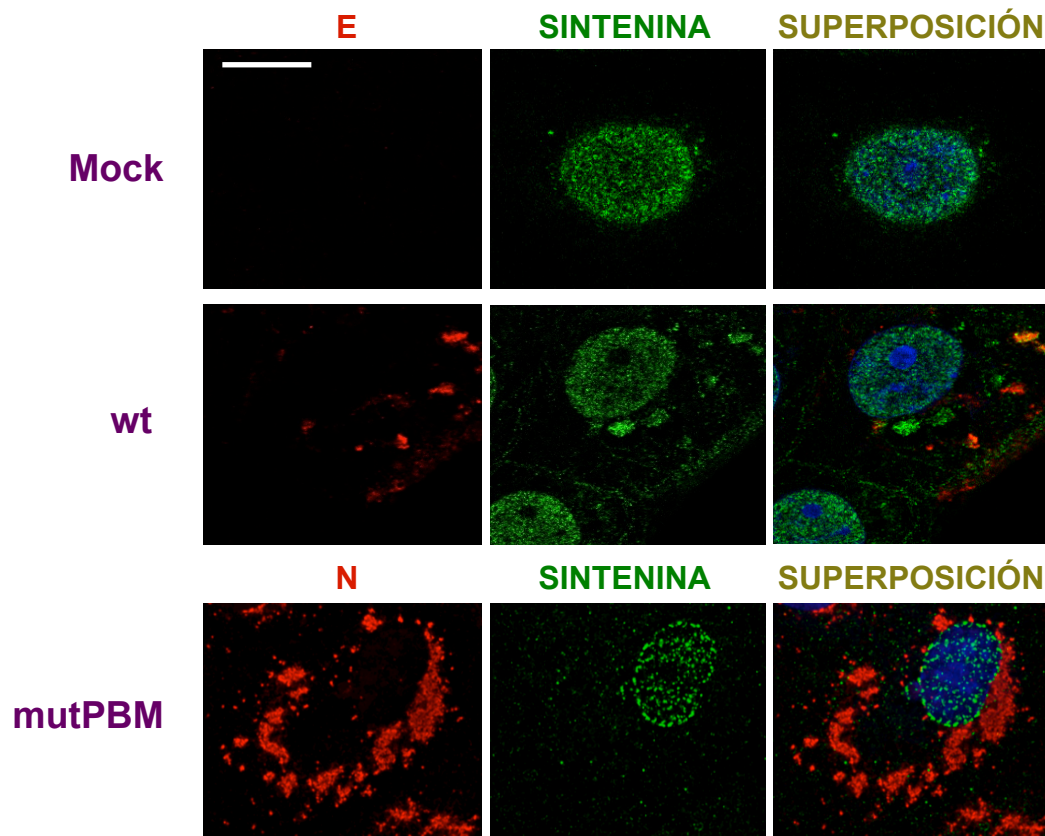


**Figura 19. Interacción entre la proteína celular sintenina y la proteína E del SARS-CoV en el contexto de la infección.** La interacción entre de la proteína celular sintenina y la proteína E (E) del SARS-CoV se evaluó mediante ensayos de coimmunoprecipitación utilizando células Vero E6. Las células se transfectaron con un plásmido que expresaba la proteína sintenina unida a un péptido HA (HA-Sintenina) y se infectaron con los SARS-CoVs recombinantes generados que incluían un motivo PBM en la proteína E (wt y potPBM), o sin este motivo ( $\Delta E$ ,  $\Delta PBM$  y mutPBM). Además, como control se utilizaron en paralelo cultivos de células no infectadas (Mock) o células sin transfectar e infectadas con el virus nativo (wt). Las células se lisaron y la expresión de ambas proteínas se evaluó mediante *Western blot* en los lisados celulares de partida. Se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación usando anticuerpos específicos para el péptido HA unido a sintenina (IP $\alpha$ Sintenina) o para la proteína E del SARS-CoV (IP $\alpha$ E). La presencia de ambas proteínas en las fracciones inmunoprecipitadas se analizó mediante *Western blot* usando anticuerpos específicos.

Estos resultados indicaron que los últimos cuatro aminoácidos de la proteína E del SARS-CoV forman un PBM funcional que, en el contexto de la infección, media la asociación de la proteína E con la proteína sintenina. La ausencia de esta interacción durante el desarrollo de la infección podría estar jugando un papel importante en la atenuación observada en los virus que carecen del PBM en la proteína E.

### **3.3. Colocalización de la proteína E del SARS-CoV y la proteína celular sintenina en células infectadas o transfectadas**

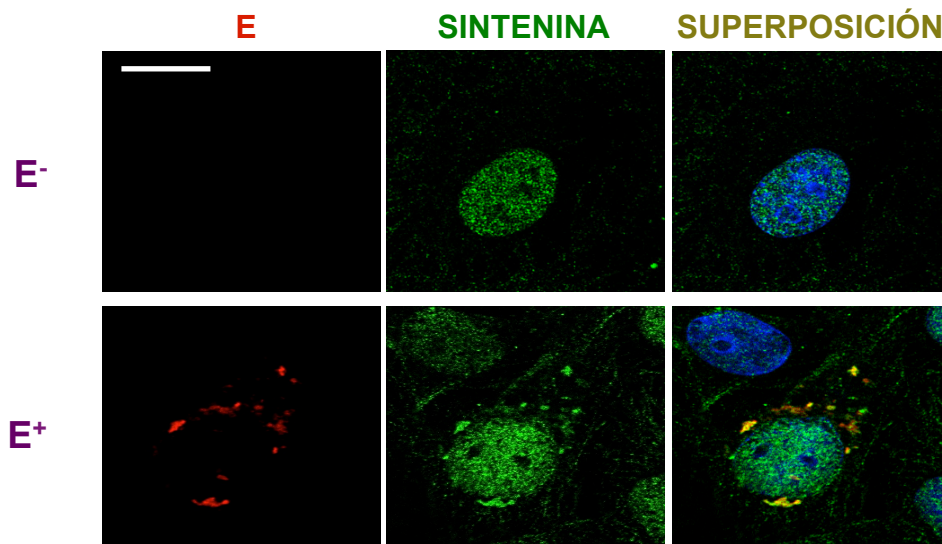
Para determinar si la proteína E del SARS-CoV y la proteína celular sintenina colocalizaban durante la infección, y para evaluar si su interacción alteraba la localización subcelular de la sintenina, pudiendo condicionar las funciones de esta proteína, se estudió la localización subcelular de ambas proteínas en células infectadas. Para ello, se utilizaron células Vero E6 sin infectar (Mock) o infectadas con el virus nativo (wt) o el virus con el PBM de la proteína mutado (mutPBM) y se analizó, mediante inmunomicroscopía confocal, la presencia de la proteína celular sintenina y la proteína E usando anticuerpos específicos (**Figura 20**). En el caso de la infección con el virus mutPBM se analizó la presencia de la proteína N del SARS-CoV para detectar las células infectadas, y no la proteína E, debido a que el anticuerpo utilizado para detectar la proteína E en inmunofluorescencia reconoce específicamente la región del extremo carboxilo terminal (Nieto-Torres et al, 2011), mutada en este recombinante. La proteína sintenina se encontró en el núcleo de las células no infectadas. Sin embargo, después de la infección con el virus nativo, la proteína sintenina relocalizó en la región perinuclear y zonas cercanas a la membrana plasmática, colocalizando parcialmente con la proteína E. Esta se localizó principalmente en el ERGIC, tal como se había descrito previamente (Nieto-Torres et al, 2011). Por el contrario, durante la infección con el virus mutPBM, el cual carece de un PBM funcional en la proteína E, no se observó una relocalización evidente de la proteína sintenina desde el núcleo hacia el citoplasma (**Figura 20**).



**Figura 20. Localización subcelular de la proteína E del SARS-CoV y la proteína sintenina en células infectadas.** Se utilizaron células Vero E6 sin infectar (Mock) o infectadas con los virus nativo (wt) o mutante sin PBM en la proteína E (mutPBM) a una mdi de 0.3. Las células se fijaron 24 horas después de la infección con paraformaldehído al 4% y las proteínas sintenina (verde), E (rojo) y N (rojo) se marcaron utilizando anticuerpos específicos con inmunofluorescencia de distintos colores. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las áreas de colocalización de la proteína E con sintenina aparecen en amarillo. La barra blanca representa una escala de 10  $\mu\text{m}$ .

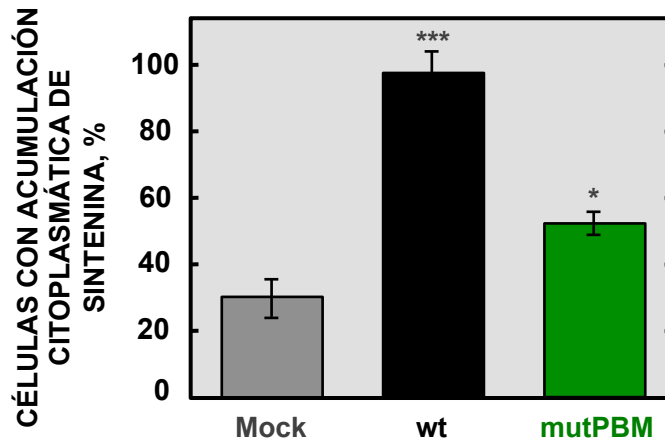
Durante la infección con el SARS-CoV que contiene el PBM en la proteína E se observó una colocalización parcial entre esta proteína viral y la proteína celular sintenina. Además, la proteína sintenina relocalizó desde el núcleo hacia la región perinuclear y zonas cercanas a la membrana plasmática. Para determinar si la proteína E era la única proteína viral implicada en la relocalización de sintenina durante la infección con el SARS-CoV, se transfectaron células Vero E6 con un plásmido vacío o con un plásmido que expresaba la proteína E del SARS-CoV. La presencia de ambas proteínas se detectó mediante inmunomicroscopía confocal usando anticuerpos específicos (**Figura 21**). Como se ha descrito anteriormente en células sin infectar, la proteína sintenina se detectó de forma mayoritaria en el

núcleo de las células transfectadas con plásmido vacío ( $E^-$ ). Sin embargo, en células transfectadas con plásmidos que expresaban la proteína E del SARS-CoV ( $E^+$ ), la proteína sintenina se translocó del núcleo al citoplasma, colocalizando parcialmente con la proteína E, de forma similar a lo descrito durante la infección con el SARS-CoV (**Figura 21**).



**Figura 21. Localización subcelular de la proteína E del SARS-CoV y la proteína sintenina en células transfectadas.** Se utilizaron células Vero E6 transfectadas con un plásmido vacío ( $E^-$ ) o transfectadas con un plásmido que expresaba la proteína E del SARS-CoV ( $E^+$ ). Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% 24 horas después de la transfección y las proteínas sintenina (verde) y E (rojo) se identificaron utilizando anticuerpos específicos. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las áreas de colocalización de la proteína E con sintenina aparecen en amarillo. La barra blanca representa una escala de 10  $\mu\text{m}$ .

El porcentaje de células con acumulación citoplasmática de sintenina se cuantificó en células sin infectar (Mock) y en células infectadas con los SARS-CoVs con (wt) y sin (mutPBM) PBM en la proteína E (**Figura 22**). La proteína sintenina se acumuló en el citoplasma del 98.5% de las células infectadas con el virus nativo (wt), mientras que solo en el 31.2% de las células sin infectar se observó una pequeña acumulación citoplasmática de esta proteína. En células infectadas con el virus sin PBM en la proteína E (mutPBM), se observó una mínima relocalización de la sintenina en el 51.5% de las células (**Figura 22**).



**Figura 22. Porcentaje de células que mostraban acumulación citoplasmática de sintenina.** La figura muestra el porcentaje de células sin infectar (Mock) y células infectadas con los SARS-CoV con (wt) y sin (mutPBM) PBM en la proteína E (n>50) que mostraban acumulación citoplasmática de sintenina. Los datos estadísticamente significativos se indican con uno (t de Student p-valor <0.05) o tres (t de Student p-valor <0.001) asteriscos.

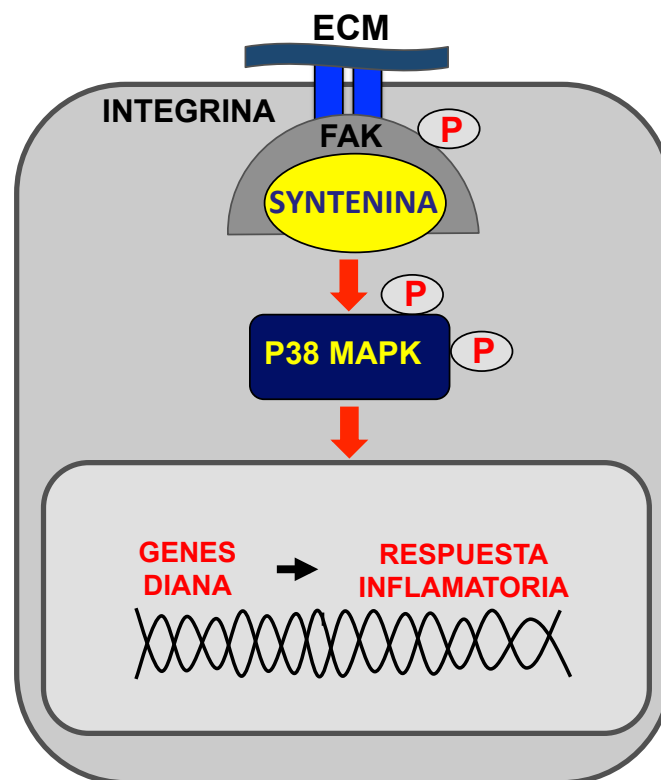
Estos resultados indicaron que la proteína sintenina colocalizaba parcialmente con la proteína E del SARS-CoV en células infectadas y transfectadas, produciendo una relocalización parcial de la sintenina desde el núcleo hacia el citoplasma.

#### **4. MECANISMOS MOLECULARES RESPONSABLES DEL EFECTO DEL PBM DE LA PROTEÍNA E DEL SARS-CoV EN VIRULENCIA**

##### **4.1 Activación de la proteína p38 MAPK en pulmones de ratones infectados con los SARS-CoV en presencia y ausencia del PBM de la proteína E**

Durante el desarrollo de esta tesis se ha mostrado que la proteína celular sintenina interacciona con el PBM de la proteína E durante la infección con el SARS-CoV. Esta interacción está asociada de una redistribución de la proteína sintenina desde el núcleo hacia el citoplasma. La sintenina es una proteína adaptadora implicada en procesos de metástasis, función neuronal, tráfico de proteínas y activación de factores de transcripción con influencia en el metabolismo celular (Boukerche et al, 2007). Se ha descrito que la proteína sintenina puede iniciar una cascada de señalización que resulta en la activación de la proteína quinasa p38 activada por

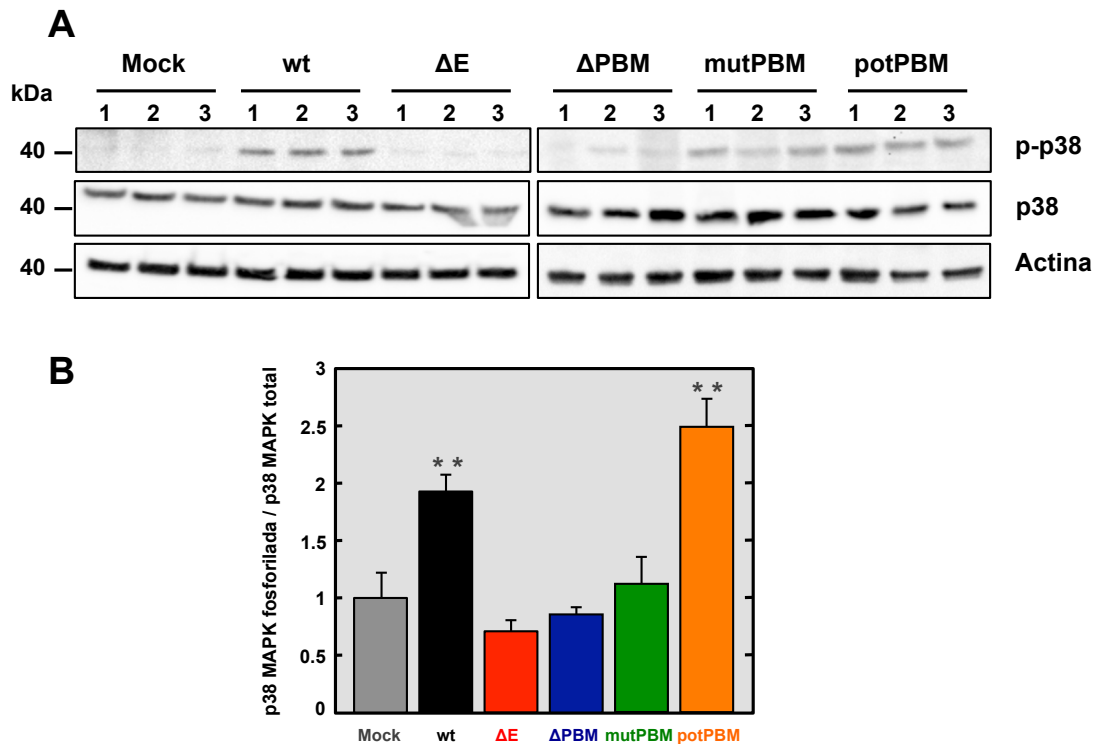
mitógeno (p38 MAPK). Esta quinasa es un regulador importante de las funciones celulares que controlan la producción de citoquinas y otras moléculas esenciales en el desarrollo de procesos inflamatorios (Boukerche et al, 2007). En este modelo, la proteína sintenina podría interactuar con proteínas asociadas a la matriz extracelular, resultando en la fosforilación y activación de la p38 MAPK, dando lugar a la producción de citoquinas proinflamatorias (**Figura 23**) (Kumar et al, 2003; Underwood et al, 2000).



**Figura 23. Modelo postulado de la activación de la respuesta inflamatoria mediada por sintenina y p38 MAPK.** En este modelo, la interacción de la proteína sintenina con proteínas asociadas a la matriz extracelular (ECM) daría lugar a la fosforilación de la proteína quinasa de adhesión focal (FAK), resultando en la fosforilación y activación de la proteína p38 MAPK, lo que produciría un aumento de la respuesta inflamatoria.

Para determinar si la proteína p38 MAPK se activa diferencialmente en los pulmones de ratones infectados con los SARS-CoV con (wt y potPBM) y sin ( $\Delta E$ ,  $\Delta PBM$  y mutPBM) PBM en la proteína E, ratones hembra BALB/c de 16 semanas se inocularon intranasalmente con 100000 ufp de estos virus. Se sacrificaron tres ratones por variable dos días después de la infección y se homogeneizaron sus

pulmones. La activación de la proteína p38 MAPK se analizó mediante *Western blot* usando los extractos de pulmón y un anticuerpo específico para la forma fosforilada (p-p38) de esta proteína, que es la forma activa, y otro anticuerpo específico para evaluar la cantidad de p38 MAPK total. Se utilizó la proteína actina como control de carga (**Figura 24**).

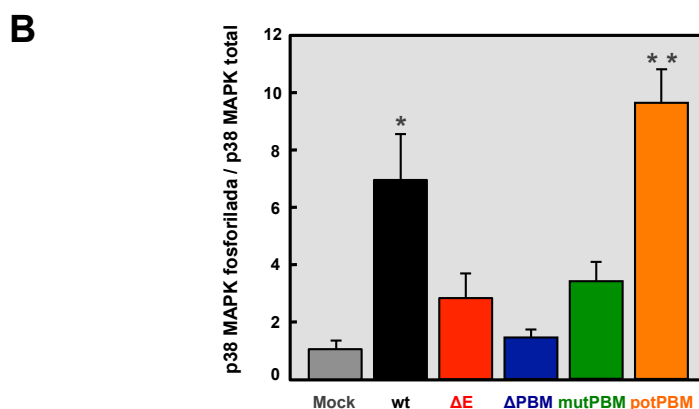
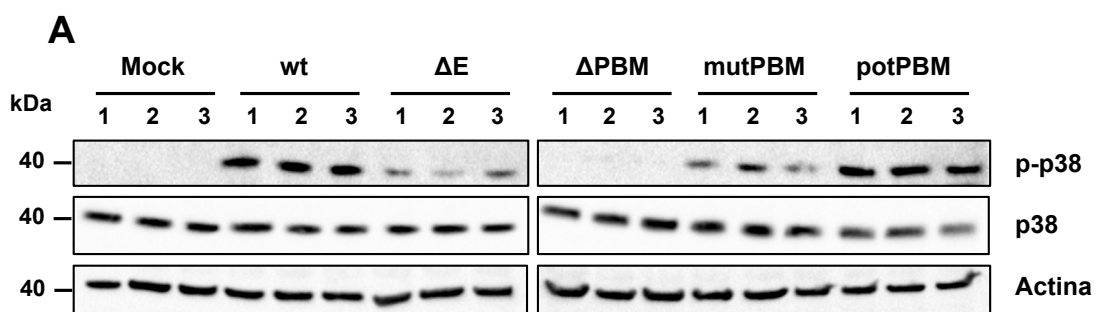


**Figura 24. Activación de la proteína p38 MAPK en ratones BALB/c infectados con los SARS-CoV con y sin PBM en la proteína E.** Se utilizaron ratones hembra BALB/c de 16 semanas, sin infectar (Mock) o inoculados intranasalmente con 100000 ufp de los SARS-CoV recombinantes con (wt y potPBM) y sin ( $\Delta E$ ,  $\Delta PBM$  y mutPBM) PBM en la proteína E. Dos días después de la inoculación los pulmones de los ratones infectados se recogieron y homogeneizaron (**A**) Se analizó la forma activa (p-p38) y la cantidad total (p38) de la proteína p38 MAPK en los pulmones de tres ratones por variable mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos. La proteína actina se utilizó como control de carga. (**B**) Los niveles de la proteína p38 MAPK activa y total se cuantificaron mediante análisis densitométricos. El gráfico muestra la relación p38 MAPK fosforilada / p38 MAPK total dos días después de la inoculación en ratones sin infectar o ratones infectados con los distintos virus recombinantes. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres ratones analizados por variable. Los datos estadísticamente significativos (t de Student p-valor <0.01) se indican con dos asteriscos.



Los niveles de la forma activa de la p38 MAPK fueron mayores en los pulmones de los ratones infectados con los SARS-CoV que contenían un PBM funcional en la proteína E (wt y potPBM), en comparación con el nivel de activación en los pulmones de ratones sin infectar (Mock) o infectados con el virus sin el PBM en la proteína E ( $\Delta E$ ,  $\Delta PBM$  y mutPBM) (**Figura 24**). Estos resultados indicaron que la proteína p38 MAPK se activa de forma significativa en ratones infectados con el SARS-CoV cuando el PBM está presente en la proteína E.

Para analizar si esta activación diferencial de la proteína p38 MAPK puede tener lugar en células infectadas, además de en pulmones de ratones infectados, se analizó su activación en cultivos celulares. Para ello, se utilizaron células Vero E6 sin infectar (Mock) o células infectadas a una mdi de 0.3 con los SARS-CoV recombinantes con (wt y potPBM) y sin ( $\Delta E$ ,  $\Delta PBM$  y mutPBM) PBM en la proteína E. 24 horas después de la infección, la activación de la proteína p38 MAPK se analizó mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos. Se observó un aumento significativo en la activación de la proteína p38 MAPK en células infectadas con los virus que contienen un PBM en la proteína E, en comparación con células sin infectar o infectadas con virus sin el PBM, de forma similar a lo descrito en ratones (**Figura 25**).



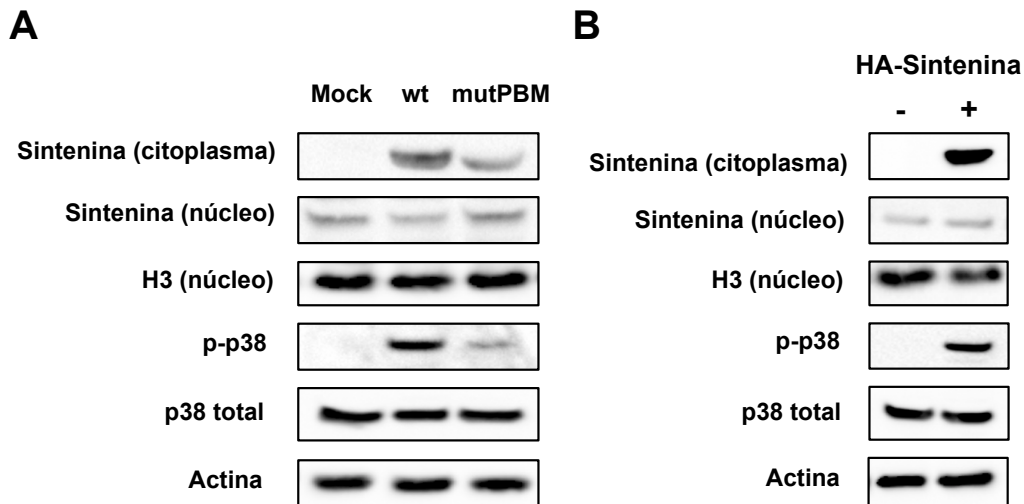
**Figura 25. Activación de la proteína p38 MAPK en células Vero E6 infectados con los SARS-CoV con y sin PBM en la proteína E.** Se utilizaron células Vero E6 sin infectar (Mock) o infectadas a una mdi de 0.3 con los SARS-CoV recombinantes con (wt y potPBM) y sin ( $\Delta E$ ,  $\Delta PBM$  y mutPBM) PBM en la proteína E. 24 horas después de la infección se lisaron las células para obtener el extracto celular. **(A)** Se analizó la forma activa (p-p38) y la cantidad total (p38) de la proteína p38 MAPK mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos. La proteína actina se utilizó como control de carga. **(B)** Se cuantificaron los niveles de la proteína p38 MAPK activa y total mediante análisis densitométricos. El gráfico muestra la relación p38 MAPK fosforilada / p38 MAPK total 24 horas después de la infección en células Vero E6 sin infectar o infectadas con los distintos virus recombinantes. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres experimentos analizados por variable. Los datos estadísticamente significativos se indican con uno (t de Student p-valor <0.05) o dos (t de Student p-valor <0.01) asteriscos.

Estos resultados indicaron que la proteína p38 MAPK se activa durante la infección con el SARS-CoV y que esta activación es dependiente del PBM de la proteína E. El aumento de la fosforilación de p38 MAPK probablemente es responsable de la exacerbada respuesta inflamatoria descrita durante la infección y, en consecuencia, de la alta virulencia de este coronavirus.

#### **4.2. Relevancia de la proteína sintenina en la activación de la proteína p38 MAPK mediada por el PBM de la proteína E durante la infección con el SARS-CoV**

En esta tesis hemos descrito que el PBM de la proteína E interacciona con la proteína celular sintenina y que esta interacción da lugar a la acumulación de sintenina en el citoplasma. La presencia del PBM durante la infección con SARS-CoV causa un aumento en la activación de la proteína p38 MAPK, implicada directamente en la expresión de citoquinas proinflamatorias (Kumar et al, 2003; Underwood et al, 2000). Se ha descrito previamente que la proteína sintenina puede promover la activación de la proteína p38 MAPK en el citoplasma (Boukerche et al, 2007). Teniendo en cuenta esta información postulamos que la relocalización de la proteína sintenina observada durante la infección con el SARS-CoV conteniendo un PBM funcional en la proteína E podría ser responsable de la activación diferencial observada para la p38 MAPK. Para comprobar si este era el caso, se utilizaron células Vero E6 sin infectar (Mock) o células infectadas con los

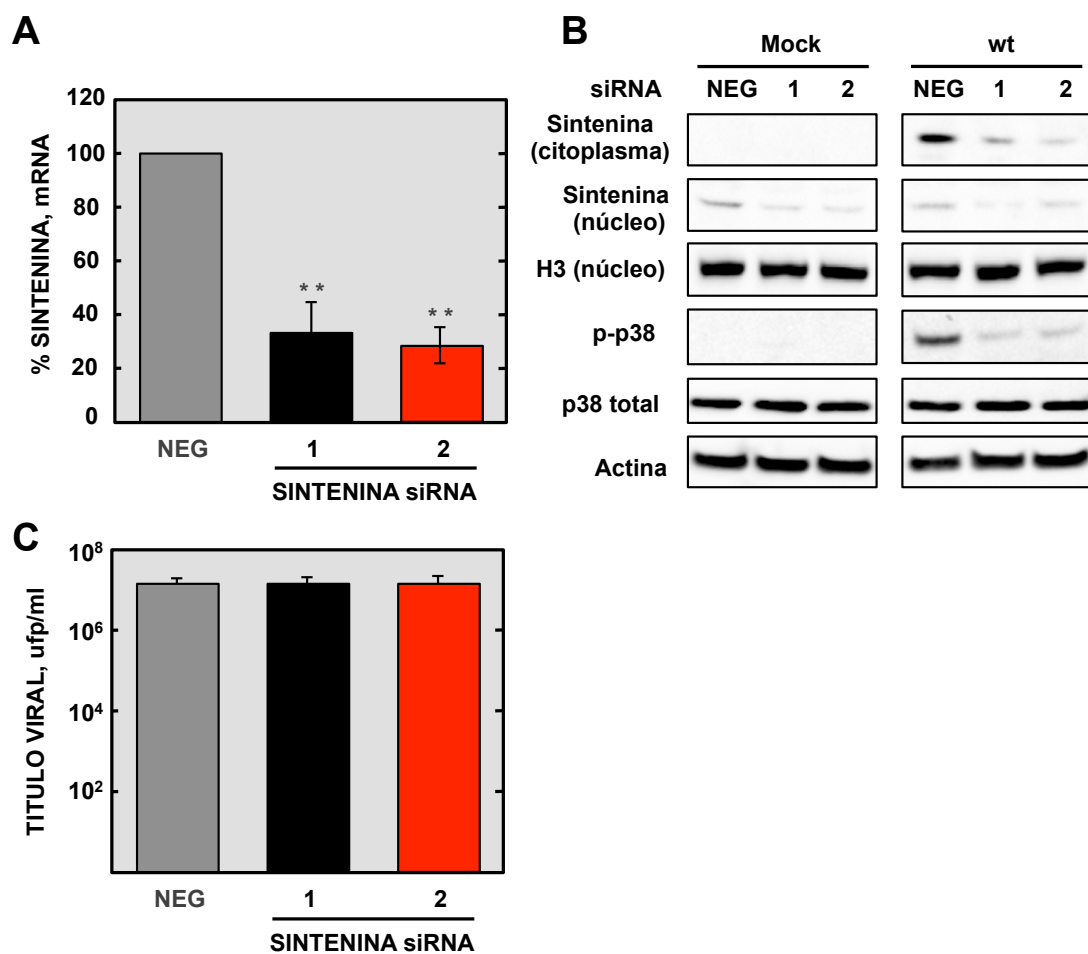
SARS-CoVs recombinantes en presencia (wt) o ausencia (mutPBM) de un PBM funcional en la proteína E. Fracciones citoplasmática y nuclear de las células infectadas se recogieron 24 horas después de la infección y se analizó la presencia de la proteína sintenina en ambas fracciones. Asimismo, se evaluó la activación de la proteína p38 MAPK (p-p38) mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos. Las cantidades de histona H3 (H3), p38 MAPK total (p38 total) y actina se utilizaron como control del fraccionamiento celular (**Figura 26**). Los niveles de sintenina en el citoplasma aumentaron durante la infección con el virus nativo (wt) en comparación con las células sin infectar (Mock). El recombinante sin PBM en la proteína E (mutPBM) acumuló parcialmente sintenina en la fracción citoplasmática. Ello podría deberse a la presencia de otras proteínas virales con PBMs, como por ejemplo la proteína 3a, la cual también interacciona con la proteína E (Tan et al, 2004; Yuan et al, 2005). La presencia de sintenina en el citoplasma se correlacionó con un aumento en la activación de la proteína p38 MAPK (**Figura 26A**). Para analizar si realmente la relocalización de sintenina desde el núcleo hacia el citoplasma es responsable de la activación de la proteína p38 MAPK, se transfectaron células Vero E6 con un plásmido vacío (-), o con un plásmido que expresaba la proteína sintenina humana unida a un marcador HA en el extremo amino (+). La presencia de la proteína sintenina en la fracción citoplasmática y nuclear de las células transfectadas y los niveles de activación de la proteína p38 MAPK se determinaron mediante *Western blot* 24 horas después de la transfección. Los niveles de histona H3 (H3), p38 MAPK total (p38 total) y actina se utilizaron como controles (**Figura 26B**). Los resultados mostraron la presencia de sintenina en el núcleo de las células transfectadas con ambos plásmidos. Por el contrario, solo se detectó sintenina en la fracción citoplasmática en las células transfectadas con el plásmido que expresaba la proteína celular. La sobreexpresión de sintenina no dio lugar a una acumulación de esta proteína en el núcleo, y sí en el citoplasma, posiblemente debido a una saturación de la maquinaria de importación nuclear, tal como se ha descrito para otras proteínas sobreexpresadas (Eckmann et al, 2001). La presencia de sintenina en el citoplasma se correlacionó con un aumento en la activación de la proteína p38 MAPK (**Figura 26B**), de forma similar a lo descrito durante la infección con el SARS-CoV.



**Figura 26. Papel de la sintenina en la activación de la proteína p38 MAPK durante la infección.** (A) Se utilizaron células Vero E6 sin infectar (Mock) o infectadas a un mdi de 0.3 con SARS-CoV recombinantes con (wt) o sin (mutPBM) PBM en la proteína E. La presencia de sintenina en las fracciones citoplasmática y nuclear de las células infectadas y la activación de la proteína p38 MAPK (p-p38) se analizó mediante *Western blot* 24 horas después de la infección. La presencia de la histona H3 (H3), p38 MAPK total (p38 total) y actina se determinó como control en las mismas muestras. (B) Células Vero E6 se transfectaron con un plásmido vacío (-) o un plásmido que expresaba la proteína sintenina unida al péptido HA en el extremo amino (+). La presencia de sintenina en las fracciones citoplasmática y nuclear de las células transfectadas y la activación de la proteína p38 MAPK (p-p38) se analizó mediante *Western blot* 24 horas después de la transfección. La presencia de la histona H3 (H3), p38 MAPK total (p38 total) y actina se analizó como control.

Para confirmar la relevancia de la sintenina en la activación de la proteína p38 MAPK durante la infección con el virus, se realizó un experimento de silenciamiento de la expresión de sintenina. Para ello, se utilizaron células sin infectar (Mock) y células infectadas con el virus nativo (wt) silenciadas con siRNAs diseñados específicamente para inhibir la expresión de sintenina (sintenina siRNA 1 y 2) y se analizó la activación de la proteína p38 MAPK mediante *Western blot*. Células Vero E6 se transfectaron dos veces usando 25 nM de un siRNA control negativo ya validado (NEG) o con la misma cantidad de cada uno de los dos siRNAs utilizados para inhibir la expresión de sintenina endógena (sintenina siRNA 1 y 2). Las células se incubaron con los siRNAs durante 48 horas. Posteriormente se infectaron con el virus nativo (wt) a una mdi de 0.3 o se dejaron sin infectar (Mock). Los extractos celulares se recogieron 24 horas después de la infección

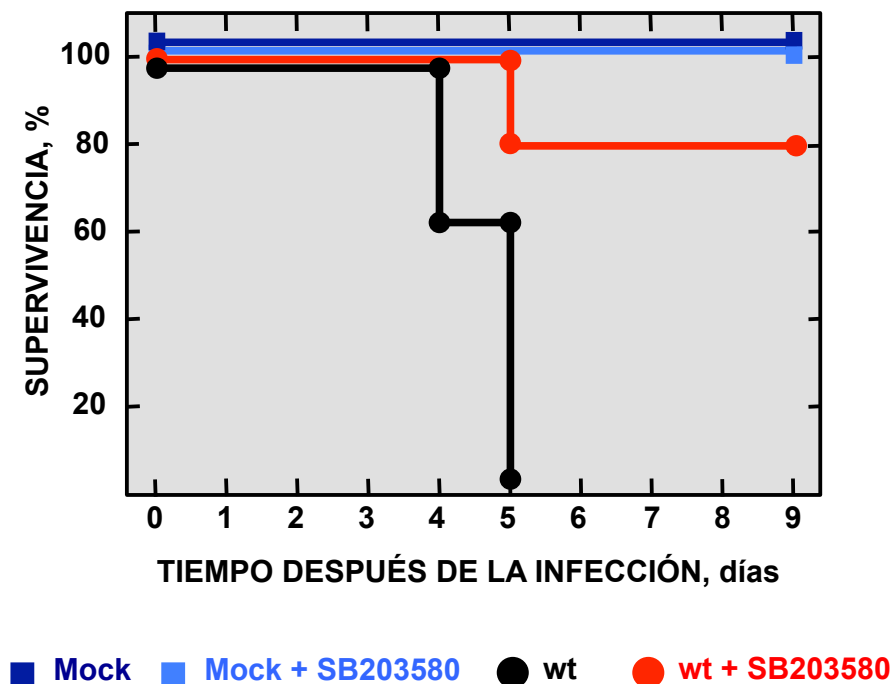
para analizar los niveles de mRNA y proteínas y también el sobrenadante para medir el título viral (**Figura 27**). Los niveles de mRNA de sintenina se analizaron mediante qRT-PCR utilizando un ensayo *TAQMAN* específico para el gen de la proteína sintenina 24 horas después de la infección. El silenciamiento con siRNAs redujo los niveles de mRNA de sintenina hasta un 30-40%, según el siRNA utilizado, en comparación con las células tratadas con el siRNA negativo (**Figura 27A**). En consecuencia, la cantidad de sintenina también disminuyó, tanto en la fracción citoplasmática como en la nuclear de las células tratadas con el siRNA específico para el mRNA de la sintenina (**Figura 27B**). De forma interesante, esta disminución no afectó al título del virus (**Figura 27B**), sin afectar al título viral (**Figura 27C**). En conjunto, estos resultados apoyan la relevancia de los niveles de sintenina en el citoplasma en la activación de la proteína p38 MAPK.



**Figura 27. Efecto del silenciamiento de la sintenina sobre la activación de la proteína p38 en células infectadas.** Células Vero E6 se transfectaron con un siRNA control negativo (NEG) o con siRNAs específicos para la proteína sintenina (sintenina siRNA 1 y 2). **(A)** Los niveles de mRNA de sintenina se cuantificaron mediante qRT-PCR para determinar el nivel de silenciamiento en células transfectadas con siRNAs específicos para la sintenina (1 y 2), en comparación al nivel de referencia obtenido en células transfectadas con el siRNA control negativo (NEG). **(B)** Efecto del silenciamiento de la expresión de sintenina en células sin infectar (Mock) y células infectadas con el virus nativo (wt). La presencia de sintenina en las fracciones citoplasmática y nuclear de las células infectadas y la activación de la proteína p38 MAPK (p-p38) se analizó mediante *Western blot*. Los niveles de histona H3 (H3), p38 MAPK total (p38 total) y actina se utilizaron como controles. **(C)** El título del virus nativo se determinó en células Vero E6 infectadas y tratadas con siRNAs específicos para la proteína sintenina 24 horas después de la infección. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres experimentos independientes analizados por variable. Los datos estadísticamente significativos (*t* de Student *p*-valor <0.01) se indican con dos asteriscos.

#### **4.3. Efecto de inhibición de la proteína p38 MAPK sobre la supervivencia de ratones BALB/c infectados con el SARS-CoV**

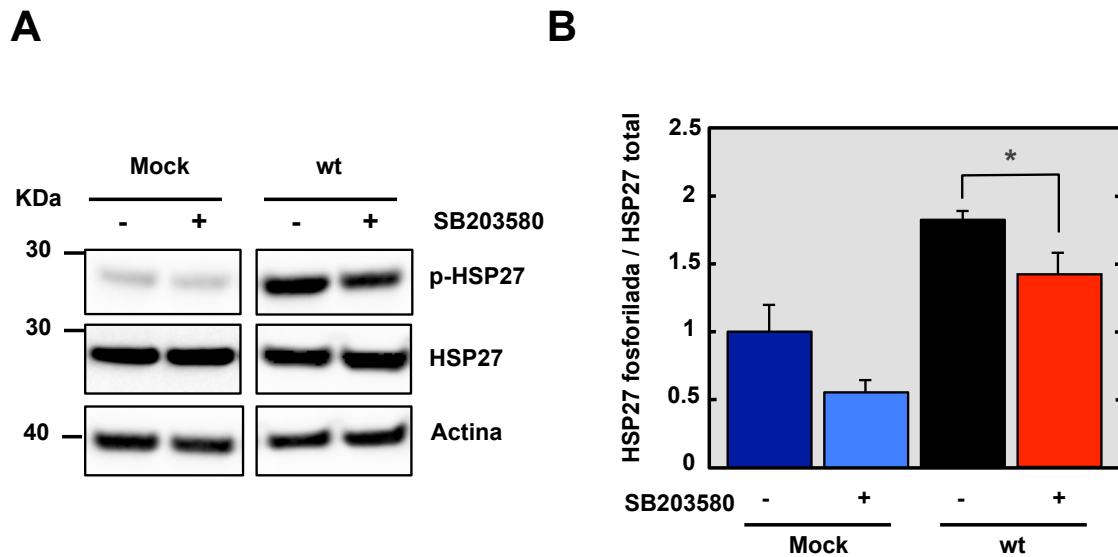
Para analizar la contribución que tiene la activación de la proteína p38 MAPK mediada por el PBM de la proteína E del SARS-CoV sobre la supervivencia de ratones infectados por el virus, se administró un inhibidor específico de esta quinasa en ratones infectados con el virus nativo y se analizó su supervivencia. En la evaluación se utilizaron hembras BALB/c de 16 semanas a las que se administró intraperitonealmente un tampón control solo o con el compuesto SB203580, un inhibidor altamente específico de la proteína p38 MAPK. Los ratones se inocularon intranasalmente con 100000 ufp del virus nativo (wt) o no se infectaron (Mock), monitorizándose la supervivencia durante 9 días después de la inoculación (**Figura 28**). Los ratones sin infectar (Mock) y los sin infectar tratados con el inhibidor (Mock + SB203580) mostraron una supervivencia del 100% y no presentaron ningún efecto secundario. Por el contrario, todos los ratones infectados con el virus nativo sin tratamiento con el inhibidor (wt) murieron durante la monitorización. De manera interesante, los ratones tratados con el inhibidor de la proteína p38 MAPK e infectados con el virus nativo (wt + SB203580) mostraron valores de supervivencia del 80% (**Figura 28**).



**Figura 28. Efecto del inhibidor de la proteína p38 MAPK sobre la supervivencia de ratones BALB/c infectados con el SARS-CoV.** Ratones hembra BALB/c de 16 semanas se inocularon intranasalmente con 100000 ufp del virus nativo (wt). Los ratones se trataron intraperitonealmente con SB203580 a una concentración de 6 mg/kg de peso corporal a las 4 horas después de la inoculación y cada 12 horas a partir de ese momento, entre los días 1 y 8. La supervivencia de los ratones se monitorizó durante 9 días después de la inoculación. Los datos representan tres experimentos independientes con cinco ratones por grupo evaluados en cada experimento.

Se ha descrito que el compuesto SB203580 no inhibe la fosforilación de la proteína p38 MAPK (Kumar et al, 1999), sino que inhibe su actividad catalítica uniéndose al sitio de unión a ATP. Ello bloquea la activación de un conjunto de proteínas reguladas por la ruta de la p38 MAPK, incluyendo la proteína de choque térmico 27 (HSP27) (Cuenda et al, 1995). Para analizar si el compuesto SB203580 realmente estaba inhibiendo la actividad de la proteína p38 MAPK en pulmones de ratones infectados, se estudió la activación de la proteína HSP27 a los 2 días después de la inoculación mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos para la forma fosforilada y activa de la proteína (p-HSP27) y para la proteína endógena total (HSP27). Se utilizó la actina como control (**Figura 29**). El tratamiento con el inhibidor disminuyó significativamente la activación de la proteína HSP27 en los pulmones de los ratones infectados, en comparación con

ratones sin tratar infectados con el virus nativo (**Figura 29**). Por lo tanto, el tratamiento con SB203580 disminuyó la actividad de la proteína p38 MAPK. Estos resultados confirmaron que la activación de la proteína p38 MAPK es un factor importante en la enfermedad inducida por la infección con el SARS-CoV.



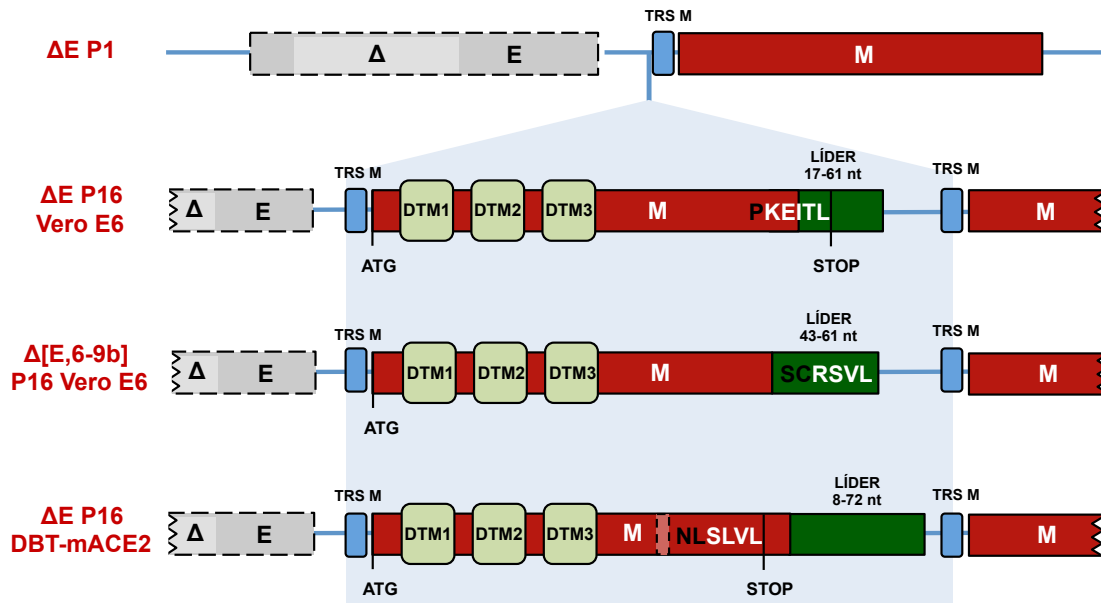
**Figura 29. Efecto del compuesto SB203580 sobre la inhibición de la proteína p38 MAPK durante la infección de ratones BALB/c con el SARS-CoV.** Ratones hembra BALB/c de 16 semanas se inocularon intranasalmente con 100000 ufp del virus nativo (wt). Cuatro horas después de la inoculación y cada doce horas a partir de ese momento, los ratones se trataron intraperitonealmente con (+) SB203580 a una concentración de 6 mg/kg de peso corporal o con el tampón control (-). Los ratones se sacrificaron dos días después de la inoculación y los pulmones se recogieron y homogeneizaron. **(A)** La forma activa (p-HSP27) y la cantidad total (HSP27) de la proteína HSP27 se analizaron mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos. La proteína actina se utilizó como control de carga. **(B)** Los niveles de la proteína HSP27 activa y total se cuantificaron mediante análisis densitométricos. El gráfico muestra la relación HSP27 fosforilada / HSP27 total 2 días después de la infección en pulmones de ratones sin infectar o infectados con el virus nativo. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres experimentos analizados por variable. Los datos estadísticamente significativos (t de Student p-valor <0.05) se indican con un asterisco.



## 5. RELEVANCIA DEL PBM DE LA PROTEÍNA E EN LA INFECCIÓN CON EL SARS-CoV

### 5.1. Estabilidad de los SARS-CoV recombinantes con y sin PBM de la proteína E después de 16 pases seriados en células

Durante el desarrollo de esta tesis se ha descrito que el PBM de la proteína E es un determinante relevante en la virulencia del SARS-CoV. Para analizar el requerimiento de este motivo durante la infección con el SARS-CoV, los diferentes SARS-CoV recombinantes con (wt y potPBM) y sin ( $\Delta E$ ,  $\Delta PBM$  y mutPBM) PBM en la proteína E se pasaron 16 veces en cultivos celulares y se analizó su secuencia. Para ello, células Vero E6 se infectaron con los diferentes virus a una mdi de 0.5. Los sobrenadantes de las células infectadas se pasaron cada 24 horas y, después de 16 pases, el último tercio del genoma, desde el gen S hasta el gen N, se secuenció usando oligonucleótidos específicos (**Tabla V**). Los SARS-CoV recombinantes con proteína E sin PBM ( $\Delta PBM$  y mutPBM) generaron un nuevo PBM igual al descrito en la proteína E nativa (DLLV). Por el contrario, en los virus donde el PBM de la proteína E estaba presente (wt y PBM) no se encontraron cambios en la secuencia. Se observó que el SARS-CoV sin proteína E (SARS-CoV- $\Delta E$ ) incorporó un nuevo gen situado precediendo al gen M nativo, después de 16 pases en células Vero E6. Este nuevo gen, denominado gen M quimérico ( $M_{CH}$ ), estaba formado por una duplicación parcial del gen M, fusionado a un fragmento de la secuencia líder del SARS-CoV (**Figura 30**). Para reforzar estos resultados, la estabilidad de un SARS-CoV recombinante con el gen E y los genes específicos de grupo 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b delecionados [SARS-CoV- $\Delta[E,6-9b]$ ] se pasó en células Vero E6. Además, el SARS-CoV- $\Delta E$  se pasó 16 veces en células murinas DBT-mACE2 y la generación de genes M quiméricos se analizó mediante secuenciación del genoma. Los resultados indicaron que ambos virus también incorporaron genes M quiméricos después de 16 pases en los distintos tipos celulares (**Figura 30**). El gen  $M_{CH}$  generado en el virus  $\Delta E$  pasado en células DBT-mACE2 presentaba además una deleción de 7 nucleótidos dentro de la secuencia del gen M parcialmente duplicada (**Figura 30**).



**Figura 30. Generación de nuevos genes M quiméricos en SARS-CoV que carecen de la proteína E después de 16 pases seriados.** Esquema de la estructura de los genes M quiméricos generados después de pasar los virus SARS-CoV-ΔE (ΔE) y SARS-CoV-Δ[E,6-9b] 16 veces en células Vero E6 y del virus ΔE pasado 16 veces en células DBT-mACE2. En la parte superior, ΔE P1 representa la secuencia de los virus que no expresan la proteína E. En el recuadro gris se muestra el gen E con la deleción parcial del gen en gris claro (Δ). La TRS de los distintos genes se representa con un recuadro azul y el gen M se muestra en color rojo. Los distintos genes M quiméricos formados después de 16 pases (P16) están formados por una duplicación parcial del gen M. Las regiones génicas que codifican los dominios transmembranas de la proteínas M quiméricas incorporadas en los pases del virus, se representan como DTM1, DTM2 y DTM3. La secuencia líder fusionada a la duplicación parcial del gen M y los nucleótidos implicados se muestran en color verde oscuro. El codón de inicio de la nueva proteína M quimérica se representa por ATG y STOP representa el codón de parada. KEITL, RSVL y SLVL representan los cuatro últimos aminoácidos de las proteínas quiméricas, que constituyen PBMs potenciales. El recuadro rojo claro de la barra inferior representa una deleción de 7 nucleótidos dentro del gen M parcialmente duplicado.

Los tres genes M quiméricos generados expresarían proteínas quiméricas que serían idénticas a la primera porción de la proteína M nativa, incluyendo el dominio amino terminal y sus tres dominios transmembrana. Es relevante notar que cada una de estas proteínas tendría un PBM distinto en su extremo carboxilo terminal, formado por los últimos cuatro aminoácidos (**Figuras 30 y 31**). Estos resultados indicaron que cuando distintos virus que carecen del PBM la proteína E se pasan en cultivos celulares, el virus evoluciona hasta recuperar el PBM,

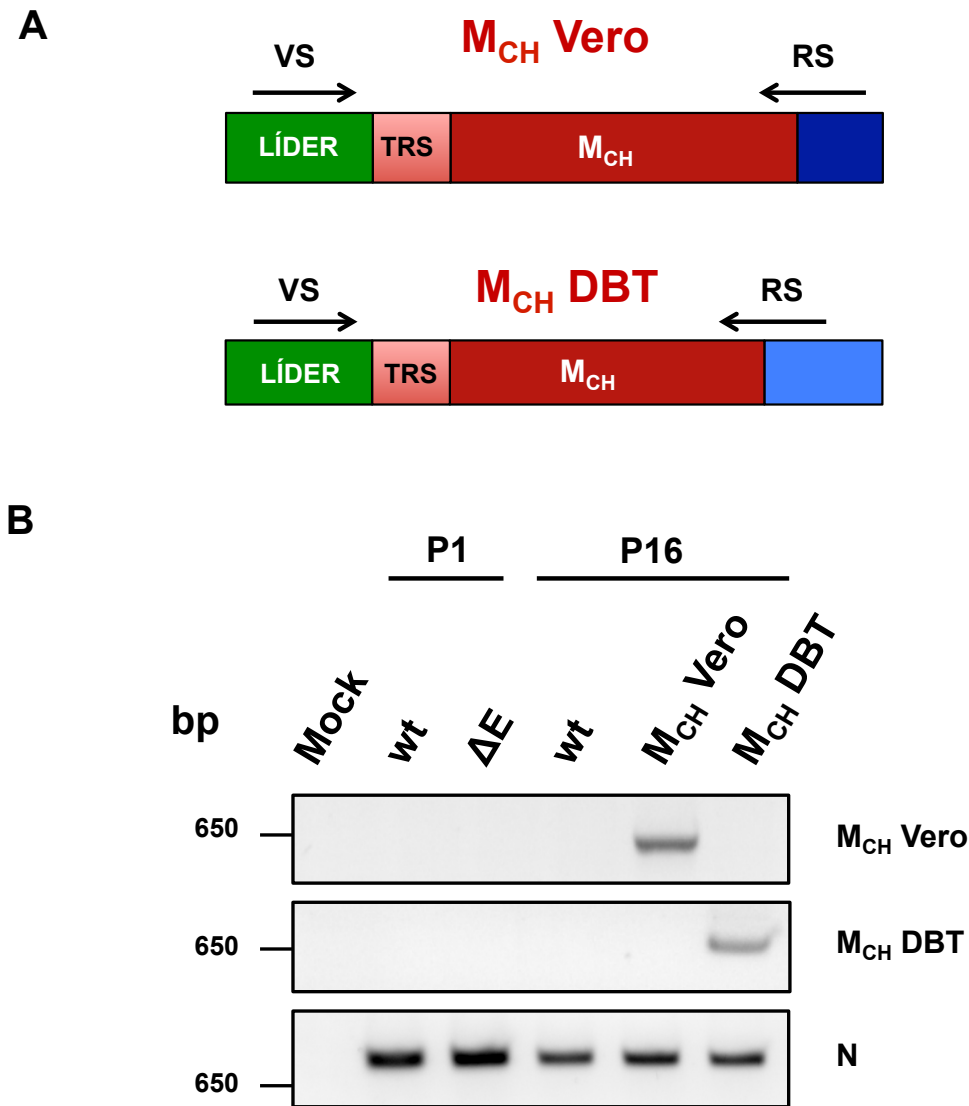
generando nuevos PBMs al final de la proteína E, o generando nuevas proteínas quiméricas con PBMs en el extremo carboxilo.

		<b>DTM 1</b>		<b>DTM 2</b>																																											
<b>M wt</b>	MADNGTITVEK	KLQ	LLQ	WNLVIGFL	FLAWIMLLQFAYS	NRNRF	LYI	IKLVFLWLL	WPVT	LACFV	LAVVYR	INWVTGGIA	<b>80</b>																																		
<b>M<sub>CH</sub> ΔE Vero</b>	MADNGTITVEK	KLQ	LLQ	WNLVIGFL	FLAWIMLLQFAYS	NRNRF	LYI	IKLVFLWLL	WPVT	LACFV	LAVVYR	INWVTGGIA	<b>80</b>																																		
<b>M<sub>CH</sub> Δ[E,6-9b] Vero</b>	MADNGTITVEK	KLQ	LLQ	WNLVIGFL	FLAWIMLLQFAYS	NRNRF	LYI	IKLVFLWLL	WPVT	LACFV	LAVVYR	INWVTGGIA	<b>80</b>																																		
<b>M<sub>CH</sub> ΔE DBT</b>	MADNGTITVEK	KLQ	LLQ	WNLVIGFL	FLAWIMLLQFAYS	NRNRF	LYI	IKLVFLWLL	WPVT	LACFV	LAVVYR	INWVTGGIA	<b>80</b>																																		
		<b>DTM 3</b>																																													
<b>M wt</b>	IAMACIVGLM	WLSYF	VAS	FRLF	FAR	TRSM	W	SFNP	PET	NILL	NVPL	RGTIV	TRPL	MESEL	VIGAVI	IRGHL	R	MAGH	SLGR	CDI	<b>160</b>																										
<b>M<sub>CH</sub> ΔE Vero</b>	IAMACIVGLM	WLSYF	VAS	FRLF	FAR	TRSM	W	SFNP	PET	NILL	NVPL	RGTIV	TRPL	MESEL	VIGAVI	IRGHL	R	MAGH	PLGR	CDI	<b>160</b>																										
<b>M<sub>CH</sub> Δ[E,6-9b] Vero</b>	IAMACIVGLM	WLSYF	VAS	FRLF	FAR	TRSM	W	SFNP	PET	NILL	NVPL	RGTIV	TRPL	MESEL	VIGAVI	IRGHL	R	MAGH	PLGR	CDI	<b>160</b>																										
<b>M<sub>CH</sub> ΔE DBT</b>	IAMACIVGLM	WLSYF	VAS	FRLF	FAR	TRSM	W	SFNP	PET	NILL	NVPL	RGTIV	TRPL	MNL	SLVL						<b>138</b>																										
<b>M wt</b>	KDLPKEITV	ATS	R	TLS	Y	YK	L	G	A	S	Q	R	V	G	T	D	S	G	F	A	A	N	R	Y	R	I	G	N	Y	K	L	N	D	H	A	G	S	N	D	N	I	A	L	L	V	<b>221</b>	
<b>M<sub>CH</sub> ΔE Vero</b>	KDLP	KEITL																																											<b>168</b>		
<b>M<sub>CH</sub> Δ[E,6-9b] Vero</b>	KDLPKEIT	IS	CR	SVL																																								<b>175</b>			
<b>M<sub>CH</sub> ΔE DBT</b>																																															

**Figura 31. Secuencia de aminoácidos de las proteínas M quiméricas generadas.** Secuencia de aminoácidos de las proteínas M quiméricas generadas después de 16 pases de los distintos SARS-CoV sin proteína E, en células Vero E6 y DBT-mACE2. M wt representa la secuencia de la proteína M nativa. M<sub>CH</sub> ΔE Vero representa la secuencia de la proteína M quimérica generada cuando se pasa el SARS-CoV-ΔE 16 veces en células Vero E6. M<sub>CH</sub> Δ[E,6-9b] Vero representa la proteína M quimérica generada al pasar el virus SARS-CoV-Δ[E,6-9b] 16 veces en células Vero E6. M<sub>CH</sub> ΔE DBT representa la proteína M quimérica generada después de pasar el virus SARS-CoV-ΔE 16 veces en células DBT-mACE2. Los dominios transmembrana de las proteínas se muestran como DTM 1, DTM 2 y DTM 3. Los aminoácidos que difieren entre las distintas secuencias se representan en rojo. Los recuadros verdes indican la presencia de los PBMs. Los números a la derecha muestran la posición de los aminoácidos.

## 5.2. Análisis de la expresión del sgmRNA de los genes M quiméricos

Para determinar si los genes M quiméricos generados daban lugar a la expresión de sus respectivos sgmRNAs, la expresión de estos se analizó mediante RT-PCR. Para ello, el SARS-CoV-ΔE pasado 16 veces en células Vero E6 (M<sub>CH</sub> Vero) y el virus pasado 16 veces en células DBT-mACE2 (M<sub>CH</sub> DBT) se clonaron mediante tres pasos de selección de placas de lisis en medio semi-sólido, y se amplificaron para generar stocks de ambos virus. A continuación, células Vero E6 sin infectar (Mock) o infectadas con los virus wt y ΔE de pase 1 (P1), o los virus wt, SARS-CoV-ΔE-MCH-Vero (MCH Vero) y SARS-CoV-ΔE-MCH-DBT (MCH DBT) pasados 16 veces (P16) a una mdi de 0.001 se recogieron a las 24 horas después de la infección, se lisaron y el RNA se analizó mediante RT-PCR (**Figura 32**).



**Figura 32. Expresión de los sgmRNAs correspondientes a las M quiméricas durante la infección.** Células Vero E6 se dejaron sin infectar (Mock) o se infectaron con los virus nativo (wt) y  $\Delta E$  de pase 1 (P1) o los virus wt, SARS-CoV- $\Delta E$ -M<sub>CH</sub>-Vero (M<sub>CH</sub> Vero) y SARS-CoV- $\Delta E$ -M<sub>CH</sub>-DBT (M<sub>CH</sub> DBT) de pase 16 (P16). La presencia de los sgmRNAs correspondientes a las proteínas M quiméricas de los virus M<sub>CH</sub> Vero y M<sub>CH</sub> DBT se analizó 24 horas después de la infección utilizando oligonucleótidos específicos para cada sgmRNA. El sgmRNA correspondiente al gen N se utilizó como control. **(A)** El esquema representa los sgmRNAs correspondientes a las proteínas M quiméricas de los virus M<sub>CH</sub> Vero y M<sub>CH</sub> DBT. La posición de los oligonucleótidos VS y RS específicos utilizados se indica en la figura con flechas. La TRS de cada sgmRNA se representa en rojo claro, y la secuencia líder se muestra en verde. La secuencia de cada sgmRNA se representa por rectángulos rojo oscuro y azul. Los rectángulos azul oscuro y claro a la derecha del esquema denotan que estas secuencias son distintas entre si. **(B)** Productos de PCR en células sin infectar o infectadas con los distintos virus en pase 1 y 16 utilizando oligonucleótidos específicos para los sgmRNAs de las proteínas M quiméricas de los virus M<sub>CH</sub> Vero y M<sub>CH</sub> DBT, respectivamente.

Para amplificar los sgmRNAs correspondientes a las dos proteínas M quiméricas, se usó un oligonucleótido VS específico para la secuencia líder y oligonucleótidos RS específicos para cada uno de los genes M quiméricos (**Figura 32A**). No se detectó la amplificación de producto de la PCR en las células sin infectar o en las infectadas con el virus  $\Delta E$  de pase 1, ni en las infectadas con el virus wt de pase 1 o 16. Sin embargo, se identificaron productos de PCR específicos correspondientes a los sgmRNAs de los genes M quiméricos de los virus SARS-CoV- $\Delta E$ -M<sub>CH</sub>-Vero (M<sub>CH</sub> Vero) y SARS-CoV- $\Delta E$ -M<sub>CH</sub>-DBT (M<sub>CH</sub> DBT) (**Figura 32B**). Este resultado confirmó que los genes M quiméricos generados expresaban los sgmRNAs virales esperados en el contexto de la infección.

**Tabla VII. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de los sgmRNAs correspondientes a los genes quiméricos.**

PCR	Oligonucleótido	Secuencia	Longitud (nt)	Tamaño (pb)
M <sub>CH</sub> Vero	Urb-29-VS	AAGCCAACCAACCTCGATCTC	21	564
	MQ1-RS	AGAGAACAGATCTACAAGGT	19	
M <sub>CH</sub> DBT	Urb-29-VS	AAGCCAACCAACCTCGATCTC	21	555
	MQ2-RS	TGGGTAGGTAAAAACGTGAT	20	
N	Urb-29-VS	AAGCCAACCAACCTCGATCTC	21	782
	N733-RS	GGCCTTGTTGTTGTTGGCC	19	

### 5.3. Expresión de las proteínas M quiméricas durante la infección

Para evaluar si los sgmRNAs correspondientes a los genes M quiméricos codificaban proteínas M quiméricas durante la infección, la expresión de estas proteínas se analizó mediante *Western blot*. Para ello, se generaron anticuerpos que reconocieran específicamente las proteínas M generadas (**Figura 33**). Se obtuvieron anticuerpos policlonales específicos de una secuencia de aminoácidos compartida por todas las proteínas M, la proteína M nativa y las dos proteínas quiméricas generadas en células Vero E6 y DBT-mACE2 (**Figura 33A**). Asimismo, se generaron anticuerpos policlonales que reconocían específicamente una secuencia de aminoácidos única en la proteína M quimérica obtenida al pasar el

virus SARS-CoV- $\Delta$ E 16 veces en células DBT-mACE2 (**Figura 33B**), dado que esta era la única secuencia diferente entre las distintas proteínas M.

## A

### M

MADNGTITVEELKQLEQWNLVIGFLFLAWIMLLQFAYSNRNRFLYIIKLVFLWLLWPVTLACFVLAAYV  
 RINWWTGGIAIAMACIVGLMWLSYFVASFRLFARTRSMWSFNPETNILLNVPLRGTIVTRPLMESELVI  
 GAVIIRGHLMAGHSLGRCDIKDLPKEITVATSRTLSYYKLGASQRVGTDSGFAAYNRYRIGNYKLT  
 DHA GSNDNIALLVQ

### M<sub>CH</sub> Vero

MADNGTITVEELKQLEQWNLVIGFLFLAWIMLLQFAYSNRNRFLYIIKLVFLWLLWPVTLACFVLAAYV  
 RINWWTGGIAIAMACIVGLMWLSYFVASFRLFARTRSMWSFNPETNILLNVPLRGTIVTRPLMESELVI  
 GAVIIRGHLMAGHPLGRCDIKDLPKEITL

### M<sub>CH</sub> DBT

MADNGTITVEELKQLEQWNLVIGFLFLAWIMLLQFAYSNRNRFLYIIKLVFLWLLWPVTLACFVLAAYV  
 RINWWTGGIAIAMACIVGLMWLSYFVASFRLFARTRSMWSFNPETNILLNVPLRGTIVTRPLMNLSLVL

## B

### M

MADNGTITVEELKQLEQWNLVIGFLFLAWIMLLQFAYSNRNRFLYIIKLVFLWLLWPVTLACFVLAAYV  
 RINWWTGGIAIAMACIVGLMWLSYFVASFRLFARTRSMWSFNPETNILLNVPLRGTIVTRPLMESELVI  
 GAVIIRGHLMAGHSLGRCDIKDLPKEITVATSRTLSYYKLGASQRVGTDSGFAAYNRYRIGNYKLT  
 DHA GSNDNIALLVQ

### M<sub>CH</sub> Vero

MADNGTITVEELKQLEQWNLVIGFLFLAWIMLLQFAYSNRNRFLYIIKLVFLWLLWPVTLACFVLAAYV  
 RINWWTGGIAIAMACIVGLMWLSYFVASFRLFARTRSMWSFNPETNILLNVPLRGTIVTRPLMESELVI  
 GAVIIRGHLMAGHPLGRCDIKDLPKEITL

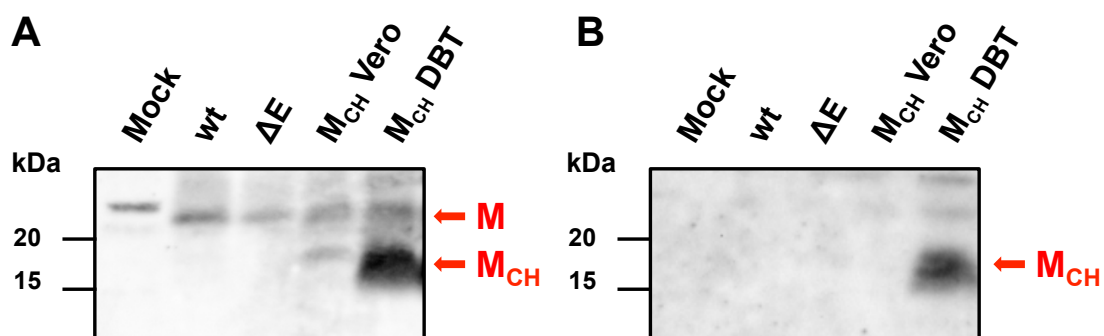
### M<sub>CH</sub> DBT

MADNGTITVEELKQLEQWNLVIGFLFLAWIMLLQFAYSNRNRFLYIIKLVFLWLLWPVTLACFVLAAYV  
 RINWWTGGIAIAMACIVGLMWLSYFVASFRLFARTRSMWSFNPETNILLNVPLRGTIVTRPLMNLSLVL

**Figura 33. Anticuerpos policlonales generados específicos para las distintas proteínas M.** Secuencia de aminoácidos de la proteína M nativa (M) y de las proteínas M quiméricas formadas después de pasar el SARS-CoV- $\Delta$ E en células Vero E6 (M<sub>CH</sub> Vero) y DBT-mACE2 (M<sub>CH</sub> DBT), respectivamente. Los aminoácidos correspondientes a los dominios transmembrana se muestran en naranja. Los aminoácidos utilizados para generar los distintos anticuerpos policlonales que reconocían una zona común en las tres proteínas generadas (**A**) o una región específica de la proteína M quimérica generada en células DBT-mACE2 (**B**), se muestran en el recuadro verde.

Para analizar la expresión de las proteínas M quiméricas durante la infección con el SARS-CoV, células Vero E6 sin infectar (Mock) o infectadas con los diferentes virus recombinantes (SARS-CoV-wt, SARS-CoV- $\Delta$ E, SARS-CoV- $\Delta$ E-M<sub>CH</sub>-Vero y SARS-CoV- $\Delta$ E-M<sub>CH</sub>-DBT) a una mdi de 0.3 se recogieron 24 horas después de la infección.

Extractos de estas células se analizaron para determinar la presencia de las distintas proteínas M mediante *Western blot* utilizando los anticuerpos específicos generados (**Figura 34**). El anticuerpo que reconocía una secuencia de aminoácidos común a las distintas proteínas M generadas mostró la expresión de la proteína M nativa durante la infección con todos los virus recombinantes. Además, la expresión de las proteínas M quiméricas se observó en la infección con los virus SARS-CoV- $\Delta$ E-M<sub>CH</sub>-Vero y SARS-CoV- $\Delta$ E-M<sub>CH</sub>-DBT. (**Figura 34A**). El análisis por *Western blot* utilizando los anticuerpos específicos para la proteína quimérica generada en células DBT-mACE2, mostró la expresión de esta proteína durante la infección con el virus SARS-CoV- $\Delta$ E-M<sub>CH</sub>-DBT. Por el contrario, la expresión de otras proteínas M no se observó durante la infección con el resto de virus recombinantes (**Figura 34B**). Estos resultados indicaron que las proteínas M quiméricas se expresaban durante la infección con los SARS-CoV- $\Delta$ E recombinantes generados después de 16 pases.

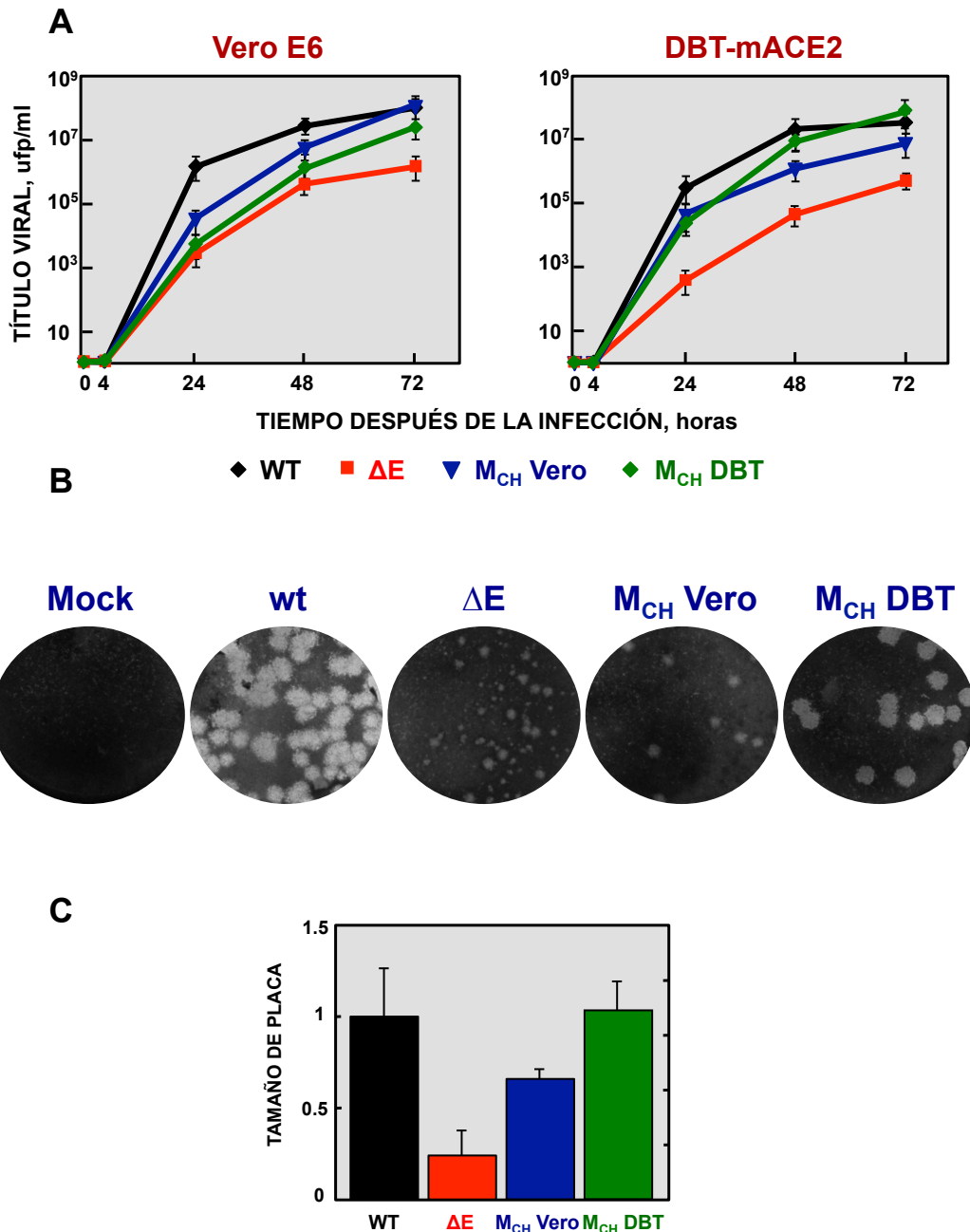


**Figura 34. Análisis de las proteínas M expresadas durante la infección con SARS-CoVs recombinantes.** Células Vero E6 se dejaron sin infectar (Mock) o se infectaron con los virus SARS-CoV-wt (wt) y SARS-CoV- $\Delta$ E ( $\Delta$ E) de pase 1 o los virus SARS-CoV- $\Delta$ E-M<sub>CH</sub>-Vero (MCH Vero) y SARS-CoV- $\Delta$ E-M<sub>CH</sub>-DBT (MCH DBT) de pase 16. La presencia de las diferentes proteínas M se analizó 24 horas después de la infección utilizando anticuerpos específicos. La presencia de la proteína M nativa (M) y las proteínas M quiméricas (M<sub>CH</sub>) se muestra en rojo. **(A)** *Western blot* de los extractos celulares utilizando anticuerpos específicos que reconocen una secuencia común todas las proteínas M generadas. **(B)** *Western blot* de los extractos celulares utilizando anticuerpos específicos que reconocen una secuencia única en la proteína M quimérica generada en células DBT-mACE2.

#### 5.4. Cinéticas de crecimiento en cultivos celulares de los SARS-CoV- $\Delta$ E que expresan las proteínas M quiméricas

Para analizar si la presencia de las proteínas M quiméricas confieren alguna ventaja selectiva a los virus que carecen de la proteína E (SARS-CoV- $\Delta$ E), se estudió la cinética de crecimiento de estos virus en cultivos celulares. Para ello, células Vero E6 y DBT-mACE2 se infectaron con los virus SARS-CoV- $\Delta$ E- $M_{CH}$ -Vero ( $M_{CH}$  Vero), SARS-CoV- $\Delta$ E- $M_{CH}$ -DBT ( $M_{CH}$  DBT) o los virus wt y  $\Delta$ E de pase 1 a una mdi de 0.001. El título viral se determinó a 4, 24, 48 y 72 horas después de la infección (**Figura 35A**). Los virus  $M_{CH}$  Vero y  $M_{CH}$  DBT, que incluyen una proteína M quimérica, alcanzaron títulos similares al virus nativo 72 horas después de la infección en los dos tipos celulares. En contraste, se observó una disminución de alrededor de 100 veces en el título viral del virus sin la proteína E en pase 1, el cual no ha incorporado la proteína M quimérica a ese tiempo después de la infección (**Figura 35A**). Además, se detectaron diferencias claras en el tamaño de las placas de lisis de estos virus. El virus nativo formó placas de mayor tamaño que el virus  $\Delta$ E de pase 1 que carecía de la proteína E. Sin embargo, el virus  $M_{CH}$  Vero y especialmente el virus  $M_{CH}$  DBT, los cuales carecían de la proteína E e incluían la proteína M quimérica, formaron placas mayores que las observadas para el virus  $\Delta$ E, sin proteína quimérica (**Figuras 35B y 35C**). Estos resultados indicaron que la presencia de la proteína M quimérica confirió una ventaja en su multiplicación y diseminación sobre los virus que carecían de la proteína E.

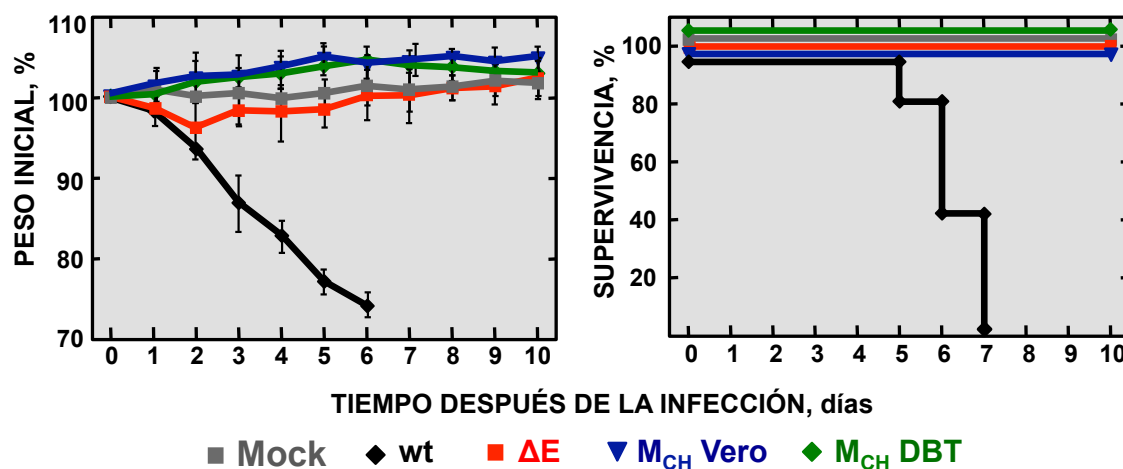




**Figura 35. Crecimiento en cultivos celulares de los virus SARS-CoV-ΔE que han generado proteínas M quiméricas. (A)** Células Vero E6 y DBT-mACE2 se infectaron a mdi 0.001 con el virus nativo (wt), virus sin proteína E (ΔE) y con los virus de pase 16 que generaron proteínas M recombinantes: SARS-CoV-ΔE-M<sub>CH</sub>-Vero (M<sub>CH</sub> Vero) y SARS-CoV-ΔE-M<sub>CH</sub>-DBT (M<sub>CH</sub> DBT). Los sobrenadantes se recogieron a 4, 24, 48 y 72 hdi y la progenie viral se tituló mediante formación de placas de lisis en medio semi-sólido. **(B)** Células Vero E6 se infectaron con los virus recombinantes y se analizó el tamaño de placa de lisis 72 hdi utilizando medio semi-sólido. **(C)** El tamaño de las placas en células infectadas se cuantificó. El gráfico muestra el tamaño de placa representado en relación al tamaño de placa en células infectadas por el virus nativo. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres experimentos independientes.

### 5.5. Virulencia y crecimiento en ratón de los SARS-CoV- $\Delta$ E que contienen proteínas M quiméricas generadas en cultivos celulares

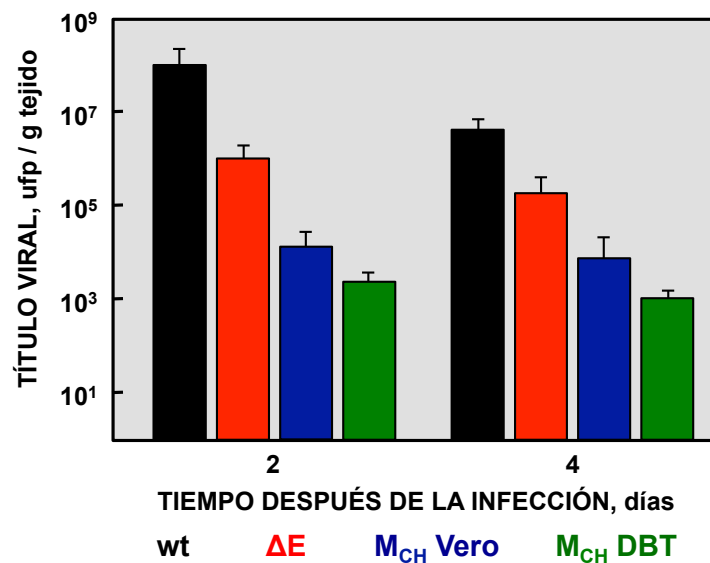
Para determinar el efecto en patogénesis de las proteínas M quiméricas generadas en cultivos celulares, ratones BALB/c se inocularon intranasalmente con los distintos virus recombinantes, con o sin proteína M quimérica, y la pérdida de peso y la mortalidad se determinó diariamente durante 10 días (**Figura 36**). Los ratones infectados con el virus nativo (wt) mostraron síntomas de enfermedad desde el segundo día después de la inoculación, incluyendo pérdida de movilidad, pelo erizado (resultados no mostrados) y una importante pérdida de peso, resultando en la muerte de todos los ratones a los 6 ddi. Por el contrario, los ratones sin infectar (Mock) y los ratones infectados con el virus que carece de la proteína E, sin ( $\Delta$ E) o con ( $M_{CH}$  Vero y  $M_{CH}$  DBT) proteína M quimérica, no perdieron peso y presentaron una supervivencia del 100% (**Figura 36**).



**Figura 36. Patogénesis causada por los virus recombinantes con o sin proteína M quimérica.** Grupos de cinco ratones BALB/c de 16 semanas de edad se inocularon con 100000 ufp de los distintos virus recombinantes. Se determinó la pérdida de peso media (gráfica de la izquierda) y la supervivencia (gráfica de la derecha) durante 10 días. Las barras de error representan la desviación estándar del peso de los ratones en cada variable experimental.

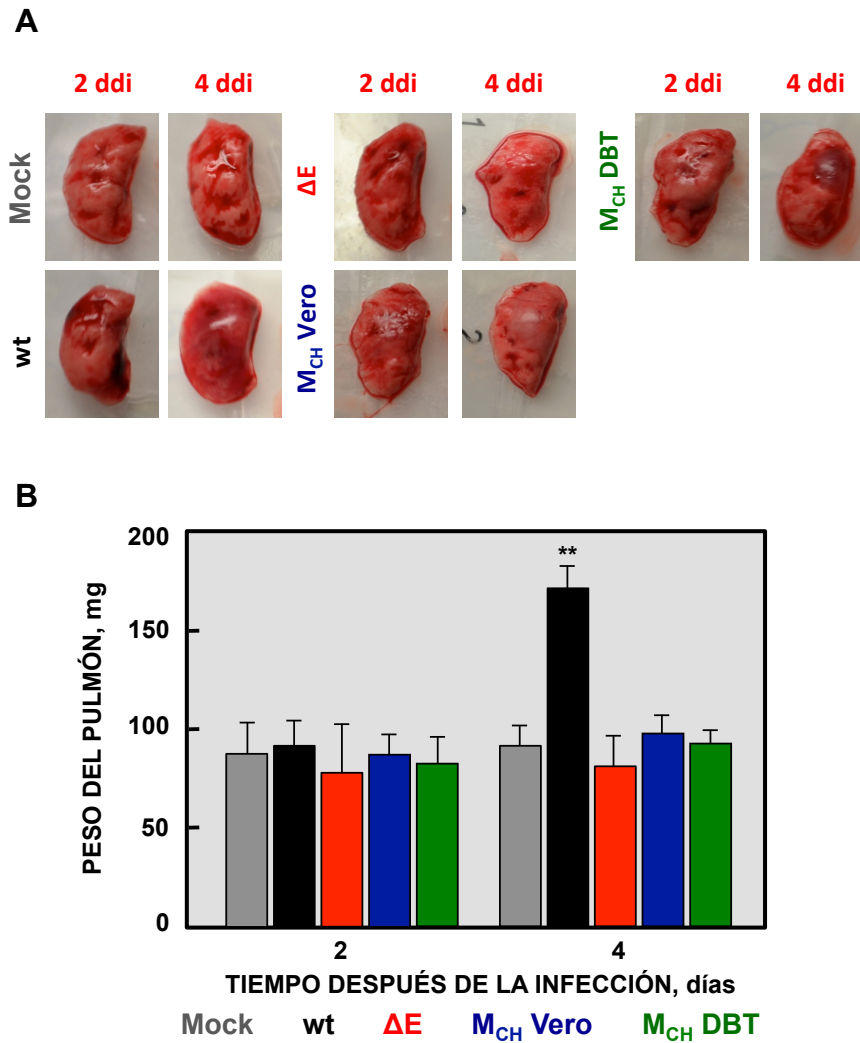
La presencia de las proteínas M quiméricas  $M_{CH}$  Vero y  $M_{CH}$  DBT aumentó el título viral en cultivos celulares. Para evaluar si también potenciaba el crecimiento del SARS-CoV- $\Delta$ E en ratón, ratones BALB/c se inocularon intranasalmente con los

distintos virus recombinantes y, a los 2 y 4 días después de la infección, los pulmones de los ratones infectados se homogeneizaron y se determinó el título viral (**Figura 37**). Los virus que carecían de la proteína E, tanto en ausencia ( $\Delta E$ ), como en presencia ( $M_{CH}$  Vero y  $M_{CH}$  DBT) de proteínas M quiméricas, mostraron una disminución en los títulos virales en los pulmones de los ratones infectados a 2 y 4 días después de la infección, en comparación con el título viral obtenido para el virus nativo (wt). De hecho, se observó un título viral mayor en el virus  $\Delta E$  en comparación con los obtenidos para los virus con proteína M quiméricas, sugiriendo que las proteínas M quiméricas generadas durante pases seriados en cultivos celulares podrían ser específicas del tipo celular y aumentar el *fitness* únicamente en cultivos celulares (**Figura 37**). Estos resultados indicaron que la adquisición de la proteína M quimérica por el SARS-CoV- $\Delta E$  en cultivos celulares aumentó el *fitness in vitro* pero no dio lugar a una reversión al fenotipo virulento asociado al virus nativo en ratón.



**Figura 37. Efecto de las proteínas M quiméricas generadas en cultivos celulares en la producción viral en pulmones de ratones BALB/c.** Grupos de seis ratones BALB/c de 16 semanas de edad se inocularon con 100000 ufp de cada uno de los virus recombinantes indicados. A los días 2 y 4 después de la infección, tres ratones de cada grupo se sacrificaron y se determinó el título viral en pulmón. Las barras de error representan la desviación estándar de los títulos obtenidos en los pulmones de los ratones utilizados por cada variable experimental.

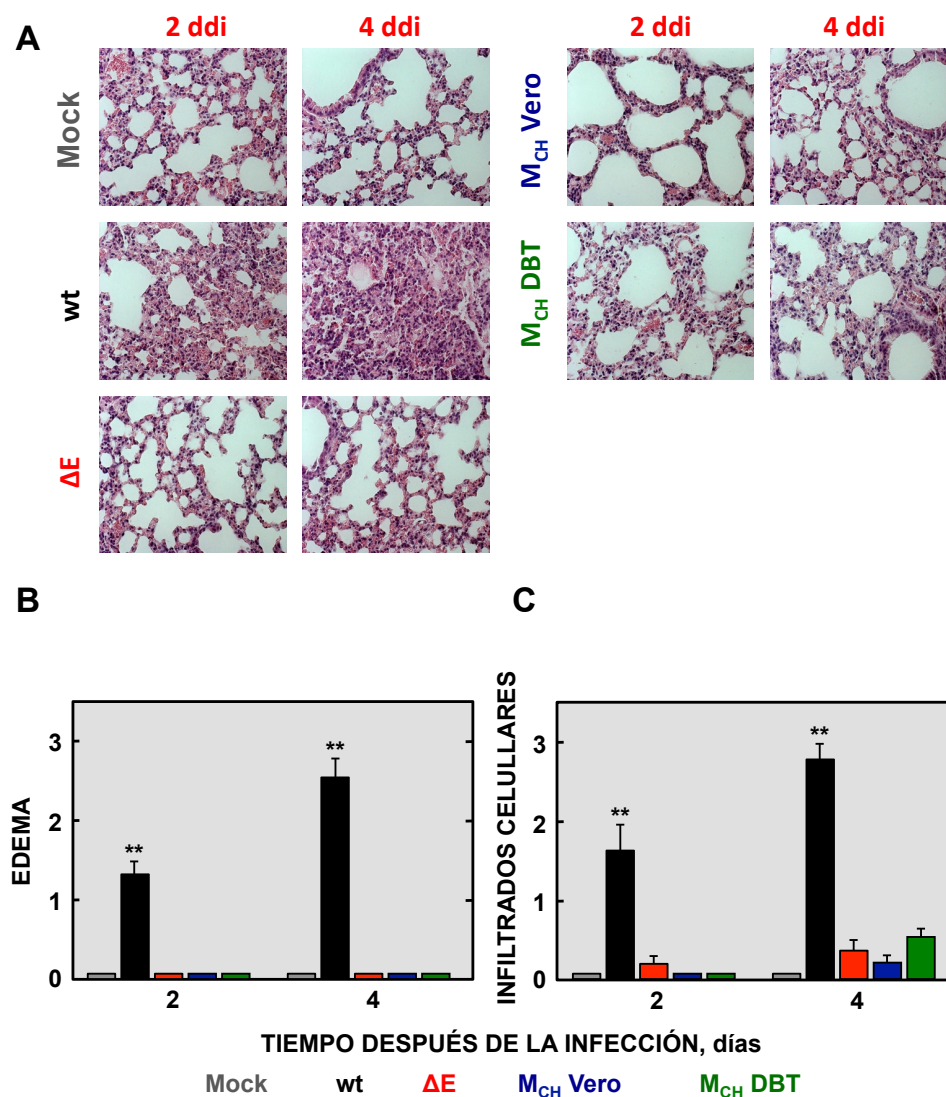
Para analizar la patología pulmonar de los ratones infectados con los virus recombinantes con o sin proteína M quimérica, ratones BALB/c se inocularon intranasalmente con los distintos virus recombinantes. Los pulmones se recogieron a los 2 y 4 días después de la infección y se analizaron las características macroscópicas y el peso de los pulmones (**Figura 38**). Los pulmones de los ratones infectados con el virus nativo (wt) mostraron un aspecto edematoso y con amplias áreas hemorrágicas a 2, y especialmente 4 días después de la infección (**Figura 38A**). El daño pulmonar observado correlacionó con un significativo incremento en el peso del pulmón al cuarto día después de la infección, probablemente debido a la presencia de edema e infiltrados celulares (**Figura 38B**). Por el contrario, no se observaron lesiones importantes o cambios en el tamaño de los pulmones de los ratones sin infectar (Mock) o de los ratones infectados con los virus sin proteína E, tanto en ausencia ( $\Delta E$ ), como en presencia de proteínas M quiméricas ( $M_{CH}$  Vero y  $M_{CH}$  DBT) (**Figura 38**).



**Figura 38. Patología en pulmones de ratones infectados con los SARS-CoV recombinantes con y sin proteína M quimérica.** Grupos de seis ratones BALB/c de 16 semanas de edad se inocularon con 100000 ufp de los virus recombinantes. Tres ratones de cada grupo se sacrificaron a 2 y 4 días después de la infección (ddi) y se recogieron sus pulmones. **(A)** Patología macroscópica de los pulmones obtenidos de ratones infectados con los virus recombinantes. **(B)** Peso de los pulmones recogidos a 2 y 4 ddi. Las barras de error representan la desviación estándar de los pesos obtenidos en los pulmones de los tres ratones utilizados por cada variable experimental. Los datos estadísticamente significativos (t de Student p-valor <0.01) se indican con dos asteriscos.

Para examinar con detalle la patología pulmonar asociada a la presencia de la proteína M quimérica en los virus SARS-CoV-ΔE, los pulmones de los ratones recogidos a los 2 y 4 días se incluyeron en parafina y se obtuvieron microsecciones que se tiñeron con hematoxilina y eosina (**Figura 39A**). Los cambios histopatológicos se analizaron y se determinó el grado de daño pulmonar, determinando la presencia de edema pulmonar e infiltrados celulares (**Figura 39B**

y 39C). Los animales sin infectar (Mock) o infectados con el virus sin proteína E en ausencia ( $\Delta E$ ) o presencia de proteínas M quiméricas ( $M_{CH}$  Vero y  $M_{CH}$  DBT) no mostraron evidencia de daño pulmonar, presentando las vías aéreas (alveolos y bronquiolos) despejadas y ausencia de infiltrados celulares a 2 y 4 días después de la inoculación. Por el contrario, los pulmones de ratones infectados con el virus nativo (wt), mostraron infiltraciones leucocitarias, engrosamiento de los epitelios alveolares y edema a los dos tiempos evaluados. (Figura 39).



**Figura 39. Patología pulmonar asociada a los SARS-CoV- $\Delta E$  con y sin proteína M quimérica.** Grupos de seis ratones BALB/c de 16 semanas de edad se inocularon con 100000 ufp de los virus recombinantes. Tres ratones de cada grupo se sacrificaron a 2 y 4 días después de la infección (ddi) y se recogieron sus pulmones. (A) Los pulmones se fijaron con formalina de zinc, se incluyeron en parafina y se obtuvieron microsecciones que se tiñeron con hematoxilina y eosina. El aumento

original de las microfotografías fue 20x. **(B y C)** El grado de daño en pulmón se evaluó dando una puntuación de 0 a 3 según la cantidad de edema **(B)** o de infiltrados celulares **(C)**. Se asignó 0 cuando estos eran casi inexistentes, y 3 cuando los espacios aéreos estaban totalmente colapsados. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos obtenidos en los pulmones de los tres ratones utilizados por cada variable experimental. Los datos estadísticamente significativos se indican con dos asteriscos (t de Student p-valor <0.01).

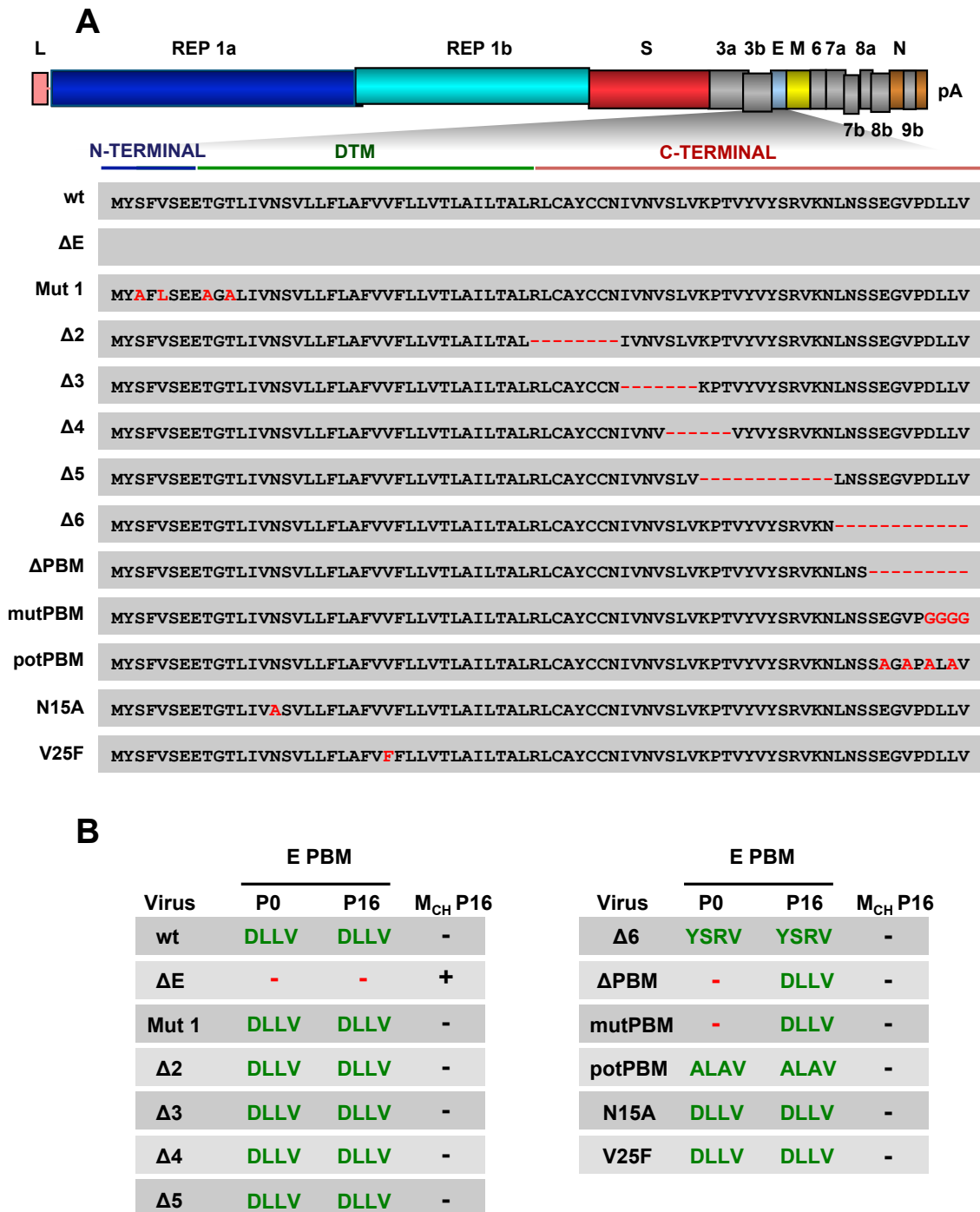
Los resultados indicaron que la atenuación observada *in vivo* para los virus que generaron las proteínas M quiméricas en cultivos celulares correlacionaba con una disminución en la patología pulmonar.

## **5.6. Relevancia del PBM de la proteína E en la generación de la proteína M quimérica**

Todas las proteínas M quiméricas descritas en esta tesis incluían un PBM canónico, formado por los últimos cuatro aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la proteína, de forma similar a lo descrito para la proteína E (Jimenez-Guardeño et al, 2014). Por lo tanto, la relevancia de este motivo en la generación de las proteínas M quiméricas se estudió con más detalle. Para ello, un conjunto de recombinantes del SARS-CoV previamente generados en nuestro laboratorio (Jimenez-Guardeño et al, 2014; Nieto-Torres et al, 2014; Regla-Nava et al, 2015), que incluían mutaciones o deleciones en diferentes regiones de la proteína E (**Figura 40A**), se pasó 16 veces en células Vero E6. Posteriormente, la incorporación de proteínas M quiméricas al genoma viral y la generación de PBMs se determinó mediante secuenciación (**Figura 40B**). En el virus recombinante Mut 1 el dominio amino terminal estaba mutado. En los recombinantes  $\Delta 2$ ,  $\Delta 3$ ,  $\Delta 4$ ,  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  se introdujeron secuencialmente pequeñas deleciones parcialmente solapantes de entre 6 y 12 aminoácidos situadas en la región carboxilo terminal de la proteína E. Es importante notar que en todos estos mutantes de deleción se mantenía un PBM al final de la proteína. En el recombinante  $\Delta$ PBM se deleccionaron los últimos nueve aminoácidos de la proteína E, truncando el extremo carboxilo terminal y eliminando el PBM. En el virus mutPBM, cuatro aminoácidos del extremo carboxilo terminal se mutaron a glicina, eliminando el PBM de la proteína E, pero manteniendo el tamaño de la proteína. En el virus potPBM, cuatro aminoácidos del

extremo carboxilo terminal de la proteína E se mutaron a alanina, manteniendo el PBM. Por último, en los recombinantes N15A y V25F, la actividad canal iónico de la proteína E se inhibió mediante una sola mutación puntual en el dominio transmembrana (**Figura 40A**). El último tercio del genoma de cada uno de los virus se secuenció después de los 16 pases tal como se ha descrito previamente utilizando oligonucleótidos específicos (**Tabla V**). Los resultados indicaron que los virus con un PBM en la proteína E (wt, Mut 1,  $\Delta 2$ ,  $\Delta 3$ ,  $\Delta 4$ ,  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$ , potPBM, N15A y V25F) en el pase 0, no modificaron su secuencia ni generaron proteínas M quiméricas después de 16 pases seriados. Como se ha descrito previamente, virus con el PBM de la proteína E mutado o delecionado ( $\Delta$ PBM y mutPBM) generaron nuevos PBMs en el extremo carboxilo terminal de la proteína E. Es importante notar que la proteína M quimérica solo se generó cuando la proteína E se encontraba totalmente delecionada ( $\Delta$ E). Todos estos resultados sugirieron que la proteína M quimérica se generaba para compensar la ausencia del PBM de la proteína E solo cuando la proteína estaba delecionada completamente. También es relevante constatar que cuando el PBM se había eliminado por sustitución de sus aminoácidos, se introdujeron nuevas mutaciones restableciendo de nuevo el PBM al final de la proteína E.





**Figura 40. Identificación del dominio de la proteína E del SARS-CoV implicado en la generación de la proteína M quimérica. (A)** Conjunto de virus recombinantes con mutaciones o deleciones en distintos dominios de la proteína E utilizados para determinar las regiones relevantes en la generación de la proteína M quimérica. Los virus recombinantes se pasaron 16 veces en células Vero E6 y, posteriormente, el último tercio del genoma se secuenció utilizando oligonucleótidos específicos. **(B)** Se muestra la presencia y correspondiente secuencia (verde) de PBMs en las distintas proteínas E de los virus recombinantes (E PBM), en pase 0 (P0) y en pase 16

(P16). Además, se muestra la generación (+) o no (-) de una proteína M quimérica después de los pases seriados ( $M_{CH}$  P16).

## **DISCUSIÓN**



En esta tesis se ha estudiado el motivo de unión a PDZ de la proteína E del SARS-CoV, su implicación en la patogénesis del virus, su relevancia en la interacción con proteínas del huésped durante la infección y el requerimiento de este motivo en ausencia de la proteína E. Para ello se han combinando varias estrategias experimentales. El trabajo se basó en observaciones previas que mostraron que la delección del gen E atenuaba al SARS-CoV (DeDiego et al, 2007; DeDiego et al, 2008; Fett et al, 2013).

En primer lugar se generaron mediante genética reversa virus recombinantes adaptados a ratón, en los cuales el PBM de la proteína E se mutó o delecionó, eliminando su función o conservándola. Para determinar las implicaciones del PBM de la proteína E en la producción de virus y patogénesis, la virulencia de estos virus recombinantes se evaluó usando ratones BALB/c. Este modelo animal reproduce los principales síntomas clínicos observados para el SARS-CoV durante la infección en humanos. Se determinó que el PBM de la proteína E no era esencial para el crecimiento del virus en cultivos celulares ni en el ratón. Sin embargo, se ha demostrado que este motivo es un determinante de virulencia, dado que su eliminación dio lugar a una disminución en la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria exacerbada, característica de la infección por SARS-CoV, resultando en la atenuación completa del virus.

Se ha determinado que el PBM de la proteína E es un motivo que media la interacción con proteínas celulares durante la infección viral. De hecho, se ha caracterizado la interacción del PBM de la proteína E con la proteína celular sintenina y el papel de esta interacción en la activación de la p38 MAPK y la expresión de citoquinas proinflamatorias durante la infección por el SARS-CoV. Además, se ha descrito la generación en cultivos celulares de proteínas quiméricas con un PBM en el extremo carboxilo terminal cuando la proteína E estaba ausente. Ello reforzó la importancia de este motivo durante la infección por el SARS-CoV.

Este es el primer estudio en el que se describe la relevancia y mecanismos de actuación del PBM de una proteína de coronavirus durante la infección *in vivo*.

## 1. RELEVANCIA DEL PBM DE LA PROTEÍNA E DEL SARS-CoV EN VIRULENCIA

Se han descrito numerosas proteínas celulares con dominios PDZ que participan en complejas redes de interacciones entre proteínas, dando lugar a la modulación de variados procesos biológicos entre los que se incluyen el establecimiento de la polaridad celular, interacciones entre células, control de la proliferación, migración, reconocimiento de células inmunes y rutas de transducción de señales (Gardiol, 2012; Javier & Rice, 2011; Subbaiah et al, 2011). La alteración de estos procesos altamente regulados podría dar lugar a desordenes importantes, incluyendo varios tipos de cáncer (Roberts et al, 2012). De hecho, numerosos virus han desarrollado proteínas con motivos de unión a estos dominios PDZ (PBM) para explotar estas redes de interacciones celulares en su propio beneficio, potenciando la replicación viral, diseminación en el huésped (Javier & Rice, 2011) o, como se ha descrito durante esta tesis, la patogenicidad.

La proteína E del SARS-CoV constituye por sí sola un factor de virulencia, favoreciendo la producción de virus, tal como se determinó al deletar el gen completo (DeDiego et al, 2007; Fett et al, 2013). Por otro lado, se ha descrito en cultivos celulares que esta proteína contiene un PBM funcional que podría estar interaccionando con múltiples proteínas durante la infección del SARS-CoV (Teoh et al, 2010). Sin embargo, las repercusiones específicas de este motivo de la proteína E en la producción viral y patogénesis *in vivo* se desconocían. Por ello, en este trabajo se generaron tres virus recombinantes adaptados a ratón con deleciones o mutaciones en el extremo carboxilo terminal de la proteína E, eliminando o inactivando el PBM. Mediante el análisis de cinéticas de crecimiento en cultivos celulares de diferente origen se determinó que la eliminación del PBM de la proteína E del SARS-CoV no alteró significativamente la producción viral. Sin embargo, la eliminación de la proteína E completa, o la introducción de mutaciones más drásticas en los dominios amino o carboxilo terminal disminuyeron significativamente el título viral, como se ha mostrado en esta tesis y previamente por nuestro grupo (DeDiego et al, 2007; Regla-Nava et al, 2014). Este hecho sugiere que la proteína E participa en la producción viral a través de otros motivos no relacionados con el PBM.

Para analizar la virulencia de los recombinantes generados se utilizaron ratones BALB/c convencionales y los virus se inocularon intranasalmente, dado que se ha descrito que esta es la ruta más frecuente de entrada del virus en los organismos (Dwosh et al, 2003). Los SARS-CoV recombinantes sin PBM en la proteína E estaban atenuados *in vivo*, causando daños mínimos en los pulmones de los ratones infectados y una supervivencia del 100%. Por el contrario, los virus con un PBM funcional, incluso con pequeñas mutaciones en el extremo carboxilo terminal que daban lugar a un PBM alternativo, eran altamente virulentos. La infección con estos virus virulentos indujo lesiones en grandes áreas del pulmón, con acumulación de edema e infiltrados celulares y causando la muerte de todos los ratones infectados. Ello indicó que el PBM de la proteína E es un determinante de virulencia.

En este trabajo se describe por primera vez que el PBM de la proteína E del SARS-CoV es un responsable relevante de la patogénesis causada por la infección viral en el modelo de ratón (Jimenez-Guardeño et al, 2014). De acuerdo con estos datos, se ha descrito que los PBMs de proteínas pertenecientes a diferentes virus tienen un papel importante en virulencia (Javier & Rice, 2011). Por ejemplo, la proteína NS1 del virus de la gripe contiene un PBM formado por los últimos cuatro aminoácidos del extremo carboxilo terminal y puede modular la patogenicidad inducida por la infección en modelos de ratón (Jackson et al, 2008). Es importante destacar que la atenuación observada en el SARS-CoV causada por la eliminación del PBM de la proteína E, sin alterar el tamaño de la proteína, no estuvo acompañada con una menor producción viral. En sintonía con estos datos, nuestro grupo ha descrito que mutaciones que eliminan la actividad canal iónico de la proteína E del SARS-CoV también confieren un fenotipo atenuado al virus sin afectar significativamente al título viral (Nieto-Torres et al, 2014). Ello refuerza el concepto de que la virulencia de un virus no está necesariamente asociada con el título viral. Se ha descrito que las proteínas con dominios PDZ podrían tener un papel importante en la agrupación y correcto posicionamiento de las proteínas con actividad canal iónico, modulando su función (Bezprozvanny & Maximov, 2001). La posible relación entre la actividad canal iónico y el PBM de la proteína E del SARS-CoV está siendo objeto de nuevos estudios en nuestro laboratorio.

## **2. EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DURANTE LA INFECCIÓN CON EL SARS-CoV CON Y SIN PBM DE EN PROTEÍNA E**

Se ha descrito que la infección de pacientes por el SARS-CoV induce una respuesta inmune exacerbada potenciando el daño epitelial y endotelial en pulmón y conduciendo finalmente al desarrollo de ALI y ARDS (Nicholls et al, 2003; Rockx et al, 2009; Tang et al, 2005). Los estadios tardíos de esta enfermedad se caracterizan por un aumento de infiltrados celulares provocado por una respuesta inmune desproporcionada y la acumulación de edema en los pulmones, impidiendo el intercambio gaseoso y conduciendo eventualmente al fallo pulmonar y la muerte de los individuos infectados. Esta patología se reprodujo fielmente durante la infección de ratones convencionales con el SARS-CoV que contiene el PBM de la proteína E.

Se ha descrito que la patología observada en pacientes y animales modelo infectados con el SARS-CoV está asociada con una respuesta inflamatoria exacerbada, unida a una elevada expresión de citoquinas proinflamatorias (Peiris et al, 2003; Smits et al, 2010; Tang et al, 2005). Para identificar los mecanismos moleculares que dan lugar a la atenuación observada durante la infección con el SARS-CoV que carece del PBM de la proteína E, en esta tesis se ha comparado la expresión génica diferencial en pulmones de ratones infectados con los virus recombinantes con y sin este motivo en la proteína E. Para ello se ha utilizado un análisis con micromatrices de oligonucleótidos. Como fuente de los mRNAs a analizar, se utilizaron pulmones de ratones porque es el modelo que mejor reproduce lo que ocurre durante la infección en humanos (Fett et al, 2013; Roberts et al, 2007). Asimismo, se tuvo en cuenta que existen micromatrices de oligonucleótidos comerciales disponibles para ratón. En ratones infectados con el SARS-CoV sin PBM en la proteína E se observó una disminución importante en la expresión de genes implicados en la respuesta inmune innata. Ello sugirió que este motivo podría tener un papel importante en la inducción de la respuesta inmune incontrolada observada durante la infección con el SARS-CoV. La expresión diferencial de citoquinas proinflamatorias durante la infección con el SARS-CoV con y sin proteína E se había descrito previamente en cultivos celulares (DeDiego et al, 2011). En estudios anteriores se ha estudiado el transcriptoma en células



Vero E6, MA-104, Huh7, CaCo-2 y macrófagos infectados con el SARS-CoV en comparación con células sin infectar, utilizando la tecnología de micromatrices de oligonucleótidos (Cheung et al, 2005; Cinatl et al, 2004; DeDiego et al, 2011; Leong et al, 2005; Spiegel et al, 2005). Sin embargo, hasta el momento no se había comparado la expresión de genes diferencialmente expresados durante la infección en ratones utilizando virus recombinantes que diferían exclusivamente en la presencia o ausencia del PBM en la proteína E.

### **3. INTERACCIÓN DEL PBM DE LA PROTEÍNA E DEL SARS-CoV CON PROTEÍNAS DEL HUÉSPED Y SU IMPLICACIÓN EN VIRULENCIA**

Durante el desarrollo de esta tesis se ha descrito que la proteína E del SARS-CoV contiene un PBM, un dominio de interacción entre proteínas que puede unirse a otras proteínas, virales o celulares, que contengan un dominio PDZ. Además, se ha descrito que la eliminación de este dominio mediante genética reversa produce la atenuación completa del virus y produce una disminución significativa en la expresión de genes relacionados con la activación de la respuesta inmune innata. Por el contrario, durante la infección con el virus nativo, que incluye un motivo PBM en la proteína E, se produjo una respuesta inmune exacerbada y la muerte de todos los animales infectados.

Dada la importancia del PBM de la proteína E en virulencia, se estudiaron las bases moleculares de la respuesta inmune exacerbada que tiene lugar durante la infección con el SARS-CoV en presencia de este motivo. Para ello, y dado que se ha descrito que solo en el genoma humano hay más de 400 proteínas que contienen dominios PDZ (Spaller, 2006), se llevó a cabo la identificación de proteínas celulares que interaccionaran con la proteína E mediante un sistema de doble híbrido en levaduras. Durante este estudio se identificaron varias proteínas celulares que interaccionaban con la proteína E del SARS-CoV. Una de las interacciones que se consideró más interesante fue con la proteína celular sintenina. El sistema de evaluación de la fiabilidad de la interacción la clasificó como B (Formstecher et al, 2005), lo que implica una alta probabilidad de que fuera real. La sintenina es una importante proteína adaptadora que contiene dos dominios PDZ y está implicada en varios procesos celulares, incluyendo

metástasis, función neuronal, tráfico de proteínas y activación de factores de transcripción (Boukerche et al, 2007). Curiosamente, PALS1, una proteína con un dominio PDZ, previamente asociada a la proteína E en un estudio similar (Teoh et al, 2010) no se identificó en este análisis, probablemente debido a que se usaron diferentes librerías de cDNAs en ambos estudios. Durante nuestro trabajo se utilizó una librería de cDNAs de pulmón humano para mimetizar lo ocurrido durante la infección del SARS-CoV *in vivo*. Por el contrario, PALS1 fue identificada utilizando una colección de cDNAs de placenta humana.

La interacción de la proteína E del SARS-CoV con la proteína celular sintenina se confirmó mediante ensayos de coimmunoprecipitación en ambos sentidos, inmunoprecipitando de la proteína E y también de la proteína celular. Además, durante este estudio se identificó que la interacción entre estas dos proteínas estaba mediada específicamente por el PBM de la proteína E, formado por los cuatro últimos aminoácidos de la proteína, porque solo se identificó la interacción cuando este motivo estaba presente. Asimismo, durante este trabajo se determinó que la interacción de ambas proteínas daba lugar a la relocalización de la sintenina desde el núcleo, donde se encontraba en células sin infectar o infectadas con el virus sin PBM en la proteína E, hacia la región perinuclear. La proteína sintenina colocalizó parcialmente con la proteína E y en zonas próximas a la membrana plasmática en células de mamífero infectadas por el SARS-CoV, confirmando nuevamente la interacción identificada en el doble híbrido en levaduras. El valor de esta colocalización es que se determina en una célula viva, lo que aumenta su significado.

Se ha descrito que la proteína celular sintenina puede iniciar una cascada de señalización que resulta en la activación de la proteína p38 MAPK (Boukerche et al, 2007), una proteína crucial en la activación de una variedad de factores de transcripción que controlan la producción de citoquinas y otras moléculas esenciales en el desarrollo de procesos inflamatorios (Kumar et al, 2003; Underwood et al, 2000). Basándonos en esta observación postulamos que la interacción del PBM de la proteína E con la proteína celular sintenina podría activar la proteína p38 MAPK, aumentando la expresión de citoquinas inflamatorias.

Durante el desarrollo de este trabajo se ha demostrado que la ausencia del PBM de la proteína E resultó en una disminución *in vivo* de la expresión de genes implicados en inflamación, en comparación con lo que ocurre en ratones infectados con virus que contienen este motivo. Además, se ha descrito una disminución significativa en la activación de la p38 MAPK en pulmones de ratones infectados con SARS-CoVs recombinantes sin PBM en la proteína E, en comparación con los ratones infectados con los virus que contienen este motivo. Esta disminución en la activación de la p38 MAPK correlacionaba perfectamente con la adquisición del fenotipo atenuado en los virus que carecen del PBM de la proteína E. Además, la relocalización observada de la proteína sintenina durante la infección con el SARS-CoV que contiene el PBM en la proteína E, se ha relacionado directamente con la activación de la proteína p38 MAPK. Para ello se han combinado varias estrategias, describiendo mediante el uso de fraccionamiento celular y siRNAs que la presencia y acumulación de sintenina en el citoplasma son fundamentales en la activación de esta ruta.

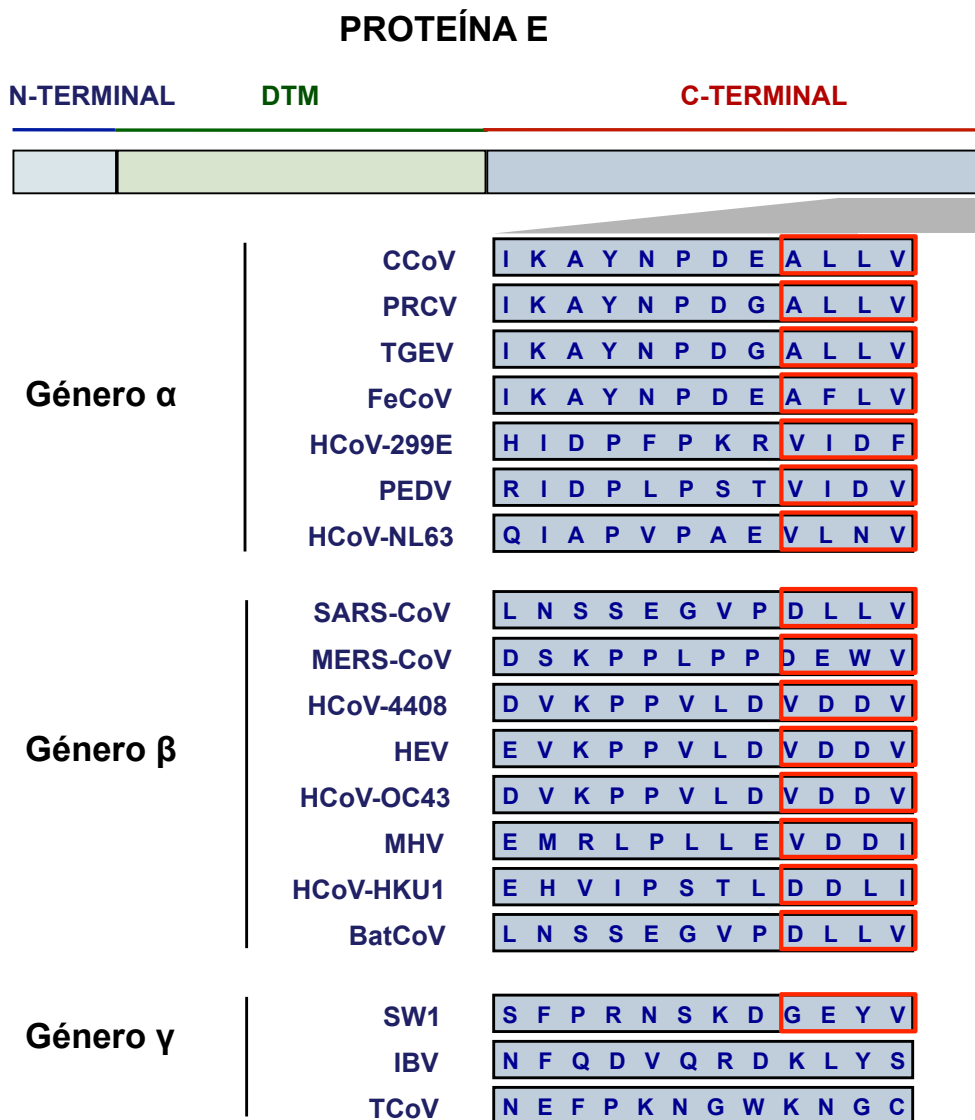
Para determinar realmente el impacto de la activación de la proteína p38 MAPK en la virulencia observada durante la infección de ratones con el SARS-CoV, se trataron los ratones con un inhibidor altamente específico de la actividad p38 MAPK (Cuenda et al, 1995), aumentando significativamente la supervivencia de los ratones infectados hasta un 80% después de la infección con el virus nativo. La hipótesis de que la activación de la p38 MAPK está implicada en la virulencia inducida por la infección con coronavirus se postuló también cuando los pacientes con SARS mostraron un aumento en los niveles de p38 MAPK activada (Lee et al, 2004). Durante el desarrollo de esta tesis se ha descrito la interacción del PBM de la proteína E con la proteína celular sintenina y su implicación en patogénesis. Hay que tener en cuenta que, aunque los PBM son bastante específicos de secuencia, el PBM podría unirse potencialmente a otras múltiples proteínas del huésped, activando o inhibiendo otras rutas o procesos celulares. Los resultados indican que la interacción del PBM de la proteína E con las proteínas celulares sintenina y PALS1 podría contribuir de forma diferente o incluso complementaria a la patogénesis inducida por el SARS-CoV, dado que la sintenina indujo la activación de la proteína p38 MAPK y la activación de citoquinas inflamatorias, mientras que la interacción con PALS1 podría estar afectando a la alteración del epitelio

pulmonar en pacientes con SARS (Jimenez-Guardeño et al, 2014; Teoh et al, 2010). De acuerdo con estos resultados, se ha descrito que proteínas codificadas por diferentes virus y que contienen PBMs, presentes por ejemplo en el virus de la gripe A, el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas y el virus del papiloma humano, también potenciaron la patogénesis viral mediante la interacción con proteínas celulares con dominios PDZ, alterando procesos celulares como la apoptosis, polaridad celular o la respuesta inmune innata (Javier & Rice, 2011). Además, recientemente se ha descrito que la proteína F11 del virus vaccinia contiene un PBM y también un dominio PDZ en una misma proteína. Estos dominios podrían interaccionar inter- o intramolecularmente durante la infección, modulando la actividad de otras proteínas celulares, afectando a la diseminación del virus en el huésped y a la evolución de la infección (Handa et al, 2013). La presencia de dominios PDZ, además de los PBM, en proteínas virales abre un nuevo campo para identificar nuevos sistemas de regulación de la replicación viral y de la interacción del virus con la célula.

Un análisis comparativo de los últimos doce aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la proteína E de un conjunto de coronavirus pertenecientes a los géneros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (**Figura 41**) indica que los resultados obtenidos en esta tesis podrían ser relevantes en la inmensa mayoría de los coronavirus que infectan a mamíferos. Ello se debe a que el motivo PBM de la proteína E se encuentra altamente conservado en los coronavirus que infectan a mamíferos, pertenecientes a los géneros  $\alpha$  y  $\beta$  y también el coronavirus SW1 del género  $\gamma$  que infecta ballenas. Por el contrario, el PBM no se encontraba presente en virus que afectaban a aves, indicando que la presencia del PBM en la proteína E podría ser importante durante la infección en mamíferos.

Se ha descrito que el extremo carboxilo de la proteína E de los coronavirus que infectan a mamíferos está orientado hacia el citosol (Godet et al, 1992; Nieto-Torres et al, 2011; Raamsman et al, 2000). Sin embargo, se ha propuesto que la topología de la proteína E de coronavirus que infectan a aves tiene el extremo carboxilo orientado hacia el lumen de membranas intracelulares (Corse & Machamer, 2000; Ruch & Machamer, 2012b), con lo que no estaría expuesto en el citosol, evitando su interacción con muchas proteínas celulares. Además, el genoma del SARS-CoV codifica otras proteínas con motivos PBM, como por

ejemplo la proteína 3a, la cual, de manera similar a la proteína E, también tiene actividad canal iónico y podría modular la patogenicidad (Castaño-Rodríguez et al, 2014). El estudio de la relación y posible complementación entre las funciones de ambas proteínas será de gran interés en futuras investigaciones.



**Figura 41. Presencia de PBMs en la proteína E de otros coronavirus.** En la parte superior se representa la secuencia de la proteína E de coronavirus y sus correspondientes dominios. En la parte inferior se muestran las secuencias correspondientes a los últimos 12 aminoácidos de la proteína E de los coronavirus analizados representativos de los géneros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Los rectángulos rojos representan la presencia de un posible motivo PBM.

#### 4. ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE UN NUEVO GEN PARA COMPENSAR LA DELECCIÓN DEL GEN E EN EL GENOMA DEL SARS-CoV

Se ha descrito que el PBM de la proteína E es un determinante importante de la virulencia. Para profundizar en la relevancia de este motivo durante la infección por el SARS-CoV se pasaron distintos virus recombinantes con y sin PBM en la proteína E en cultivos celulares y se secuenció el último tercio del genoma. Los resultados indicaron que en ausencia del PBM, pero estando presente parte de la proteína E, se generaban nuevos PBMs en el extremo carboxilo de la proteína. Además, diferentes virus recombinantes en los que la proteína E se había delecionado por completo, generaron en cultivos celulares un nuevo gen quimérico formado por una duplicación parcial del gen M y otros dominios del genoma, tales como la secuencia líder del RNA viral. La alteración del genoma de los coronavirus no es un hecho extraño debido a la alta frecuencia de recombinación descrita para estos virus, tanto en cultivos celulares como en animales (Enjuanes et al, 1993; Fu & Baric, 1992; Liao & Lai, 1992). Todas las proteínas M quiméricas generadas estaban formadas por los tres dominios transmembrana de la proteína M e incluían un PBM en su extremo carboxilo terminal formado por los últimos cuatro aminoácidos (**Figura 30**). Estos resultados ponen de manifiesto la relevancia del PBM de la proteína E durante la infección. De acuerdo con estos datos, se ha descrito que la deleción de la proteína E del coronavirus de ratón MHV también generó una proteína quimérica similar a la descrita en esta tesis, después de varios pases seriados en cultivos celulares, reemplazando parcialmente las funciones de la proteína E, potenciando el crecimiento viral y mediando la interacción entre los dominios transmembrana de los monómeros de la proteína M (Kuo & Masters, 2010). La nueva proteína quimérica generada al pasar el virus MHV en ausencia de la proteína E también presentaba un PBM formado por los últimos cuatro aminoácidos de la proteína. Sin embargo, en este trabajo no se identificó la relevancia de este motivo.

La expresión de las proteínas quiméricas, generadas de forma similar pero con ligeras diferencias en la secuencia, según el tipo celular empleado, resultó en un aumento en el título viral en cultivos celulares hasta niveles similares a los descritos para el virus nativo. Por el contrario, la adquisición del gen quimérico en

cultivos celulares no supuso un aumento en la producción viral durante la infección en ratones, resultando en un fenotipo completamente atenuado. Son necesarios experimentos adicionales que analicen la posible generación de proteínas M quiméricas *in vivo* y su relevancia en virulencia.

En resumen, el PBM de la proteína E del SARS-CoV es un determinante de virulencia que modula la respuesta inflamatoria, el daño pulmonar y la progresión de la enfermedad mediante la interacción con múltiples proteínas celulares, incluyendo la proteína sintenina. El trabajo desarrollado durante esta tesis sugiere fuertemente que existe una relación causal entre la interacción del PBM de la proteína E y la proteína celular sintenina con la activación de la p38 MAPK y el aumento en la expresión de citoquinas inflamatorias observada durante la infección con el SARS-CoV. Estos resultados identifican a la proteína sintenina como una potencial diana terapéutica para reducir la respuesta inmune exacerbada inducida durante la infección con el SARS-CoV. Por lo tanto, terapias dirigidas que inactiven temporalmente a la proteína sintenina o la actividad de la p38 MAPK durante la infección aguda podría mejorar la prognosis en pacientes infectados por el SARS-CoV. De hecho, durante esta tesis se ha demostrado que la inhibición de la p38 MAPK aumentó la supervivencia de los ratones hasta un 80% después de la infección con el virus nativo. De acuerdo con estos datos, la inhibición *in vivo* de la p38 MAPK disminuyó la expresión de citoquinas inducida por la infección con el virus de la gripe, protegiendo a los ratones y aumentando su supervivencia (Borgeling et al, 2013).

Durante el desarrollo de esta tesis se han realizado varias observaciones de interés que podrían ser relevantes para otros coronavirus altamente patogénicos como por el ejemplo el MERS-CoV, o incluso para otros virus que codifiquen proteínas con PBMs. La búsqueda de la presencia de proteínas celulares adicionales con dominios PDZ que interaccionen con el PBM de la proteína E del SARS-CoV, la relevancia en virulencia del PBM de las proteínas E presentes en otros coronavirus y la relación entre el PBM de la proteína E y su actividad como canal iónico debería estudiarse en el futuro para entender mejor la influencia de los dominios PDZ y los PBMs en la patogenicidad viral y la respuesta inmune a la infección por virus.





## **CONCLUSIONES**



1. La proteína E del SARS-CoV contiene un motivo de unión a PDZ (PBM) funcional en su extremo carboxilo, formado por los últimos cuatro aminoácidos.
2. El PBM de la proteína E del SARS-CoV no promueve significativamente el crecimiento viral en cultivos celulares ni en ratón.
3. Se ha demostrado que el PBM de la proteína E del SARS-CoV es un determinante de la patogénesis viral. Virus recombinantes que carecen de este motivo muestran un fenotipo atenuado en ratones BALB/c.
4. La expresión de los genes relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria se encuentran disminuida significativamente en ausencia del PBM de la proteína E del SARS-CoV.
5. El PBM de la proteína E del SARS-CoV interacciona con la proteína celular sintenina durante la infección, produciendo su relocalización desde el núcleo hacia el citoplasma, dando lugar a la activación de la proteína p38 MAPK y a la expresión de citoquinas inflamatorias responsables de la respuesta inmune exacerbada descrita durante la infección con el virus nativo.
6. La inhibición de la actividad de la proteína p38 MAPK durante la infección de ratones con el SARS-CoV aumenta significativamente la supervivencia de los individuos infectados, lo que implica que se ha identificado una familia de antivirales para prevenir el SARS.
7. SARS-CoVs recombinantes que carecen del PBM de la proteína E generan nuevos PBMs al final de la proteína.
8. SARS-CoVs sin la proteína E generan en cultivos celulares proteínas M quiméricas con un PBM en el extremo terminal, potenciando el crecimiento del virus.



## **BIBLIOGRAFÍA**



Almazan F, DeDiego ML, Galan C, Escors D, Alvarez E, Ortego J, Sola I, Zuñiga S, Alonso S, Moreno JL, Nogales A, Capiscol C, Enjuanes L (2006) Construction of a SARS-CoV infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J Virol* **80**: 10900-10906

Almazan F, DeDiego ML, Sola I, Zuñiga S, Nieto-Torres JL, Marquez-Jurado S, Andres G, Enjuanes L (2013) Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. *mBio* **4**: e00650-00613

Almazan F, Galan C, Enjuanes L (2004) The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J Virol* **78**: 12683-12688

Almazan F, Gonzalez JM, Penzes Z, Izeta A, Calvo E, Plana-Duran J, Enjuanes L (2000) Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 5516-5521

Annan A, Baldwin HJ, Corman VM, Klose SM, Owusu M, Nkrumah EE, Badu EK, Anti P, Agbenyega O, Meyer B, Oppong S, Sarkodie YA, Kalko EK, Lina PH, Godlevska EV, Reusken C, Seebens A, Gloza-Rausch F, Vallo P, Tschapka M, Drosten C, Drexler JF (2013) Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. *Emerg Infect Dis* **19**: 456-459

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25**: 25-29

Assiri A, McGeer A, Perl TM, Price CS, Al Rabeeah AA, Cummings DA, Alabdullatif ZN, Assad M, Almulhim A, Makhdoom H, Madani H, Alhakeem R, Al-Tawfiq JA, Cotten M, Watson SJ, Kellam P, Zumla AI, Memish ZA (2013) Hospital outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *N Engl J Med*: doi:10.1056/NEJMoa1306742

Balint A, Farsang A, Zadori Z, Hornyak A, Dencso L, Almazan F, Enjuanes L, Belak S (2012) Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus Strain DF-2 and studies of the role of ORF3abc in viral cell tropism. *J Virol* **86**: 6258-6267

Baudoux P, Carrat C, Besnardeau L, Charley B, Laude H (1998) Coronavirus pseudoparticles formed with recombinant M and E proteins induce alpha interferon synthesis by leukocytes. *J Virol* **72**: 8636-8643

Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc B* **57**: 289-300

Bezprozvanny I, Maximov A (2001) PDZ domains: More than just a glue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 787-789

Borgeling Y, Schmolke M, Viemann D, Nordhoff C, Roth J, Ludwig S (2013) Inhibition of p38 Mitogen-activated protein kinase impairs influenza virus-induced primary and secondary host gene responses and protects mice from lethal H5N1 infection. *J Biol Chem*: doi 10.1074/jbc.M1113.469239

Boukerche H, Aissaoui H, Prevost C, Hirbec H, Das SK, Su ZZ, Sarkar D, Fisher PB (2010) Src kinase activation is mandatory for MDA-9/syntenin-mediated activation of nuclear factor-kappaB. *Oncogene* **29**: 3054-3066

Boukerche H, Su ZZ, Emdad L, Sarkar D, Fisher PB (2007) mda-9/Syntenin regulates the metastatic phenotype in human melanoma cells by activating nuclear factor-kappaB. *Cancer Res* **67**: 1812-1822

Carstens EB (2010) Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Arch Virol* **155**: 133-146

Casais R, Thiel V, Siddell SG, Cavanagh D, Britton P (2001) Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J Virol* **75**: 12359-12369

Castañero-Rodríguez C, Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Fernandez-Delgado R, Torres J, Enjuanes L (2014) Relevance of SARS-CoV 3a ion channel activity in virulence. Unpublished results.

Cavanagh D (2005) Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol* **34**: 439-448

Chan KH, Poon LL, Cheng VC, Guan Y, Hung IF, Kong J, Yam LY, Seto WH, Yuen KY, Peiris JS (2004) Detection of SARS coronavirus in patients with suspected SARS. *Emerg Infect Dis* **10**: 294-299

Cheung CY, Poon LL, Ng IH, Luk W, Sia SF, Wu MH, Chan KH, Yuen KY, Gordon S, Guan Y, Peiris JS (2005) Cytokine responses in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected macrophages in vitro: possible relevance to pathogenesis. *J Virol* **79**: 7819-7826

Chu DK, Peiris JS, Chen H, Guan Y, Poon LL (2008) Genomic characterizations of bat coronaviruses (1A, 1B and HKU8) and evidence for co-infections in *Miniopterus* bats. *J Gen Virol* **89**: 1282-1287

Cinatl J, Jr., Hoever G, Morgenstern B, Preiser W, Vogel JU, Hofmann WK, Bauer G, Michaelis M, Rabenau HF, Doerr HW (2004) Infection of cultured intestinal epithelial cells with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Cell Mol Life Sci* **61**: 2100-2112

Coley SE, Lavi E, Sawicki SG, Fu L, Schelle B, Karl N, Siddell SG, Thiel V (2005) Recombinant mouse hepatitis virus strain A59 from cloned, full-length cDNA replicates to high titers in vitro and is fully pathogenic in vivo. *J Virol* **79**: 3097-3106



Corse E, Machamer CE (2000) Infectious bronchitis virus E protein is targeted to the Golgi complex and directs release of virus-like particles. *J Virol* **74**: 4319-4326

Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR, Lee JC (1995) SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* **364**: 229-233

Day CW, Baric R, Cai SX, Frieman M, Kumaki Y, Morrey JD, Smee DF, Barnard DL (2009) A new mouse-adapted strain of SARS-CoV as a lethal model for evaluating antiviral agents in vitro and in vivo. *Virology* **395**: 210-222

de Groot RJ, Baker SC, Baric R, Enjuanes L, Gorbalenya AE, Holmes KV, Perlman S, Poon L, Rottier PJM, Talbot PJ, Woo PCY, Ziebuhr J (2012) Coronaviridae. In *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds), pp 774-796. San Diego: Elsevier Academic Press

de Haan CA, Rottier PJ (2005) Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Adv Virus Res* **64**: 165-230

de Haan CAM, Smeets M, Vernooij F, Vennema H, Pottier PJM (1999) Mapping of the coronavirus membrane protein domains involved in interaction with the spike protein. *J Virol* **73**: 7441-7452

DeDiego ML, Alvarez E, Almazan F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A, Shieh WJ, Zaki SR, Subbarao K, Enjuanes L (2007) A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol* **81**: 1701-1713

DeDiego ML, Nieto-Torres JL, Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Alvarez E, Oliveros JC, Zhao J, Fett C, Perlman S, Enjuanes L (2011) Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein regulates cell stress response and apoptosis. *PLoS pathogens* **7**: e1002315

DeDiego ML, Nieto-Torres JL, Regla-Nava JA, Jimenez-Guardeño JM, Fernandez-Delgado R, Fett C, Castaño-Rodríguez C, Perlman S, Enjuanes L (2014) Inhibition of NF-kappaB mediated inflammation in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected mice increases survival. *J Virol* **88**: 913-924

DeDiego ML, Pewe L, Alvarez E, Rejas MT, Perlman S, Enjuanes L (2008) Pathogenicity of severe acute respiratory coronavirus deletion mutants in hACE-2 transgenic mice. *Virology* **376**: 379-389

Delmas B, Laude H (1990) Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J Virol* **64**: 5367-5375

Ding Y, He L, Zhang Q, Huang Z, Che X, Hou J, Wang H, Shen H, Qiu L, Li Z, Geng J, Cai J, Han H, Li X, Kang W, Weng D, Liang P, Jiang S (2004) Organ distribution of severe

acute respiratory syndrome (SARS) associated coronavirus (SARS-CoV) in SARS patients: implications for pathogenesis and virus transmission pathways. *J Pathol* **203**: 622-630

Donaldson EF, Yount B, Sims AC, Burkett S, Pickles RJ, Baric RS (2008) Systematic assembly of a full-length infectious clone of human coronavirus NL63. *J Virol* **82**: 11948-11957

Donnelly CA, Ghani AC, Leung GM, Hedley AJ, Fraser C, Riley S, Abu-Raddad LJ, Ho L-M, Thach T-Q, Chau P (2003) Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *Lancet* **361**: 1761-1766

Drexler JF, Gloza-Rausch F, Glende J, Corman VM, Muth D, Goettsche M, Seebens A, Niedrig M, Pfefferle S, Yordanov S, Zhelyazkov L, Hermanns U, Vallo P, Lukashev A, Muller MA, Deng H, Herrler G, Drosten C (2010) Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J Virol* **84**: 11336-11349

Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguiere AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Muller S, Rickerts V, Sturmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW (2003) Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **348**: 1967-1976

Dwosh HA, Hong HH, Austgarden D, Herman S, Schabas R (2003) Identification and containment of an outbreak of SARS in a community hospital. *CMAJ* **168**: 1415-1420

Eckmann CR, Neunteufl A, Pfaffstetter L, Jantsch MF (2001) The human but not the *Xenopus* RNA-editing enzyme ADAR1 has an atypical nuclear localization signal and displays the characteristics of a shuttling protein. *Mol Biol Cell* **12**: 1911-1924

Enjuanes L, Almazan F, Sola I, Zuñiga S, Alvarez E, Reguera J, Capiscol C (2006) Biochemical aspects of coronavirus replication. *Adv Exp Med Biol* **581**: 13-24

Enjuanes L, Gorbalenya AE, de Groot RJ, Cowley JA, Ziebuhr J, Snijder EJ (2008a) The Nidovirales. In *Encyclopedia of Virology, Third Edition*, Mahy BWJ, Van Regenmortel M, Walker P, Majumder-Russell D (eds), pp 419-430. Oxford: Elsevier Ltd.

Enjuanes L, Sanchez C, Gebauer F, Mendez A, Dopazo J, Ballesteros ML (1993) Evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronavirus. *Adv Exp Med Biol* **342**: 35-42

Enjuanes L, Sola I, Zuñiga S, Almazán F (2008b) Coronavirus replication and interaction with host. In *Animal viruses. Molecular biology*, Mettenleiter TC, Sobrino F (eds), pp 149-202. Norfolk: Caister Academic Press

Escors D, Camafeita E, Ortego J, Laude H, Enjuanes L (2001) Organization of two transmissible gastroenteritis coronavirus membrane protein topologies within the virion and core. *J Virol* **75**: 12228-12240

Falcon A, Vazquez-Moron S, Casas I, Aznar C, Ruiz G, Pozo F, Perez-Brena P, Juste J, Ibanez C, Garin I, Aihartza J, Echevarria JE (2011) Detection of alpha and betacoronaviruses in multiple Iberian bat species. *Arch Virol* **156**: 1883-1890

Fett C, DeDiego ML, Regla-Nava JA, Enjuanes L, Perlman S (2013) Complete protection against severe acute respiratory syndrome coronavirus-mediated lethal respiratory disease in aged mice by immunization with a mouse-adapted virus lacking E protein. *J Virol* **87**: 6551-6559

Formstecher E, Aresta S, Collura V, Hamburger A, Meil A, Trehin A, Reverdy C, Betin V, Maire S, Brun C, Jacq B, Arpin M, Bellaiche Y, Bellusci S, Benaroch P, Bornens M, Chanet R, Chavier P, Delattre O, Doye V, Fehon R, Faye G, Galli T, Girault JA, Goud B, de Gunzburg J, Johannes L, Junier MP, Mirouse V, Mukherjee A, Papadopoulo D, Perez F, Plessis A, Rosse C, Saule S, Stoppa-Lyonnet D, Vincent A, White M, Legrain P, Wojcik J, Camonis J, Daviet L (2005) Protein interaction mapping: a *Drosophila* case study. *Genome Res* **15**: 376-384

Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, Niemeyer B, de Jong JC, Simon JH, Osterhaus AD (2004) A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 6212621-6212626

Franks TJ, Chong PY, Chui P, Galvin JR, Lourens RM, Reid AH, Selbs E, McEvoy CP, Hayden CD, Fukuoka J, Taubenberger JK, Travis WD (2003) Lung pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a study of 8 autopsy cases from Singapore. *Hum Pathol* **34**: 743-748

Frieman M, Heise M, Baric R (2008) SARS coronavirus and innate immunity. *Virus Res* **133**: 101-112

Frieman MB, Chen J, Morrison TE, Whitmore A, Funkhouser W, Ward JM, Lamirande EW, Roberts A, Heise M, Subbarao K, Baric RS (2010) SARS-CoV pathogenesis is regulated by a STAT1 dependent but a type I, II and III interferon receptor independent mechanism. *PLoS pathogens* **6**: e1000849

Fromont-Racine M, Rain JC, Legrain P (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet* **16**: 277-282

Fu KS, Baric RS (1992) Evidence for variable rates of recombination in the MHV genome. *Virology* **189**: 88-102

Fukutomi T, Tsunemitsu H, Akashi H (1999) Detection of bovine coronaviruses from adult cows with epizootic diarrhea and their antigenic and biological diversities. *Arch Virol* **144**: 997-1006

Gallagher TM, Buchmeier MJ (2001) Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology* **279**: 371-374

Garbino J, Crespo S, Aubert JD, Rochat T, Ninet B, Deffernez C, Wunderli W, Pache JC, Soccac PM, Kaiser L (2006) A prospective hospital-based study of the clinical impact of non-severe acute respiratory syndrome (Non-SARS)-related human coronavirus infection. *Clin Infect Dis* **43**: 1009-1015

Gardiol D (2012) PDZ-containing proteins as targets in human pathologies. *FEBS J* **279**: 3529

Gerek ZN, Keskin O, Ozkan SB (2009) Identification of specificity and promiscuity of PDZ domain interactions through their dynamic behavior. *Proteins* **77**: 796-811

Godet M, L'Haridon R, Vautherot JF, Laude H (1992) TGEV coronavirus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology* **188**: 666-675

Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM (1989) Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis. *Nucleic Acids Res* **17**: 4847-4861

Graham RL, Donaldson EF, Baric RS (2013) A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* **11**: 836-848

Gu J, Gong E, Zhang B, Zheng J, Gao Z, Zhong Y, Zou W, Zhan J, Wang S, Xie Z, Zhuang H, Wu B, Zhong H, Shao H, Fang W, Gao D, Pei F, Li X, He Z, Xu D, Shi X, Anderson VM, Leong AS (2005) Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *J Exp Med* **202**: 415-424

Handa Y, Durkin CH, Dodding MP, Way M (2013) Vaccinia virus F11 promotes viral spread by acting as a PDZ-containing scaffolding protein to bind myosin-9A and inhibit RhoA signaling. *Cell host & microbe* **14**: 51-62

Harris BZ, Lim WA (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* **114**: 3219-3231

Hatakeyama S, Matsuoka Y, Ueshiba H, Komatsu N, Itoh K, Shichijo S, Kanai T, Fukushi M, Ishida I, Kirikae T, Sasazuki T, Miyoshi-Akiyama T (2008) Dissection and identification of regions required to form pseudoparticles by the interaction between the nucleocapsid (N) and membrane (M) proteins of SARS coronavirus. *Virology* **380**: 99-108

Ho Y, Lin PH, Liu CY, Lee SP, Chao YC (2004) Assembly of human severe acute respiratory syndrome coronavirus-like particles. *Biochem Biophys Res Commun* **318**: 833-838

Hsiao CH, Chang MF, Hsueh PR, Su IJ (2005) Immunohistochemical study of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus in tissue sections of patients. *J Formos Med Assoc* **104**: 150-156

Huang C, Ito N, Tseng CT, Makino S (2006) Severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a accessory protein is a viral structural protein. *J Virol* **80**: 7287-7294

Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009a) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* **37**: 1-13

Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009b) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**: 44-57

Huang YW, Dickerman AW, Pineyro P, Li L, Fang L, Kiehne R, Opriessnig T, Meng XJ (2013) Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *mBio* **4**: e00737-00713

Hung AY, Sheng M (2002) PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem* **277**: 5699-5702

Jackson D, Hossain MJ, Hickman D, Perez DR, Lamb RA (2008) A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 4381-4386

Jacobs L, Van der Zeijst BAM, Horzinek M (1986) Characterization and translation of transmissible gastroenteritis virus mRNAs. *J Virol* **57**: 1010-1015

Javier RT, Rice AP (2011) Emerging theme: cellular PDZ proteins as common targets of pathogenic viruses. *J Virol* **85**: 11544-11556

Jimenez G, Correa I, Melgosa MP, Bullido MJ, Enjuanes L (1986) Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *J Virol* **60**: 131-139

Jimenez-Guardeño JM, Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Regla-Nava JA, Fernandez-Delgado R, Castaño-Rodríguez C, Enjuanes L (2014) The PDZ-binding motif of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein is a determinant of viral pathogenesis. *PLoS pathogens* **10**: e1004320

Kan B, Wang M, Jing H, Xu H, Jiang X, Yan M, Liang W, Zheng H, Wan K, Liu Q, Cui B, Xu Y, Zhang E, Wang H, Ye J, Li G, Li M, Cui Z, Qi X, Chen K, Du L, Gao K, Zhao YT, Zou XZ, Feng YJ, Gao YF, Hai R, Yu D, Guan Y, Xu J (2005) Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms. *J Virol* **79**: 11892-11900

Kennedy MB (1995) Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. *Trends Biochem Sci* **20**: 350

Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M (1997) Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 11612-11616

Knoops K, Kikkert M, Worm SH, Zevenhoven-Dobbe JC, van der Meer Y, Koster AJ, Mommaas AM, Snijder EJ (2008) SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol* **6**: e226

Koroll M, Rathjen FG, Volkmer H (2001) The neural cell recognition molecule neurofascin interacts with syntenin-1 but not with syntenin-2, both of which reveal self-associating activity. *J Biol Chem* **276**: 10646-10654

Kozak M (1987) At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* **196**: 947-950

Kumar S, Boehm J, Lee JC (2003) p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* **2**: 717-726

Kumar S, Jiang MS, Adams JL, Lee JC (1999) Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **263**: 825-831

Kuo L, Masters PS (2003) The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. *J Virol* **77**: 4597-4608

Kuo L, Masters PS (2010) Evolved variants of the membrane protein can partially replace the envelope protein in murine coronavirus assembly. *Journal of virology* **84**: 12872-12885

Lamirande EW, DeDiego ML, Roberts A, Jackson JP, Alvarez E, Sheahan T, Shieh WJ, Zaki SR, Baric R, Enjuanes L, Subbarao K (2008) A live attenuated SARS coronavirus is immunogenic and efficacious in golden Syrian hamsters. *J Virol* **82**: 7721-7724

Lau SK, Woo PC, Li KS, Huang Y, Tsoi HW, Wong BH, Wong SS, Leung SY, Chan KH, Yuen KY (2005) Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 14040-14045

Lauber C, Ziebuhr J, Junglen S, Drosten C, Zirkel F, Nga PT, Morita K, Snijder EJ, Gorbalenya AE (2012) Mesoniviridae: a proposed new family in the order Nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses. *Arch Virol* **157**: 1623-1628

Lee CH, Chen RF, Liu JW, Yeh WT, Chang JC, Liu PM, Eng HL, Lin MC, Yang KD (2004) Altered p38 mitogen-activated protein kinase expression in different leukocytes with increment of immunosuppressive mediators in patients with severe acute respiratory syndrome. *J Immunol* **172**: 7841-7847

Leong WF, Tan HC, Ooi EE, Koh DR, Chow VT (2005) Microarray and real-time RT-PCR analyses of differential human gene expression patterns induced by severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus infection of Vero cells. *Microbes Infect* **7**: 248-259

Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M (2003) Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for de SARS coronavirus. *Nature* **426**: 450-454

Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, Wang H, Crameri G, Hu Z, Zhang H, Zhang J, McEachern J, Field H, Daszak P, Eaton BT, Zhang S, Wang LF (2005) Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* **310**: 676-679

Liao CL, Lai MMC (1992) RNA recombination in a coronavirus - recombination between viral genomic RNA and transfected RNA fragments. *J Virol* **66**: 6117-6124

Lim KP, Liu DX (2001) The missing link in coronavirus assembly. Retention of the avian coronavirus infectious bronchitis virus envelope protein in the pre-Golgi compartments and physical interaction between the envelope and membrane proteins. *J Biol Chem* **276**: 17515-17523

Lu X, Pan J, Tao J, Guo D (2011) SARS-CoV nucleocapsid protein antagonizes IFN-beta response by targeting initial step of IFN-beta induction pathway, and its C-terminal region is critical for the antagonism. *Virus genes* **42**: 37-45

Lunney JK, Benfield DA, Rowland RR (2010) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: an update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Virus Res* **154**: 1-6

Maeda J, Maeda A, Makino S (1999) Release of coronavirus E protein membrane vesicles form virus-infected cells and E protein-expressing cells. *Virology* **263**: 265-272

Masters PS (2006) The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* **66**: 193-292

Matthay MA, Zemans RL (2011) The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol* **6**: 147-163

McCray PB, Jr., Pewe L, Wohlford-Lenane C, Hickey M, Manzel L, Shi L, Netland J, Jia HP, Halabi C, Sigmund CD, Meyerholz DK, Kirby P, Look DC, Perlman S (2007) Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* **81**: 813-821

McIntosh K, Kapikian AZ, Hardison KA, Hartley JW, Chanock RM (1969) Antigenic relationships among the coronaviruses of man and between human and animal coronaviruses. *J Immunol* **102**: 1109-1118

Melik W, Ellencrona K, Wigerius M, Hedstrom C, Elvang A, Johansson M (2012) Two PDZ binding motifs within NS5 have roles in Tick-borne encephalitis virus replication. *Virus Res* **169**: 54-62

Méndez A, Smerdou C, Gebauer F, Izeta A, Enjuanes L (1995) Structure and encapsidation of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) defective interfering genomes. *Adv Exp Med Biol* **380**: 583-589

Méndez A, Smerdou C, Izeta A, Gebauer F, Enjuanes L (1996) Molecular characterization of transmissible gastroenteritis coronavirus defective interfering genomes: packaging and heterogeneity. *Virology* **217**: 495-507

Miura TA, Holmes KV (2009) Host-pathogen interactions during coronavirus infection of primary alveolar epithelial cells. *J Leukoc Biol* **86**: 1145-1151

Muller MA, Paweska JT, Leman PA, Drosten C, Grywna K, Kemp A, Braack L, Sonnenberg K, Niedrig M, Swanepoel R (2007) Coronavirus antibodies in African bat species. *Emerg Infect Dis* **13**: 1367-1370

Munz M, Hein J, Biggin PC (2012) The role of flexibility and conformational selection in the binding promiscuity of PDZ domains. *PLoS Comput Biol* **8**: e1002749

Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, Sata T (2008) Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. *Am J Pathol* **172**: 1625-1637

Nal B, Chan C, Kien F, Siu L, Tse J, Chu K, Kam J, Staropoli I, Crescenzo-Chaigne B, Escriou N, van der Werf S, Yuen KY, Altmeyer R (2005) Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. *J Gen Virol* **86**: 1423-1434

Narayanan K, Huang C, Makino S (2008) SARS coronavirus accessory proteins. *Virus Res* **133**: 113-121

Narayanan K, Maeda J, Maeda A, Makino S (2000) Mechanism of specific coronavirus RNA packaging into virus particles. In *19th Annual Meeting*, p 84. Colorado

Netland J, DeDiego ML, Zhao J, Fett C, Alvarez E, Nieto-Torres JL, Enjuanes L, Perlman S (2010) Immunization with an attenuated severe acute respiratory syndrome coronavirus deleted in E protein protects against lethal respiratory disease. *Virology* **399**: 120-128

Ng SKC (2003) Possible role of an animal vector in the SARS outbreak at Amoy Gardens. *Lancet* **362**: 570-572



Nguyen VP, Hogue BG (1997) Protein interactions during coronavirus assembly. *J Virol* **71**: 9278-9284

Nicholls JM, Poon LL, Lee KC, Ng WF, Lai ST, Leung CY, Chu CM, Hui PK, Mak KL, Lim W, Yan KW, Chan KH, Tsang NC, Guan Y, Yuen KY, Peiris JS (2003) Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **361**: 1773-1778

Nieto-Torres JL, Dediego ML, Alvarez E, Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Llorente M, Kremer L, Shuo S, Enjuanes L (2011) Subcellular location and topology of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. *Virology* **415**: 69-82

Nieto-Torres JL, Dediego ML, Verdia-Baguena C, Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Fernandez-Delgado R, Castaño-Rodriguez C, Alcaraz A, Torres J, Aguilera VM, Enjuanes L (2014) Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS pathogens* **10**: e1004077

Oliveros LB, Domeniconi MA, Vega VA, Gatica LV, Brigada AM, Gimenez MS (2007) Vitamin A deficiency modifies lipid metabolism in rat liver. *Br J Nutr* **97**: 263-272

Ortego J, Ceriani JE, Patino C, Plana J, Enjuanes L (2007) Absence of E protein arrests transmissible gastroenteritis coronavirus maturation in the secretory pathway. *Virology* **368**: 296-308

Ortego J, Escors D, Laude H, Enjuanes L (2002) Generation of a replication-competent, propagation-deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome. *J Virol* **76**: 11518-11529

Page KW, Britton P, Bourns MEG (1990) Sequence analysis of the leader RNA of two porcine coronaviruses: transmissible gastroenteritis coronavirus and porcine respiratory coronavirus. *Virus genes* **4**: 289-301

Peiris JS, Chu CM, Cheng VC, Chan KS, Hung IF, Poon LL, Law KI, Tang BS, Hon TY, Chan CS, Chan KH, Ng JS, Zheng BJ, Ng WL, Lai RW, Guan Y, Yuen KY (2003) Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* **361**: 1767-1772

Perlman S, Netland J (2009) Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* **7**: 439-450

Ponting CP (1997) Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Sci* **6**: 464-468

Quan PL, Firth C, Street C, Henriquez JA, Petrosov A, Tashmukhamedova A, Hutchison SK, Egholm M, Osinubi MO, Niezgodna M, Ogunkoya AB, Briese T, Rupprecht CE, Lipkin WI (2010) Identification of a severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in a leaf-nosed bat in Nigeria. *mBio* **1**: e00208-00210

Raamsman MJB, Locker JK, de Hooge A, de Vries AAF, Griffiths G, Vennema H, Rottier PJM (2000) Characterization of the coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 small membrane protein E. *J Virol* **74**: 2333-2342

Regla-Nava JA, Jimenez-Guardeño JM, Nieto-Torres JL, Gallagher TM, Enjuanes L, DeDiego ML (2013) The replication of a mouse adapted SARS-CoV in a mouse cell line stably expressing the murine SARS-CoV receptor mACE2 efficiently induces the expression of proinflammatory cytokines. *J Virol Methods* **193**: 639-646

Regla-Nava JA, Nieto-Torres JL, Jimenez-Guardeño JM, Fernandez-Delgado R, Fett C, Castaño-Rodríguez C, Perlman S, Enjuanes L, DeDiego ML (2014) Identification of host responses contributing to attenuation of severe acute respiratory syndrome coronaviruses containing mutated E protein. *J Virol*: In press.

Regla-Nava JA, Nieto-Torres JL, Jimenez-Guardeño JM, Fernandez-Delgado R, Fett C, Castaño-Rodríguez C, Perlman S, Enjuanes L, DeDiego ML (2015) SARS coronaviruses with mutations in E protein are attenuated and promising vaccine candidates. *J Virol*: DOI 10.1128/JVI.03566-03514

Repass JF, Makino S (1998) Importance of the positive-strand RNA secondary structure of a murine coronavirus defective interfering RNA internal replication signal in positive-strand RNA synthesis. *J Virol* **72**: 7926-7933

Riley S, Fraser C, Donnelly CA, Ghani AC, Abu-Raddad LJ, Hedley AJ, Leung GM, Ho L-M, Lam T-H, Thach TQ, Chau P, Chan K-P, Lo S-V, Leung P-Y, Tsang T, Ho W, Lee K-H, Lau EMC, Ferguson NM, Anderson RM (2003) Transmission Dynamics of the Etiological Agent of SARS in Hong Kong: Impact of Public Health Interventions. *Science* **300**: 1961-1966

Roberts A, Deming D, Paddock CD, Cheng A, Yount B, Vogel L, Herman BD, Sheahan T, Heise M, Genrich GL, Zaki SR, Baric R, Subbarao K (2007) A mouse-adapted SARS-coronavirus causes disease and mortality in BALB/c mice. *PLoS pathogens* **3**: 23-37

Roberts A, Paddock C, Vogel L, Butler E, Zaki S, Subbarao K (2005) Aged BALB/c mice as a model for increased severity of severe acute respiratory syndrome in elderly humans. *J Virol* **79**: 5833-5838

Roberts S, Delury C, Marsh E (2012) The PDZ protein discs-large (DLG): the 'Jekyll and Hyde' of the epithelial polarity proteins. *FEBS J* **279**: 3549-3558

Rockx B, Baas T, Zornetzer GA, Haagmans B, Sheahan T, Frieman M, Dyer MD, Teal TH, Prohl S, van den Brand J, Baric R, Katze MG (2009) Early upregulation of acute respiratory distress syndrome-associated cytokines promotes lethal disease in an aged-mouse model of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J Virol* **83**: 7062-7074

Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campganoli R, Icenogle JP, Peñaranda S, Bankamp B, Maher K, Chen M-H, Tong S, Tamin A, Lowe L, Frace M, DeRisi JL, Chen Q, Wang D, Erdman Dd, Peret TCT, Burns C, Ksiazek TG, Rollin PE, Sanchez A, Liffick S, Holloway B, Limor J, McCaustland K, Olsen-Rasmussen M, Fouchier R, Gunther S, Osterhaus ADME, Drosten C, Pallansch MA, Anderson LJ, Bellini WJ (2003) Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* **300**: 1394-1399

Rousset R, Fabre S, Desbois C, Bantignies F, Jalinot P (1998) The C-terminus of the HTLV-1 Tax oncoprotein mediates interaction with the PDZ domain of cellular proteins. *Oncogene* **16**: 643-654

Ruch TR, Machamer CE (2012a) The Coronavirus E Protein: Assembly and Beyond. *Viruses* **4**: 363-382

Ruch TR, Machamer CE (2012b) A single polar residue and distinct membrane topologies impact the function of the infectious bronchitis coronavirus E protein. *PLoS pathogens* **8**: e1002674

Saif LJ, Wesley RD (1999) Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory coronavirus. In *Diseases of Swine*, Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'Allaire S, Taylor DJ (eds), Seventh edn, pp 295-325. Ames, Iowa: Wolfe Publishing Ltd

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sawicki SG, Sawicki DL (1990) Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis. *J Virol* **64**: 1050-1056

Schaefer SR, Mackenzie JM, Pekosz A (2007) The ORF7b protein of SARS-CoV is expressed in virus-infected cells and incorporated into SARS-CoV particles. *J Virol* **81**: 718-731

Scobey T, Yount BL, Sims AC, Donaldson EF, Agnihothram SS, Menachery VD, Graham RL, Swanstrom J, Bove PF, Kim JD, Grego S, Randell SH, Baric RS (2013) Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 16157-16162

Sheahan T, Morrison TE, Funkhouser W, Uematsu S, Akira S, Baric RS, Heise MT (2008) MyD88 is required for protection from lethal infection with a mouse-adapted SARS-CoV. *PLoS pathogens* **4**: e1000240

Shen S, Lin PS, Chao YC, Zhang A, Yang X, Lim SG, Hong W, Tan YJ (2005) The severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a is a novel structural protein. *Biochem Biophys Res Commun* **330**: 286-292

Shieh WJ, Hsiao CH, Paddock CD, Guarner J, Goldsmith CS, Tatti K, Packard M, Mueller L, Wu MZ, Rollin P, Su IJ, Zaki SR (2005) Immunohistochemical, in situ

hybridization, and ultrastructural localization of SARS-associated coronavirus in lung of a fatal case of severe acute respiratory syndrome in Taiwan. *Hum Pathol* **36**: 303-309

Sizun J, Yu MW, Talbot PJ (2000) Survival of human coronaviruses 229E and OC43 in suspension and after drying on surfaces: a possible source of hospital-acquired infections. *J Hosp Infect* **46**: 55-60

Smits SL, de Lang A, van den Brand JM, Leijten LM, van IWF, Eijkemans MJ, van Amerongen G, Kuiken T, Andeweg AC, Osterhaus AD, Haagmans BL (2010) Exacerbated innate host response to SARS-CoV in aged non-human primates. *PLoS pathogens* **6**: e1000756

Smyth GK (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**: Article3

Snijder EJ, Spaan WJM (1995) The coronaviruslike superfamily. In *The Coronaviridae*, Siddell SG (ed), pp 239-252. New York: Plenum press

Sola I, Moreno JL, Zuñiga S, Alonso S, Enjuanes L (2005) Role of nucleotides immediately flanking the transcription-regulating sequence core in coronavirus subgenomic mRNA synthesis. *J Virol* **79**: 2506-2516

Song HD, Tu CC, Zhang GW, Wang SY, Zheng K, Lei LC, Chen QX, Gao YW, Zhou HQ, Xiang H, Zheng HJ, Chern SW, Cheng F, Pan CM, Xuan H, Chen SJ, Luo HM, Zhou DH, Liu YF, He JF, Qin PZ, Li LH, Ren YQ, Liang WJ, Yu YD, Anderson L, Wang M, Xu RH, Wu XW, Zheng HY, Chen JD, Liang G, Gao Y, Liao M, Fang L, Jiang LY, Li H, Chen F, Di B, He LJ, Lin JY, Tong S, Kong X, Du L, Hao P, Tang H, Bernini A, Yu XJ, Spiga O, Guo ZM, Pan HY, He WZ, Manuguerra JC, Fontanet A, Danchin A, Niccolai N, Li YX, Wu CI, Zhao GP (2005) Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 2430-2435

Spaller MR (2006) Act globally, think locally: systems biology addresses the PDZ domain. *ACS Chem Biol* **1**: 207-210

Spiegel M, Pichlmair A, Martinez-Sobrido L, Cros J, Garcia-Sastre A, Haller O, Weber F (2005) Inhibition of beta interferon induction by severe acute respiratory syndrome coronavirus suggests a two-step model for activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* **79**: 2079-2086

St-Jean JR, Desforges M, Almazan F, Jacomy H, Enjuanes L, Talbot PJ (2006) Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. *J Virol* **80**: 3670-3674

Subbaiah VK, Kranjec C, Thomas M, Banks L (2011) PDZ domains: the building blocks regulating tumorigenesis. *Biochem J* **439**: 195-205

Subbarao K, Roberts A (2006) Is there an ideal animal model for SARS? *Trends Microbiol* **14**: 299-303

Sui J, Li W, Murakami A, Tamin A, Matthews LJ, Wong SK, Moore MJ, Tallarico AS, Olurinde M, Choe H, Anderson LJ, Bellini WJ, Farzan M, Marasco WA (2004) Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 2536-2541

Tan YJ, Teng E, Shen S, Tan THP, Goh PY, Fielding BC, Ooi EE, Tan HC, Lim SG, Hong W (2004) A novel severe acute respiratory syndrome coronavirus protein, U274, is transported to the cell surface and undergoes endocytosis. *J Virol* **78**: 6723-6734

Tang NL, Chan PK, Wong CK, To KF, Wu AK, Sung YM, Hui DS, Sung JJ, Lam CW (2005) Early enhanced expression of interferon-inducible protein-10 (CXCL-10) and other chemokines predicts adverse outcome in severe acute respiratory syndrome. *Clin Chem* **51**: 2333-2340

Teoh KT, Siu YL, Chan WL, Schluter MA, Liu CJ, Peiris JS, Bruzzone R, Margolis B, Nal B (2010) The SARS coronavirus E protein interacts with PALS1 and alters tight junction formation and epithelial morphogenesis. *Mol Biol Cell* **21**: 3838-3852

Thiel V, Herold J, Schelle B, Siddell S (2001) Infectious RNA transcribed *in vitro* from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J Gen Virol* **82**: 1273-1281

Thiel V, Ivanov KA, Putics A, Hertzog T, Schelle B, Bayer S, Wessbrich B, Snijder EJ, Rabenau H, Doerr HW, Gorbalenya AE, Ziebuhr J (2003) Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J Gen Virol* **84**: 2305-2315

Tooze J, Tooze SA, Fuller SD (1987) Sorting of progeny coronavirus from condensed secretory proteins at the exit from the trans-golgi network of atT20 cells. *J Cell Biol* **105**: 1215-1226

Tsang KW, Ho PL, Ooi GC, Yee WK, Wang T, Chan-Yeung M, Lam WK, Seto WH, Yam LY, Cheung TM, Wong PC, Lam B, Ip MS, Chan J, Yuen KY, Lai KN (2003) A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* **348**: 1977-1985

Tseng CT, Huang C, Newman P, Wang N, Narayanan K, Watts DM, Makino S, Packard MM, Zaki SR, Chan TS, Peters CJ (2007) Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of mice transgenic for the human Angiotensin-converting enzyme 2 virus receptor. *J Virol* **81**: 1162-1173

Underwood DC, Osborn RR, Bochnowicz S, Webb EF, Rieman DJ, Lee JC, Romanic AM, Adams JL, Hay DW, Griswold DE (2000) SB 239063, a p38 MAPK inhibitor, reduces neutrophilia, inflammatory cytokines, MMP-9, and fibrosis in lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**: L895-902

Vennema H, Godeke GJ, Rossen JWA, Voorhout WF, Horzinek MC, Opstelten DJ, Rottier PJM (1996) Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J* **15**: 2020-2028

Walker PJ, Bonami JR, Boonsaeng V, Chang PS, Cowley JA, Enjuanes L, Flegel TW, Lightner DV, Loh PC, Snijder EJ, Tang K (2005) *Roniviridae*. In *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds), pp 975-979. San Diego, California: Academic Press

Wang K, Boysen C, Shizuya H, Simon MI, Hood L (1997) Complete nucleotide sequence of two generations of a bacterial artificial chromosome cloning vector. *BioTechniques* **23**: 992-994

Wong SK, Li W, Moore MJ, Choe H, Farzan M (2004) A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem* **279**: 3197-3201

Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, Poon RW, Cai JJ, Luk WK, Poon LL, Wong SS, Guan Y, Peiris JS, Yuen KY (2005) Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* **79**: 884-895

Xu J, Zhong S, Liu J, Li L, Li Y, Wu X, Li Z, Deng P, Zhang J, Zhong N, Ding Y, Jiang Y (2005) Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus in the brain: potential role of the chemokine mig in pathogenesis. *Clin Infect Dis* **41**: 1089-1096

Ye J, Zhang B, Xu J, Chang Q, McNutt MA, Korteweg C, Gong E, Gu J (2007a) Molecular Pathology in the Lungs of Severe Acute Respiratory Syndrome Patients. *Am J Pathol* **170**: 538-545

Ye Y, Hauns K, Langland JO, Jacobs BL, Hogue BG (2007b) Mouse hepatitis coronavirus A59 nucleocapsid protein is a type I interferon antagonist. *J Virol* **81**: 2554-2563

Yount B, Curtis KM, Fritz EA, Hensley LE, Jahrling PB, Prentice E, Denison MR, Geisbert TW, Baric RS (2003) Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 12995-13000

Yount B, Denison MR, Weiss SR, Baric RS (2002) Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J Virol* **76**: 11065-11078

Yuan X, Li J, Shan Y, Yang Z, Zhao Z, Chen B, Yao Z, Dong B, Wang S, Chen J, Cong Y (2005) Subcellular localization and membrane association of SARS-CoV 3a protein. *Virus Res* **109**: 191-202

Zhao GP (2007) SARS molecular epidemiology: a Chinese fairy tale of controlling an emerging zoonotic disease in the genomics era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**: 1063-1081

Zhao Z, Zhang F, Xu M, Huang K, Zhong W, Cai W, Yin Z, Huang S, Deng Z, Wei M, Xiong J, Hawkey PM (2003) Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China. *J Med Microbiol* **52**: 715-720

Ziebuhr J (2005) The coronavirus replicase. In *Coronavirus replication and reverse genetics*, Enjuanes L (ed), Vol. 287, pp 57-94. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag

Ziebuhr J, Snijder EJ, Gorbalenya AE (2000) Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the *Nidovirales*. *J Gen Virol* **81**: 853-879

Zuñiga S, Sola I, Alonso S, Enjuanes L (2004) Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J Virol* **78**: 980-994

Zuñiga S, Sola I, Moreno JL, Sabella P, Plana-Duran J, Enjuanes L (2007) Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology* **357**: 215-227





**ANEXO**

