



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO EN OPCIÓN AL GRADO DE DOCTOR

**ESTUDIO SISTEMÁTICO SOBRE LAS FUNCIONES
CELULARES DEL RECEPTOR SIGMA-1:
IMPLICACIONES PARA LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE
LA HEPATITIS C**

CLAUDIA VASALLO VEGA

MADRID, 2017

Esta memoria es presentada por la Licenciada en Bioquímica Da. Claudia Vasallo Vega, para optar al grado de Doctor en Bioquímica, Biología Molecular, Biomedicina y Biotecnología (Biociencias Moleculares) por la Universidad Autónoma de Madrid.

El trabajo presentado en esta tesis doctoral ha sido realizado de octubre de 2013 a enero de 2017 en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB-CSIC) bajo la dirección del Dr. Pablo Gastaminza Landart y financiado por una beca predoctoral la Caixa-CSIC.

Madrid, enero de 2017



1. Índice

1. ÍNDICE

1. ÍNDICE.....	3
2. ABREVIATURAS.....	9
3. RESUMEN/ SUMMARY.....	15
4. INTRODUCCIÓN.....	21
4.1 El virus de la hepatitis C.....	21
4.1.1 Distribución de genoma y proteínas virales.....	22
4.1.3 Ciclo viral.....	24
4.2 Respuesta innata antiviral de la célula infectada por virus de RNA.....	33
4.2.1 Mecanismos de reconocimiento de virus de RNA.....	34
4.2.2 Receptores de la familia de RIG-I (RLRs).....	34
4.2.3 Activación y señalización de la vía de los RLRs.....	35
4.2.4 Regulación de la señalización de RLRs por mecanismos celulares.....	37
4.2.5 Regulación de la vía de RLR por antagonistas virales.....	39
4.3 La proteína receptor sigma-1 (SIGMAR1).....	41
4.3.1 Descubrimiento y clasificación.....	41
4.3.2 Estructura, localización, topología y propiedades.....	42
4.3.3 Farmacología, ligandos agonistas y antagonistas.....	44
4.3.4 Funciones fisiológicas y mecanismos moleculares propuestos.....	46
4.3.5 Asociación de SIGMAR1 con enfermedades neurodegenerativas.....	47
4.3.6 Asociación de SIGMAR1 con el cáncer.....	48
4.3.7 Papel de SIGMAR1 en la infección por HCV.....	49
5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	53
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
6.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo celular.....	57
6.2 Virus.....	57
6.3 Construcciones virales subgenómicas.....	58
6.4 Plásmidos.....	59

6.5 Anticuerpos.....	63
6.6 Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de acrilamida (SDS-PAGE), tinción con Ag y <i>Western blot</i>	65
6.7 Evaluación de la viabilidad celular mediante ensayo de MTT.....	66
6.8 Generación de partículas lentivirales para silenciamiento génico por RNA interferente (iRNA).....	66
6.9 Generación de partículas lentivirales para la expresión de la proteasa viral Npro de BVDV.....	67
6.10 Generación de partículas lentivirales para la expresión de la construcción para purificación en tándem TAP y las proteínas de fusión APOE-TAP y SIGMAR1-TAP.....	67
6.11 Generación de partículas virales transcomplementadas de HCV- JFH1 (HCV _{TCP}).....	68
6.12 Silenciamiento génico en células humanas mediante la transducción con partículas lentivirales para silenciamiento por RNA interferente (iRNA).....	68
6.13 Generación de una línea celular Huh-7 con expresión estable de la proteasa viral BVDB Npro.....	68
6.14 Generación de líneas celulares Huh-7 con expresión estable de la construcción para purificación TAP, la proteína de fusión APOE-TAP o SIGMAR1-TAP.....	69
6.15 Evaluación de replicación de HCV _{TCP}	69
6.16 Transfección en líneas celulares humanas mediante lipotransfección.....	69
6.17 Activación de la vía de los RLRs por transfección de poly(I:C) en células Huh-7.....	70
6.18 Activación de la vía de los RLRs por infección con el virus SeV.....	70
6.19 Activación de la vía de los RLRs por transfección de plásmidos de expresión de mediadores constitutivamente activos de la vía.....	71
6.20 Evaluación de la respuesta a estímulo con IFNA2A exógeno en células Huh-7.....	71
6.21 Ensayo de titulación viral por formación de placas de lisis del virus VSV.....	72
6.22 Expresión de la región NS3-5B de la poliproteína de HCV2a en ausencia de replicación mediante sistema de expresión basado en plásmidos.....	72
6.23 Expresión de la poliproteína de HCV1a mediante la infección con MVA-HCV.....	73
6.24 Extracción de RNA total y tratamiento de RNA con DNasa para la eliminación de DNA contaminante.....	73
6.25 Cuantificación de mRNA mediante RT-qPCR.....	73
6.26 Ensayos de actividad luciferasa.....	74
6.27 Tinción de Inmunofluorescencia.....	75
6.28 Microscopía de Fluorescencia.....	75

6.29 Transcriptómica diferencial mediante secuenciación masiva de RNA total (RNAseq).....	76
6.30 Proteómica diferencial mediante el marcaje con iTRAQ-8plex de extractos celulares totales.....	77
6.31 Análisis de datos de transcriptómica y proteómica diferencial.....	78
6.32 Purificación de complejos de asociación a proteínas de fusión con TAP SIGMAR1-TAP, APOE-TAP y TAP mediante cromatografía de afinidad.....	79
6.33 Análisis proteómico cuantitativo de complejos purificados de SIGMAR1-TAP, APOE-TAP y TAP.....	80
6.34 Nomenclatura de genes y proteínas.....	81
6.35 Análisis estadístico.....	81
7.RESULTADOS.....	85
7.1 Estudio del papel de SIGMAR1 en la respuesta antiviral frente a virus de RNA.....	85
7.1.1 Respuesta antiviral frente a infección por virus de RNA modelo en células Huh-7 deficientes en SIGMAR1.....	85
7.1.2 Respuesta antiviral frente a virus de RNA modelo en células HEK293T y A549 deficientes en SIGMAR1.....	91
7.1.3 Respuesta antiviral frente poly(I:C) intracelular en células Huh-7 deficientes en SIGMAR1.....	93
7.1.4 Respuesta a estímulo con IFNA2A en células Huh-7 deficientes en SIGMAR1.....	94
7.1.5 Respuesta de la vía de los RLRs frente a la estimulación por expresión de mediadores constitutivamente activos en células Huh-7 deficientes en SIGMAR1.....	95
7.1.6 Permisividad a la infección de HCV _{TCP} de células Huh-7 deficientes en SIGMAR1 en ausencia de respuesta antiviral mediada por IRF3.....	97
7.1.7 Impacto de la deficiencia de SIGMAR1 en la replicación viral de virus sensibles a IFN-I.....	99
7.2 Estudio del papel de la proteína SIGMAR1 en la regulación de la proteostasis y la localización de las proteínas virales de HCV en sistemas de expresión de la poliproteína viral en ausencia de replicación.....	101
7.2.1 Acumulación de proteínas no estructurales de HCV en sistema de expresión mediante plásmidos pTM de la región NS3-NS5B de la poliproteína viral de genotipo 2a en células Huh-7 deficientes en SIGMAR1.....	102
7.2.2 Acumulación de proteínas estructurales y no estructurales de HCV en sistema de expresión mediante infección con un vector vacunal/vaccinia (MVA) recombinante en células deficientes en SIGMAR1.....	103
7.2.3 Tamaño y distribución de los sitios de co-localización entre las proteínas virales no estructurales NS3 y NS5 de HCV expresadas en ausencia de replica-	

ción viral (sistema MVA-HCV) en células deficientes en SIGMAR1.....	104
7.3 Perfil transcriptómico y proteómico diferencial de células Huh-7 deficientes en SIGMAR1.....	108
7.3.1 Estudio transcriptómico y proteómico y diferencial de células deficientes en SIGMAR1.....	108
7.3.2 Análisis funcional de datos de la proteómica y transcriptómica diferencial de células Huh-7 deficientes en SIGMAR1.....	112
7.4 Estudio de interacciones físicas de SIGMAR1 con complejos proteicos celulares.....	131
7.4.1 Proteómica de complejos que contienen la proteína de fusión SIGMAR1-TAP en células Huh-7.....	131
8.DISCUSIÓN.....	145
9.CONCLUSIONES.....	167
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	171
11.ANEXOS.....	213
11.1 Fichas.....	213
11.2 Tablas.....	225

2. Abreviaturas

aa	aminoácido
AD	enfermedad de Alzheimer
ALS	enfermedad amiloide lateral
CARD	<i>Caspase recruiting domain</i>
CCV	vesícula recubierta de clatrina
CRE	elemento interno de replicación de <i>cis</i>
C-terminal	extremo carboxilo-terminal
DNA	ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario
EE	endosoma temprano
ER	retículo endoplásmico
FC	veces de cambio
FDR	riesgo de falsos positivos
FYVE	<i>Fab1, YOTB, Vac1, EEA1 domain</i>
GAP	proteína activadora de actividad GTPasa
GEF	factor intercambiador de nucleótido de Guanina
GTP	trifosfato de guanosina
GTPasa	actividad fosfatasa de trifosfato de guanosina
HCV	virus de la hepatitis C
IFN	interferón
IRES	sitio interno de entrada al ribosoma
ISG56	nombre alternativo de la proteína IFIT1
LE	endosoma tardío

LD	gota de lípidos
cLD	LD citosólica
ILD	LD luminal
LGP2	nombre alternativo de la proteína DHX58
MAM	membranas del ER asociadas a mitocondrias
MDA5	nombre alternativo de la proteína IFIH1
MOI	multiplicidad de infección
MS/MS	espectrometría de masas en tándem
MVB	cuerpo multivesicular
nt	nucleótido
N-terminal	extremo amino-terminal
PAMP	patrón molecular asociado a patógenos
PD	enfermedad de Parkinson
PH	<i>Pleckstrin homology domain</i>
PI	fosfatidilinositol
PIs	fosfoinosítidos
PI-4K	fosfatidil inositol 4-quinasa
PI4P	fosfatidil inositol 4-fosfato
PIPasa	fosfatidil inositol fosfato-fosfatasa
poly(I:C)	ácido poliinosínico-citidínico
PRR	receptor de reconocimiento de PAMPs
PX	<i>Phox homology domain</i>
RIG-I	nombre alternativo de la proteína DDX58

RNA	ácido ribonucleico
ssRNA	RNA de simple cadena
dsRNA	RNA de doble cadena
mRNA	RNA mensajero
shRNA	RNA corto en hebilla
SeV	virus Sendai
SNARE	SNAP (Soluble NSF attachment protein) receptor
VSG	gen estimulado por virus
VSV	virus de la estomatitis vesicular

3. Resumen/ *Summary*

Resumen

Receptor Sigma-1 (SIGMAR1, Sigma-1 Receptor) es una proteína celular residente en el retículo endoplásmico con funciones poco caracterizadas, que se han asociado a un papel protector (anti-apoptótico) en diferentes condiciones de estrés celular. Además, esta proteína une ciertas especies de lípidos y se considera que tiene un papel en el tráfico lipídico entre compartimentos de membranas. Los niveles incrementados de SIGMAR1 se han asociado a la incidencia o malignidad de ciertos tipos de cáncer, mientras su disfunción se ha relacionado con la patogénesis de ciertas enfermedades neurodegenerativas. Un trabajo previo de nuestro grupo ha revelado además un papel de SIGMAR1 en el inicio de la infección por el virus de la hepatitis C (HCV). Como continuidad de ese estudio, en esta tesis nos propusimos investigar las funciones que median el papel proviral de SIGMAR1 en la infección por HCV a través de aproximaciones basadas en hipótesis así como aproximaciones globales no sesgadas, con el objetivo de obtener nuevas nociones sobre eventos celulares poco conocidos que sustentan las etapas tempranas de la infección, así como conocer los mecanismos moleculares que subyacen a las funciones de SIGMAR1 en dichos eventos. En primer lugar, y siguiendo las hipótesis derivadas de nuestro estudio inicial sobre SIGMAR1 en la infección de HCV, hemos explorado el papel de SIGMAR1 en la regulación de la respuesta innata antiviral frente a virus de RNA a través del estudio de sistemas modelo de la activación de la respuesta antiviral en células deficientes en SIGMAR1. Estos estudios mostraron que SIGMAR1 tiene un papel regulador sobre la vía de los receptores tipo RIG-I (Retinoic acid - inducible gene I)-like receptor (RLRs), mediante la alteración de la formación/ disociación de los “signalosomas” de MAVS (Mitochondrial anti-viral-signaling protein). Sin embargo, hemos comprobado que este papel en la regulación de la respuesta innata antiviral es independiente de su papel proviral en la infección por HCV. Los resultados previos de nuestro grupo indicaron que los niveles de SIGMAR1 son limitantes para un paso del ciclo viral posterior a la traducción primaria y conducente a la replicación de RNA viral. Para conocer el destino de las proteínas virales en este lapso, hemos estudiado la acumulación y localización de éstas tras su traducción en sistemas libres de replicación. Estos estudios evidenciaron que los componentes de la replicasa viral, NS3 y NS5A, pero no la proteína estructural core, se acumulan menos eficientemente en las células deficientes en SIGMAR1 respecto a sus controles, lo que sugiere que SIGMAR1 podría determinar el destino de proteínas de la replicasa viral, clave en la formación de complejos de replicación funcionales. Por último, hemos empleado aproximaciones globales como la proteómica y transcriptómica

diferencial de células deficientes en SIGMAR1 y la caracterización proteómica de complejos purificados de una proteína de fusión de SIGMAR1, con el objetivo obtener nuevas nociones sobre los mecanismos moleculares que subyacen a las funciones celulares y provirales de SIGMAR1. La integración de los datos obtenidos por estas diferentes aproximaciones apuntan a una función de SIGMAR1 en la reorganización del citoesqueleto y el transporte vesicular, que posiblemente involucra la distribución local de fosfoinosítidos en microdominios de membrana especializados en la biogénesis de vesículas cargo en asociación con proteínas relacionadas con el transporte entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Esta noción sugiere que SIGMAR1 podría tener un papel en la biogénesis de compartimentos de membrana que sustentan la formación de los complejos de replicación de HCV funcionales. Además, la regulación dependiente de SIGMAR1 de la acumulación local de fosfoinosítidos, dado su impacto en la señalización celular, el transporte vesicular y el flujo autofágico, podría estar en la base de la asociación de la deficiencia de SIGMAR1 con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y de su expresión aberrante en cáncer.

Summary

Sigma-1 Receptor (SIGMAR1) is an endoplasmic reticulum-resident protein with poorly characterized molecular functions that has been proposed to play pro-survival functions under different stress conditions. As a lipid-binding protein SIGMAR1 is supposed to be involved in the traffic of different lipid species between membranous compartments. Increased SIGMAR1 expression correlates with malignancy in certain types of cancer, while its dysfunction is associated with pathogenesis in certain neurodegenerative diseases. Previous work from our group has revealed also a novel role of SIGMAR1 at the onset of hepatitis C virus (HCV) infection. As a consequence of the latter, in this Thesis we set out to investigate the functions underlying the proviral role of SIGMAR1 in HCV infection through both mechanistic, hypothesis-based and unbiased global approaches, in an attempt to gain insight into the cellular processes taking place at very early stages of the infection as well as to learn new molecular mechanisms by which SIGMAR1 exerts its cellular functions. First, based on hypotheses derived from the initial study of SIGMAR1 role in HCV infection, we explored the role of SIGMAR1 in the regulation of innate antiviral response against RNA viruses through the study of model systems for the activation of antiviral responses in SIGMAR1-deficient cells. These studies lead to the conclusion that SIGMAR1 plays a regulatory role in RLRs (Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors) pathway, possibly by altering the formation/dissociation rate of MAVS (Mitochondrial antiviral-signaling protein) signalosomes. However, we show that this role in innate immune response regulation was independent of its proviral role in HCV infection. Since previous studies in the laboratory determined that SIGMAR1 levels limit a step downstream of primary translation leading to RNA replication, we investigated the fate of the viral proteins after translation in a replication-deficient system. These studies lead to concluding that replicase components NS3 and NS5A, but not structural protein core, accumulate less efficiently in SIGMAR1-deficient cells comparing with their controls, suggesting that SIGMAR1 may determine the fate of viral proteins key to the formation of functional replication complexes. Finally, we performed differential transcriptomics and proteomics studies of SIGMAR1-deficient cells as well as proteomic characterization of purified SIGMAR1 tag-fusion protein-containing complexes to gain insight into the molecular mechanisms underlying SIGMAR1 proviral and cellular functions. Integration of the data obtained from these different approaches strongly support a function of SIGMAR1 in cytoskeleton reorganization and vesicular transport, possibly through regulation of local distribution and metabolism of phosphoinositides at microdomains specialized

in the biogenesis of cargo vesicles, in association with proteins involved in ER - Golgi trafficking. This new notion suggests that SIGMAR1 may play a role in the biogenesis of the membranous compartment that hosts functional HCV replication complexes. In addition, SIGMAR1-dependent regulation of local phosphoinositide accumulation and its impact on cell signaling, vesicular transport and autophagosomal flux may be at the basis of the pathogenesis associated with SIGMAR1 deficiency in neurodegenerative diseases and SIGMAR1 aberrant expression in cancer.

4. Introducción

4.1 El virus de la hepatitis C

El virus de la hepatitis C (HCV) es el miembro fundador del género *Hepacivirus* de la familia *Flaviviridae*. Por su gran variabilidad genética, está dividido en 7 genotipos y más de 100 subtipos que difieren de un 20 % a un 30 % en sus secuencias y que muestran diferentes perfiles de respuesta al tratamiento y distribución geográfica (revisado en (Weiss 2005)).

La infección crónica por HCV constituye un importante problema de salud a nivel mundial ya que es una de las principales causas de enfermedad hepática grave como cirrosis y carcinoma hepatocelular (revisado en (Shiffman y Benhamou 2014)). El problema de la infección crónica por HCV parece superado, al menos en los países desarrollados, con la llegada de los fármacos antivirales de acción directa (DAA, del inglés *direct-acting antiviral*). La primera generación de inhibidores de proteasa boceprevir y telaprevir en uso clínico desde 2011 logró una tasa de curación del 70% para el genotipo 1 en combinación con la la terapia estándar de interferón (IFN) recombinante y ribavirina. A pesar del avance, estos tratamientos estaban asociados con una alta incidencia de importantes efectos adversos. La segunda generación de terapias DAA, que incluyen combinaciones de inhibidores con diferentes dianas virales como la polimerasa (sofosbuvir), la proteína de la replicasa NS5A (daclatasvir, ledipasvir) o nuevos compuestos frente a la proteasa viral (simeprevir), permitieron abandonar la utilización de IFN, agente causal de la mayoría de los efectos adversos, en terapias de combinación a partir de 2014. Estos nuevos tratamientos, además de conseguir una notable reducción en la toxicidad de los tratamientos, tienen una tasa de curación superior al 95% frente a todos los genotipos. A pesar de la alta eficacia de los tratamientos en uso y la promesa de nuevas combinaciones de compuestos pendientes de aprobación, el surgimiento de mutaciones de resistencia a largo plazo, que ya ha empezado a reportarse, junto al alto coste del tratamiento, el riesgo incrementado de carcinoma hepatocelular (HCC) y las secuelas del daño hepático irreversible, con el consecuente el detrimento en la calidad de vida tras la curación (revisado en (Shiffman y Benhamou 2014)), aún son preocupaciones patentes en el campo que demandan la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas (revisado en (Zhang 2016)).

Más de veinte años de intensa investigación sobre la infección por HCV han aportado sin dudas muchas lecciones sobre la interacción virus-hospeda-

dor. Además, el desarrollo de poderosos sistemas y experiencia en el estudio de HCV ha permitido un importante avance científico en el campo de la virología (revisado en (Chisari 2005), (Gerold y Pietschmann 2014) y (Lohmann y Bartenschlager 2014)). La disponibilidad de éstos puede ser una herramienta útil para estudios mecanísticos de diferentes aspectos de la infección viral y la interacción virus-célula de HCV, pero también pueden sentar las bases para el estudio de otros virus de genoma de ácido ribonucleico (RNA), de potencial contribución a la investigación traslacional de virus allegados que permanecen sin solución terapéutica, como el virus Dengue, Zika, y otros virus emergentes.

4.1.1 Distribución de genoma y proteínas virales

HCV tiene un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 9,6 kb que contiene la secuencia codificadora de la poliproteína viral bajo un único marco abierto de lectura principal y las regiones no codificantes (UTRs, del inglés *untranslated regions*) 5' y 3' que contienen regiones de RNA no codificantes altamente estructuradas que actúan como reguladores en *cis* de la traducción y la replicación del genoma viral, incluyendo el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES (del inglés *internal ribosome entry site*) 5' (**Figura 4.1A**)). Además, posee un elemento interno de replicación de *cis* (CRE, del inglés *cis regulatory element*) en la región codificante. Asimismo, el extremo 3' del genoma no poliadenilado presenta una secuencia de poly(U/C) que antecede a una región de tres tallos de bucles, conocida como región 3'X, que contribuyen a la eficacia de la replicación (revisado en (Piñeiro y Martínez-Salas 2012)).

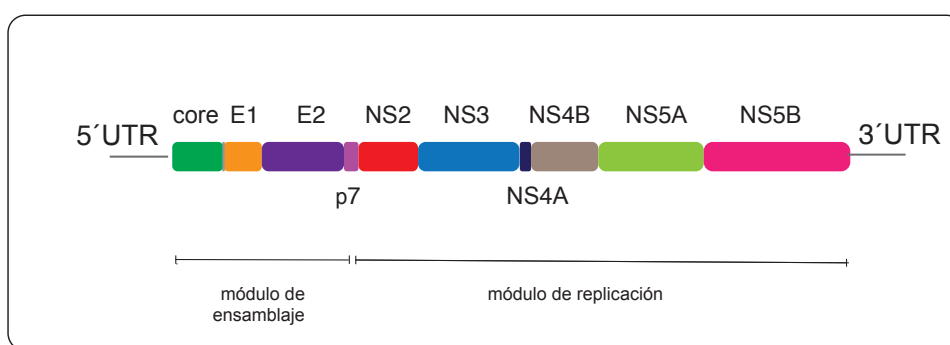


Figura 4.1. Organización del genoma y proteínas de HCV. UTR: región no traducible; IRES: sitio interno de entrada al ribosoma; CRE: elemento interno de replicación en *cis*; 3'X: región 3'X.

El RNA genómico viral de polaridad positiva se traduce directamente en la membrana del ER, produciendo una poliproteína transmembrana de alrededor de 3000 aminoácidos que es procesada proteolíticamente de forma co-transcripcional y postraducciona por proteasas celulares y virales produciendo las proteínas individuales: core, E1 y E2 (estructurales), p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, y NS5B (no estructurales, NS) (**Figura 4.1**).

La región core-NS2, constituye el módulo de ensamblaje y es dispensable para la replicación del genoma (**Figura 4.1**). Lo constituyen, del extremo amino al carboxilo (de izquierda a derecha en el esquema): core, una proteína básica con capacidad de unión a ácidos nucleicos que une y empaqueta el genoma y conforma la cápsida viral; las proteínas de la envoltura E1 y E2, proteínas de paso simple transmembrana con un dominio luminal con múltiples sitios de glicosilación que forman un heterodímero que media la entrada viral; p7, una proteína canal iónico que participa en el complejo de ensamblaje; y NS2, una proteína con tres pasos transmembrana que funciona como autoproteasa en el procesamiento proteolítico de la poliproteína y participa en el complejo de ensamblaje viral (revisado en (Bartenschlager, Lohmann *et al.* 2013)) y (Vieyres, Dubuisson *et al.* 2014)). La región NS3-NS5B constituye el módulo de replicación; es la región mínima del genoma capaz de formar complejos de replicación y autoreplicarse (revisado en (Bartenschlager, Lohmann *et al.* 2013)). Las proteínas de la replicasa viral NS3/4A, NS5A y NS5B, son dianas de los principales compuestos antivirales específicos contra HCV empleados en clínica (Pawlotsky 2014).

NS3 es una enzima bifuncional con un dominio proteasa N-terminal y un dominio RNA helicasa C-terminal. El dominio proteasa de NS3 es responsable del autoprosesamiento proteolítico de la secuencia de NS3 y NS4A y requiere de la interacción con el péptido NS4A para su actividad óptima en el procesamiento del resto de la poliproteína. Además, es responsable del corte e inactivación de sustratos celulares incluyendo MAVS (*mitochondrial antiviral-signaling protein*), TICAM1 (*TIR domain-containing adapter molecule 1*), DDB1 (*DNA damage-binding protein 1*) y GPX8 (*probable glutathione peroxidase 8*), implicados en la respuesta antiviral o en el ciclo viral (Ferreon, Ferreon *et al.* 2005; Li, Sun *et al.* 2005; Kang, Chen *et al.* 2013; Morikawa, Gouttenoire *et al.* 2014). El dominio RNA helicasa/ NTPasa de NS3 es esencial para la replicación del RNA viral (revisado en (Dubuisson y Cosset 2014)).

La pequeña proteína NS4A une a NS3 y le sirve como cofactor para ambas actividades enzimáticas, proteasa y helicasa, y es responsable del anclaje

del heterodímero NS3-NS4A a la membrana (revisado en (Dubuisson y Cosset 2014)).

NS4B es una proteína de membrana politópica que oligomeriza y funciona como andamiaje para el ensamblaje de la replicasa. También participa en la generación de curvatura en la membrana que da lugar a las vesículas que contienen los complejos de replicación (Konan, Giddings *et al.* 2003; Romero-Brey, Merz *et al.* 2012)(revisado en (Dubuisson y Cosset 2014)).

NS5A es una fosfoproteína de unión a RNA que contiene un dominio anfipático N-terminal de anclaje a membrana, un dominio estructurado de unión a Zn que dirige su homodimerización y un dominio C-terminal desplegado (**Figura 4.2**). Un aspecto esencial de la regulación de NS5A en procesos de replicación es su fosforilación por la caseína quinasa II α (CSNK2A1-2, Casein kinase II subunit alpha) (Ross-Thriepland, Mankouri *et al.* 2015). Las funciones de NS5A en la replicación no están del todo resueltas, pero entre sus funciones mejor caracterizadas está el reclutamiento de factores celulares esenciales para el ensamblaje de la replicasa, incluyendo la chaperona ciclofilina A (PPIA, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A), la enzima fosfatidil inositol 4-quinasa, (abreviado PI-4K), PI4KA (Phosphatidylinositol 4-kinase III α) y la proteína de tráfico vesicular VAPA (Vesicle-associated membrane protein-associated protein A) (revisado en (Dubuisson y Cosset 2014)), (Popescu, Riva *et al.* 2014) y (Meyers, Fontaine *et al.* 2016)). NS5A también desempeña funciones importantes en el ensamblaje de viriones infecciosos (Tellinghuisen, Foss *et al.* 2008; Zayas, Long *et al.* 2016), probablemente gracias a su interacción con core en la superficie de gotas lipídicas, que constituyen la plataforma de ensamblaje de viriones de HCV (Miyanari, Atsuzawa *et al.* 2007).

NS5B es la polimerasa de RNA dependiente de RNA y tiene una cola de anclaje a membrana C-terminal (revisado en (Dubuisson y Cosset 2014)).

4.1.3 Ciclo viral

El ciclo de HCV es enteramente citoplásmico. Comienza con la unión a receptores de superficie y entrada mediante endocitosis mediada por clatrina de las lipovirionpartículas, que son fusionadas a los endosomas liberándose y desencapsidándose el genoma viral. La traducción directa del genoma de RNA de polaridad positiva produce la acumulación de proteínas virales en membranas del ER, a las que causan profundas modificaciones estructurales durante la formación de los complejos de replicación virales. Estas modificaciones son ev-

identes cuando con la replicación aumenta exponencialmente la acumulación de proteínas virales, y vesículas de simple, doble y multimembrana llenan forman áreas denominadas redes membranosas (MWs, del inglés *membranous webs*) (Romero-Brey, Merz *et al.* 2012; Pérez-Berná, Rodríguez *et al.* 2016).

Las etapas tempranas de la infección, más allá de la entrada viral y en relación con la formación de complejos de replicación funcionales, dependen estrechamente de procesos celulares como la respuesta de estrés, la autofagia y el metabolismo lipídico (revisado en (Ploen y Hildt 2015),(Vasallo y Gastaminza 2015) y (Dash, Chava *et al.* 2016)).

La célula infectada puede sostener durante meses a años la replicación persistente del RNA viral en un estado estable en que las células producen cantidades fluctuantes de virus y coexisten con una alta carga de estrés de ER y oxidativo, sin sufrir apoptosis, en condiciones en las que las MWs pueden ocupar casi todo el citoplasma (revisado en (Vasallo y Gastaminza 2015)). En condiciones de infección persistente, la replicación es independiente de procesos que son limitantes para el establecimiento inicial de la infección como la autofagia y la UPR, lo que ilustra la profunda adaptación estructural y funcional de la célula hospedadora (revisado en (Vasallo y Gastaminza 2015)). Sin embargo, otros procesos como el metabolismo de lípidos, resultan transversales a la infección tanto aguda como persistente (revisado en (Dubuisson y Cosset 2014)).

4.1.3.1 Entrada

La entrada del virión (**Figura 4.3 1**) se inicia con la unión al hepatocito por medio de la interacción de la lipoproteína APOE de la superficie de las partículas virales con los glucosaminoglicanos, los proteoglicanos de heparán sulfato y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR, LDL receptor) de la superficie celular, y la subsiguiente interacción con los receptores tirosín-quinasa, EGFR (Epidermal growth factor receptor) y EPHA2 (Ephrin type-A receptor 2), el receptor de transferrina TFRC (Transferrin receptor protein 1), el receptor carroñero SRB1 (SCARB1, Scavenger receptor class B member 1), la tetraspanina CD81 (CD81 antigen), el receptor de colesterol NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like protein 1) y las proteínas de las uniones estrechas, CLDN-1 (Claudin-1) y OCLN (Occludin). Finalmente, el virus es internalizado mediante endocitosis mediada por clatrina (revisado en (Dubuisson y Cosset 2014)).

El endosoma que contiene la partícula viral parece ser transportado vía microtúbulos en vesículas marcadas con RAB5 (Roohvand, Maillard *et al.*

2009). Distintos factores del citoesqueleto median funciones post-entrada en la infección por HCV (Blackham, Baillie *et al.* 2010, Bukong, Kodys *et al.* 2013).

Finalmente, la partícula viral es liberada del endosoma mediante fusión de su envoltura lipídica con la membrana endosomal de manera dependiente del pH y el genoma es desencapsidado y liberado en el citoplasma, donde es traducido (revisado en (Dubuisson y Cosset 2014)) (**Figura 4.3 2**).

4.1.3.2 Traducción primaria

En el citoplasma, el genoma de RNA de polaridad positiva se une directamente a la subunidad 40S del ribosoma mediante su IRES (Fraser y Doudna 2007) y es transportado a las membranas del ER, donde sirve de molde para la síntesis de la poliproteína precursora (revisado en (Dubuisson y Cosset 2014)) (**Figura 4.3 3**). Una característica distintiva del IRES de HCV es que requiere sólo dos factores iniciación de la traducción celular (eIF, del inglés *eukaryotic translation initiation factor*) eIF3 y eIF2 para el reclutamiento del ribosoma y la iniciación de la traducción (revisado en (Khawaja, Vopalensky *et al.* 2014) y (Piñeiro y Martínez-Salas 2012)). Recientemente ha surgido la interrogante de si el IRES de HCV, como el del virus de la parálisis del grillo (CrPV) puede iniciar la traducción sin asistencia del complejo eIF2, y también ha sido considerada la operación simultánea de ambos mecanismos de iniciación dependiente e independiente del complejo eIF2 (Pestova, de Breyne *et al.* 2008). En cualquier caso, el IRES de HCV permite la traducción eficaz del genoma viral incluso en situaciones que causan la fosforilación de eIF2a como en estrés de ER o durante la respuesta innata frente a dsRNA (Shimoike, McKenna *et al.* 2009, Thakor y Holcik 2011). No obstante se ha descrito que varios factores celulares pueden regular la iniciación de la traducción del genoma de HCV, de manera especial proteínas de unión a RNA que interaccionan con su IRES (revisado (Piñeiro y Martínez-Salas 2012)). Además, se ha propuesto que el miRNA122, un factor determinante del tropismo hepático de HCV, es capaz de unir a dos motivos en tándem presentes en el 5'-UTR, promoviendo la estabilización y potenciando la tasa traduccional del genoma viral (revisado en (Sarnow y Sagan 2016)). También se ha descrito que factores celulares implicados en la iniciación de la autofagia son limitantes para la traducción de genomas entrantes, pero no para la traducción de genomas derivados de replicación viral en infecciones persistentes, aunque se desconocen los detalles moleculares que subyacen a este fenómeno (Dreux, Gastaminza *et al.* 2009).

La topología de las proteínas estructurales (core, E1 y E2) y p7 (**Figura**

4.2) está definida por el mecanismo dependiente de reconocimiento de péptidos señales para la asociación a membrana y el procesamiento proteolítico que rinde las proteínas individuales es mediado co- y post-traduccionalmente por la peptidasa señal y la peptidasa del péptido señal del lumen del ER (revisado en (Dubuisson y Cosset 2014)). El dominio transmembrana C-terminal de core contiene el péptido señal que conduce al polisoma con el polipéptido naciente a la membrana del ER. El primer sitio de procesamiento proteolítico es el extremo C-terminal péptido señal interno entre core y E1, por la peptidasa señal luminal. El procesamiento posterior del péptido señal por la peptidasa del péptido señal libera core hacia el citosol (McLauchlan, Lemberg *et al.* 2002). Con el corte del péptido señal interno, el extremo N-terminal de E1 es liberado también y forma un lazo luminal. El extremo C-terminal de la cadena naciente de E1 queda anclada en membrana por medio de su tramo hidrofóbico interno que funciona como una secuencia señal no canónica y que forma una estructura en bucle de vuelta al lumen para formar un gran lazo luminal correspondiente a E2. Tras el corte por la peptidasa señal del extremo C-terminal del bucle, la secuencia señal es retenida en la membrana y el extremo C-terminal del segundo tallo del bucle es reorientado hacia el lado citosólico de la membrana para dar la topología final de la proteína. Con el corte de la secuencia señal en E1, el lazo N-terminal de E2 es liberado en el lumen del ER. El extremo C-terminal de la cadena naciente de E2 queda anclada en membrana por una secuencia señal que forma un bucle, similar a la secuencia transmembrana de E1, que es reorientado tras el corte de la unión E2-p7 por la peptidasa señal, quedando el paso transmembrana N-terminal de p7 en su orientación original. La región C-terminal de p7 actúa como secuencia señal interna y queda como un segundo paso transmembrana. A continuación en la secuencia los tres dominios hidrofóbicos de NS2 conforman tres pasos transmembrana. El corte de la unión p7-NS2 por la peptidasa señal parecen ocurrir post-traduccionalmente y de manera poco eficiente, conservando la topología de membrana del polipéptido precursor (**Figura 1.1B**) (revisado en (Dubuisson y Cosset 2014)).

Las proteínas E1 y E2 son modificadas post-traduccionalmente mediante N- glicosilación en el ER (Vieyres, Dubuisson *et al.* 2014). El proceso de plegamiento, modificación y ensamblaje del dímero E1-E2 es altamente dependiente de chaperonas celulares (revisado en (Khachatoorian 2016)).

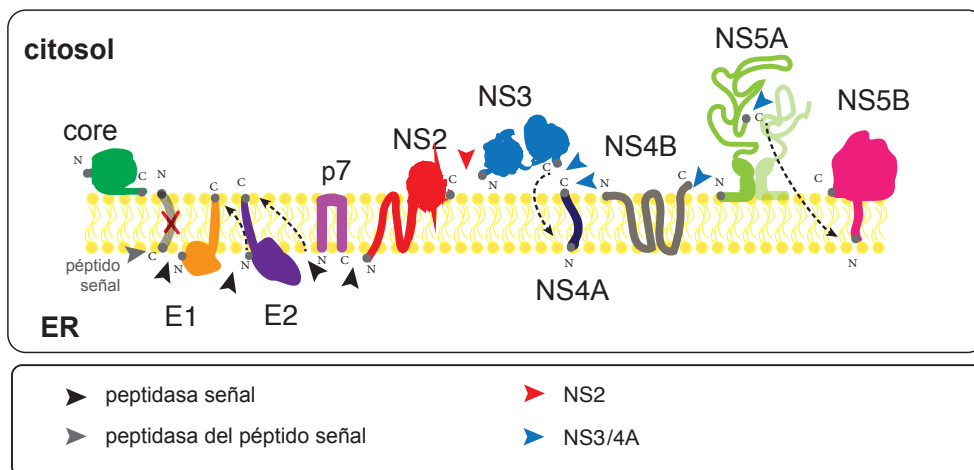


Figura 4.2. Esquema de la topología de membrana de las proteínas virales individuales a partir del procesamiento de la poliproteína por proteasas celulares y virales. Las cabezas de flecha indican los sitios de corte por las proteasas celulares y virales, de acuerdo al código de colores indicado en el cuadro inferior de la figura. La región transmembrana en gris representa el péptido señal interno que une Core y E1, que es eliminado por la peptidasa del péptido señal. Las flechas negras discontinuas indican la translocación co-traducciona de los péptidos correspondientes tras el corte proteolítico.

El procesamiento de la región no estructural (**Figura 4.2**) es mediado por dos proteasas virales solapadas en la secuencia de la poliproteína: la auto-proteasa NS2-NS3 dependiente de zinc que media el corte del sitio NS2-3 y la serín-proteasa NS3 que corta autoproteolíticamente el sitio NS3-4A y usa NS4 como cofactor corte en los sitios NS4A-4B, NS4B-5A y NS5A-5B (revisado en (Raney, Sharma *et al.* 2010)). El corte de la unión NS2-NS3 por la autoproteasa NS2-NS3 ocurre de manera co-traducciona, dejando el extremo N-terminal proteasa de NS3 libre. El procesamiento intramolecular de la unión NS3-NS4A libera el extremo N-terminal hidrofóbico de NS4A que se inserta formando un dominio transmembrana y separa NS3 del resto de la poliproteína naciente en la membrana del ER, siendo NS3 liberada hacia el citosol, quedando retenida al lado citosólico de la membrana del ER por la interacción con el dominio C-terminal de NS4A. Para los subsiguientes eventos proteolíticos NS3 utiliza NS4A como cofactor (revisado en (Raney, Sharma *et al.* 2010)). La unión de NS3 a su cofactor NS4A permite la proximidad de NS3 a sus sustratos y el rápido procesamiento proteolítico de las uniones citosólicas NS4A-NS4B, NS4B-NS5A, y NS5A-5B (revisado en (Dubuisson y Cosset 2014)).

Las proteínas individuales NS4B, NS5A, y NS5B, quedan asociadas a la membrana del ER. NS4B queda integrada por medio de cuatro dominios

transmembrana. NS5A, dispuesta hacia el lado citosólico se asocia mediante una hélice alfa anfipática dispuesta en paralelo sobre la membrana del ER. Por su parte, NS5B se ancla a membrana postraduccionalmente de manera independiente de la topología de la poliproteína precursora, mediante de la translocación de un dominio de inserción hidrofóbica C-terminal o cola de anclaje (revisado en (Moradpour, Gosert *et al.* 2003) y (Dubuisson y Cosset 2014)).

4.1.3.3 Formación de complejos de replicación

Después de varias rondas de traducción primaria, las proteínas no estructurales de la región NS3-NS5B (módulo de replicación) reclutan el RNA viral y conforman los complejos de replicación asociados a membrana de ER (revisado en (Dubuisson y Cosset 2014)). Se ha sugerido que la competición de NS3 y la proteína celular La (SSB, *single-stranded DNA-binding protein*) por la unión al IRES de HCV podría regular el paso traducción y replicación. La unión de la proteína SSB favorece la traducción mientras la de unión de NS3 favorece la replicación (Ray y Das 2011).

La formación de las estructuras de los complejos de replicación iniciales depende de interacciones funcionales entre las proteínas virales, fundamentalmente NS4B y NS5A, con factores de la célula hospedadora (Moradpour, Gosert *et al.* 2003, Romero-Brey, Merz *et al.* 2012)(revisado en (Dubuisson y Cosset 2014)).

Cabe destacar que la proteína NS5A parece interactuar con numerosos factores celulares, muchos de los cuales facilitan la formación de complejos de replicación (revisado en (Ross-Thriepland y Harris 2015)). Por ejemplo, las interacciones de NS5A con la PI-4K PI4KA induce la acumulación de PI4P en la membrana. PI4P es un lípido polar que participa en la formación de curvatura de membranas y además favorecen el reclutamiento de otros factores que unen PIP4 como FAPP2 (PLEKHA8, Pleckstrin homology domain-containing family A member 8) y sus lípidos asociados hacia las membranas ricas en NS5A, para promover la curvatura de la membrana y la biogénesis de las vesículas que contienen las factorías de replicación de HCV (revisado en (Popescu, Riva *et al.* 2014) y (Meyers, Fontaine *et al.* 2016)). De acuerdo con este papel, la subregulación o inhibición de PI4KA en la infección por HCV suprime la replicación de RNA viral y causa la agregación de vesículas de doble membrana (DMVs, del inglés *double-membrane vesicles*) anormalmente pequeñas (revisado en (Popescu, Riva *et al.* 2014)). Asimismo, las mutaciones en PI4KA que impiden su interacción con NS5A fenocopian el efecto de la deficiencia de PI4KA en la

replicación del RNA viral, apoyando la noción de que la concentración local de PI4P facilita la formación de las DMVs (Lim y Hwang 2011). De hecho, los inhibidores tipo daclatasvir, cuya diana molecular es NS5A inhiben la activación por NS5A de PI4KA, la acumulación local de PI4P y la formación de DMVs sin alterar la expresión de proteínas virales en sistemas libres de replicación (Berger, Romero-Brey *et al.* 2014, Chukkapalli, Berger *et al.* 2015), reforzando la noción del papel central de NS5A en el proceso de formación de DMVs.

4.1.3.4 Replicación

La replicación viral ocurre en los complejos de replicación (RC, del inglés *replication complex*) (**Figura 4.3 4**) en estructuras de membranas de creciente complejidad inducidas por las proteínas virales que son denominadas genéricamente redes membranosas (MWs, del inglés *membranous webs*) y que consisten en gotas de lípidos (LD, del inglés *lipid droplet*) y membranas derivadas del ER, incluyendo, además de las DMVs, vesículas de membrana simple y múltiple, que contienen varias copias de la replicasa viral NS3-5B, el genoma de RNA y factores celulares (Romero-Brey, Merz *et al.* 2012) y cuyo posicionamiento y localización depende de microtúbulos y filamentos de actina (Lai, Jeng *et al.* 2008). En estas estructuras, el RNA genómico viral es replicado por la polimerasa de RNA dependiente de RNA viral NS5B por iniciación *de novo* en o cerca del extremo 3' mediante la producción de un intermediario de RNA completo complementario de polaridad negativa que es usado iterativamente como molde para la producción de genomas de polaridad positiva, que serán empleadas como molde de traducción o bien encapsidadas para formar los viriones progenie (revisado en (Dubuisson y Cosset 2014)).

El mantenimiento de la estabilidad del genoma, un punto crucial para el establecimiento de la infección, convierte al microRNA (miR122) en un factor de tropismo en la infección por HCV (Chang, Guo *et al.* 2008). Otras proteínas de unión a RNA también pudieran regular la estabilidad y localización del genoma y favoreciendo la replicación viral (Rivas-Aravena, Ramdohr *et al.* 2009).

4.1.3.5 Ensamblaje y egresión

El ensamblaje de los viriones progenie (**Figura 4.3 5**) ocurre en la superficie de las LD citosólicas (cLD) anexas a los RC en las MWs y a las que core se asocia (revisado en (Grassi 2016)).

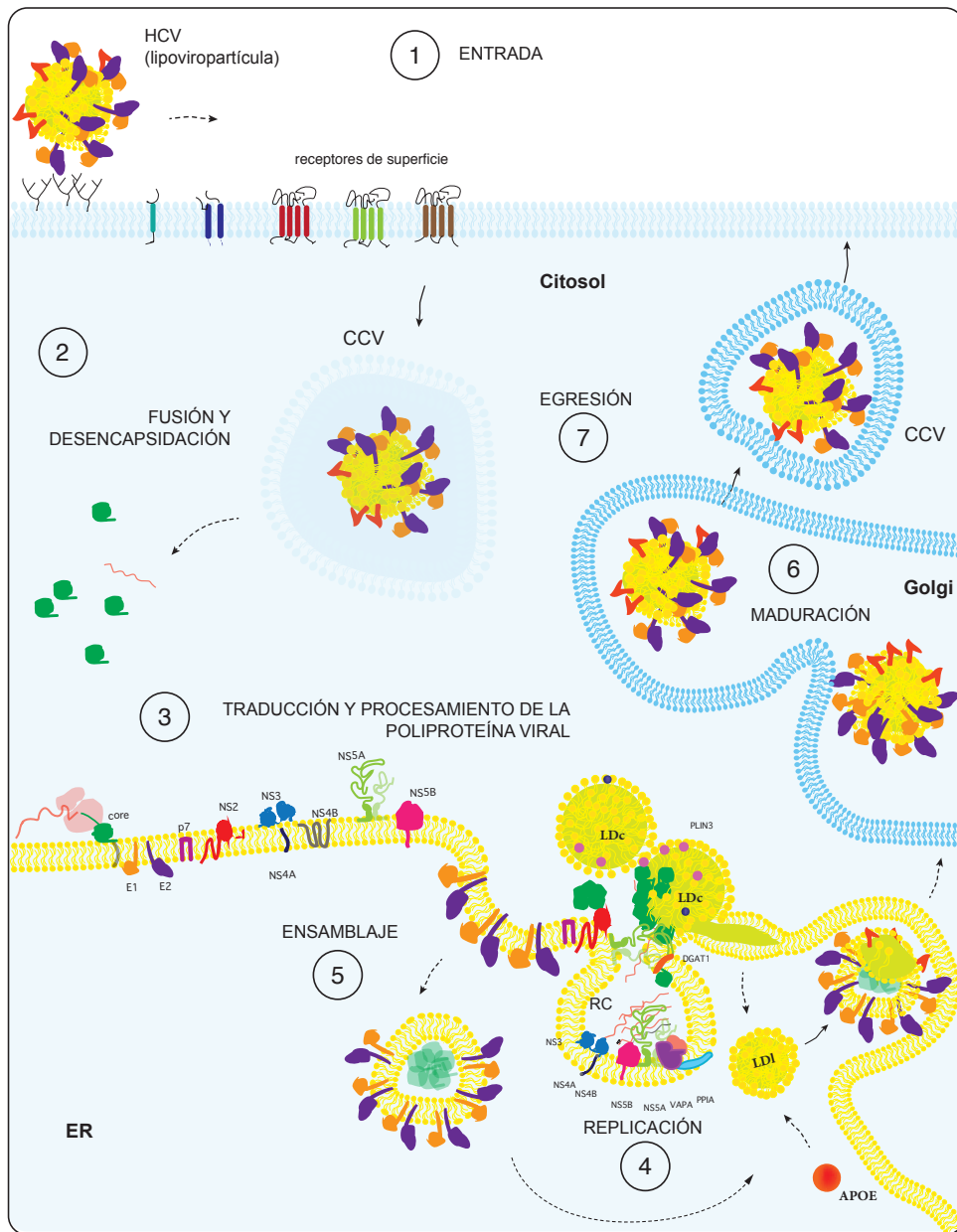


Figura 4.3 Ciclo celular de HCV. 1. El virión es reconocido por receptores de superficie e internalizado mediante endocitosis en vesículas recubierta de clatrina CCV. 2. El virus desnudo es liberado al citosol, donde el genoma es desencapsidado. 3. El genoma viral es traducido en la membrana del ER y la poliproteína viral se procesa proteólicamente produciendo las proteínas individuales. 4. Las proteínas del módulo de replicación en asociación con factores celulares forman estructuras e membrana en aposición a gotas de lípido citosólicas (cLD) donde ocurre la replicación del genoma viral. 5. Los genomas progenie son encapsulados con la proteína core, e incorporados a vesículas nacientes que contienen las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2, que invaginan hacia el lumen donde incorporan componentes de las VLDL. 6. El virión madura durante su paso por la vía secretora, adquiriendo la conformación infecciosa. 7. El virión infeccioso sale de la célula mediante exocitosis mediada por clatrina.

La proteína core es reclutada a las LDs citosólicas mediante su interacción con la enzima de la síntesis de triacilglicéridos DGAT1 (Diacylglycerol O-acyltransferase 1) y la fosfolipasa citosólica PLA2G1B (Phospholipase A2). La creciente asociación de core con la superficie de las LDs citosólicas promueve la salida de PLIN2 incrementando la asociación de PLPN3. NS5A interacciona con PLIN3, que presenta gran similitud con APOE, y con la pequeña GTPasa RAB18 (Ras-related protein Rab-18), en la superficie de las LDs, mediando la interacción entre los sitios de replicación y de ensamblaje, y dirige el RNA sintetizado *de novo* desde los complejos de replicación hacia la plataforma de ensamblaje cerca de las LDs (revisado en (Suzuki 2011) y (Meyers, Fontaine *et al.* 2016)).

El paso inicial del ensamblaje de los viriones es la interacción de NS5A con la proteína de la cápsida, core, unida a las cLDs. El resto de las proteínas virales involucradas en el proceso son entonces reclutadas hacia los sitios de ensamblaje en membranas asociadas a cLDs por medio de interacción con core. Las proteínas virales p7 y NS2 juegan un papel crucial en la organización del complejo de ensamblaje. El complejo p7-NS2 interacciona con NS3/4A y promueve la incorporación de core de las cLDs hacia la partícula viral naciente (revisado en (Meyers, Fontaine *et al.* 2016)). La proteína celular HNRNPK (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K) regula el ensamblaje viral mediante la interacción con el RNA viral de cadena positiva y con la proteína core en la proximidad de las LDs y determina la incorporación del genoma naciente a los nuevos viriones (Poenisch, Metz *et al.* 2015).

La partícula viral naciente adquiere la envoltura mediante gemación hacia el lumen del ER y queda asociada a las LDs intraluminales, precursores de VLDLs, de manera que la proteínas de ensamblaje de VLDLs APOE participa en la formación del virión y queda incorporado en éste (Yang, Wang *et al.* 2016). La gemación parece requerir componentes de la maquinaria ESCRT como VPS4 y el complejo ESCRT III (del inglés *endosomal sorting complex required for transport*) (revisado en (Vieyres, Dubuisson *et al.* 2014) y (Meyers, Fontaine *et al.* 2016)).

Las partículas virales asociadas a componentes de las VLDLs maduran través de la vía secretora (**Figura 4.3 6**). Para esto es esencial la interacción de PLNP3 con la forma asociada a GTP de RAB9 (Ras-related protein Rab-9A)(revisado en (Vieyres, Dubuisson *et al.* 2014)). Durante este proceso las proteínas de superficie E1 y E2 son modificadas mediante glicosilación y reorganización de sus puentes disulfuro, adquiriéndose progresivamente la conformación final

del heterodímero maduro (revisado en (Vieyres, Dubuisson *et al.* 2014)). La maduración culmina en la formación de partículas virales infectivas que son liberadas al exterior celular por exocitosis mediada por clatrina (Benedicto, Gondar *et al.* 2015). Este proceso de maduración de las partículas virales, íntimamente ligado a la vía secretora y las VLDL celulares, determina los requerimientos de entrada viral de las partículas virales progenie (revisado en (Vieyres, Dubuisson *et al.* 2014))(Yang, Wang *et al.* 2016) (Sección 4.1.3.1).

4.2 Respuesta innata antiviral de la célula infectada por virus de RNA

Las células eucariotas, incluso las no especializadas en la respuesta inmunológica presentan mecanismos muy conservados evolutivamente para detectar y responder rápidamente a las infecciones por patógenos intracelulares. Estos sistemas permiten la detección de una amplia gama de patógenos mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*) (revisado en (Randall y Goodbourn 2008)), patrones de estrés celular incluyendo la fusión de membranas, reorganización del citoesqueleto, estrés de ER y estrés metabólico, y dan lugar a la inducción de genes de defensa con cierta especificidad de patógeno, así como respuestas inespecíficas asociadas a alteraciones de la homeostasis celular (revisado en (Collins y Mossman 2014)).

La identificación de PAMPs virales como patrones de ácidos nucleicos intermediarios de replicación y de determinadas proteínas virales induce la expresión de genes activados por virus (VSGs, del inglés *virus-stimulated genes*) y, en muchos casos, la inducción de los sistemas antivirales mediados por interferones (abreviado IFN) tipo I (IFN-I) y tipo III (IFN-III), que inducen la expresión de genes estimulados por interferón (ISGs, del inglés *interferon stimulated genes*) en la células infectadas y sus células adyacentes, restringiendo así la propagación del virus (Schoggins, Wilson *et al.* 2011)(revisado en (Randall y Goodbourn 2008)).

4.2.1 Mecanismos de reconocimiento de virus de RNA

Un grupo de sensores citosólicos de virus de RNA está constituido por enzimas celulares activadas por la unión a RNA de doble cadena (dsRNA), como PKR (EIF2AK2, Interferon-induced, double-stranded RNA-activated

protein kinase), OAS1-3 (2'-5'-oligoadenylate synthase 1-3), OASL (2'-5'-oligoadenylate synthase-like protein) y ADAR (Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase). Un segundo grupo está constituido por los receptores de reconocimiento de PAMPs (PRR, del inglés *PAMPs recognition receptor*), incluyendo los receptores tipo Toll (TLR, del inglés *Toll-like receptor*) TLR3 y TLR7, que reconocen dsRNA extracelular internalizado por endocitosis, los receptores RNA helicasa de la familia de RIG-I (RLRs, del inglés *retinoic acid inducible gene-I-like receptor*) que reconocen RNA de doble cadena (dsRNA, del inglés *double-stranded RNA*) y RNA de doble simple cadena (ssRNA, del inglés *single-stranded RNA*) con extremo 5'-trifosfato presente en citosol durante la replicación viral y los receptores tipo NOD (del inglés, *nucleotide-binding oligomerization domain*) (NLR, del inglés *NOD-like receptor*), que reconocen diversos PAMPs asociados a infección y DAMPs (del inglés *danger-associated molecular pattern*), asociados a estrés celular (revisado en (Randall y Goodbourn 2008)).

4.2.2 Receptores de la familia de RIG-I (RLRs)

La familia de los receptores RLRs incluye tres helicasas de RNA, RIG-I (DDX58, Probable ATP-dependent RNA helicase DDX58), MDA5 (IFIH1, Interferon-induced helicase C domain-containing protein 1) y LGP2 (DHX58, Probable ATP-dependent RNA helicase DHX58), que comparten dominios helicasa centrales de reconocimiento de RNA, mientras que RIG-I y MDA5, tienen además dos dominios de reclutamiento de caspasas (CARD, del inglés *caspase-recruiting domain*) N-terminales, responsables de la transducción de la señal. Aunque fue inicialmente considerado un represor de la señalización, LGP2 podría cooperar con la señalización de RIG-I y MDA5 (Moresco y Beutler 2010, Satoh, Kato *et al.* 2010, Childs, Randall *et al.* 2013).

Los RLRs reconocen dsRNA y ssRNA con extremo 5'-trifosfato, generados durante la replicación de algunos virus de RNA (Hornung, Ellegast *et al.* 2006, Pichlmair, Schulz *et al.* 2006, Rehwinkel, Tan *et al.* 2010, Goulet, OLAGNIER *et al.* 2013). RIG-I detecta preferentemente especies de dsRNA cortos mientras MDA5 reconoce con preferencia dsRNA largos (Kato, Takeuchi *et al.* 2008). RIG-I, además, muestra una especial preferencia por ssRNA con extremo 5'-trifosfato, intermediario de la replicación viral que se considera su sustrato canónico (Hornung, Ellegast *et al.* 2006, Strahle, Garcin *et al.* 2006).

Debido a sus diferentes especificidades, RIG-I y MDA5 muestran cierta selectividad en el reconocimiento de virus de RNA: mientras RIG-I es el sensor

predominante de los virus de las familias *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, y *Rhabdoviridae*, MDA5 es el principal responsable del reconocimiento de *Picornaviridae* y de los miembros de la familia de los *Flaviviridae* Virus del Nilo Occidental (WNV) y Virus del dengue (DENV), mientras que los virus de la familia *Reoviridae* pueden ser reconocidos por ambos receptores (revisado en (Chattopadhyay y Sen 2014)). RIG-I es el principal sensor de PAMPs de HCV (Gale y Foy 2005), que reconoce y es activado robustamente por RNA 5'-trifosfatos del genoma de HCV, de manera especial de motivos de la región 3'-UTR como el segmento poly-U/UC (Saito, Owen *et al.* 2008)(Uzri y Gehrke 2009). El papel antiviral de esta vía para HCV (Raychoudhuri, Shrivastava *et al.* 2011, Shrivastava, Raychoudhuri *et al.* 2011, Yao, Yan *et al.* 2011) es reforzado por el hecho de que, al menos en cultivo celular, el virus contraresta su activación muy eficientemente desde tiempos muy tempranos (revisado en (Gokhale, Vazquez *et al.* 2014)) (Sección 4.2.5).

4.2.3 Activación y señalización de la vía de los RLRs

Los mecanismos de activación de RLRs se han estudiado con mayor detalle utilizando RIG-I como modelo, aunque muchos de estos se han demostrado también para MDA5 (revisado en (Chattopadhyay y Sen 2014)).

RIG-I se encuentra en niveles relativamente bajos en las células no infectadas y se mantiene en una conformación inactiva mediante el bloqueo por fosforilación de sus dominios CARD (Nistal-Villán, Gack *et al.* 2010). Tras la unión a PAMPs virales (**Figura 4.4 1**), la desfosforilación de estos dominios por la fosfatasa PPP1CA permite el acceso de las E3 ubiquitin ligasas RNF135 y TRIM25, a sus dominios CARD (**Figura 4.4 2**), dando lugar a la ubiquitinación y oligomerización de RIG-I (Gack, Shin *et al.* 2007, Oshiumi, Miyashita *et al.* 2010, Wies, Wang *et al.* 2013). Estos cambios promueven la interacción, a través de sus dominios CARD, con los dominios CARD de MAVS (**Figura 4.4 2**), la proteína adaptadora central de la cascada, que se localiza en la membrana externa mitocondrial, en las membranas de ER asociadas a mitocondrias (MAM, del inglés *mitochondria-associated ER membrane*) y las en membranas de los peroxisomas (Dixit, Boulant *et al.* 2010). La interacción con los dominios CARD de los RLRs provoca una rápida agregación de multímeros de MAVS que forman fibras de agregados de gran tamaño en un proceso semejante al de la agregación de priones (Hou, Sun *et al.* 2011).

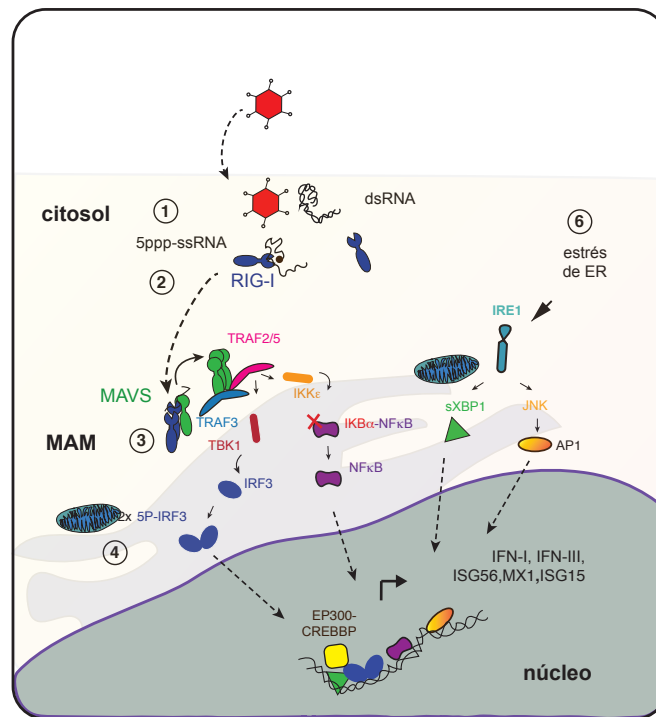


Figura 4.4 Vía de señalización de los RLRs. A) Activación de la vía de los RLRs por virus de RNA y cooperación de las vías de respuesta a estrés de ER con la vía de los RLRs. Las etapas de la cascada se indican con números: **1.** estímulo viral; **2.** receptores y mediadores de la activación; **3.** complejo de señalización formado por los mediadores que transmiten la señal desde la activación de los receptores hacia la activación de los factores de transcripción; **4.** factores de transcripción activos; **5.** complejo de potenciación de la transcripción que regula la actividad de promotores de la transcripción de genes antivirales; **6.** regulación de la vía de RLRs por la respuesta a estrés de ER. MAM: membranas del ER asociadas a mitocondrias. (Ver detalles en el texto).

La oligomerización de MAVS permite el ensamblaje del complejo de señalización (“signalosoma”) (**Figura 4.4 3**), donde se reclutan proteínas adaptadoras como las ubiquitin-ligasas TRAF (Tumor necrosis factor receptor-associated factor) 3/6/2 y 5 (Liu, Chen *et al.* 2013). Las proteínas TRAF forman una plataforma para el reclutamiento de la subunidad reguladora del complejo de quinasas IKK (del inglés *IκB kinase*), IKKγ o NEMO (IKBKG, NF(nuclear factor)-kappa-B essential modulator), y de las quinasas TBK1 (Serine/threonine-protein kinase TBK1) e IKKε (IKBKE, Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon), que son responsables de la fosforilación de los factores de transcripción IRF3 (Interferon regulatory factor 3) e IRF7 y de la proteína inhibidora de NF-κB, IκBα (NFKBIA, NF-kappa-B inhibitor alpha), respectivamente. La fosforilación y subsiguiente dimerización de IRF3/7 y la liberación de NF-κB

p65/p50 (NF- κ B1, Nuclear factor NF- κ B p105 subunit) de su inhibidor I κ B α conduce a la translocación de estos factores de transcripción al núcleo (**Figura 4.4 4**).

IRF3 se asocia con el complejo histona acetiltransferasa CBP/p300 (CREBBP/EP300), reclutando así este co-activador transcripcional al potenciador (*enhancer*) del promotor. El ensamblaje del complejo potenciador de la transcripción (“enhanceosoma”) conduce al reclutamiento secuencial de factores modificadores de la cromatina y la maquinaria de transcripción. En el núcleo IRF3 se asocia al co-activador transcripcional CBP/p300 (CREBBP/EP300) y, junto a los factores de transcripción del complejo AP1 (del inglés *activator protein 1*), c-Jun (JUN, Transcription factor AP-1) y ATF2 (Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-2), y a NF- κ B, se une al *enhancer* del promotor del gen de interferón beta (*IFNB1*, Interferon beta), y de otros VSGs, formando el “ehncanceosoma” que activa la transcripción genes antivirales incluyendo IFN tipo I y III, *ISG56* (*IFIT1*, Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1), *ISG15* (Ubiquitin-like protein ISG15) y *MX1* (*Interferon-induced GTP-binding protein Mx1*) (revisado en (Hiscott 2007)) (**Figura 4.4 5**), que inhiben la infección por diferentes virus mediante el bloqueo de la entrada o tráfico pre-replicación de las nucleoproteínas, la traducción del genoma viral y sus modificaciones post-traduccionales, la egresión y/o la inducción del arresto del ciclo celular o la apoptosis de la célula infectada (revisado en (Schneider, Chevillotte *et al.* 2014)).

4.2.4 Regulación de la señalización de RLRs por mecanismos celulares

Varios pasos de la cascada de los RLRs están sujetos a regulación por mecanismos homeostáticos de la célula. Entre los procesos celulares que funcionan como reguladores positivos de la vía de los RLRs cabe destacar, por ejemplo, la respuesta a estrés de ER (UPR, del inglés *unfolded protein response*), que funciona como un mecanismo adicional de detección y potenciación de la respuesta antiviral. Las tres ramas de la respuesta de UPR activan NF- κ B, mientras la vía de IRE1 (ERN1, Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE1) activa además la quinasa JNK1 (Mitogen-activated protein kinase 8), que favorece la activación de los factores de transcripción c-Jun y ATF2 (AP1), y la función factor de transcripción de sXBP1, que se une al “enhanceosoma” de *IFNB1* y potencia su inducción (revisado en (Hare y Mossman 2013)) (**Figura 4.4 6**). Diversos mecanismos de reconocimiento de señales de estrés celular asociados a eventos como la entrada viral, la fusión

de membranas o la reestructuración del citoesqueleto celular, también regulan positivamente la respuesta antiviral mediante la potenciación de la señal de vías accesorias (revisado en (Smith 2014)). Otros reguladores celulares que funcionan en la activación cruzada de la vía incluyen la cooperación y potenciación por la helicasa DDX3 (DDX3X, ATP-dependent RNA helicase DDX3X) (Oshiumi, Sakai *et al.* 2010), la potenciación de la oligomerización de MAVS por la alteración de los lípidos de membrana por especies reactivas de oxígeno derivadas de la mitocondria (mROS, del inglés *mitochondrial reactive oxygen species*) (Nobre, Wise *et al.* 2015), entre otros (revisado en (Komuro, Bamminger *et al.* 2008)). Asimismo, la fosforilación y activación de IRF3 por TBK1 está regulada por la chaperona del ER HSP90 (Yang, Shi *et al.* 2006), la cual estabiliza TBK1, y por STING (TMEM173, Stimulator of interferon genes protein), que favorece la interacción y fosforilación de IRF3 por TBK1 (Maringer y Fernandez-Sesma 2014). Muchos de estos mecanismos son activados por la infección viral mediante la detección del estrés asociado a la infección (revisado en (Collins y Mossman 2014)), lo cual constituye un nivel adicional de control de la especificidad de la activación de la vía.

Por otro lado, numerosos mecanismos de control regulan negativamente la activación de la vía a nivel de MAVS, incluyendo la interacción inhibitoria con el complejo de autofagia ATG5–ATG12 (Jounai, Takeshita *et al.* 2007; Takeshita, Kobiyama *et al.* 2008), la interacción y destinación a degradación por Gp78 (AMFR, E3 ubiquitin-protein ligase AMFR) (Jacobs, Zhu *et al.* 2014), la desubiquitinación de RIG-I por CYLD (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD) y la unión e interferencia con la oligomerización por la chaperona UBXN1 (UBX domain-containing protein 1) (Wang, Yang *et al.* 2013). El funcionamiento de la autofagia, y en particular la autofagia inducida por estrés de ER tiene un papel en la limitación de la respuesta antiviral (Takeshita, Kobiyama *et al.* 2008, Tal, Sasai *et al.* 2009, Estrabaud, De Muynck *et al.* 2011, Shrivastava, Raychoudhuri *et al.* 2011). Mecanísticamente, la autofagia pudiera ejercer esta función mediante la degradación de las plataformas y efectores de la señalización (revisado en (Tal y Iwasaki 2009) y (Ke y Chen 2011)). Algunos de estos mecanismos, activados a su vez por la vía de los RLRs, funcionan como retroalimentación negativa controlando la cinética de autolimitación de la respuesta, por ejemplo, mediante la inducción de inhibidores celulares de la vía como las ubiquitín-ligasas A20 y DUBA por NF κ B, y de RNF150, ISG15, LGP2 por AP1, IRF3/7 y NF- κ B (revisado en (Komuro, Bamminger *et al.* 2008)).

Recientemente, también la vía reguladora del destino celular Wnt/

β -catenina ha sido reportada como regulador de la vía de las RLRs. La propia β -catenina (CTNNB1) ha sido implicada en diferentes estudios con un papel activador (Zhu, Coyne *et al.* 2011; Hillesheim, Nordhoff *et al.* 2014) o inhibitorio (Baril, Es-Saad *et al.* 2013) de la vía de los RLRs, actuando como co-activador o antagonista de la actividad transcripcional de IRF3 (revisado en (Gao, Xiao *et al.* 2014)) y NF- κ B (revisado en (Du y Geller 2010) y (Ma y Hottiger 2016)). Asimismo, recientemente ha empezado a conocerse la regulación cruzada de la respuesta de IFN y la vía de TP53 (revisado en (Rivas, Aaronson *et al.* 2010)). En el intermedio entre ambas vías, la RNA helicasa DDX3, forma un complejo con RIG-I o MDA5 que favorece la interacción de éstos con MAVS (Oshiumi, Sakai *et al.* 2010). Además, funciona de puente para la activación de IRF3 por IKBKE (Schröder, Baran *et al.* 2008; Gu, Fullam *et al.* 2013) y, posiblemente, por TBK1 (Soulat, Bürckstümmer *et al.* 2008).

Estas regulaciones cruzadas entre distintas vías cruciales de la homeostasis celular ilustran el grado de complejidad en la regulación de la respuesta de IFN-I/III, y de su carácter autolimitado y adaptado a las condiciones celulares. El estrecho control de la inducción de IFN-I/III por otras vías celulares centrales también coopera en la regulación del destino de la proliferación y supervivencia celular (Takaoka, Hayakawa *et al.* 2003; Bode, Brenndorfer *et al.* 2007; Leonova, Brodsky *et al.* 2013).

4.2.5 Regulación de la vía de RLR por antagonistas virales

Los virus de RNA han evolucionado junto a los PRRs, desarrollando estrategias específicas para la evasión de la activación de los receptores de sus PAMPs, como el enmascaramiento de PAMPs como los 5'-ppp, la interferencia con las modificaciones post-traduccionales de los RLRs que median la señalización, la interacción inhibitoria o el corte proteolítico de receptores y mediadores de la vía, entre otras (revisado en (Komuro, Bamming *et al.* 2008)).

Por ejemplo, la proteína V de los paramyxovirus como el virus del sarampión (MeV, measles virus) y el virus Nipah (NiV, Nipah virus) antagoniza las fosfatasa PPP1CA /PP1CC, evitando la desfosforilación de MDA5 y así su activación, mientras la proteína NS1 del virus de la gripe (IAV, influenza A virus) se une a la E3 ubiquitin ligasa TRIM25 para bloquear la ubiquitinación de los dominios CARD de RIG-I (Gack, Albrecht *et al.* 2009) y en algunos casos a RNF135, inhibiendo la ubiquitinación del dominio C terminal de RIG-I (Rajsbaum, Albrecht *et al.* 2012). Otros virus interfieren con la ubiquitinación de RIG-I mediante proteínas virales que desubiquitinan RIG-I, como en el caso

de la proteína Orf64, una DUB del herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV), que elimina las cadenas de K63-ubiquitina de los dominios CARD de RIG-I (revisado en (Komuro, Bamming *et al.* 2008)).

Por otra parte, varias proteasas virales han evolucionado hacia el reconocimiento en sitios de corte en proteínas mediadoras de la vía de los RLRs, como una estrategia para el escape de la respuesta antiviral. Por ejemplo, el complejo proteasa NS3/4A de HCV corta proteolíticamente TRIF (TICAM1), bloqueando la vía de TLR3 (Li, Foy *et al.* 2005), MAVS (Li, Sun *et al.* 2005, Ferreira, Magalhães *et al.* 2016) y RNF135 (Oshiumi, Miyashita *et al.* 2013), evitando la activación de RIG-I. Asimismo, la proteasa 2Apro de los enterovirus cortan MDA5 y MAVS (Feng, Langereis *et al.* 2014), mientras la proteasa N-terminal (Npro) de pertivirus como el BVDV, corta proteolíticamente IRF3 (La Rocca, Herbert *et al.* 2005, Bauhofer, Summerfield *et al.* 2007), bloqueando así la efectivamente señalización de ambos RLRs y TLR3. Por su parte, las proteínas NS1 y NS2 del virus sincitial respiratorio (RSV, Respiratory Sincitial Virus) inducen la degradación de RIG-I, IRF3 y otros mediadores de la vía mediante la formación de un complejo de degradación en la mitocondria (revisado en (Komuro, Bamming *et al.* 2008)).

Otra estrategia, la interacción inhibitoria, es la empleada por el virus Borna (BDV, Borna disease virus), que antagoniza la señalización de IRF3 mediante la proteína P protein que se une a TBK1 e inhibe su actividad quinasa (Reuter, Ackermann *et al.* 2010). La proteína NS1 del virus de la gripe (IAV, Influenza A Virus) también usa entre sus estrategias de bloqueo de la respuesta antiviral, su interacción directa inhibitoria con el complejo RIG-I-MAVS (Pichlmair, Schulz *et al.* 2006). Las proteínas NS1 de IAV y la proteína VP35 del virus del Ebola (EBOV, Ebola Virus) también inhiben específicamente la actividad ATPasa de RIG-I, mediante el secuestro del dsRNA evitando su reconocimiento por RIG-I (Cárdenas, Loo *et al.* 2006).

Por otro lado, la infección por algunos virus como MeV (Xia, Gonzalez *et al.* 2014) y el virus del Dengue (DENV) (Chatel-Chaix, Cortese *et al.* 2016) alteran la abundancia y función mitocondrial, resultando en una reducción en la abundancia de MAVS y la reducción de la señalización de RLRs. Otros virus enmascaran sus PAMPs como los 5'-ppp en el caso del virus Hanta (HTNV, Hantaan virus), el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (CCHFV, Crimean-Congo hemorrhagic fever) y el virus Borna (BDV, Borna Disease Virus), o inducen la actividad de factores celulares de terminación de la respuesta antiviral como la desubiquitinasa de RIG-I CYLD (Ubiquitin carboxyl-terminal

hydrolase CYLD) (revisado en (Komuro, Bamming *et al.* 2008)) (Sección 4.2.4).

4.3 La proteína receptor sigma-1 (SIGMAR1)

La proteína receptor sigma-1 (SIGMAR1) es una proteína del ER cuyas funciones poco conocidas han sido relacionadas con la supervivencia a estrés (revisado en (Su, Su *et al.* 2016)). La pérdida de sus funciones se asocia con varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiloide y la neuropatía motora hereditaria (revisado en (Nguyen, Lucke-Wold *et al.* 2015)), mientras su sobre-expresión es patente en algunos de los principales tipos de cáncer como cáncer de mama y colon (revisado en (Crottes, Guizouarn *et al.* 2013))(Wang, Rouzier *et al.* 2004, Sun, Kawahara *et al.* 2014). Las funciones fisiológicas y los mecanismos precisos de los fenotipos antes mencionados permanecen por elucidar. A pesar de esto, debido a sus implicaciones en estas importantes enfermedades humanas, SIGMAR1 es intensamente estudiada y empleada como diana terapéutica. Recientemente en nuestro grupo se ha encontrado que SIGMAR1 funciona como un factor proviral para el establecimiento de la infección por HCV (Friesland, Mingorance *et al.* 2013).

4.3.1 Descubrimiento y clasificación

La proteína SIGMAR1 fue identificada por primera vez por Su y colaboradores en 1982 (Su 1982) e inicialmente clasificada como un receptor de opioides, atendiendo a la propuesta hecha por Martin y colaboradores en 1976 para la clasificación de una nueva familia de receptores de opioides que debían mediar los efectos farmacológicos del análogo estructural de morfina N-alilnormetazocina (SKF-10047) y otros benzomorfanos. Más tarde, sin embargo, se verificó que la acción de los ligandos sobre el nuevo receptor no era bloqueada por los antagonistas clásicos de opioides naloxona y naltrexona, y fue reconocido como un receptor independiente no-opioide (revisado en (Hayashi y Su 2005)), caracterizado por su afinidad por los esteroisómeros (+) de varios benzomorfanos como (+)-pentazocina y (+)-ciclazocina, y distintos fármacos psicoactivos estructural y farmacológicamente diversos, incluyendo haloperidol y cocaína, así como esteroides neuroactivos como la progesterona (revisado en (Maurice y Su 2009)).

El gen *SIGMAR1* fue clonado por primera vez en 1996 (Hanner, Moe-

bius *et al.* 1996) y muestra una alta conservación evolutiva entre especies de mamíferos como cobaya (Hanner, Moebius *et al.* 1996), ratón (Seth, Leibach *et al.* 1997), rata (Seth, Fei *et al.* 1998)(Mei y Pasternak 2001) y humano (Kekuda, Prasad *et al.* 1996).

El gen humano *SIGMA1R* tiene una longitud de 7 kbp, consiste en cuatro exones y cuatro intrones (Prasad, Li *et al.* 1998) y codifica una proteína de 223 aminoácidos que no presenta homología con ninguna otra proteína de mamíferos. Su ancestro más cercano conocido es la proteína ERG2 de levadura, una C8-C7 esterol isomerasa que participa en la vía de biosíntesis del ergosterol (Rahier, Pierre *et al.* 2008), con la que presenta un 30,3 % de identidad y un 66,4 % de similitud de secuencia (Hanner, Moebius *et al.* 1996). Sin embargo, SIGMAR1 carece de actividad enzimática (Moebius, Reiter *et al.* 1997).

La proteína SIGMAR1 presenta un patrón de expresión amplio entre tejidos con los mayores niveles en hígado, colon, próstata, placenta, intestino delgado, corazón y páncreas (Kekuda, Prasad *et al.* 1996). Además, se ha descrito que la expresión de SIGMAR1 puede ser inducida como parte de la rama PERK/ATF4 de la respuesta UPR (Mitsuda, Omi *et al.* 2011).

4.3.2 Estructura, localización, topología y propiedades

SIGMAR1 es una proteína integral de membrana de 223 aminoácidos, y localizada predominantemente en las MAM y en gotas lipídicas (Hayashi y Su 2003, Hayashi y Su 2007). La estructura de SIGMAR1 presenta tres regiones cortas hidrofóbicas, separadas por dos largas regiones hidrofílicas y flanqueadas por extremos hidrofílicos cortos de 8 (N-terminal) y 30 aminoácidos (C-terminal) (**Figura 4.5 A**). La predicción de la estructura y topología de SIGMAR1 ha sido controvertida y se han propuesto modelos de topología con uno o dos dominios transmembrana y un dominio perimembrana (revisado en (Ruoho, Chu *et al.* 2012)). La primera estructura cristalográfica de SIGMAR1, obtenida recientemente, presenta una topología de simple paso (**Figura 4.5 C**) (Schmidt, Zheng *et al.* 2016). La orientación topológica aún no está establecida. Aunque el modelo más aceptado es el de la topología de simple paso tipo I (Schmidt, Zheng *et al.* 2016), existen estudios que indican una topología de doble paso, o simple paso tipo II (Aydar, Palmer *et al.* 2002).

En las regiones adyacentes al dominio segundo hidrofóbico presenta dos motivos de oligomerización GXXXG en las posiciones 87-91 y 108-192,

(Gromek, Suchy *et al.* 2014) (**Figura 4.5 A**). El perfil de hidropatía de SIGMAR1 define tres dominios hidrofóbicos que comprenden las regiones 11-29 (I), 91-109 (II) y 176-194 (III) en la secuencia de aminoácidos (Brune, Pricl *et al.* 2013) (**Figura 4.5 A**). Inicialmente se consideró que el dominio I y uno de los otros dos podrían constituir dominios transmembrana (revisado en (Ruoho, Chu *et al.* 2012)). Los dominios II y III, con un alto grado de similitud de secuencia (alrededor de un 75 %) con el bolsillo hidrofóbico y sitio de unión a colesterol de la C8-C7-esterol isomerasa de levadura, fueron considerados dominios potenciales de unión a esteroides, SBDL (del inglés *steroid binding domain like*) I y II. Estos dominios SBDL, incluyen los aminoácidos G91 a T109 (SBDL I) y G176 a Q194 (SBDL II), respectivamente, y participan en el reconocimiento de ligandos prototípicos (Fontanilla, Hajipour *et al.* 2008)(revisado en (Ruoho, Chu *et al.* 2012)).

Asimismo, SIGMAR1 presenta un motivo de doble arginina en su extremo N-terminal (residuos 7 y 8) que funciona como señal de retención en el ER en proteínas transmembrana tipo II, para el reciclaje por vesículas COPI desde compartimentos post-ER (Schutze, Peterson *et al.* 1994). En el caso de SIGMAR1, aunque no se conoce el mecanismo, este motivo ha sido considerado una señal de retención en ER o asociación a las LD asociadas a ER (Hanner, Moebius *et al.* 1996, Seth, Leibach *et al.* 1997, Hayashi y Su 2003). Este hecho es consistente con el papel de las vesículas COPI en la biogénesis de las LDs (Soni, Mardones *et al.* 2009). Sin embargo, la señal de doble arginina de SIGMAR1, de acuerdo al modelo de topología tipo I, se expone hacia el lumen de ER, por lo que no es esperable que funcione como una señal de retención di-básica canónica, dependiente de la unión a subunidades del complejo COPI (Schutze, Peterson *et al.* 1994). Alternativamente, esta señal podría mediar la asociación con lípidos aniónicos (Johnson, Erickson *et al.* 2012).

La presencia de los SBDLs sugirió desde muy pronto la capacidad de SIGMAR1 de unirse con gran afinidad a lípidos de superficie y/o lípidos del núcleo de LDs mediante su dominio hidrofóbico central (revisado en (Hayashi y Su 2005)). Más tarde se ha verificado la capacidad de SIGMAR1 de unir directamente colesterol (Palmer, Mahen *et al.* 2007) y asociarse a galactosilceramida (Hayashi y Su 2004) y ácido mirístico (Ciesielski, Su *et al.* 2016). Además, se ha definido que SIGMAR1 se localiza en microdominios resistentes a detergentes o balsas lipídicas (revisado en (Hayashi y Su 2005)). SIGMAR1 reside predominantemente en las MAMs (Hayashi y Su 2003) (**Figura 4.5 A**), estructuras especializadas en el transporte de lípidos y comunicación

entre ER y mitocondria, y en las gotas de lípido (LD) luminales del ER (Rusiñol, Cui *et al.* 1994) (Hayashi y Su 2003), sitios de formación de las LD citosólicas (Murphy y Vance 1999) (Tauchi-Sato, Ozeki *et al.* 2002). Dada la función estructural del colesterol en los contactos ER-mitocondria (Fujimoto, Hayashi *et al.* 2012) y las LDs (revisado en (Kalantari, Bergeron *et al.* 2010)), la capacidad de unir colesterol podría determinar la localización especializada de SIGMAR1 en estas estructuras (Hayashi y Su 2003).

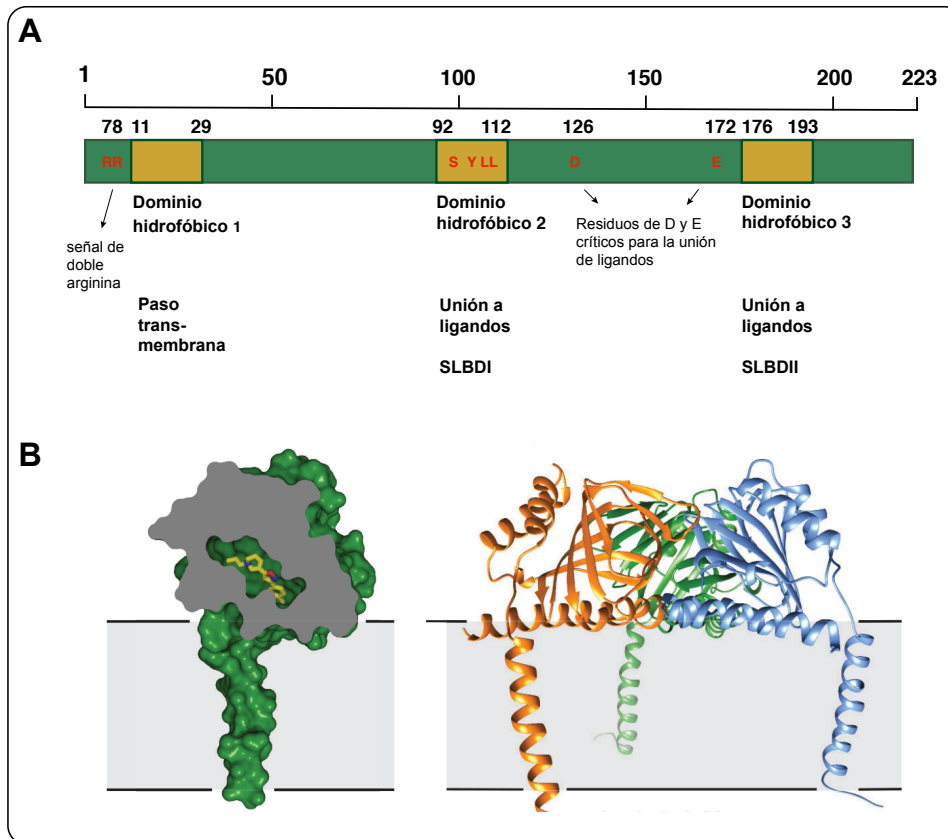


Figura 4.5 Estructura y topología de SIGMAR1 en las membranas del ER. A) Esquema la estructura secundaria de SIGMAR1 **B)** Reconstrucción tridimensional de la estructura cristalográfica de un monómero y un trímero de SIGMAR1 (Figura tomada de (Schmidt, Zheng *et al.* 2016)).

4.3.3 Farmacología, ligandos agonistas y antagonistas

SIGMAR1 tiene una capacidad promiscua para unir una gran variedad de compuestos químicos, incluyendo benzomorfanos dextrorrotatorios como (+)-pentazocina y SKF-10047, antidepresivos tricíclicos como imipramina y monocíclicos como los inhibidores de la monoamino oxidasa como la fluvox-

amina, antitusivos cíclicos como el dextrometorfano y drogas de abuso de la familia de las anfetaminas como cocaína y metanfetamina (agonistas), neurolépticos como el haloperidol, naftilpirazol y rimcazol (antagonistas) (revisado en (Cobos, Entrena *et al.* 2008)), que comparten la característica común de tener una estructura cíclica con un nitrógeno básico (revisado en (Brune, Pricl *et al.* 2013) y (Chu y Ruoho 2016)). Se considera que sus ligandos endógenos podrían ser los neuroesteroides como progesterona y pregnenolona o la N,N-dimetiltriptamina (revisado en (Brune, Pricl *et al.* 2013)).

Estudios con fotosondas y radioligandos en combinación con mutagénesis han determinado que la región de unión a ligandos está formada principalmente por la juxtaposición de los SBDLI y II (**Figura 4.5 B**), en acuerdo con el modelo propuesto por Fontanilla en 2008 (Fontanilla, Hajipour *et al.* 2008). Esta región es de considerable similitud de secuencia con el sitio de unión a ligandos de la de la C7-C8 esterol isomerasa ERG2 (Hanner, Moebius *et al.* 1996), lo cual es consistente con el perfil común de unión a ligandos con esta proteína (Laggner, Schieferer *et al.* 2005), e indican que probablemente las regiones SBDLs de SIGMAR1 también interactúan con N-alquilaminas como esfingolípidos endógenos y con derivados sintéticos de N-alquilaminas y N-araquilaminas. Un residuo crítico en el dominio de unión a ligandos de SIGMAR1 es el ácido aspártico D188 en el SBDLII, responsable de interactuar con los nitrógenos básicos de la mayoría de los ligandos (**Figura 4.5 C**) (revisado en (Ruoho, Chu *et al.* 2012)).

No se conoce la base molecular de la modulación por ligandos de las funciones celulares de SIGMAR1. La clasificación de agonistas y antagonistas de SIGMAR1 obedece fundamentalmente a estudios fisiológicos en animales, siendo los definidos como agonistas los ligandos que inducen la hiperlocomoción u otra respuesta fisiológica y como antagonistas los ligandos que bloquean esas respuestas. A nivel molecular se ha definido que los agonistas de SIGMAR1 provocan su disociación de sus parejas de interacción BiP/ GRP78 (HSPA5, 78 kDa glucose-regulated protein) (Ortega-Roldan, Ossa *et al.* 2013) y ANK2 (Ankyrin-2) (Hayashi y Su 2001), mientras los antagonistas bloquean la disociación inducida por los agonistas. Así, se considera que los agonistas activan mientras los antagonistas bloquean las funciones de SIGMAR1. Sin embargo, la relación entre la unión al receptor y la respuesta biológica permanece por aclarar, aunque en algunos casos se ha propuesto una acción indirecta mediante la modulación de la acción de sus parejas como en el caso de la regulación de IP3R3 (Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3) por ANK2

(revisado en (Su y Hayashi 2003)). Asimismo se ha propuesto que la unión de ligandos puede inducir la relocalización subcelular de SIGMAR1 (Hayashi y Su 2003)). Un estudio reciente mostró que la unión de ligandos a SIGMAR1 cambia su estado de oligomerización, de manera que los antagonistas estabilizan mientras los agonistas disocian los oligómeros de gran tamaño molecular (Mishra, Mavlyutov *et al.* 2015).-

4.3.4 Funciones fisiológicas y mecanismos moleculares propuestos

4.3.4.1 Estudios fisiológicos

Las funciones fisiológicas de SIGMAR1 no se han definido con precisión. Sin embargo, éstas parecen estar más bien relacionadas a respuestas adaptativas a condiciones estresantes, y no esenciales en el desarrollo (Langa, Codony *et al.* 2003).

Varios estudios fisiológicos sobre la administración de ligandos a ratones han relacionado a SIGMAR1 con el desarrollo y función neuronal y la neuroprotección (Zhang, Shi *et al.* 2012, Ono; Tanaka *et al.* 2014; Peviani, Salvaneschi *et al.* 2014) con el transporte mitocondrial axonal y con el correcto desarrollo de axones y dendritas (revisado en (Ruscher y Wieloch 2015)). Asimismo, se ha propuesto un papel en el control de la neuroinflamación (Dong, Ma *et al.* 2016), la neuroprotección frente a la toxicidad inducida por proteína amiloide APP (Amyloid beta A4 protein) (Marrazzo, Caraci *et al.* 2005) y la protección frente a la degeneración retinal (Wang, Saul *et al.* 2016).

A nivel celular, la pérdida de función de SIGMAR1 se ha asociado con alteraciones en la estructura del ER y aparato de Golgi, defectos del tráfico endosomal, la vía autofagolisosomal (Vollrath, Sechi *et al.* 2014, MacVicar, Mannack *et al.* 2015; Cao, Walker *et al.* 2016) y la actividad del proteosoma (Prause, Goswami *et al.* 2013), con daño mitocondrial, así como con un incremento de la muerte celular en condiciones de estrés (Wang y Duncan 2006, Mavlyutov, Nickells *et al.* 2011, Ha, Saul *et al.* 2012, Omi, Tanimukai *et al.* 2014, Wang, Shanmugam *et al.* 2015, Wong, Hristova *et al.* 2016).

4.3.4.2 Estudios moleculares

La función de SIGMAR1 se ha asociado molecularmente a la modulación próxima o distal de la actividad de varias proteínas, de manera predominante receptores acoplados a proteína G (GPCR, del inglés *G-protein coupled receptor*) y canales iónicos (revisado en (Su, Su *et al.* 2016)). Asimismo se ha

asociado a la estabilización y función del sensor de estrés de ER IRE1 (Mori, Hayashi *et al.* 2013), las quinasas p38 MAPK (MAPK14, Mitogen-activated protein kinase 14) (Moon, Roh *et al.* 2014) y ERK1/2 (MAPK1/3) (Mueller, Park *et al.* 2014), entre otros.

En el único perfil de expresión génica publicado hasta el momento de células deficientes en SIGMAR1 (neuronas de rata) se observó una regulación diferencial de las categorías de citoesqueleto de actina, metabolismo de lípidos, proteínas del ER, estrés oxidativo, sinapsis y respuesta inflamatoria (Tsai y Rothman 2012).

Estudios moleculares le han atribuído un papel en la reconstitución de balsas lipídicas (revisado en (Hayashi y Su 2003) y (Takebayashi, Hayashi *et al.* 2004)). Por otra parte, en varios de estos estudios se ha propuesto una función de SIGMAR1 en la regulación post-traducciona l de proteínas, incluyendo la regulación de la dinámica de autofosforilación y estabilidad de IRE1 (Mori, Hayashi *et al.* 2013), la regulación del transporte del factor de crecimiento BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) (Fujimoto, Hayashi *et al.* 2012) y la regulación de la función canales de iónicos como KCNH2 (Potassium voltage-gated channel subfamily H member 2) (Crottès, Martial *et al.* 2011) y KCNA3 (Potassium voltage-gated channel subfamily A member 3) (Kinoshita, Matsuoka *et al.* 2012) y ASIC1 (Acid-sensing ion channel 1) (Mari, Katnik *et al.* 2015).

Recientemente se ha propuesto que SIGMAR1 podría unir ácido mirístico y regular post-traducciona lmente la función de proteínas mediante su modificación por miristoilación (Ciesielski, Su *et al.* 2016).

4.3.5 Asociación de SIGMAR1 con enfermedades neurodegenerativas

La pérdida de función de SIGMAR1 se asocia con el desarrollo o agravamiento de varias enfermedades neurodegenerativas que conllevan la acumulación intracelular de agregados de proteínas incluyendo esclerosis lateral amiloide (ALS, del inglés *amyloid lateral sclerosis*) (Al-Saif, Al-Mohanna *et al.* 2011; Huang, Zheng *et al.* 2011; Belzil, Daoud *et al.* 2013)(revisado en (Mavlyutov, Guo *et al.* 2015))(Luty, Kwok *et al.* 2010), la enfermedad de Alzheimer (Uchida, Ujike *et al.* 2005; Mishina, Ohyama *et al.* 2008; Fehér, Juhász *et al.* 2012), la enfermedad de Parkinson (Mishina, Ishiwata *et al.* 2005) y la enfermedad de Huntington (Miki, Tanji *et al.* 2015). Además, se ha relacionado con la adicción (Cottone, Wang *et al.* 2012; Blasio, Valenza *et al.* 2015; Valenza, DiLeo *et al.* 2016), el dolor (revisado en (Davis 2015)), la depresión (Chevallier, Keller

et al. 2011) y la muerte neuronal (Wang y Duncan 2006, Mavlyutov, Nickells *et al.* 2011). En acuerdo con esto, se considera que la acción de ciertas drogas anti-depresivas que han resultado funcionar como ligandos de SIGMAR1, incluyendo inhibidores de la recaptación de serotonina, podrían mediar parte de sus efectos mediante su unión a SIGMAR1 (Frecka, Szabo *et al.* 2013; Hashimoto, 2009; Hashimoto 2015).

Entre las funciones moleculares de SIGMAR1 que se han propuesto como posibles determinantes de los fenotipos fisiológicos relacionados con la funciones neuronales se incluyen la modulación de los niveles y/o el tráfico de ciertas proteínas importantes para la función neuronal, como IP3R3, BDNF y NMDAR, (Fujimoto, Hayashi *et al.* 2012, Pabba, Wong *et al.* 2014), la liberación de neurotransmisores como el Glutamato (Pabba, Wong *et al.* 2014; Vidal-Torres; Fernández-Pastor *et al.* 2014), la resolución de estrés de ER (Ha, Dun *et al.* 2011) y la regulación de mecanismos inflamatorios (revisado en (Gris, Cobos *et al.* 2016))(Shanmugam, Wang *et al.* 2015).

El papel neuroprotectivo de SIGMAR1 junto a su capacidad de ser modulada por ligandos tiene un creciente interés en clínica, como diana en terapia del dolor (Gris, Portillo-Salido *et al.* 2016) en enfermedades nerológicas (revisado en (Francardo, Bez *et al.* 2014, Tsai, Pokrass *et al.* 2014, Hayashi 2015)).

4.3.6 Asociación de SIGMAR1 con el cáncer

Los niveles de expresión aberrantes de SIGMAR1 se relacionan con algunos tipos de cáncer como cáncer de mama (B. Wang *et al.*, 2004) y cáncer colorectal (Skrzycki y Czczot 2013). Se presume que el papel pro-tumoral de SIGMAR1 está relacionado con sus funciones antiapoptóticas (Crottès, Guizouarn *et al.* 2013, Sun, Kawahara *et al.* 2014, Xu, Yi *et al.* 2014). Además, se ha sugerido que su interacción con integrina ITGB1 (Integrin beta-1) y la mediación de la adhesión celular pudiera tener una implicación en el fenotipo invasivo de células tumorales (Crottès, Rapetti-Mauss *et al.* 2016)(revisado en (Su, Su *et al.* 2016)). Por otra parte, un posible papel proinflamatorio de SIGMAR1 se ha propuesto como base de los efectos pro-tumorales de sus ligandos agonistas (Zhu, Sharma *et al.* 2003, Gardner, Zhu *et al.* 2004).

Así, SIGMAR1 empieza a considerarse una diana prometedora en terapia y diagnóstico de cáncer. Los ligandos de SIGMAR1 inducen selectivamente muerte celular en tejidos tumorales, aparentemente mediante la acción me-

diada por SIGMAR1 de la interleuquina IL24 (Interleukin-24) y la activación de estrés de ER e inducción exacerbada de mROS en las células tumorales donde SIGMAR1 está sobre-expresado (Spruce, Campbell *et al.* 2004, Mégalizzi, De-caestecker *et al.* 2009, Do, Herrera *et al.* 2013, van Waarde, Rybczynska *et al.* 2015).

4.3.7 Papel de SIGMAR1 en la infección por HCV

Previamente en nuestro grupo se ha revelado el papel proviral de SIGMAR1 en el establecimiento de la infección por HCV en cultivo celular (Friesland, Mingorance *et al.* 2013). Experimentos de silenciamiento mediado por interferencia de RNA (RNAi) señalan que SIGMAR1 es un factor limitante al inicio de la infección, que regula un paso conducente a la replicación viral posterior a la entrada y distinto de la traducción primaria, o al menos independiente de la capacidad de traducción mediada por su IRES. Sin embargo, la función de SIGMAR1 parece limitarse al establecimiento de la infección *de novo*, ya que su deficiencia no afecta la replicación viral en células persistentemente infectadas o en células que portan un replicón constitutivo (Friesland, Mingorance *et al.* 2013). El evento y el mecanismo molecular precisos implicados en la participación de SIGMAR1 en el ciclo infectivo de HCV permanece por dilucidar y se plantearon como objetivo inicial de este trabajo.

Una observación interesante del trabajo de Friesland *et al.* en 2013 fue que el clon celular hiperpermissivo Huh-7.5.1 muestra una dependencia menor y más transitoria de SIGMAR1 para el establecimiento de la infección por HCV (Friesland, Mingorance *et al.* 2013), lo cual, dadas las diferencias en la respuesta mediada por el PRR RIG-I entre estas células (Blight, McKeating *et al.* 2002), sugiere una posible implicación de SIGMAR1 en la regulación de la respuesta innata antiviral. Esta hipótesis también se ha abordado experimentalmente en la presente tesis doctoral.

5. Hipótesis y objetivos

5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

1. La deficiencia de SIGMAR1 potencia la magnitud de la respuesta antiviral de las células Huh-7 frente al virus de la hepatitis C, lo cual retrasa la replicación viral a tiempos tempranos de la infección.
2. La deficiencia de SIGMAR1 interfiere con la formación de los complejos de replicación de HCV en un evento posterior a la traducción de genomas entrantes.

Objetivos:

1. Conocer los mecanismos que subyacen a la función proviral de SIGMAR1 en el establecimiento de la infección por HCV
 - 1.1 Determinar si SIGMAR1 regula la respuesta innata antiviral frente a virus de RNA, y si la posible regulación por SIGMAR1 de la respuesta innata antiviral mediada por RLRs determina el papel aparentemente proviral de SIGMAR1 en la infección por HCV
 - 1.2 Determinar si SIGMAR1 regula el destino de las proteínas virales de HCV entre la traducción primaria y el establecimiento de la replicación
2. Identificar procesos celulares regulados por SIGMAR1 en células humanas
 - 2.1 Evaluar la expresión génica y proteómica diferencial de células deficientes en SIGMAR1
 - 2.2. Evaluar la composición proteómica de complejos que contienen SIGMAR1

6. Materiales y métodos

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo celular

- Huh-7: Línea celular derivada de células de hepatoma humano (Nakabayashi, Taketa *et al.* 1982), cedida gentilmente por el Dr. Francis V. Chisari (TRSI, California, EEUU); línea de referencia para el estudio de la infección por HCV en cultivo celular.

- Huh-7.5.1 Clon 2: Clon hiperpermissivo a la replicación de HCV (Pedersen, Cheng *et al.* 2007), derivado del subclon Huh 7.5.1 (Zhong, Gastaminza *et al.* 2005).

- HEK293T: Línea celular derivada de células de riñón embrionario humano (ATCC CRL-3216) (DuBridge, Tang *et al.* 1987), cedida gentilmente por el Dr. Juan Ortín (CNB-CSIC, Madrid, España) (ATCC).

-A549: línea celular derivada de células de carcinoma de pulmón humano (Giard, Aaronson *et al.* 1973) (ATCC-CCL185)

Todas las líneas celulares se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (del inglés *Dulbecco's modified Eagle's medium*) (Gibco, 31600-091) suplementado con 10 μ M HEPES, 1% v/v de aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich, M7145), 100 UI/ml penicilina/estreptomicina (Gibco, ThermoFisher Scientific, 15140122) y 10 % v/v de suero fetal bovino (Cultek, 0677B) previamente inactivado por calor (56°C 30 min), en adelante referido como DMEM completo. Las condiciones de cultivo celular fueron en todos los casos 37 °C, 5 % CO₂ y 90 % de humedad. Para la selección y mantenimiento de las líneas transducidas con los vectores lentivirales para silenciamiento (Sección 6.8) o expresión (Sección 6.9) que contienen gen *pac* de resistencia a puomicina, el medio de cultivo se suplementó además con de dihidrocloruro de puomicina (Sigma-Aldrich, P8833), a 5 μ g/ml o 1 μ g/ml, respectivamente.

6.2 Virus

6.2.1 Virus Sendai (SeV) del aislado Cantell producido en fluido alantoideo de huevos de pollo embrionados mediante pases sucesivos a alta multiplicidad de infección MOI (del inglés *multiplicity of infection*) con una alta tasa de genomas defectivos de la forma ssRNA 5' trifosforilados producidos durante la replicación, por lo que funcionan como potentes activadores de la vía de los

RLRs y han sido extensamente empleadas para estudiar esta vía de señalización antiviral (Kato, Takeuchi *et al.* 2006)(Strahle, Garcin *et al.* 2006) Baum y García-Sastre 2011), cedido gentilmente por el Dr. Estanislao Nistal (Universidad San Pablo-CEU de Madrid, España)

6.2.2 Virus de la estomatitis vesicular (VSV) generado en células Vero (ATCC CCL-81) mediante pases a baja MOI, cedido gentilmente por el Dr. Juan Ortín (CNB-CSIC, Madrid, España).

6.2.3 Virus recombinante MVA-HCV (Gómez, Perdiguero *et al.* 2013) que expresa la región poliproteína de HCV de genotipo 1a (excepto región C-terminal de NS5B) bajo el promotor sE/L de MVA, cedido gentilmente por el Dr. Mariano Estéban (CNB-CSIC, Madrid, España).

6.2.4 Vectores lentivirales para silenciamiento o expresión, generadas según se describe en Sección 6.8 y Sección 6.9, respectivamente. Son partículas producidas a partir de vectores para el ensamblaje de lentivirus modificado del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) pseudotipado con la envuelta de VSV y un vector lentiviral de transferencia donde se ha clonado un shRNA o un cDNA determinado, para su integración y expresión en células humanas (Kafri, Blomer *et al.* 1997, Dull, Zufferey *et al.* 1998).

6.2.5 Partículas virales de HCV JFH1 generadas por complementación en *trans* (HCV_{TCP}) en células empaquetadoras (Steinmann, Brohm *et al.* 2008) Son partículas virales auténticas con capacidad de replicarse pero cuyo genoma (SGR-JFH-1-Luc) (Sección 6.3.1) carece de la región estructural y por tanto no pueden ensamblarse y formar nueva progenie infectiva en la célula diana. Contienen en su genoma un gen reportero de luciferasa que permite evaluar la replicación. Se emplean como modelo de las primeras etapas de infección en un ciclo único (Steinmann, Brohm *et al.* 2008).

6.3 Construcciones virales subgenómicas

6.3.1 SGR-JFH-1-Luc: Replicón subgenómico basado en la secuencia consenso de la cepa JFH-1 (genotipo 2a) de HCV (Kato, Sugiyama *et al.* 2003). Consta de dos cistrones: el primero que contiene el IRES de HCV para la traducción del gen reportero de luciferasa de *Photinus pyralis* (Firefly) y el segundo, que contiene el IRES del virus de la encefalomiocarditis (ECMV) para la traducción de las proteínas no-estructurales de HCV NS3-NS5B. Las secuencias 5' y 3'UTR de HCV en los extremos permiten la replicación del minigenoma. Se

emplea como modelo de estudio de la replicación viral de HCV2a y como minigenoma para la producción de HCV_{TCP} (Sección 6.2.5). Fue cedida gentilmente por el Dr. Ralf Bartenschlager (Universidad de Heidelberg, Alemania).

6.3.2 SGR-JFH-1-Luc-dGND: Construcción derivada de SGR-JFH-1-Luc que contiene una mutación puntual (GDD-GND) en el motivo catalítico de la polimerasa NS5B que lo hace defectivo para la replicación. En esta construcción el gen *luc* de *Photinus pyralis* (Firefly) está sustituido por el gen *luc* de *Renilla reniformis* (Renilla).

Ambas construcciones subgenómicas se produjeron mediante la transcripción *in vitro* de sus cDNAs moldes linearizados con el enzima de restricción XbaI, empleando la herramienta comercial Megascript T7 (Ambion, Life technologies AM1334) según las recomendaciones de los fabricantes.

6.4 Plásmidos

-pFK j389-Firefly-Luc_EI_NS3-3' JFH1: Plásmido molde del replicón subgenómico de JFH-1. Contiene la secuencia del subgenoma viral (región replicasa) expresado bajo el control del promotor ECMV y un gen reportero luciferasa de *Photinus pyralis* (Firefly) tras la secuencia IRES de HCV.

-pLKO.1 Vector lentiviral de transferencia para silenciamiento que permite el clonaje de shRNAs bajo el control transcripcional del promotor U6 y contiene el gen *pac* aislado de *Streptomyces sp.*, marcador de resistencia a puromicina bajo el control del promotor CMV. Dichas secuencias están flanqueadas por repeticiones largas terminales (LTRs, del inglés *long terminal repeats*) para su integración por transducción lentiviral.

-pIKO.1-shRNATT, pIKO.1-shRNAscrambled y pIKO.1-shRNAFluc: Vectores lentivirales de transferencia para silenciamiento que contienen shRNA sin diana en transcriptoma de mamíferos y el gen *pac* aislado de *Streptomyces sp.*, marcador de resistencia a puromicina. (shRNA mission Sigma-Aldrich, Tabla 6.I), referidos en el texto como shCTRL1, shCTRL2 y shCTRL3, respectivamente.

-pIKO.1-shRNA595, pIKO.1-shRNA667, pIKO.1-shRNA1160 : Vectores lentivirales de transferencia para silenciamiento contienen el cDNA codificante de un shRNA dirigido al mRNA de *SIGMAR1* y el gen *pac* aislado de *Streptomyces sp.*, marcador de resistencia a puromicina (shRNA mission Sigma-Aldrich, Tabla 6.I). En adelante referidos como shS1R1, shS1R2 y shS1R3, respectivamente.

-pDL.BVDV/Npro.puro: Vector lentiviral de transferencia para la expresión de la proteasa viral Npro de BVDV (Everett, Young *et al.* 2008), cedido gentilmente por el Dr. Hugh Reyburn (CNB-CSIC, España).

-pRSV-Rev: Plásmido de empaquetamiento lentiviral de tercera generación, que codifica el gen *rev* de HIV-1, cedido gentilmente por el Dr. Didier Trono (EPFL, Laussane, EEUU)(Addgene, 12253).

-pMDLg/pRRE: Plásmido de empaquetamiento lentiviral de tercera generación, que codifica los *gag* y *pol* de HIV-1, cedido gentilmente por Dr. Didier Trono (EPFL, Laussane)(Addgene, 12251)

-pSPAX2: Plásmido de empaquetamiento lentiviral de segunda generación, que codifica los genes *gag*, *pol*, *rev* y *tat* de HIV-1; puede utilizarse con vectores de transferencia de segunda o tercera generación (dependientes o independientes de Tat), cedido gentilmente por Dr. Didier Trono (EPFL, Laussane, EEUU) (Addgene, 12260).

-pMD2.G: Plásmido de envoltura lentiviral, que expresa la proteína G de VSV empleado para la generación de partículas lentivirales, cedido gentilmente por el Dr. Didier Trono (EPFL, Laussane)(Addgene, 12259).

-pGEM-T: Plásmido para clonaje de productos de PCR (Promega, A3600).

-pcDNA3: Plásmido para clonaje y expresión en células de mamíferos bajo promotor de CMV, que contiene un marcador de resistencia a neomicina (Thermo Fisher Scientific)

-pMCS-RIG-I-CARD: Plásmido para expresión en células de mamíferos de los dominios CARD de RIG-I bajo el promotor de CMV que funciona como un análogo constitutivamente activo de RIG-I en la inducción de la vía de los RLRs (Gack, Kirchhofer *et al.* 2008), cedido gentilmente por el Dr. Estanislao Nistal (Universidad San Pablo-CEU de Madrid, España).

-pEF-BOS-MAVS: Plásmido para expresión en células de mamíferos de la proteína humana MAVS, cedido gentilmente por el Dr. Fujita (Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japón)(Addgene, 27224)

-pIRF3-5D: Plásmido para expresión en células de mamíferos de la variante fosfomimética de proteína humana IRF3, con residuos de aspártico en los cinco sitios de fosforilación de la forma activa del factor de transcripción (Irie, Kiy-

tani *et al.* 2012), cedido gentilmente por la Dr. Dolores Rodríguez (CNB-CSIC, Madrid, España).

-pCAGGS-T7: Plásmido para expresión en células de mamíferos de la RNA polimerasa del bacteriófago T7, cedido gentilmente por el Dr. Juan Carlos de la Torre (The Scripps Research Institute, California, EE.UU).

-pTM-NS3-4A: Plásmido para expresión de la región NS3-NS4A de la poliproteína viral de HCV bajo el control del promotor de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 (Romero-Brey, Merz *et al.* 2012), cedido gentilmente por el Dr. Volker Lohmann (Universidad de Heidelberg, Alemania).

-pTM-NS3-5B: Plásmido de expresión de la región NS3-NS5B de la poliproteína viral de HCV bajo el control del promotor de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 (Romero-Brey, Merz *et al.* 2012), cedido gentilmente por el Dr. Volker Lohmann (Universidad de Heidelberg, Alemania).

-pRenilla-Luc-null: Plásmido de expresión de la luciferasa de *Renilla reniformis* (Renilla) bajo un promotor mínimo sin otros elementos reguladores, empleado como control de eficiencia de transfección en co-transfecciones (Clontech) cedido gentilmente por el Dr. Juan Ortín (CNB-CSIC, Madrid, España).

-pIFNb(-116/+72)Lucler: Plásmido reportero que expresa la luciferasa de *Photinus pyralis* (Firefly) bajo el control del promotor de *IFNB1* (King y Goodbourn 1992), cedido gentilmente por el Dr. Steve Goodburn (Universidad de Londres, Reino Unido).

-pISRE-Luc: Plásmido reportero que expresa la luciferasa de *Photinus pyralis* (Firefly) bajo control por el elemento ISRE (Qiagen), cedido gentilmente por el Dr. Juan Ortín (CNB-CSIC, Madrid, España).

-pLV-TAP: Vector de expresión lentiviral del péptido TAP (del inglés *tandem affinity purification*), que permite su purificación en dos pasos consecutivos de cromatografía de afinidad. Contiene la secuencia codificante de una proteína recombinante TAP que incluye un dominio de unión a streptavidina (SBD), una secuencia diana de la proteasa TEV del virus del grabado del tabaco (TEV) y dos dominios proteína G en tándem, con afinidad por inmunoglobulina G (IgG) procedentes del vector comercial pCeMM-NTAP(GS) (Euroscarf, P30535), cedido gentilmente por The Austrian Academy of Sciences. Se emplea como control en la purificación por cromatografía de afinidad de proteínas de fusión a TAP; cedido gentilmente por el Dr. Francis Chisari (The Scripps Research

Institute, California, EE.UU).

-pLV-S1R_TAP: Vector de expresión lentiviral que contiene un cassette de expresión de la proteína SIGMAR1 fusionada con la secuencia TAP que permite su purificación en dos pasos consecutivos de cromatografía de afinidad; cedido gentilmente por el Dr. Francis Chisari (The Scripps Research Institute, California, EE.UU)

-pLV-apoE_TAP: Vector de expresión lentiviral que contiene un cassette de expresión de la proteína APOE fusionada con la secuencia TAP que permite su purificación en dos pasos consecutivos de cromatografía de afinidad; cedido gentilmente por el Francis Chisari (The Scripps Research Institute, California, EE.UU)

Todos los plásmidos se amplificaron en la cepa competente de *E.coli* DH5a [genotipo supE44 ΔlacU169 (φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thiA1 relA1] mediante transformación por choque térmico, que se cultivaron a 37°C en medio Luria-Bertani LB (LB) en presencia del antibiótico de selección adecuado (100 μg/ml kanamicina para p.Dest-mCherry-EGFP-LC3B y 100 μg/ml ampicilina para el resto), y se purificaron mediante el kit comercial para purificación de plásmidos Pure Yield Maxiprep System (Promega, A2393).

Tabla 6.I

Abb. en el texto	ID /Referencia	Diana	Secuencia
shCTRL1	shRNATT (Friesland, Mingo-rance <i>et al.</i> 2013)	Thermo-toga sp.	AATTCTCCGAACGTGTCAC-GTTTCAAGAGAACGTGACAC-GTTCCGGAGAATT
shCTRL2	<i>Scrambled</i> (Sarbasov, Guertin <i>et al.</i> 2005) (Add-gene, 1864)	-	CCTAAGGTTAAGTCGCCCTC-GCTCGAG <u>CGAGGGCGACTTAACCTTAGG</u>
shCTRL3	Scrambled (Kim, 2012, Add-gene 46896)	luciferasa Firefly	AACGTACGCGGAATACTTC-GACTCGAG <u>TCGAAGTATTCCGCGTACGTT</u>

shS1R1	shRNA Mission Sigma-Aldrich ID:NM_005866.2667s1c1	SIGMAR1	CCCTCTTCTATACTCTTC-GCTCTCGAG <u>AGCGAAGAGTATAGAAGAGGG</u>
shS1R2	shRNA Mission Sigma-Aldrich ID:NM_005866.2657s1c1	SIGMAR1	GACTTCCTCACCCCTCTTC-TATCTCGAGATAGAAGAGGGT-GAGGAAGTC
shS1R3	shRNA Mission Sigma-Aldrich ID:NM_005866.21160s21c1	SIGMAR1	CCTCAACCCAGCAGCAATTT-GCTCGAGCAAATTGCT-GCTGGGTTGAGG

6.5 Anticuerpos

- B-actin (Abcam, ab8226) Anticuerpo monoclonal de ratón frente a actina humana (ACTB, Actin, cytoplasmic 1). Se empleó como control de carga en *Western blot* (**Sección 6.6**) a una dilución de 1:5000.
- GAPDH (Abcam, ab-9485): policlonal conejo frente a la proteína GAPDH humana (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Se empleó como control de carga en *Western blot* a una dilución de 1:1000.
- Sigma Receptor (S-18) (Santa Cruz, sc-22948) Anticuerpo policlonal de cabra frente a la proteína receptor sigma-1 humana (SIGMAR1, S). Se empleó para detectar SIGMAR1 a una dilución de 1:400.
- Mx1/2/3 (H-285) (Santa Cruz, sc-50509). Anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína MX1 (Interferon-induced GTP-binding protein Mx1) humana. Se empleó para detectar Mx1 en *Western blot* a una dilución 1:1000.
- IFIT1 (N-16): (Santa Cruz, sc-82946) Anticuerpo policlonal de cabra frente a ISG56 humana (IFIT1, Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1). Se empleó para detectar ISG56 en *Western blot* a una dilución 1:1000.
- LC3B (D11) XP Rabbit mAb (Cell Signaling, 3868). Anticuerpo monoclonal de conejo frente a LC3B humana (MAP1LC3B, Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B). Se empleó para detectar las formas LC3B I y LC3B II en *Western blot* a una dilución 1:5000.

- SQSTM1 (p62) Antibody (C-term): Anticuerpo policlonal purificado de conejo frente a la proteína humana p62 (SQSTM1, Sequestosome-1). Se empleó para detectar SQSTM1 en *Western blot* a una dilución 1:1000.
- MAVS (E3): (Santa Cruz, sc-166583). Anticuerpo monoclonal de ratón frente a MAVS humana. Se empleó para detectar MAVS en *Western blot* a una dilución 1:1000.
- Anti-Seladin 1 antibody: (Abcam, ab40490). Anticuerpo policlonal de ratón frente a DHCR24 humana. Se empleó para detectar DHCR24 en *Western blot* a una dilución 1:1000.
- NS3 2E3: (Biofront, HCV-2E3). Anticuerpo monoclonal de ratón frente a la proteína NS3 de HCV genotipo 2a. Se empleó para detectar NS3 HCV2a en *Western blot* a una dilución 1:2000, y en inmunofluorescencia (Sección 6.27) a una dilución 1:250.
- NS5A 7B5 (Biofront, HCV-7B5) Anticuerpo monoclonal de ratón frente a la proteína NS5A de HCV genotipo 2a. Se empleó para detectar NS5 HCV2a en *Western blot* a una dilución 1:500, y en inmunofluorescencia a una dilución 1:250.
- NS3 HCV (Abcam, ab21124) Anticuerpo policlonal de cabra frente a la proteína NS3 de HCV genotipo 1a. Se empleó para detectar NS3 HCV1a en *Western blot* a una dilución 1:3000, y en inmunofluorescencia a una dilución 1:500.
- NS5A HCV (H26) (Abcam, ab13833) Anticuerpo monoclonal de ratón frente a la proteína NS5A de HCV genotipo 1a. Se empleó para detectar NS5 HCV1a en *Western blot* a una dilución 1:500, y en inmunofluorescencia a una dilución 1:250.
- Goat Anti-Mouse IgG (H + L)-HRP Conjugate (Biorad, 170-6516). Anticuerpo monoclonal de cabra frente a IgG de ratón conjugado a peroxidasa. Se empleó como anticuerpo secundario en *Western blot* a una dilución 1:20000.
- Anti-Rabbit IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in goat (Sigma, A9169). Anticuerpo monoclonal de cabra frente a IgG de conejo conjugado a peroxidasa. Se empleó como anticuerpo secundario en *Western blot* a una dilución 1:40000.

- Anti-Goat IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in rabbit (Sigma, A5420). Anticuerpo monoclonal de conejo frente a IgG de cabra conjugado a peroxidasa. Se empleó como anticuerpo secundario en *Western blot* a una dilución 1:80000.
- Alexa Fluor Goat a-mouse 546, a-goat 546, a-mouse (Novex, Life Technologies). Se emplearon como anticuerpos secundarios en inmunofluorescencia a una dilución 1:500.

6.6 Electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de acrilamida (SDS-PAGE), tinción con Ag y *Western blot*

La separación de proteínas para su inmunodetección se realizó en mediante electroforesis en geles de acrilamida y condiciones desnaturizantes según método estándar (Laemmli 1970). Las muestras de células se recogieron directamente en tampón de ruptura (25 mM Tris-HCl pH 6,8, 50 mM 1,4-ditriotretitol (DTT), 1 % SDS, 0,05 % azul de bromofenol, 5 % glycerol), se calentaron durante 10 min a 100 °C, se centrifugaron a 7000 g durante 1 min a 4 °C y se cargaron en geles previamente montados usando solución de acrilamida:bisacrilamida (29:1) (BioRad) a porcentaje final atendiendo al peso molecular de las proteínas a detectar. La electroforesis se realizó a una intensidad de corriente de 40 mA.

Posteriormente, el gel de poli(acrilamida) se reveló usando la tinción con nitrato de plata (Switzer, Merrill *et al.* 1979, Jorba, Juárez *et al.* 2008).

Alternativamente, las proteínas se transfirieron del gel a membranas de polivinilideno (PVDF; Immobilon P, Millipore) usando un sistema húmedo (Amersham, TE 22 Mini Tank Transfer Unit) con tampón de transferencia (Tris 5,8 g/L, Glicina 2,9 g/L, SDS 0,33 g/L methanol 20 % (v/v)) y aplicando una corriente de 150 mA con voltaje libre a 4°C durante 16 h. Una vez transferidas las proteínas, la membrana se bloqueó con 3% BSA (o 5 % leche descremada para la detección de SIGMAR1) en PBS 0,25% Tween20 durante 1 h a 25 °C y en agitación. Posteriormente, las membranas se incubaron con las diluciones correspondientes de anticuerpo primario (Sección 6.5) durante 1 h a 25 °C. Después de tres lavados con PBS-0,25% Tween20, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Sección 6.5) durante 1 h a 25 °C. Finalmente las membranas se lavaron tres veces con PBS- 0,25 % Tween20 y se reveló la reacción de quimioluminiscencia con una solución de revelado recién preparada (100 mM Tris pH 8,5, 250 mM luminol, 90 mM ácido

cumárico, 0,01% (v/v) H_2O_2), y se expusieron películas sensibles a quimioluminiscencia que se revelaron en reveladora M35 X-OMAT Processor (Kodak). Las señales se analizaron con el *software* ImageJ 1.45s según lo previamente descrito (Schneider, Rasband y Eliceiri, 2012), determinándose el rango lineal de las señales para así comparar la señal entre las distintas muestras.

6.7 Evaluación de la viabilidad celular mediante ensayo de MTT

Para medir la viabilidad celular se empleó como medida indirecta la actividad reductasa mitocondrial mediante ensayo de reducción de bromuro de metiltiazolildifenil tetrazolio (MTT) (Denizot y Lang, 1986). Las células se sembraron el día anterior a una densidad de 10^4 células/ pocillo en placas M96. Al día siguiente se les retiró el medio, que se sustituyó por 50 μ l de medio fresco conteniendo 0,25 mg/ml de MTT (Sigma-Aldrich, M2128) y se devolvieron al incubador. Tras un tiempo de incubación de aproximadamente 30 min y cuando los cristales azules de formazán eran evidentes al microscopio, el medio se retiró por inversión sobre un papel secante y se añadió solución disolvente (isopropanol, 0,1 % NP40, 1 M HCl) y se agitó en balancín hasta disolución. La absorbancia se midió empleando un colorímetro de placas con un filtro de 570 nm (Appliskan, Thermo Fisher Scientific), empleando como blanco el promedio de los pocillos de células tratadas con SDS y como control positivo el promedio de los pocillos tratados con la condición *mock* o control.

6.8 Generación de partículas lentivirales para silenciamiento génico por RNA interferente (RNAi)

Para la generación de lentivirus para silenciamiento génico se empleó un sistema de empaquetamiento tercera generación que es independiente de Tat y separa en dos plásmidos los componentes de empaquetamiento e integración Gag - Pol y de regulación Rev, incrementando la seguridad biológica del sistema.

Los plásmidos de empaquetamiento, pMDLg/pRRE (10 μ g) y pRS-VPRev (3.6 μ g), el plásmido de envuelta, pMD2.G (3 μ g) y el vector de transferencia, pLKO.1-shRNA (10 μ g) (Sección 6.4), se co-transfectaron en 2.5×10^6 células HEK293T mediante transfección con fosfato cálcico en placas de 10 cm de diámetro. Brevemente, para cada preparación los plásmidos se adicionaron a 500 μ L de una solución de 250 mM $CaCl_2$ que luego se mezcló con igual volumen de solución de HBS 2x (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5mM

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 12 mM D-Glucosa, 50 mM HEPES (pH 7,3), pH 7,05) y se esperó a la formación de agregados de fosfato cálcico conteniendo el DNA (durante 1 min). Esta mezcla se añadió a la monocapa de células HEK293T a 60 % de confluencia. Después de 48 h los sobrenadantes conteniendo los lentivirus se recogieron y filtraron con filtros de 0,45 μM y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Estas preparaciones se evaluaron por su capacidad de conferir a las células diana resistencia al antibiótico de selección puromicina. En cada caso, se determinó el volumen mínimo capaz de conferir resistencia a puromicina al 100 % de las células transducidas, el cual sería empleado subsiguientemente para el silenciamiento génico de poblaciones celulares (Sección 6.12).

6.9 Generación de partículas lentivirales para la expresión de la proteasa viral Npro de BVDV

Para la generación de lentivirus para la expresión estable de la proteína viral Npro del virus de la diarrea viral bovina (BVDV) se empleó el vector lentiviral de segunda generación p Δ l.BVDV/Npro.puro, que codifica el cDNAs para la expresión de Npro y el marcador de resistencia a puromicina *pac* o un lentivirus control pLKO.1 (5 μg), un plásmido de empaquetamiento de segunda generación, pSPAX2 (5 μg) y un plásmido de envoltura, pMD2.G (3 μg) (Sección 6.4), para la generación de preparaciones de lentivirus (Sección 6.9), verificando el menor volumen de éstas capaz de conferir resistencia a puromicina y bloquear la respuesta antiviral mediada por IRF3 de las poblaciones celulares transducidas (Sección 6.18).

6.10 Generación de partículas lentivirales para la expresión de la construcción para purificación en tándem TAP y las proteínas de fusión APOE-TAP y SIGMAR1-TAP

Los vectores pLV-SIGMAR1-TAP, pLV-APOE-TAP y pLV-TAP (Sección 6.4) se emplearon para generar lentivirus para la expresión estable de las proteínas de fusión en células de mamíferos, empleando un sistema de empaquetamiento de segunda generación, de manera similar a lo descrito en Sección 6.9.

6.11 Generación de partículas virales transcomplementadas de HCV- JFH1 (HCV_{TCP})

Las partículas transcomplementadas de hepatitis C (HCV_{TCP}) son partículas virales de HCV encapsidadas en *trans* en células empaquetadoras, que portan un genoma defectivo para la encapsidación y formación de nuevo virión infectivo y contienen un gen reportero de luciferasa. Así, las HCV_{TCP} son un sistema modelo de ciclo único de infección que permite el estudio de estadios tempranos de la infección (entrada viral, traducción y replicación del RNA viral) en laboratorios con nivel de bioseguridad 2.

Para la producción de HCV_{TCP} se emplearon líneas celulares empaquetadoras Huh-7.5.1 clon-2 que expresan las proteínas virales core-E1 y E2-p7-NS2 a partir de dos construcciones lentivirales integradas en su genoma. Estas células fueron electroporadas con 1 µg/ 10⁶ células del RNA transcrito *in vitro* del replicón SGR-JFH1-luc según el método descrito por Steinmann y colaboradores en 2008 (Steinmann, Brohm *et al.* 2008). Los sobrenadantes infecciosos de las células electroporadas se recogieron 24, 48, 72 y 96h tras la electroporación, se filtraron con filtros de 0,45 µm y se almacenaron a -80°C hasta su uso. La evaluación de la infectividad de las HCV_{TCP} se realizó mediante la infección en células Huh-7 como se describe en Sección 6.15.

6.12 Silenciamiento génico en células humanas mediante la transducción con partículas lentivirales para silenciamiento por RNAi

Las células fueron transducidas con los volúmenes previamente establecidos (Sección 6.8) de lentivirus que expresan shRNA diseñados frente al mRNA de SIGMAR1 (shS1R1, shS1R2 o shS1R3) shRNA sin diana en el transcriptoma humano (shCTRL1, shCTRL2 o shCTRL3). A partir de 24 h tras la transducción lentiviral, las células fueron cultivadas en DMEM completo complementado con puromicina (Sección 6.1). Se monitorizó el silenciamiento mediante Western blot (Sección 6.6) y la viabilidad mediante ensayo de MTT (Sección 6.7) y se determinaron los puntos de óptimo silenciamiento y viabilidad celular, que fueron empleados en los subsiguientes experimentos.

6.13 Generación de una línea celular Huh-7 con expresión estable de la proteasa viral BVDB Npro

Las células Huh-7 se transdujeron con los volúmenes previamente de-

terminados de lentivirus para la expresión de la proteasa Npro de BVDV o un lentivirus control, pLKO.1 (Sección 6.9). Pasadas 48 h tras la transducción, las células se mantuvieron en medio de selección DMEM completo complementado con puromicina (Sección 6.1). Tras cinco días de selección, se verificó la incapacidad de la población celular BVDV Npro+ seleccionada de responder a estímulos virales como la transfección con poly(I:C) (Sección 6.17) y la infección con SeV (Sección 6.18), mientras las células portadoras de pLKO.1 seleccionadas mostraban un fenotipo control.

6.14 Generación de líneas celulares Huh-7 con expresión estable de la construcción para purificación TAP, la proteína de fusión APOE-TAP o SIGMAR1-TAP

Las preparaciones de lentivirus LV-TAP, LV-SIGMAR1-TAP y LV-APOE-TAP generadas en la Sección 6.10 se emplearon para transducir células Huh-7. La expresión de SIGMAR1 y APOE en los cultivos se verificó mediante inmunofluorescencia (Secciones 6.27 y 6.28).

6.15 Evaluación de replicación de HCV_{TCP}

Las células Huh-7 o sus derivadas, sembradas a una densidad de 1×10^4 células / pocillo en placas multipocillos M96 el día anterior, se inocularon con un volumen de 100-200 μ L de preparación viral HCV_{TCP} (Sección 6.2.5), añadido sobre su medio de cultivo, y se incubaron a 37°C durante 48 h. Pasado este tiempo, se retiró el sobrenadante y se evaluó la actividad luciferasa de los extractos celulares (Sección 6.26).

6.16 Transfección en líneas celulares humanas mediante lipotransfección

Las células sembradas el día anterior, alcanzado un 80 % se transfectaron con poly(I:C) (Invivogen, cat. ref. tlr-picw) (Sección 6.17) o con plásmidos (Secciones 6.19, 6.20 y 6.22) empleando el transfectante comercial lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, 12566014), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Brevemente, las diluciones del transfectante y las diluciones de poly(I:C) o mezclas de plásmidos se prepararon en medio reducido en suero Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, 31985070) y se adicionó la dilución de transfectante sobre la de plásmidos o poly (I:C), se mezclaron con vórtex y se dejó reposar la mezcla a 25 °C

por 15 min. Pasado este tiempo, las células se transfectaron, adicionándose la mezcla gota a gota sobre el medio de cultivo fresco.

6.17 Activación de la vía de los RLRs por transfección de poly(I:C) en células Huh-7

Las células Huh-7 sembradas en pocillos de M12 a un 80 % de confluencia fueron transfectadas según se describe en **Sección 6.16**, empleando 300 ng de poly:IC (Invivogen, cat. ref. tlr-picw) y 1 μ L de transfectante por pocillo. Pasadas 16 h desde la transfección, las células se recogieron en 1 ml de TRIzol (Ambion, 15596018) para extracción de RNA (Sección 6.24) y cuantificación de genes antivirales mediante RT-PCR (Sección 6.25). La inducción se expresó como *ratio* entre el valor obtenido con poly I:C entre el valor basal (*mock*). Para comparar entre líneas celulares y para promediar experimentos independientes se emplearon dichos valores de inducción.

6.18 Activación de la vía de los RLRs por infección con el virus SeV

Las células se sembraron el día anterior a una densidad de 10^5 células/pocillo para las Huh-7 y las A549 y o 5×10^5 células/pocillo para las HEK293T en placas M12 en DMEM completo. La infección se realizó con una dilución 1:20 de la preparación viral original, previamente establecido experimentalmente (Sección 6.2.1) en 200 μ l de OptiMEM, durante 1h a 37 °C y 5 % CO₂, agitando suavemente la placa cada 15 min. Pasado este tiempo se retiró el inóculo, se añadió DMEM completo y se incubó a 37 °C y 5 % CO₂ durante 16 h (12 h para A549). Tras las 16 h de infección las células se recogieron en 1 ml de TRIzol (Ambion, 15596018) para la extracción de RNA (Sección 6.24) y cuantificación de genes antivirales mediante RT-qPCR (Sección 6.25).

Los valores de inducción se calcularon como el *ratio* entre los valores obtenidos en la condición de estimulación con poly(I:C) y los valores basales (*mock*). La inducción relativa al control se determinó como el *ratio* entre el valor de inducción en cada situación experimental respecto al valor de inducción del control. Para comparar entre líneas celulares y para promediar los resultados de experimentos independientes se emplearon dichos valores de inducción relativa.

6.19 Activación de la vía de los RLRs por transfección de plásmidos de expresión de mediadores constitutivamente activos de la vía

Para evaluar la activación de la vía de las RLRs en células deficientes en SIGMAR1 y sus controles, las células se co-transfectaron (Sección 6.16) con plásmidos de expresión de mediadores constitutivamente activos de la vía de los RLRs (RIG-I-CARD, MAVS, IRF3-5D), un plásmido reportero que expresa la luciferasa de *Photinus pyralis* (Firefly) bajo el control del promotor de *IFNB1*, pIFNb(-116/+72)Lucler, y un plásmido para control de transfección que expresa la luciferasa de *Renilla reniformis* bajo un promotor mínimo, pRenilla-Luc-null, (Sección 6.4). Pasadas 16 h desde la transfección, las células se lisaron en el tampón de lisis adecuado para la medición de la actividad luciferasa, que se realizó mediante ensayo dual de luciferasas como se describe en Sección 6.26. Los niveles de inducción de *IFNB1* se cuantificaron como la medida relativa de la actividad de luciferasa Firefly en la condición estimulada vs control, normalizada de acuerdo a la actividad luciferasa de *Renilla reniformis* (Renilla) en cada muestra. Para promediar los resultados de distintos experimentos, éstos se convirtieron en *ratio* de la tasa de inducción en las distintas líneas celulares respecto a la tasa de inducción en las células control de manera similar a la descrita en Sección 6.18.

6.20 Evaluación de la respuesta a estímulo con IFNA2A exógeno en células Huh-7

Las células Huh-7 sembradas en pocillos de M12 a un 80 % de confluencia fueron transfectadas (Sección 6.16) empleando 300 ng del plásmido pISREluc (Sección 6.4) y 1 µL de transfectante por pocillo. Pasadas 16 h desde la transfección, las células se estimularon con 100 U, 10 U y 1 U de IFNA2A (PBL Assay Science, 11100-1) en DMEM fresco durante 1h y después de 16 h se recogieron en tampón de lisis y se determinó la actividad luciferasa (Sección 6.26). Alternativamente, las células Huh-7 se estimularon con IFNA2A en ausencia de plásmido reportero y a las 16 h tras el estímulo se recogieron en 1 ml de TRIzol (Ambion, 15596018) para extracción de RNA (Sección 6.24) y cuantificación de genes antivirales mediante RT-PCR (Sección 6.25).

La inducción se expresó como *ratio* entre el valor obtenido en células estimuladas frente al valor basal (*mock*). Para comparar entre líneas celulares y para promediar experimentos independientes se emplearon dichos valores de inducción.

6.21 Ensayo de titulación viral por formación de placas de lisis del virus VSV

Las células Huh-7, sembradas el día anterior a una densidad de 3×10^5 células/ pocillo en placas M6, se inocularon durante 1 h a 37°C y atmósfera de 5 % CO_2 y 98 % de humedad con 100 μl diluciones seriadas (en solución de 5 $\mu\text{g/ml}$ albúmina sérica bovina (BSA, *bovine serum albumin*)-PBS) de sobrenadantes infecciosos de células deficientes en SIGMAR1 o células control que habían sido infectadas con con VSV moi 0,001 durante 12 horas. Tras la incubación, se retiró el inóculo y las células se incubaron en medio DMEM semi-sólido (complementado con 0,4 % agar 1 % DEAE-dextrano) en condiciones de 37°C , 5% CO_2 y 98 % humedad durante 72 h. Después de las 72 h de incubación, las monocapas se fijaron con 5 % formaldehído-PBS durante 15 min y se tiñeron con solución 15 % (v/v) de metanol y 1 % (w/v) del colorante histológico violeta cristal (Sigma-Aldrich, C3886). El número de placas se determinó para cada dilución en que éstas pudieron contarse y se promedió el número de placas determinado para cada réplica de la misma muestra, corregido por el factor de dilución. El título viral promedio se expresó como el número de placas virales por ml de inóculo.

6.22 Expresión de la región NS3-5B de la poliproteína de HCV2a en ausencia de replicación mediante sistema de expresión basado en plásmidos

Las células Huh-7, sembradas el día anterior a una densidad de 10^5 células/ pocillo de M12 o sobre cristales en la misma superficie, se transfectaron con 500 ng de un plásmido de expresión de la polimerasa del bacteriófago T7 (T7 pol) (pCAGSST7) y 1000 ng de un plásmido de expresión que contiene la región NS3-NS5B poliproteína de HCV bajo el control del promotor de la T7 pol, pTMNS3-5B (Sección 6.4) mediante transfección con lipofectamina (Sección 6.16). Después de 36 horas las células se recogieron en tampón de carga para análisis de la expresión de las proteínas virales individuales por *Western blot* (Sección 6.6).

6.23 Expresión de la poliproteína de HCV1a mediante la infección con MVA-HCV

Las células fueron sembradas el día anterior a la infección a una densidad de 10^5 células/ pocillo en placas de M12 o sobre cristales en la misma

superficie. Después, el medio se retiró y las células se expusieron a un volumen de 200 μ l de inóculo viral a una multiplicidad de infección de 2, 5 o 10 del virus Vaccinia de Ankara Modificado (MVA) recombinante que expresa la poliproteína de HCV Core-NS5B, excepto las dos terceras partes C-terminales de NS5B (Gómez, Perdiguero *et al.* 2013), diluido en DMEM. Tras una hora de inoculación a 37 °C 5 % CO₂, el inóculo se retiró y se sustituyó por 1 ml de DMEM 2 % SFB, 5 mg/ ml Citosina β -D-arabinofuranósido (Ara-C) (Sigma-Aldrich, C1768) y las células infectadas se incubaron por un período de 2 a 12 h adicionales a 37 °C y 5 % CO₂. Al cabo de este tiempo las células se fijaron para microscopía de inmunofluorescencia (Secciones 6.27 y 6.28) o se recogieron en tampón de carga para analizar la expresión de las proteínas virales individuales por *Western blot* (Sección 6.6) o en TRIzol (Ambion, 15596018) (Sección 6.24) para analizar la expresión de RNA molde del ORF de la poliproteína viral mediante RT-qPCR (Sección 6.25).

6.24 Extracción de RNA total y tratamiento de RNA con DNasa para la eliminación de DNA contaminante

Para la extracción de RNA se empleó TRIzol (Ambion, 15596018), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

Las muestras de RNA de células transfectadas con DNA plasmídico del cual se quería cuantificar el producto de transcripción, se trataron adicionalmente con DNasa para eliminar el DNA contaminante que podría afectar el resultado de la cuantificación. Para esto se empleó el kit comercial de DNasa Turbo DNA-free (Life Technologies, AM1907), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes para muestras con alto contenido de DNA. Tras el tratamiento se verificó que las muestras estaban libres de DNA plasmídico amplificable mediante PCR.

6.25 Cuantificación de mRNA mediante RT-qPCR

Las preparaciones de RNA obtenidas en Sección 6.24 se sometieron a reacción de reversotranscripción con hexámeros aleatorios empleando el kit comercial Taqman Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, N8080234) y posterior reacción de qPCR empleando la mezcla de Power SYBR Green (Applied Biosystems, 436759) y en un equipo de PCR a tiempo real 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Se emplearon los oligonucleótidos de la **Tabla**

6.II y curvas estándar generadas mediante la inserción del producto de PCR generado a con los mismos oligonucleótidos a partir del cDNA de las células Huh-7 en el plásmido pGEM-T (Promega, A3600).

Tabla 6.II: Oligonucleótidos para qPCR

GAPDH	up 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' low 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'
ISG56	up 5'-GGGCAGACTGGCAGAAG-3' low 5'-CTATAGCGGAAGGGATTTGA-3'
ISG15	up 5'-CAGCGAACTCATCTTTGCCAGTA-3' low 5'-CCAGCATCTTCACCGTCAGG-3'
MX1	up 5'-ACAGGACCATCGGAATCTTG-3' low 5'-CCCTTCTTCAGGTGGAACAC-3'
NS3ORF 2a	up 5'-CAGCTCAGGGAGATGTGGTG-3' low 5'-CTGAAGTCGACAGCTTGGGT-3'
NS3ORF 1a	up 5'-CCCGCCGAGACTACAGTTAG-3' low 5'-AGTTCTCCCCACTCTGCTTTG-3'

6.26 Ensayos de actividad luciferasa

Las células se recogieron en un volumen de 30 μ L para pocillos de M96 o 50 μ l para pocillos de M12 de tampón de lisis celular (Promega, E1941) y se incubaron en movimiento a 25 °C durante 20 min y se midió la actividad luciferasa de los extractos en un luminómetro de placas (Appliskan, Thermo Fisher Scientific), empleando el kit para ensayo de actividad de luciferasa de *Poethynus. pyralis*, Firefly Luciferase Assay Kit (Promega, E1500), el kit para ensayo de actividad de luciferasa de *Renilla reniformis*, Renilla Luciferase Assay System (Promega, E2810), o el kit de medición dual de ambas actividades luciferasas, Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, E1910), para co-transfecciones de ambos reporteros.

6.27 Tinción de Inmunofluorescencia

Las células que serían marcadas con anticuerpos conjugados a sondas fluorescentes para microscopía de fluorescencia (Sección 6.28) se sem-

braron a una confluencia del 60 % sobre cristales cubreobjetos (5×10^4 células por pocillo en placas de M12). Después de los tratamientos (Secciones 6.22 y 6.23), se retiró el sobrenadante y fijaron con 4% formaldehído en PBS durante 20 min a 25, con la excepción del marcaje con el anticuerpos anti-SIGMAR1, para el que se fijó en metanol frío durante 15 min. Tras la fijación, las células se lavaron tres veces con PBS. Posteriormente, los cubreobjetos se colocaron sobre superficie plástica en una cámara húmeda, donde se permeabilizaron y bloquearon durante 1 h a 25 °C con tampón de bloqueo 3 % BSA, 0.3% Triton X-100 in PBS y se incubaron posteriormente con las diluciones adecuadas de anticuerpos primarios (Sección 6.5) en tampón de bloqueo durante 1 h a 25 °C. Después de lavar tres veces se incubó con una dilución 1:500 del anticuerpo secundario anti-mouse 546 o anti-goat 546 (Sección 6.5) durante 1 h en la oscuridad. Pasado este tiempo se lavó tres veces con 1 ml PBS mientras se aspiraba mediante vacío. Posteriormente, los cubreobjetos se pusieron sobre gotas de 5 μ l del sellador Prolong Gold Antifade (Life technologies, P36930) y se dejó secar en posición horizontal en la oscuridad y a 25 °C durante toda la noche. El análisis por microscopía de fluorescencia se realizó como se describe en Sección 6.28.

6.28 Microscopía de Fluorescencia

Las células fueron teñidas para inmunodetección por fluorescencia (Sección 6.27) o teñidas con sondas fluorescentes para la identificación de núcleo, DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate)(Thermo-Fisher Scientific, D3571) compartimentos ácidos, LysoTracker (Thermo-Fisher Scientific, A12379) y actina polimerizada, faloidina (Alexa Fluor® 488 Phalloidin) (Thermo Fischer Scientific, A12379) o lyso-tracker LysoTracker® Deep Red (Thermo Fischer Scientific, L12492) según las indicaciones de los fabricantes y se analizaron con un microscopio confocal Leica TSC SP5 empleando una distancia de pasada en el eje z de 0,5 μ M (z-step size). El procesamiento de las imágenes se realizó empleando el software Image J (Schneider, Rasband *et al.* 2012).

6.29 Transcriptómica diferencial mediante secuenciación masiva de RNA total (RNAseq)

El RNA total de duplicados de 8×10^6 células deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) y células control (shCTRL) a d+8 del silenciamiento por RNAi (Sec-

ción 6.12) se extrajo empleando dos rondas de extracción con isotiocianato de guanidina y fenol ácido (pH 4.2) (Chomczynski y Sacchi 1987) y se eliminó el DNA contaminante mediante tratamiento con DNasa (Roche, 04716728001) como se describe en Sección 6.24. Las muestras de RNA purificado se resuspendieron en agua libre de nucleasas y se cuantificaron mediante la medida de absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Muestras de 1µg de RNA total purificado de los duplicados de cada condición se destinaron para la secuenciación de RNA.

La secuenciación masiva de RNA (NGS, del inglés *next generation sequencing*) se realizó en el Servicio de Genómica del Centro de Reserca Genómica (CRG, Barcelona) empleando la plataforma Illumina. Para la preparación de las librerías de cDNA se empleó el kit comercial TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit (Illumina, RS-122-2201) de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes. Se comprobó la calidad de las muestras resultantes cuantitativamente, mediante qPCR y cualitativamente en el 2100 Bioanalyzer (Agilent). La secuenciación se realizó en un formato de 50 ciclos de lectura de 2 x 50 nucleótidos (paired-end).

La calidad de las lecturas en formato FASTQ se verificó con el programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Para cada muestra las lecturas pareadas se alinearon con el genoma humano (primary_assembly, Ensembl release 84) usando el programa TopHat2 (Langmead, Trapnell *et al.* 2009) con los parámetros por defecto para lecturas pareadas. Los archivos de alineamientos (BAM) se distribuyeron e indexaron con la herramienta Samtools (Li, Handsaker *et al.* 2009) y se visualizaron con el visualizador genómico IGV (Robinson, Thorvaldsdóttir *et al.* 2011).

Las lecturas alineadas se asignaron a genes humanos con la función htseq-count del paquete HTSeq (Anders, Pyl *et al.* 2015) con los arámetros asignados por defecto para secuencias de lecturas pareadas cadena -específicas (reverse), y usando como filtro la opción de genes completos (que incluye ARNm, pseudogenes, RNA largos no codificantes y otros RNA) empleando como referencia la versión de anotaciones GRCh84.p5 (Ensembl annotation version).

La expresión diferencial se estimó mediante el paquete bioconductor DESeq2 (Love, Huber *et al.* 2014) usando como parámetro `cooksCutoff=FALSE`. La significancia estadística (valores de p) para la cuantificación de cada identificación se ajustaron por el método FDR (del inglés *false discovery rate*) (Ben-

jamini y Hochberg 1995), para minimizar el sesgo de las comparaciones múltiples.

Para visualizar gráficamente los resultados y establecer un filtro de FDR válido, se utilizó el visualizador FIESTA (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA>). Se consideraron genes candidatos los que mostraron cambios significativos con un FDR < 0,01.

6.30 Proteómica diferencial mediante el marcaje con iTRAQ-8plex de extractos celulares totales

Ocho muestras correspondientes a extractos celulares totales de 4 líneas deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) y 4 líneas control (shCTRL1) generadas paralelamente se lisaron a d+8 del silenciamiento génico con tampón de lisis (8M urea, 2M tiourea, 5% CHAPS, 2mM TCEP y un cocktail anti-proteasas (Thermo Fischer Scientific, 78441B).

A continuación los lisados se precipitaron por el método de metanol/cloroformo y se cuantificaron con el reactivo PIERCE 660 nm Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, 22660) y 40 µg de cada muestra y se digirieron se digirieron durante 16 h con tripsina de alto grado de pureza (Promega, V5111) a un *ratio* 1:20 (w/w enzima:proteína). Los péptidos obtenidos de cada muestra se marcaron con distintas etiquetas para marcaje (iTRAQ-8plex, Sigma-Aldrich 4381663): 158-R1 (tag-113); 62-R1 (tag-114); 158-R2 (tag-115); 62-R2 (tag-116); 158-R3 (tag-117); 62-R3 (tag-118); 158-R4 (tag-119); 62-R4 (tag-121) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

Tras 2 h de marcaje los 8 digeridos marcados se juntaron y la mezcla se secó al vacío (Digital Series SpeedVac™ Systems, Thermo Fisher Scientific). La mezcla de péptidos trópticos marcados se disolvió y se fraccionó en 30 fracciones mediante cromatografía de fase reversa-C18 a pH básico (150 min), y las fracciones obtenidas se combinaron alternándolas hasta reducirlas a 5 fracciones, que se aclararon mediante StageTip-C18. Las 5 fracciones de péptidos trópticos se cuantificaron mediante fluorimetría y se inyectó subsecuentemente 1 µg de cada una en el equipo de espectrometría de masas Q-TOF (TRIPLE-TOF).

Los datos de los espectros de masas (MS/MS) obtenidos se analizaron con cuatro motores de búsqueda, incluyendo MASCOT (Matrix Science, v.2.5), OMSSA (NCBI, v.2.1.9), X!Tandem2 con k-score (LabKey Software, v.2.3-

7806) y Myrimatch (Vanderbilt University, v.2.1) frente a la base de datos de Homo sapiens (que contiene también la base de datos Decoy). Las identificaciones y los datos de cuantificación de los cuatro motores se combinaron y se calcularon las tasas de falsos positivos (FDR, del inglés *false discovery rate*) que se fijaron en FDR <1% para la identificación de proteínas y FDR <5% para la comparación de medias (empleando el programa informático GraphPAD Prism (GraphPAD Prism, CA, EE.UU <http://www.graphpad.com>) para realizar las pruebas T múltiples con corrección de Benjamini–Hochberg.

6.31 Análisis de datos de transcriptómica y proteómica diferencial

Los proteínas y transcritos identificados y en ambas líneas, Huh-7 shS1R2 y shCTRL1, se clasificaron mediante el sistema PANTHER (Protein Analysis THrough Evolutionary Relationships, <http://pantherdb.org>) (Mi, Muruganujan *et al.* 2013). Además, se efectuó un a prueba estadística de sobre-representación (ORA, del inglés *over-representation analysis*), basada en tablas de contingencia para la evaluación del enriquecimiento en la muestra de proteínas/ transcritos regulados de proteínas asociadas con términos de *Gene Ontology* (GO) de procesos biológicos, funciones moleculares, componentes celulares y vías de señalización con respecto a la frecuencia de éstos en el conjunto de todas las proteínas humanas de las que se recoge información en las bases de datos de Uniprot (Mi, Muruganujan *et al.* 2013). Se empleó la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples, excepto en los casos en que ésta no permitió encontrar ninguna categoría significativa (esto es fundamentalmente en las pruebas de vías de señalización y en las pruebas en grupos reducidos de proteínas). En los casos en que no se aplicó la corrección de Bonferroni, se consideraron y representaron las categorías más significativas, filtradas de acuerdo a una representación mínima y máxima de proteínas calculada en relación con el total de proteínas de las categorías y un enriquecimiento mínimo de 2 veces en proteómica y 1,3 en transcriptómica, en correspondencia con el tamaño de los grupos y las magnitudes de los cambios. Asimismo, cuando varias categorías de una familia cumplieron con las antedichas premisas, se representó sólo la más amplia de ellas, a fin de minimizar la redundancia de las clasificaciones.

Un análisis más exhaustivo de las categorías que resultaron significativamente sobre-representadas fue realizado a partir de la interrogación de bases de datos más extensas (GO-Complete) o específicas (KEGG, Reactome, TRANSFAC TF, TRANSFAC TFfam y TRANSFAC mirRNA, Pfam) empleando

la herramienta de análisis en línea GENETRAIL2 del sitio <https://genetrail2.bio-inf.uni-sb.de> realizando las pruebas de sobre-representación con la corrección de Bonferroni.

6.32 Purificación de complejos de asociación a proteínas de fusión con TAP SIGMAR1-TAP, APOE-TAP y TAP mediante cromatografía de afinidad

La estrategia de purificación de complejos SIGMAR1-TAP planteada inicialmente fue la descrita previamente para la purificación de complejos en dos pasos sucesivos de afinidad (IgG y estreptavidina) separados por una digestión por la proteasa TEV y elución con biotina (Burckstummer, Bennett *et al.* 2006). Sin embargo, la proteína recombinante SIGMAR1-TAP no permitió la digestión con TEV con un rendimiento satisfactorio y por esto se realizó la purificación de complejos que contienen SIGMAR1-TAP en un único paso mediante cromatografía de afinidad en una fase sólida de estreptavidina conjugada con agarosa (Sigma-Aldrich, S1638). Para esto, precipitados de cultivos de 10^7 células Huh-7 transducidas con los vectores de expresión LV-TAP, LV-APOE-TAP o LV-SIGMAR-TAP se lavaron con PBS y se resuspendieron en 250 μ l del tampón de unión a resina (50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 125 mM NaCl 5 % glicerol 0,2 % Igepal 1,5 mM $MgCl_2$) suplementado con inhibidores de proteasas (Roche, Roche-11836170001). La suspensión se incubó en hielo durante 30 minutos para permitir la lisis celular y los lisados se centrifugaron a 15000 g durante 10 min a 4 °C, después de lo cual los sobrenadantes se transfirieron a un tubo nuevo para servir como muestra inicial en la cromatografía de afinidad. La cromatografía se realizó empleando la resina de agarosa-estreptavidina (Ultralink Immobilized Streptavidin Plus (Pierce). La resina (25 μ l de cama por condición) se equilibró mediante tres lavados con 20 volúmenes del tampón de unión, centrifugando a baja velocidad durante 20 segundos cada vez. Los lisados (125 μ l) se diluyeron 1:2 en tampón de unión, se aplicaron a la resina y se incubaron durante 4 h a 4 °C en agitación suave. Pasado este tiempo la resina se lavó 5 veces con 20 volúmenes de tampón de unión y posteriormente los complejos unidos se eluyeron en 50 μ l de tampón de elución (50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 125 mM NaCl 5 % glicerol 0.2% Igepal 1,5 mM $MgCl_2$ 1mM biotina). Para ello las resina se incubaron en el tampón de elución durante 15 min en hielo, tras lo cual se centrifugaron a baja velocidad y se recogieron los eluidos de tres rondas de elución consecutivas. El rendimiento y la calidad de las muestras eluidas se verificó por tinción con Ag de muestras sometidas a SDS-PAGE (Sección 6.6). La elución 1 se empleó para el estudio proteómico (Sección 6.33).

6.33 Análisis proteómico cuantitativo de complejos purificados de SIGMAR1-TAP, APOE-TAP y TAP

El análisis proteómico de los purificados obtenidos en **Sección 6.32** fue realizado por el Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología y la empresa Proteobotics (CNB-CSIC, Madrid).

Las proteínas de las muestras provenientes de cada muestra de los purificados SIGMAR1-TAP, APOE-TAP y TAP (**Sección 6.32**) se precipitaron con una mezcla metanol:cloroformo (2:1), centrifugándose a 15 000 g durante 10 min a 4°C. Las muestras de proteína precipitada se disolvieron en solución 8M urea (Sigma-Aldrich, U5378) 25 mM NH₄HCO₃ (Sigma-Aldrich, 09830). Posteriormente, éstas se sometieron a reducción con 10 mM 1,4-ditiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, D9779) durante 1 h a 37 °C, y a alquilación de los grupos sulfidilo con 50 mM iodoacetamida (Sigma-Aldrich, I1149) durante 45 min a 25 °C. A continuación las muestras se diluyeron cuatro veces (hasta concentración menor 2 M urea) y se digirieron durante 16 h con tripsina de alto grado de pureza (Promega, V5111) a un ratio 1:20 (w/w enzima:proteína). Las soluciones de péptidos se purificaron en columnas ZipTip C18 Pipette tips (Millipore, ZTC18M096).

El análisis de espectrometría de masas de las muestras peptídicas se realizó mediante una plataforma nano LC-MS/MS Q-TOF (triple TOF) de alta resolución, empleando un sistema de nano-cromatografía líquida Eksigent Technologies nanoLC Ultra 1D plus (AB SCIEX, Foster City, CA) acoplado a un espectrómetro de masas Triple TOF 5600 con una fuente de iones nano-electrospray (AB SCIEX, Foster City, CA) a un flujo 250 nL/min. Para los registros TOF se ajustó un tiempo de acumulación de 250 ms y un tomaron los 15 iones más abundantes por ciclo para su fragmentación y la obtención de los espectros de masas MS/MS. El conjunto de espectros de fragmentación MS/MS se empleó para la identificación por búsqueda y comparación en bases de datos públicas empleando el motor de búsqueda desarrollado por Proteobotics, y considerando un número de modificaciones químicas predichas y observadas en los péptidos obtenidos, calculando la tasa de error (FDR) a nivel de péptido y considerando sólo los péptidos identificados con un FDR<0,01.

Los datos de los tres experimentos independientes se integraron utilizando un esquema de análisis libre de marcaje, conteo redundante de péptidos o conteo espectral, que compara las variaciones de intensidad de péptidos individuales asociados a proteínas en distintas carreras cromatográficas,

atribuyéndoles a estas variaciones una significancia estadística (Gilchrist, Au *et al.*). Las variaciones de intensidad de los espectros de las muestras SIGMAR1-TAP, APOE-TAP y TAP se compararon estimando el grado de enriquecimiento y significancia estadística para cada péptido con respecto al control negativo TAP. Se consideraron proteínas específicamente asociadas a SIGMAR1-TAP o APOE-TAP cuando las medias de las variaciones de intensidad respecto al control presentaron un $FDR < 0,05$.

6.34 Nomenclatura de genes y proteínas

Los genes y transcritos se designaron con el símbolo Oficial NCBI Gene en mayúsculas arábigas e itálica y las proteínas con el nombre del gen en mayúsculas sin itálica, de acuerdo a los directrices para el formato de los nombres de genes del comité para la nomenclatura de genes HGNC (por sus siglas para HUGO (*Human Genome Organization*) Gene Nomenclature Committee) (Wain, Bruford *et al.* 2002). Algunos casos en los que un nombre alternativo es el de uso más extendido se refirieron ambas nomenclaturas en la forma NOMBRE COMÚN (SÍMBOLO DEL GEN). Los genes DDX58, IFIH1, IFIT1 se designaron en las gráficas y figuras por sus nombres alternativos de uso común *RIG-I*, *MDA5* e *ISG56*.

6.35 Análisis estadístico

El procesamiento estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism v5.00, 2007 (GraphPAD Prism, La Jolla, CA, <http://www.graphpad.com>), empleando la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($n < 7$) o la de Shapiro-Wilk ($n > 7$) para el análisis de la normalidad de los datos, así como la Prueba de Bartlett para el análisis de la homogeneidad de varianza. Para la comparación de dos medias se empleó la Prueba paramétrica T de Student. La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con la prueba posterior de comparaciones múltiples de Dunn se empleó para la comparación múltiple de medias. Se consideraron significativas las diferencias con una $p < 0,05$.

7. Resultados

7.1 Estudio del papel de SIGMAR1 en la respuesta antiviral frente a virus de RNA

Cuando Friesland y colaboradores en 2013 describieron la función proviral de SIGMAR1 en el establecimiento de la infección por HCV observaron que el requerimiento de esta proteína celular por el virus era menor y más transitorio en la sublínea clonal hiperpermissiva Huh-7.5.1 respecto a su línea parental Huh-7 (Friesland, Mingorance *et al.* 2013). Una característica distintiva de las sublíneas de Huh-7.5 es la mutación dominante negativa del PRR de virus de RNA, RIG-I (Blight, McKeating *et al.* 2002). Este hallazgo resultaba especialmente interesante considerando que SIGMAR1 se localiza en las MAM (Sección 4.3.2), estructuras que funcionan como plataformas de señalización de la vía de los receptores tipo RIG-I (RLRs, del inglés *RIG-I-like receptors*) (Sección 4.2.3) y de la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR, del inglés *unfolded protein response*), programa celular que colabora con la respuesta antiviral de los RLRs (revisado en (Smith 2014)) (Sección 4.2.4) y con el que SIGMAR1 se ha asociado previamente (Sección 4.3.4.2). Considerando estos antecedentes y la relevancia de la vía de los RLRs en la respuesta antiviral frente a HCV y otros virus de RNA (Sección 4.2.3), nos propusimos estudiar si SIGMAR1 tiene un papel en la regulación de la respuesta antiviral mediada por esta vía.

7.1.1 Respuesta antiviral frente a infección por virus de RNA modelo en células Huh-7 deficientes en SIGMAR1

En primer lugar, se abordó el estudio del papel de SIGMAR1 en la respuesta antiviral en las células de hepatoma humano Huh-7 (Sección 6.1), la línea celular de referencia para el estudio de la infección por HCV y en la cual se caracterizó previamente el papel proviral SIGMAR1 para éste (Friesland, Mingorance *et al.* 2013).

En las células Huh-7 la respuesta antiviral de frente a virus de RNA como HCV (Sección 4.2) depende fundamentalmente de la vía de los RLRs, ya que carecen del receptor TLR3 (Toll-like receptor 3) (Li, Chen *et al.* 2005) y, además, no son productoras eficaces de interferones de tipo I (IFN-I) (observaciones no publicadas).

Una de las herramientas más extendidas para el estudio de la activación de los RLRs es la estimulación con preparaciones de virus Sendai (SeV) ricas en genomas defectivos (DGs, del inglés *defective genomes*)

producto de errores en la replicación (Strahle, Garcin et al. 2006) (en adelante SeV-DGs). Los DGs acumulados durante la infección con SeV-DGs constituyen un sustrato prototípico del receptor RIG-I (**Figura 7.1.1**), que ha sido extensamente empleado en células Huh-7 como estímulo de la vía de los RLRs para la inducción de IFN-I (**Sección 4.2.1**)(Sección 6.2.1).

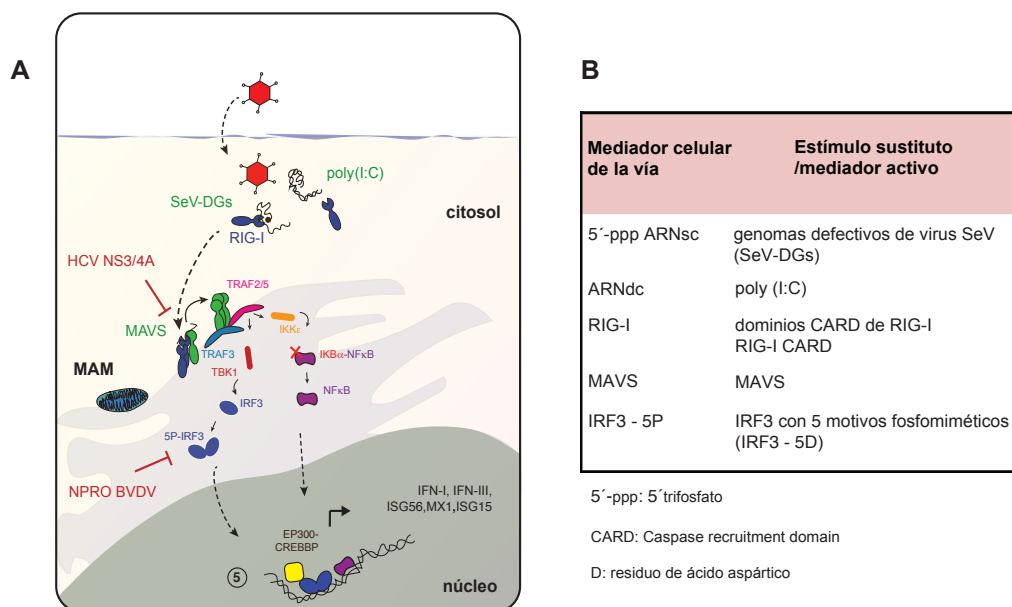


Figura 7.1.1 Esquema de la estimulación de la vía de los RLRs por estímulos modelo.

A) Esquema de la vía de señalización de los RLRs donde se representan estímulos comúnmente empleados para la activación (SeV-DGs y poly(I:C)) y enzimas virales que median el bloqueo (HCV NS3/4A y NPRO BVDV) de la respuesta antiviral. Los números indican los tres niveles de activación de la vía estudiados en este trabajo (Secciones 7.1.1, 7.1.3 y 7.1.5). **B)** Cuadro resumen de los estímulos empleando en este trabajo para estudiar la vía de los RLRs a distintos niveles.

Se generaron líneas de células Huh-7 deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) y control (shCTRL1) mediante vectores lentivirales para silenciamiento génico por RNA interferente (iRNA) (Sección 6.12). Como se muestra en la figura 7.1.2 los niveles de expresión de la proteína SIGMAR1 (panel A) y la permisividad a la infección por HCV_{TCP} (panel B) medidos a siete días tras la transducción con los vectores lentivirales (d+7) se encuentran reducidos en las células shS1R2 aproximadamente al 10 % de los niveles de la línea control shCTRL1, en acuerdo con lo descrito previamente (Friesland, Mingorance *et al.* 2013) (**Figura 7.1.2**). Las células Huh-7 shS1R2 y shCTRL1 a d+7 se co-transfectaron (Sección 6.16) con un plásmido reportero de la actividad del promotor de *IFNB1*, pIFNb(-116/+72)Lufter, y un plásmido reportero bajo un promotor mínimo, pRe-

nilla-Luc-null, como control de transfección (Sección 6.4), el día previo a la infección viral y tras 24 h se inocularon con una dosis previamente establecida de una preparación de SeV-DGs (Sección 6.2.1) o se trataron de manera similar en ausencia de virus (*mock*) (Sección 6.18). La cinética y magnitud de la respuesta antiviral se evaluó mediante la determinación de la actividad luciferasa de *Photinus pyralis* (Firefly) producto de la expresión del gen reportero Firefly *luc* bajo el control del promotor de *IFNB1* a las 0, 12, 18, 24 y 36 h de la infección normalizada respecto a la actividad luciferasa de *Renilla reniformis* (Renilla) producto de la expresión del gen reportero Renilla *luc* bajo un promotor mínimo (Sección 6.26). En la figura 7.1.2 C se muestra la cinética de inducción de *IFNB1* en células Huh-7 shS1R2 y shCTRL1 *mock* e infectadas con SeV. Los niveles basales de actividad del promotor de *IFNB1* en las células *mock* son detectables aunque próximos al fondo del experimento, y son similares entre células deficientes en SIGMAR1 y células control (**Figura 7.1.2 C**).

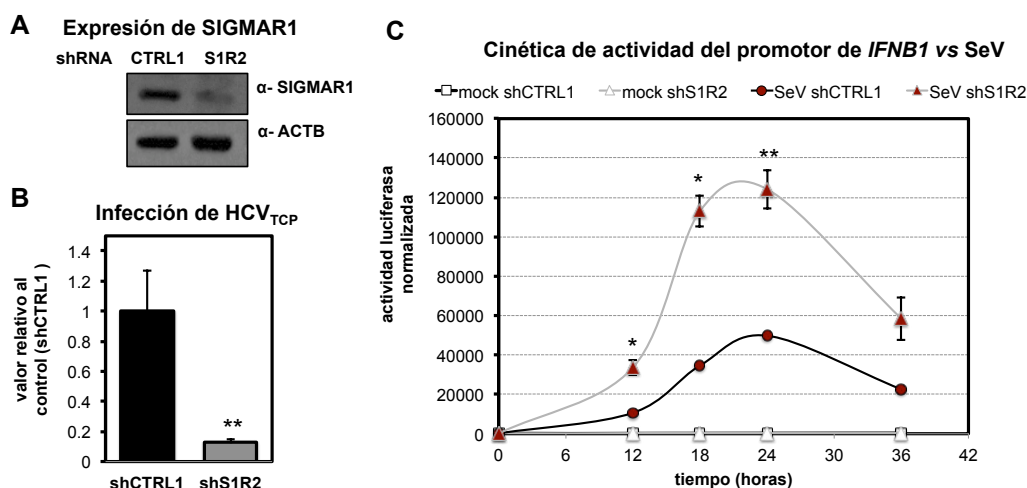


Figura 7.1.2 Cinética de inducción de *IFNB1* frente a estimulación con SeV-DGs (12, 18, 24 y 36 h) en células Huh-7 deficientes en SIGMAR1 y células control. **A)** *Western Blot* frente a SIGMAR1 y β -actina (ACTB), **B)** eficiencia de infección por HCV_{TCP} relativa al control shCTRL1 Y **C)** cinética de actividad normalizada del reportero luciferasa bajo el promotor de *IFNB1* frente a estimulación con SeV-DGs en células Huh-7 deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) y células control (shCTRL1) a día 7 post-transducción con vectores lentivirales para silenciamiento. Los datos se representan como promedio y desviación estándar de un experimento representativo (n=3). Los asteriscos representan la significancia estadística (valor de p) de la prueba T de Student para datos no pareados en la comparación de medias entre shCTRL1 y shS1R2; * p<0,05, ** p<0,01.

La estimulación con SeV-DGs en ambas líneas celulares produce la inducción de la actividad del promotor de *IFNB1* ($p<0,05$), alcanzando un máximo hacia las 24 h ($p<0,01$), que es seguido por una caída de la respuesta. Sin

embargo, la inducción de *IFNB1* en las células Huh-7 shS1R2 muestra una pendiente más aguda que en las células control shCTRL1 (3,3 veces en el rango entre las 12 y 18 h post-infección; $p < 0,05$), y alcanza una magnitud máxima también mayor respecto a sus controles shCTRL1 ($2,5 \pm 0,4$ veces) ($p < 0,01$) (**Figura 7.1.2 C**). Teniendo en cuenta la cinética de respuesta de IFN-I en estas células, los experimentos subsiguientes se realizaron con 16 h de estimulación, coincidente con la fase de inducción de *IFNB1* y donde se observan las mayores diferencias en este parámetro entre las células control y deficientes en SIGMAR1 (**Figura 7.1.2 C**).

En estas condiciones el fenotipo de respuesta antiviral incrementada de las células deficientes en SIGMAR1 respecto a las células control se verificó de manera alternativa midiendo la inducción de VSGs como *ISG56*, *ISG15* y *MX1* mediante RT-qPCR (Sección 6.25) obteniendo una inducción diferencial de $10 \pm 0,6$; $7,0 \pm 0,3$ y $9,2 \pm 0,4$ respectivamente entre las células shS1R2 y las células control shCTRL1 (**Figura 7.1.3 A**).

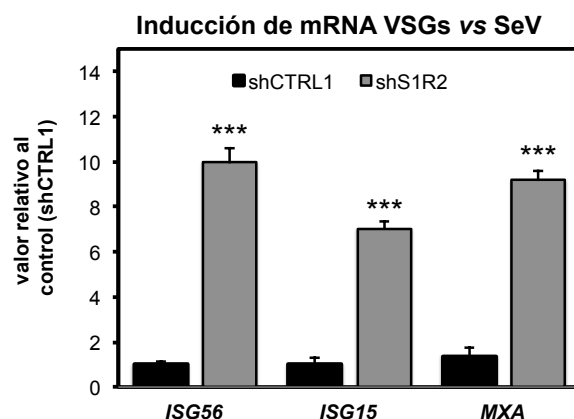


Figura 7.1.3 Inducción de *ISG56*, *ISG15* y *MX1* frente a estimulación con SeV-DGs (16 h) en células Huh-7 deficientes en SIGMAR1 y células control. *Ratio* de inducción relativa a las células control shCTRL1 (Sección 6.18) del mRNA de *ISG56*, *ISG15* y *MX1* frente a estimulación con SeV-DGs (16 h) en células deficientes de SIGMAR1 (shS1R2) y control (shCTRL1) a día 7 post-transducción con vectores lentivirales para silenciamiento. Los datos se expresan como promedio y desviación estándar ($n=9$). Los asteriscos representan la significancia estadística (valor de p) de la prueba T de Student para datos no pareados para la comparación de medias entre shCTRL1 y shS1R2; *** $p < 0,001$.

Para examinar la especificidad y dependencia de estas observaciones respecto a los niveles celulares de SIGMAR1, se empleó adicionalmente otro shRNA específico para *SIGMAR1* (shS1R1) y otros dos shRNAs control (shCTRL2 y shCTRL3) (Sección 6.4; Tabla 6.1).

Los silenciadores específicos frente a SIGMAR1 shS1R1 y shS1R2 han sido descritos previamente por Friesland *et al.* en 2013 (Friesland, Mingo-rance *et al.* 2013) y proporcionan una reducción moderada (shS1R1, aproximadamente 50 %) y más pronunciada (shS1R2, aproximadamente 90 %) de la expresión de SIGMAR1 (**Figura 7.1.4 A**) y de permisividad a la infección de HCV_{TCP} (**Figura 7.1.4 A y B**), de modo que la comparación del efecto de ambos silenciadores permite comparar la magnitud de los fenotipos a diferentes niveles de SIGMAR1. Los nuevos shRNA control transfieren un shRNA de secuencia aleatoria sin diana (shCTRL2) o diseñado frente a la secuencia de la luciferasa Firefly (shCTRL3). Como se muestra en la figura 7.1.4 B, las células que expresan el shRNA control shCTRL3 muestran, de acuerdo a lo esperado, una reducción de la medida de actividad luciferasa en estas células tras la infección por HCV_{TCP} (**Figura 7.1.4 B**), evidenciando la expresión de un shRNA funcional.

En la Figura 7.1.4 C se muestran los valores de inducción relativa del mRNA de *ISG56* en células control (shCTRL1, shCTRL2 y shCTRL3) y células deficientes en SIGMAR1 (shS1R1 y shS1R2) respecto al control shCTRL1. Mientras las líneas control shCTRL2 y shCTRL3 presentan un fenotipo similar a las shCTRL1, las líneas de células deficientes en SIGMAR1, shS1R1 y shS1R2, muestran una inducción de *ISG56* significativamente mayor ($p < 0,05$). Sin embargo, la magnitud de este efecto es mayor (10 veces la inducción de las células shCTRL1) en las células shS1R2 que en las shS1R1 (6 veces la inducción de las células shCTRL1), de acuerdo a sus niveles de silenciamiento, indicando una relación inversa entre los niveles de SIGMAR1 y la magnitud de la inducción de *ISG56* frente a la estimulación con SeV-DGs en las células Huh-7.

Como control adicional de la especificidad y de la dependencia de este incremento en la respuesta antiviral respecto a los niveles celulares de expresión de la proteína SIGMAR1, se evaluó la inducción del VSG *ISG56* frente a SeV-DGs de células transducidas con lentivirus para silenciamiento de SIGMAR1 shS1R2 o para expresión del control sin diana shCTRL1, 24 h post-transducción, momento en el cual las células que han integrado eficazmente las construcciones lentivirales han sido seleccionadas fenotípicamente por el marcador de selección de resistencia a puromicina pero no presentan cambios en los niveles de la proteína SIGMAR1 (**Figura 7.1.4 E**).

Como se muestra en la figura 7.1.4 D, a las 24 h post-transducción las células transducidas con lentivirus para silenciamiento shS1R2 y shCTRL1 responden de manera similar a la estimulación con SeV-DGs, confirmando que

la reducción en la expresión de la proteína SIGMAR1, y no efectos espurios del procedimiento de silenciamiento, es responsable de la respuesta antiviral exacerbada de las células deficientes en SIGMAR1 (**Figura 7.1.4 D**).

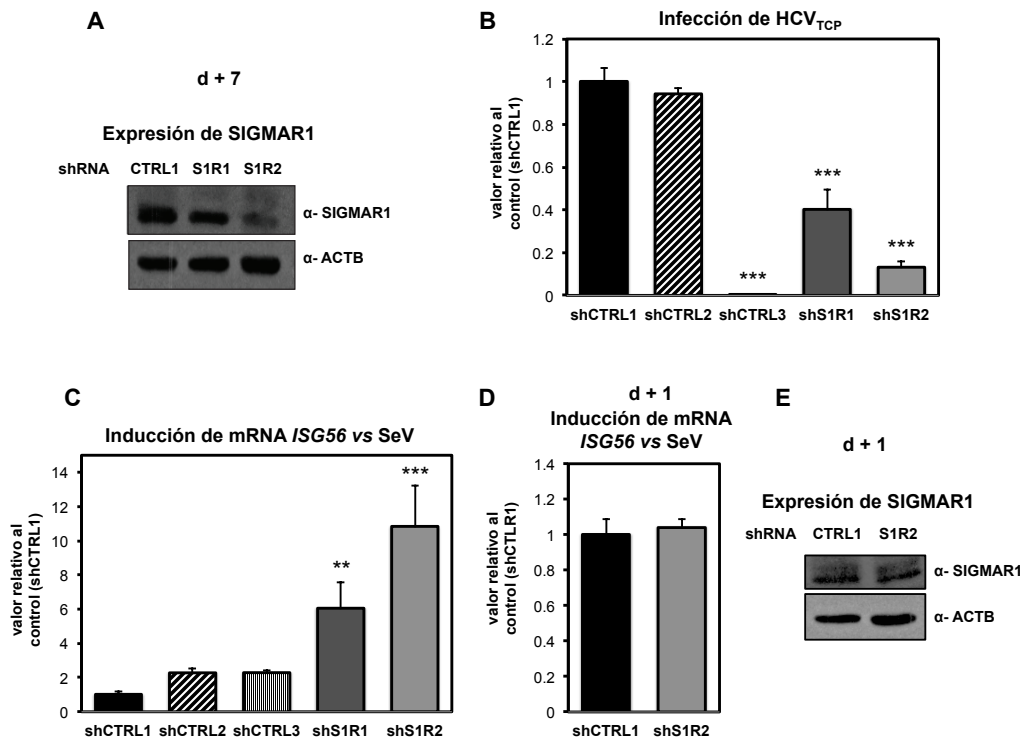


Figura 7.1.4 Inducción de *ISG56* frente a estimulación con SeV-DGs (16 h) en células Huh-7 deficientes en SIGMAR1 (shS1R1, shS1R2) y células control (shCTRL1, shCTRL2, shCTRL3). **A)** *Western Blot* frente a SIGMAR1 y β -actina (ACTB) a día 7 post-transducción con vectores lentivirales para silenciamiento (d+7) de extractos células deficientes (shS1R1, shS1R2) y células control (shCTRL1). **B)** Eficiencia de infección por HCV_{TCP} y **C)** *Ratio* de inducción relativa a las células control shCTRL1 (Sección 6.18) del mRNA de *ISG56* frente a estimulación con SeV-DGs (16 h) en líneas de células deficientes de SIGMAR1 (shS1R1, shS1R2) y control (shCTRL1, shCTRL2, shCTRL3) a d + 7. **D)** *Ratio* de inducción relativa a células control shCTRL1 del mRNA de *ISG56* frente a estimulación con SeV-DGs (16 h) en células deficientes de SIGMAR1 (shS1R2) y control (shCTRL1) 24 h post-transducción con los vectores lentivirales para silenciamiento (d+1). **E)** *Western Blot* frente a SIGMAR1 y ACTB de extractos de células transducidas con los vectores lentivirales para silenciamiento shCTRL1 y shS1R2 a d + 1. Los datos se expresan como promedio y desviación estándar (en B y C n=15 para shCTRL1 y shS1R2 y n=3 para shCTRL2 y shCTRL3; en D n=3). Los asteriscos representan la significancia estadística (valor de p) de la prueba T de Student para datos no pareados para la comparación de medias o la prueba de Kruskal Wallis con prueba posterior de Dunn para la comparación múltiple medias respecto al control shCTRL1; ** p<0,01; *** p<0,001.

En conjunto los resultados apuntan a que los niveles de SIGMAR1

tienen un efecto restrictivo sobre la inducción de VSGs frente a estimulación de la vía de los RLRs en las células Huh-7.

7.1.2 Respuesta antiviral frente a virus de RNA modelo en células HEK293T y A549 deficientes en SIGMAR1

Con el objetivo de validar las observaciones resumidas en la Sección 7.1.1 sobre la función reguladora de SIGMAR1 sobre la respuesta innata antiviral SeV-DGs, se extendió este estudio a otras dos líneas celulares de origen humano: la línea de células embrionarias de riñón HEK293T y la línea de epitelio pulmonar A549 (Sección 6.1).

Estas líneas celulares se diferencian en sus características de reconocimiento y respuesta a estímulos virales. Las células HEK293T pueden producir IFN-I pero no responden eficientemente a éste (Strahle, Garcin *et al.* 2006), siendo útiles para el estudio de la activación de la vía de los RLRs y la inducción de *IFNB1* y VSGs de manera independiente de la retroalimentación de la respuesta dependiente de IFN-I. Por el contrario, las células A549 son tanto eficientes productoras como respondedoras a IFN-I (Goulet, Olagnier *et al.* 2013), por lo que permiten estudiar una respuesta antiviral completa, incluyendo la activación de la cascada dependiente de IFN-I.

Las líneas celulares HEK293T y A549 deficientes en SIGMAR1 y sus controles se generaron como se describe en Sección 6.12, incluyendo un nuevo silenciador específico frente a *SIGMAR1*, shS1R3, dirigido frente a la región no traducible 3' (3'UTR) del gen (Sección 6.4 Tabla 6.I).

Como se muestra en la figura 7.1.5 A, las células HEK293T muestran una reducción robusta de los niveles de SIGMAR1 entre 3 y 4 días tras la transducción lentiviral (**Figura 7.1.5 A**), lo cual indica una cinética de silenciamiento más rápida que la observada en Huh-7 (Sección 7.1.1), probablemente debido a su mayor tasa de división celular. Entre los días 4 y 7 post-transducción con los vectores lentivirales, los niveles de SIGMAR1 continúan disminuyendo en las células HEK293T silenciadas, acompañado de un visible cambio fenotípico y una reducción de la viabilidad celular evaluada mediante ensayo de MTT (Sección 6.7) (datos no mostrados). Atendiendo a esto, los experimentos para el estudio de la respuesta antiviral de la vía de los RLRs frente a la infección con SeV-DGs en las células HEK293T se realizaron el cuarto día tras la transducción lentiviral (d+4), cuando el silenciamiento es robusto, sin cambios en la viabilidad entre células deficientes en SIGMAR1 y células control (datos no

mostrados). Como se muestra en la figura 7.1.5 A y C, en las células HEK293T deficientes en SIGMAR1 (shS1R1, shS1R2 y shS1R3) se verificó una inducción de *ISG56* significativamente superior (4, 6 y 7 veces, respectivamente, $p < 0,001$) a la de las células control (shCTRL1), de manera análoga a lo observado en Huh-7 (Sección 7.1.1).

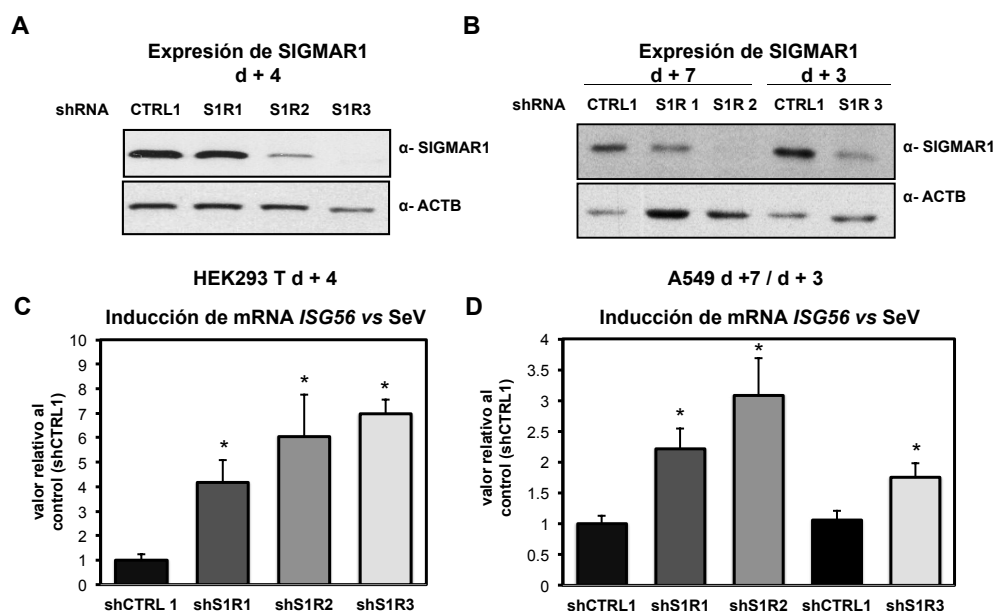


Figura 7.1.5 Inducción de *ISG56* frente a estimulación con SeV-DGs en células HEK293T (16 h) y A549 (12 h) deficientes en SIGMAR1 (shS1R1, shS1R2 y shS1R3) y control (shCTRL1). **A**) Western Blot frente a SIGMAR1 y β -actina (ACTB) de extractos de líneas de células HEK293T deficientes de SIGMAR1 (shS1R1, shS1R2 y shS1R3) y control (shCTRL1) a día 4 post-transducción con vectores lentivirales para silenciamiento (d+4). **C**) Ratio de inducción relativa a las células control shCTRL1 del mRNA de *ISG56* frente a estimulación con SeV (16 h). **B**) y **D**) *Idem* para células A549 a d+7 (shCTRL1, shS1R1, shS1R2) o d+7 (shCTRL1 y shS1R3). Los datos se expresan como promedio y desviación estándar de un experimento representativo en cada caso (n=3). Los asteriscos representan la significancia estadística (valor de p) de la Prueba de Kruskal Wallis con prueba posterior de Dunn para la comparación múltiple medias en la comparación respecto al control shCTRL1; * $p < 0,05$.

Las células A549, por su parte, muestran una cinética de silenciamiento similar a las Huh-7, con niveles máximos de silenciamiento sin cambios en la viabilidad siete días tras la transducción lentiviral (d+7) en las células shS1R1 y shS12R, mientras las células que expresan el shRNA shS1R3 muestran una reducción robusta de los niveles de SIGMAR1 entre los días 2 y 3 tras la transducción lentiviral (**Figura 7.1.5 B**). En estas últimas, a partir del día 4 comienza a aparecer de manera similar a lo observado por en las células HEK293T, una

reducción en la viabilidad celular (datos no mostrados).

Como se muestra en la figura 7.1.5 D, las células A549 deficientes en SIGMAR1 shS1R1, shS12R y shS1R3 muestran una respuesta de inducción de *ISG56* superior (2, 3 y 1.5 veces respectivamente, $p < 0,05$) a la de las células control shCTRL1 tras la infección con virus SeV-DGs, a día 7 para las células shS1R1 y shS12R y a día 3 para las células shS1R3. Cabe destacar que el silenciamiento con el silenciador shS1R3 fue menos eficaz en este experimento que el de shS1R2 (**Figura 7.1.5 B**) y esto se refleja en un menor impacto en la estimulación de la inducción del mRNA de *ISG56* (**Figura 7.1.5 D**), reforzando la noción de que existe una relación inversa entre la magnitud de la respuesta antiviral y los niveles celulares de SIGMAR1. Además, cabe puntualizar que en las células A549 la respuesta diferencial frente a SeV-DGs sólo se observó con dosis de virus cien veces inferiores a las empleadas para Huh-7 y HEK293T y a tiempos de post-infección no mayores a 12 h, presumiblemente debido la potente inducción de la cascada dependiente de IFN-I, que podría enmascarar las diferencias relativamente pequeñas de la primera rama de la respuesta antiviral.

En conjunto, el fenotipo del silenciamiento de SIGMAR1 en tres líneas celulares que difieren en su capacidad de respuesta antiviral, sugieren un papel de SIGMAR1 en la regulación de la respuesta antiviral dependiente de RLRs y/u otros PRRs, pero independiente de IFN-I. De manera similar a las células Huh-7, las líneas celulares HEK293T y A549 muestran una relación inversa entre la magnitud la inducción de respuesta antiviral y los niveles de SIGMAR1 (**Figura 7.1.5**).

7.1.3 Respuesta antiviral frente a poly (I:C) citosólico en células Huh-7 deficientes en SIGMAR1

Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos con la infección por SeV-DGs en ausencia de variables como la entrada y replicación viral, la respuesta antiviral de las células Huh-7 deficientes en SIGMAR1 se estudió adicionalmente empleando otro estímulo prototípico de la vía de los RLRs: la transfección del análogo sintético de dsRNA poly(I:C). El poly(I:C) citosólico funciona como sustrato de RIG-I y MDA5 (**Sección 4.2**) (**Figura 7.1.1**); sin embargo, en este trabajo se empleó una preparación de poly(I:C) enriquecida en fragmentos de longitud corta (**Sección 6.17**), que son reconocidos preferentemente por RIG-I (**Sección 4.2.2**).

Las células Huh-7 deficientes en SIGMAR1 (shS1R2, shS1R3) y sus controles (shCTRL1, shCTRL2, shCTRL3) se transfectaron con dicha preparación de poly(I:C) (Sección 6.17) y se determinó la inducción del VSG *ISG56* a las 16 h tras la estimulación mediante RT-qPCR (Sección 6.25).

Como se muestra en la figura 7.1.6, las células Huh-7 deficientes en SIGMAR1 shS1R2 y shS1R3 muestran una inducción de *ISG56* significativamente superior (5 y 30 veces, respectivamente, $p < 0,001$) a la de las células control shCTRL1 frente a la estimulación con poly(I:C) citosólico (**Figura 7.16 B**), que se relaciona inversamente con los niveles de SIGMAR1 en estas células (**Figura 7.1.6 A**).

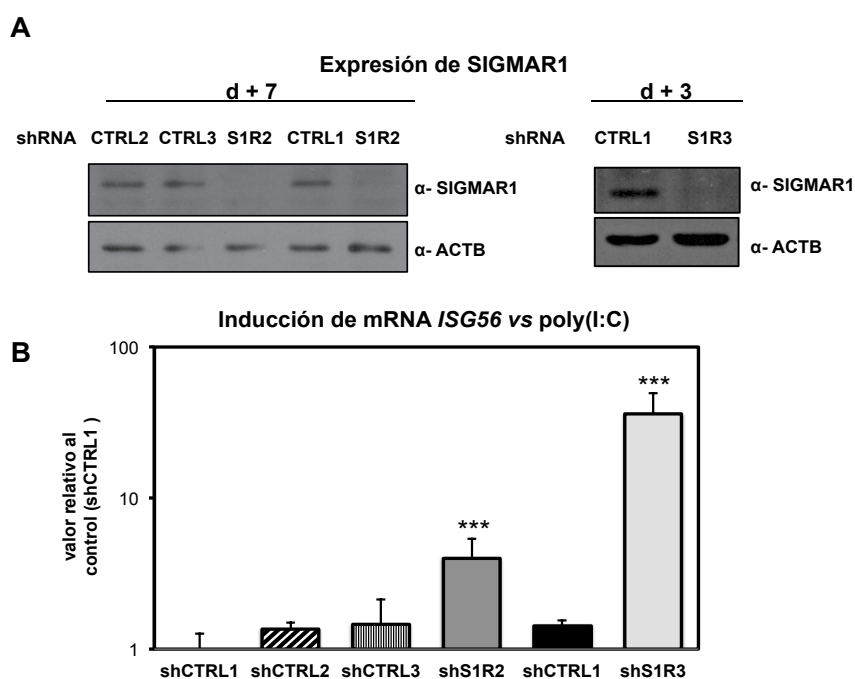


Figura 7.1.6 Inducción de *ISG56* frente a estimulación con poly(I:C) (16 h) en diferentes líneas de células Huh-7 deficientes en SIGMAR1 y células control. **A)** *Western Blot* frente a SIGMAR1 y β -actina (ACTB) de extractos de células deficientes de SIGMAR1 (shS1R2, shS1R3) y células control (shCTRL1, shCTRL2, shCTRL3) a día 7 post-transducción con vectores lentivirales para silenciamiento (día 3 para shS1R3 y su control). **B)** *Ratio* de inducción relativa al control shCTRL1 (Sección 6.18) del mRNA de *ISG56* frente a estimulación con SeV (16 h). Los datos se representan como promedio y desviación estándar ($n=9$ para shCTRL1, shS1R2, $n=3$ para shCTRL2, shCTRL3, shCTRL1 día 3 y para shS1R3). Los asteriscos representan la significancia estadística (valor de p) de la prueba de Kruskal Wallis con prueba posterior de Dunn para la comparación múltiple medias respecto a las células control shCTRL1; *** $p < 0,001$.

Estos datos refuerzan la hipótesis de que los niveles celulares de SIGMAR1 regulan la vía de los RLRs.

7.1.4 Respuesta a estímulo con IFNA2A en células Huh-7 deficientes en SIGMAR1

Para verificar si el efecto modulador SIGMAR1 sobre la respuesta antiviral involucra la vía de los RLRs y es independiente de señalización de IFN-I, como sugiere el fenotipo de las células HEK293T (incapaces de responder a IFN-I), células Huh-7 deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) y control (shCTRL1) se estimularon con distintas dosis de IFNA2A exógeno (Sección 6.20) y se evaluó la inducción del VSG/ISG *ISG56* mediante RT-qPCR (Sección 6.25) (**Figura 7.1.7 A**), así como la expresión del gen reportero luc bajo el control del elemento ISRE en células transfectadas con el plásmido reportero pISRE-Luc (Sección 6.4) (**Figura 7.1.7 B**).

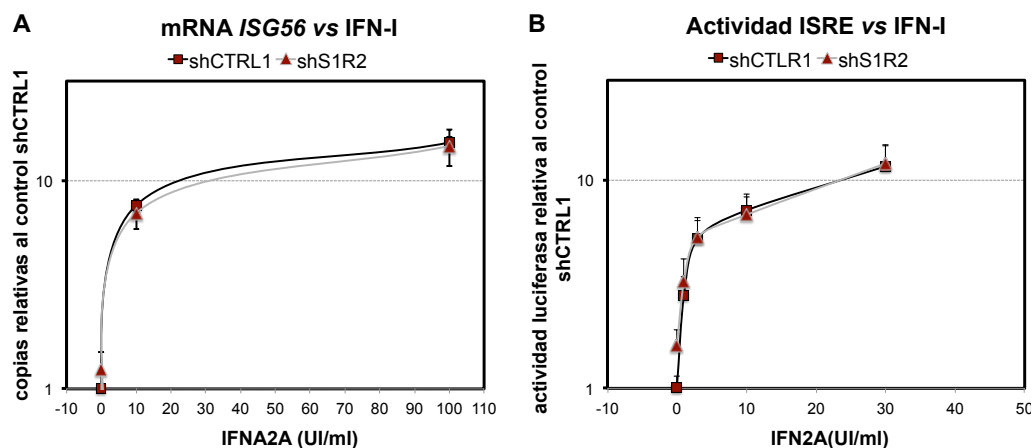


Figura 7.1.7 Respuesta de la vía de IFN-I en células deficientes en SIGMAR1 y células control. **A)** Inducción de *ISG56* e **B)** inducción de la transcripción dependiente del elemento ISRE en células deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) y células control (shCTRL1) tratadas con IFNA2A (0, 5, 10 y 100 UI/ml). Los datos se representan como promedio y desviación estándar (n=3). Prueba T de Student para datos no pareados para la comparación de medias entre las celulares deficientes en SIGMAR1 y las células control.

Como se muestra en la figura 7.1.7, las células Huh-7 shS1R2 y las células control shCTRL1 responden con una inducción de *ISG56* (**Figura 7.1.7 A**) y activación del elemento ISRE (**Figura 7.1.7 B**) similar frente a la estimulación de la vía de IFN-I en un rango de dosis no saturantes de IFNA2A.

En conjunto, los resultados de la inducción diferencial de *IFNB1* y VSGs de las células deficientes en SIGMAR1 frente a estimulación con sustratos canónicos de la vía de los RLRs pero no frente a la activación de la vía de IFN-I sugieren que los niveles de SIGMAR1 modulan la respuesta antiviral de la vía de los RLRs frente a virus de RNA en células humanas.

7.1.5 Respuesta de la vía de los RLRs frente a la estimulación por expresión de mediadores constitutivamente activos en células Huh-7 deficientes en SIGMAR1

Con el fin de determinar el nivel de la vía de los RLRs dependiente de SIGMAR1, las células Huh-7 deficientes en SIGMAR1 shS1R2 y las células control shCTRL1 se estimularon a distintos niveles de la cascada de señalización: 1) la activación de RLRs, 2) la inducción de la plataforma de señalización mediada por MAVS y 3) la activación del factor de transcripción IRF3 (Sección 4.2.2) (Figura 7.1.1).

Para esto, las células se co-trasfectaron según se describe en Sección 6.19 con un plásmido reportero de la actividad del promotor de *IFNB1* (pIFNb(-116/+72)Lucifer), un plásmido reportero bajo un promotor mínimo (pRenilla-Luc-null), como control de transfección y un plásmido control (pcDNA3) o plásmidos de expresión de mediadores o análogos constitutivamente activos de mediadores de la vía, que actúan como activadores a distintos niveles: 1) la región de los dominios CARD de RIG-I que funciona como análogo de RIG-I constitutivamente activo, 2) la proteína MAVS, que al sobreexpresarse promueve su agregación junto con la MAVS endógena, estimulando la vía a nivel de la activación de MAVS y 3) el mutante fosfomimético constitutivamente activo de IRF-3, IRF3-5D (Sección 6.4) (Figura 7.1.1). La expresión del gen reportero luciferasa se evaluó después de 16 horas tras la co-transfección con las distintas construcciones mediante ensayo de la actividad luciferasa (Sección 6.26).

En la figura 7.1.8 A se muestran los niveles de inducción de la actividad del promotor de *IFNB1* mediante el análisis de la actividad de la luciferasa de *Photinus pyralis* (Firefly) normalizados de acuerdo a la eficiencia de transfección determinada mediante la actividad de la luciferasa de *Renilla reniformis* (Renilla) en células control (shCTRL1) y deficientes en SIGMAR1 (shS1R2). La inducción del promotor de *IFNB1* frente a los estímulos RIG-I-CARD y MAVS es significativamente mayor en las células shS1R2 que en sus controles shCTRL1 ($p < 0,01$) (Figura 7.1.8 A), de manera similar a lo observado frente a la estimulación con los sustratos de RIG-I SeV-DGs y poly(I:C) (Secciones 7.1.1 y 7.1.3). Por el contrario, las células deficientes en SIGMAR1 y sus controles muestran una respuesta similar a la estimulación de la vía a nivel de la activación de IRF3 (Figura 7.1.8 A).

Como control de este experimento se realizó en paralelo el experimen-

to análogo empleando un plásmido reportero de la actividad promotora dependiente del elemento PPRE (del inglés, *peroxisome proliferator responsive element*) y la sobreexpresión del factor de transcripción PPARA (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha). Tanto los niveles de actividad constitutiva como estimulada por PPARA del elemento PPRE son similares entre células deficientes en SIGMAR1 y células control, reforzando que los fenómenos observados sobre el promotor de *IFNB1* son específicos y que SIGMAR1 regula la vía de los RLRs en un proceso que se encuentra a nivel de la activación MAVS o la formación del signalosoma, pero anterior a la fosforilación de IRF3.

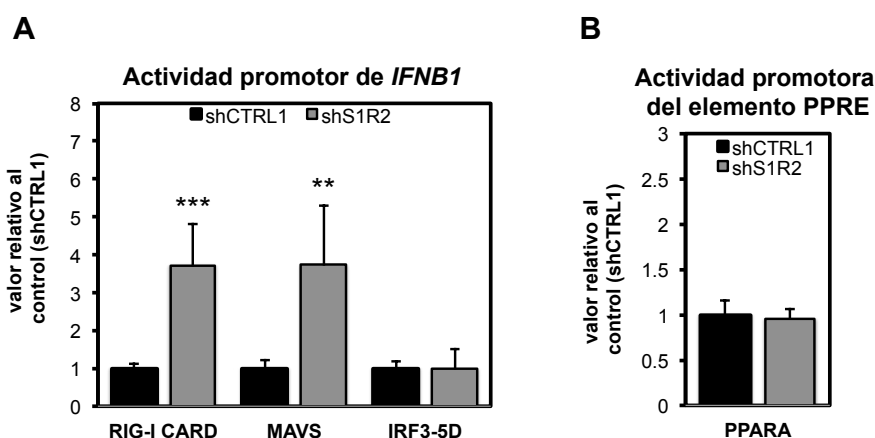


Figura 7.1.8 Inducción de *IFNB1* frente a estímulos de la vía de los RLRs en células Huh-7 deficientes en SIGMAR1 y células control. **A)** *Ratio* de inducción relativa a las células control shCTRL1 (Sección 6.18) de la expresión del reportero luciferasa expresado bajo el control del promotor de *IFNB1* en células deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) y células control (shCTRL1) transfectadas con los plásmidos de expresión de análogos constitutivamente activos de mediadores la vía de los RLRs (RIG-I-CARD, MAVS, IRF3-5D). **B)** *Ratio* de inducción relativa a las células control shCTRL1 de la expresión del reportero luciferasa expresado bajo el control del elemento de regulación transcripcional PPRE en células deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) y células control (shCTRL1) transfectadas con un plásmido de expresión del factor de transcripción PPARA. Los datos se representan como promedio y desviación estándar (n=9). Los asteriscos representan la significancia estadística (valor de p) de la prueba T de Student para datos no pareados para la comparación de medias entre shCTRL1 y shS1R2; ** p<0,01, *** p<0,001.

En conjunto, estos resultados sugieren que las células deficientes en SIGMAR1 tienen una capacidad incrementada de respuesta a estímulos de la vía de los RLRs o bien una capacidad incrementada de la activación de la señalización RLRs/MAVS, que es anterior o independiente de la activación de IRF3.

7.1.6 Permisividad a la infección de HCV_{TCP} de células Huh-7 deficientes en SIGMAR1 en ausencia de respuesta antiviral mediada por IRF3

Habiendo verificado la existencia de una modulación por SIGMAR1 sobre la respuesta antiviral de la vía de los RLRs (Secciones 7.1.1 a 7.1.5), quisimos determinar si la predisposición a una respuesta exacerbada de esta vía de las células deficientes en SIGMAR1 determina su fenotipo refractario a la infección por HCV, como sugiere el menor efecto del silenciamiento de SIGMAR1 sobre la replicación viral en la sublínea Huh-7.5.1 (Friesland, Mingorance *et al.* 2013).

Con el objetivo de estudiar la permisividad de células Huh-7 deficientes en SIGMAR1 y células control en ausencia de respuesta de la vía de los RLRs se generaron líneas deficientes en SIGMAR1 (shS1R1, shS1R2) y control (shCTRL1) a partir de líneas de Huh-7 que expresan la proteasa de BVDV, Npro (N-terminal protease) del virus de la diarrea viral bovina (BVDV), que tiene como sustrato el factor de transcripción IRF3 y por tanto, bloquea la respuesta de la vía antiviral de los RLRs (Figura 7.1.1), o bien células control transducidas con el vector vacío (pLKO.1) (Sección 6.13) (Figura 7.1.9).

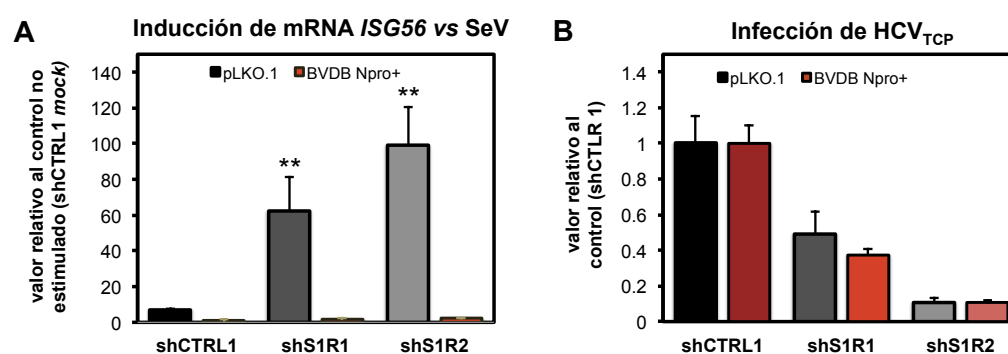


Figura 7.1.9 Inducción de *ISG56* frente a estimulación con SeV-DGs (16 h) y eficiencia de infección por HCV_{TCP} en células Huh-7-pLKO.1 y Huh-7-BVDV Npro+ deficientes en SIGMAR1 y células control. **A)** Ratio de inducción del mRNA de *ISG56* frente a estimulación con SeV (16 h) y **B)** eficiencia relativa de la infección por HCV_{TCP} relativa al control shCTRL1 en líneas células deficientes de SIGMAR1 (shS1R1 y shS1R2) y control (shCTRL1) a día 7 post-transducción con vectores lentivirales para silenciamiento (d + 7). Los datos se representan como promedio y desviación estándar (n=6). Los asteriscos representan la significancia estadística (valor de p) de la prueba T de Student para datos no pareados para la comparación de medias entre grupos pLKO.1 y BVDV Npro+; ** p<0,01.

En primer lugar, se verificó que la expresión de BDVB Npro suprime la respuesta antiviral frente a la estimulación con SeV-DGs tanto cen células defi-

cientes en SIGMAR1 (shS1R1, shS1R2) como en células control (shCTRL1), confirmando que en ambos casos la respuesta antiviral frente a SeV es dependiente de IRF3 (**Figura 7.1.9 A**).

En estas condiciones, las células shS1R1, shS1R2 y shCTRL1 se infectaron con HCV_{TCP} para evaluar su permisividad a HCV en ausencia de respuesta antiviral. Como se muestra en la figura 7.1.9 B, las células deficientes en SIGMAR1 shS1R1 y shS1R2 son refractarias a la infección por HCV_{TCP} independientemente de la capacidad de respuesta antiviral mediada por IRF3 (**Figura 7.1.9 B**). Estos datos indican que la respuesta antiviral exacerbada de la vía de los RLRs de las células deficientes de SIGMAR1 no determina su fenotipo restrictivo sobre la replicación de HCV.

Este resultado es consistente con el eficiente bloqueo de la respuesta de la vía de los RLRs por la proteasa NS3/4A de HCV (**Figura 7.1.1**) (**Sección 4.2.5**), e indica que el efecto proviral de SIGMAR1 en la infección por HCV debe implicar otro mecanismo independiente de su acción como modulador de respuesta antiviral.

7.1.7 Impacto de la deficiencia de SIGMAR1 en la replicación de un virus sensible a IFN-I

Para evaluar el efecto antiviral de la potenciación de la respuesta innata antiviral mostrada por las células deficientes en SIGMAR1, se estudió el efecto de la deficiencia de SIGMAR1 sobre la replicación de un virus sensible a IFN-I, el virus de la estomatitis vesicular (VSV), cuya replicación ha sido previamente probada independiente de SIGMAR1 (Friesland, Mingorance *et. al*, 2013).

Para esto, células A549 deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) y control (shCTRL1) se inocularon con preparación de VSV a una MOI de 0,001 y se determinó el título viral mediante ensayo de placas de lisis a diferentes tiempos post-infección (**Sección 6.21**). Como control de la respuesta a estímulo viral, en paralelo las mismas células se estimularon con SeV-DGs y se determinó la inducción de VSGs mediante *Western blot* (**Figura 7.1.10**).

Como se muestra en la figura 7.1.10, las células shS1R2 mostraron una mayor expresión de ISG56 y MX1 a las 12 h frente a la estimación con SeV-DGs (**Figura 7.1.10 A**) a la vez que una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,01$) de la permisividad a la replicación de VSV (10 veces) respecto a las células control shCTRL1 (**Figura 7.1.10 B**).

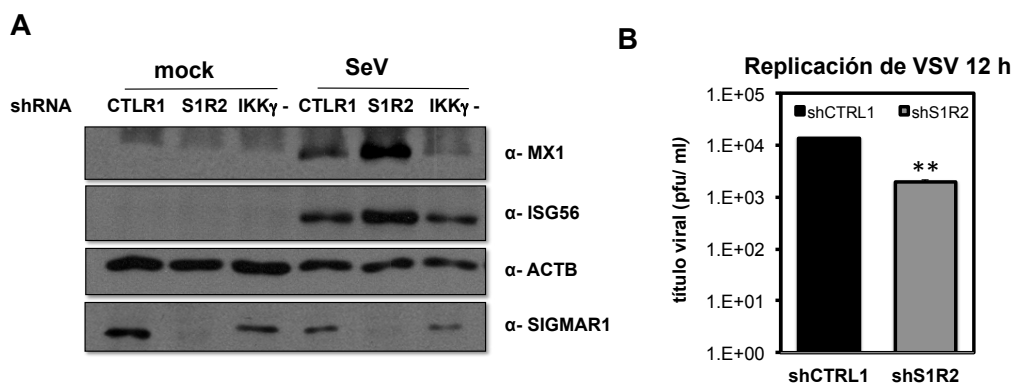


Figura 7.1.10 Inducción de respuesta de VSGs y replicación de virus sensible a IFN-I en células A549 deficientes en SIGMAR1. **A)** *Western Blot* frente a MX1, ISG56, SIGMAR1 y β -actina (ACTB) de extractos de células A549 deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) y células control (shCTRL1). Células Huh-7 que expresan una variante dominante negativa de la IKBKG (denotadas como IKK γ -) se emplearon con control negativo de la respuesta a la estimulación viral. **B)** Replicación de VSV en células A549 deficientes en SIGMAR1 (shS1R1 y shS1R2) y células control (shCTRL1). Los datos se representan como promedio y desviación estándar de un experimento representativo (n=6). Los asteriscos representan la significancia estadística (valor de p) de la prueba T de Student para datos no pareados para la comparación de medias entre las células shCTRL1 y shS1R2; ** p<0,01.

Este resultado indica que la respuesta innata antiviral exacerbada mostrada por las células deficientes en SIGMAR1 tiene un impacto sobre la cinética de replicación de virus sensibles a IFN-I.

7.2 Estudio del papel de la proteína SIGMAR1 en la regulación de la proteostasis y la localización de las proteínas virales de HCV en sistemas de expresión de la poliproteína viral en ausencia de replicación

Previamente en nuestro grupo se había descrito que los niveles de SIGMAR1 en las células Huh-7 son limitantes al inicio de la infección por HCV en cultivo celular (HCV_{CC}) pero no afectan la permisividad a la entrada de partículas virales pseudotipadas (HCV_{PP}, modelo de entrada) ni la traducción mediada por el IRES de HCV a partir de RNA subgenómico viral (modelo de traducción primaria: la traducción de proteínas virales a partir de genomas virales entrantes en las primeras horas de la infección), indicando que el defecto de las células deficientes en SIGMAR1 en la acumulación de RNA a partir de un replicón subgenómico o el RNA genómico viral en un ciclo único de infección por HCV_{CC} debía involucrar un paso del ciclo viral entre la traducción primaria y el establecimiento de los complejos de replicación funcionales (Friesland, Mingorance *et al.* 2013).

El sistema sustitutivo empleado para el estudio de la traducción primaria de HCV utiliza una prueba indirecta: la evaluación de la proteína reportera luciferasa que se traduce a partir de una construcción de RNA dicistrónico que expresa las proteínas del complejo replicasa (NS3-NS5B) bajo el IRES de ECMV y la proteína reportera luciferasa bajo el IRES de HCV, en ausencia de replicación. Con este modelo, se determinó que la traducción primaria de HCV o, más específicamente, la capacidad de traducción mediada por su IRES, no está afectada en las células deficientes en SIGMAR1 (Friesland, Mingorance *et al.* 2013). Sin embargo, no podemos ignorar que la síntesis de la poliproteína viral, una proteína de integral de membrana de 3000 aminoácidos que debe traducirse en el ER y procesarse co-traduccionalmente por proteasas celulares y virales, y adoptar una conformación compleja en la membrana del ER en asociación con lípidos y proteínas celulares (Sección 4.1.3.2), tiene diferentes requerimientos que la proteína reportera, que es una proteína relativamente pequeña y citosólica. Además de la eficiencia de traducción mediada por el IRES, otros factores son claves en el destino de la poliproteína viral: su procesamiento proteolítico, modificaciones postraduccionales, interacciones en la membrana y conformación, su localización, así como su estabilidad. Por todo esto, con el fin de describir mejor la función de SIGMAR1 en el establecimiento de la infección por HCV, nos propusimos conocer si SIGMAR1 tiene un papel en el destino de la poliproteína viral tras la traducción primaria, mediante la

evaluación de la funcionalidad, acumulación y distribución de las proteínas virales individuales en las células deficientes en SIGMAR1.

7.2.1 Acumulación de proteínas no estructurales de HCV en sistema de expresión mediante plásmidos pTM de la región NS3-NS5B de la poliproteína viral de genotipo 2a en células Huh-7 deficientes en SIGMAR1

Para estudiar el destino de la poliproteína de HCV en ausencia de replicación, se empleó un sistema sustitutivo de expresión del fragmento replicasa NS3-NS5B de la poliproteína del genotipo 2a mediante expresión de esta región de la poliproteína viral bajo el promotor de la polimerasa del bacteriófago T7 (T7 pol) a partir de un plásmido pTM, pTM-NS3-5B, y un plásmido de expresión de T7 pol, pCAGGSS-T7 (Sección 6.4), que se co-transfectaron de acuerdo a lo descrito en Sección 6.16. Los niveles de RNA molde y proteína NS3 acumulados en 36 h en células deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) y células control (shCTRL1) se evaluaron mediante RT-qPCR (Sección 6.25) empleando los oligonucleótidos NS3ORF2a (Sección 6.25 Tabla 6.I) y mediante *Western blot*, empleando el anticuerpo frente a NS3 genotipo 2a (Sección 6.6), respectivamente.

En primer lugar se observó que el transcrito de RNA molde de la región codificante de NS3 se acumula menos en 36 h en las células deficientes en SIGMAR1 que en las células control (datos no mostrados). Así, para obtener una cantidad de molde de RNA semejante en ambos tipos celulares a 36 h empleando idénticas cantidades de plásmido pTM fue necesario ajustar las cantidades a fin de co-transfectar una mayor cantidad plásmido de expresión de la T7 pol en las células deficientes en SIGMAR1 que en las células control.

En la figura 7.2.1 se muestra que, en condiciones donde las células deficientes en SIGMAR1 shS1R2 y las células control shCTRL1 expresan igual cantidad de molde de RNA, la cantidad de proteína individual NS3 acumulada es menor en las células shCTRL1 respecto a las shS1R2 (**Figura 7.2.1 A y B**).

Estos resultados evidencian que, a pesar de que la poliproteína es capaz de traducirse y procesarse en la membrana del ER, al menos hasta la región de NS4A (suficiente para el autoproteólisis de NS3), la eficiencia de la traducción, procesamiento o la acumulación de la proteína individual NS3 están disminuidas en las células deficientes en SIGMAR1.

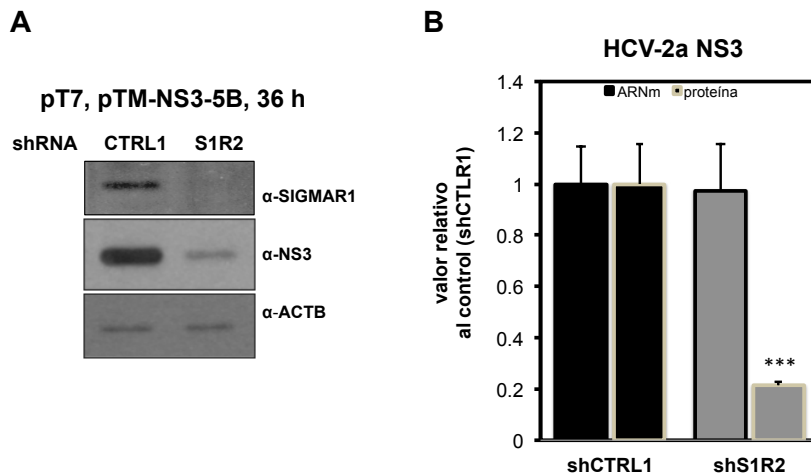


Figura 7.2.1 Acumulación de RNA y proteína viral HCV NS3 (genotipo 2a) expresados con el sistema de plásmidos pT7/ pTM NS2-NS5B en células deficientes en SIGMAR1 y células control. A) *Western Blot* frente a SIGMAR1, la proteína viral NS3 de genotipo 2a y β-actina (ACTB) **B)** *Ratio* de la abundancia relativa a las células control shCTRL1 del RNA molde determinado por RT-qPCR y de la abundancia relativa de proteína determinado por la intensidad normalizada de la señal en *Western Blot* calculada usando el software ImageJ de la proteína viral HCV NS3 de genotipo 2a en células deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) y células control (shCTRL1) a las 36 h post-transfección con los plásmidos de expresión. Los datos se representan como promedio y desviación estándar (n=9). Los asteriscos representan la significancia estadística (valor de p) de la prueba T de Student para datos no pareados para la comparación de medias entre shS1R2 y shCTRL1; *** p<0,001.

7.2.2 Acumulación de proteínas estructurales y no estructurales de HCV en sistema de expresión mediante infección con un vector vacunal/vacunina (MVA) recombinante en células deficientes en SIGMAR1

Adicionalmente y para solventar las dificultades presentadas por el sistema de co-transfección de plásmidos, se empleó un segundo sistema de expresión de la poliproteína de HCV en ausencia de replicación que consiste en la expresión a partir de un virus MVA recombinante (MVA-HCV) que expresa a altos niveles la mayor parte de la poliproteína viral del genotipo 1a (desde Core hasta las primeras dos terceras partes de NS5B) (Sección 6.2.3).

En este caso, las células deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) y sus controles (shCTRL1) fueron infectadas con el virus MVA-HCV a una MOI de 10 durante 1 h (Sección 6.23) y los niveles de RNA y proteína de las proteínas virales no estructurales NS3 y NS5A y la proteína estructural core se determinaron mediante RT-qPCR (Sección 6.25) y *Western blot* (Sección 6.6), respectivamente a tiempos 2, 8, 16, 24 h post-infección. Los niveles de acumulación

de RNA resultaron similares en ambos tipos celulares en todos los tiempos. Sin embargo, la cinética de acumulación de proteínas mostró una acumulación diferente de NS3 y NS5A desde las 2 h post-infección, con un aumento correlativo hacia las 8 horas, mientras las diferencias permanecen aparentemente constantes entre las 8 y las 24 h (datos no mostrados). Como muestra la figura 7.2.2 A los niveles de acumulación de las proteínas no estructurales NS3 y NS5A a 6 h post-infección con MVA-HCV son menores en las células shS1R2 respecto a las shCTRL1, mientras la acumulación de la proteína estructural core es similar en ambos tipos celulares (**Figura 7.2.2 A**).

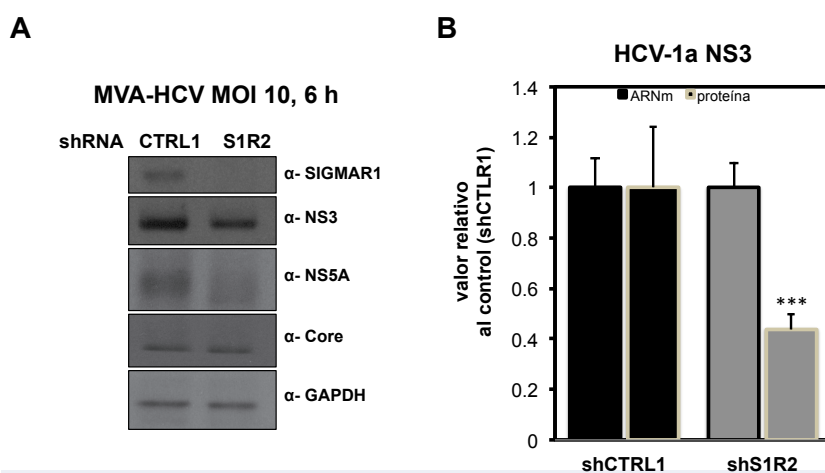


Figura 7.2.2 Acumulación de RNA y proteína viral HCV NS3 (genotipo 1a) expresados mediante infección con el virus MVA-HCV en células deficientes en SIGMAR1 y células control. **A)** Western Blot frente a SIGMAR1, la proteína viral NS3 de genotipo 1a y β -actina (ACTB), y **B)** Ratio de la abundancia relativa a las células control shCTRL1 del RNA molde determinado por RT-qPCR y de la abundancia relativa de proteína determinado por la intensidad normalizada de la señal en Western Blot calculada usando el software ImageJ de la proteína viral HCV NS3 de geotipo 1a en células deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) y células control (shCTRL1) a las 6 h post-infección con el virus recombinante MVA-HCV. Los datos se representan como promedio y desviación estándar (n=9). Los asteriscos representan la significancia estadística (valor de p) de la prueba T de Student para datos no pareados para la comparación de medias; *** p<0,001.

La acumulación similar de la proteína estructural core en ambos tipos celulares sugiere que la iniciación de la traducción de la poliproteína viral es normal en las células deficientes en SIGMAR1 y que SIGMAR1 debe regular la acumulación de las proteínas en un paso posterior. La regulación diferencial específica de algunas proteínas virales como NS3 y NS5A, pero no de core, presumiblemente obedece a una distinción en cuanto a localización (citoplasmática vs integral de membrana), posiblemente determinada por los diferentes mecanismos de maduración y estabilidad post-traduccional.

7.2.3 Tamaño y distribución de los sitios de co-localización entre las proteínas virales no estructurales NS3 y NS5 de HCV expresadas en ausencia de replicación viral (sistema MVA-HCV) en células deficientes en SIGMAR1

La expresión de la poliproteína de HCV es suficiente para inducir la formación de las “redes membranosas” que contienen las estructuras de los complejos de replicación viral (Romero-Brey, Merz *et al.* 2012). Para estudiar el efecto de la deficiencia de SIGMAR1 sobre la localización intracelular de las proteínas virales no estructurales NS3 y NS5A, componentes del complejo de replicación viral, se empleó el sistema de expresión de la poliproteína viral basado en la infección con MVA-HCV (6 h) y estudiamos su patrón de expresión mediante inmunofluorescencia (Sección 6.27 y 6.28).

Para obtener distintos niveles de expresión de proteína viral, se emplearon dos multiplicidades de infección (MOI 2 y MOI 10), que pensamos podrían reflejar dos estadios distintos de acumulación de proteína viral y formación de estructuras de membrana relevantes. En cada caso, se cuantificó mediante RT-qPCR (Sección 6.25) el RNA molde de NS3, constatando que ésta era la misma en células deficientes y control (datos no mostrados).

Como se muestra en la figura 7.2.3, a las 6 h post-infección a MOI 2 las células control (shCTRL1) muestran estructuras marcadas fundamentalmente por NS5A y algunas en las que colocalizan NS3 y NS5A, mientras que en las células deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) la tinción de ambas proteínas es más difusa, con sitios marcados mayormente sólo con NS5A, más pequeños que los observados en las células control, y escasos sitios de colocalización de NS5A y NS3 (**Figura 7.2.3, paneles superiores**).

Estas diferencias pudieran reflejar un retraso en el proceso de acumulación de las proteínas necesarias para formar estructuras de membrana, ya que como se observa en el panel inferior derecho de la figura 7.2.3, en las células deficientes en SIGMAR1 infectadas a MOI 10 se evidencia de manera similar al control, una predominancia de los puntos de co-localización de ambas proteínas (**Figura 7.2.3 paneles inferiores**).

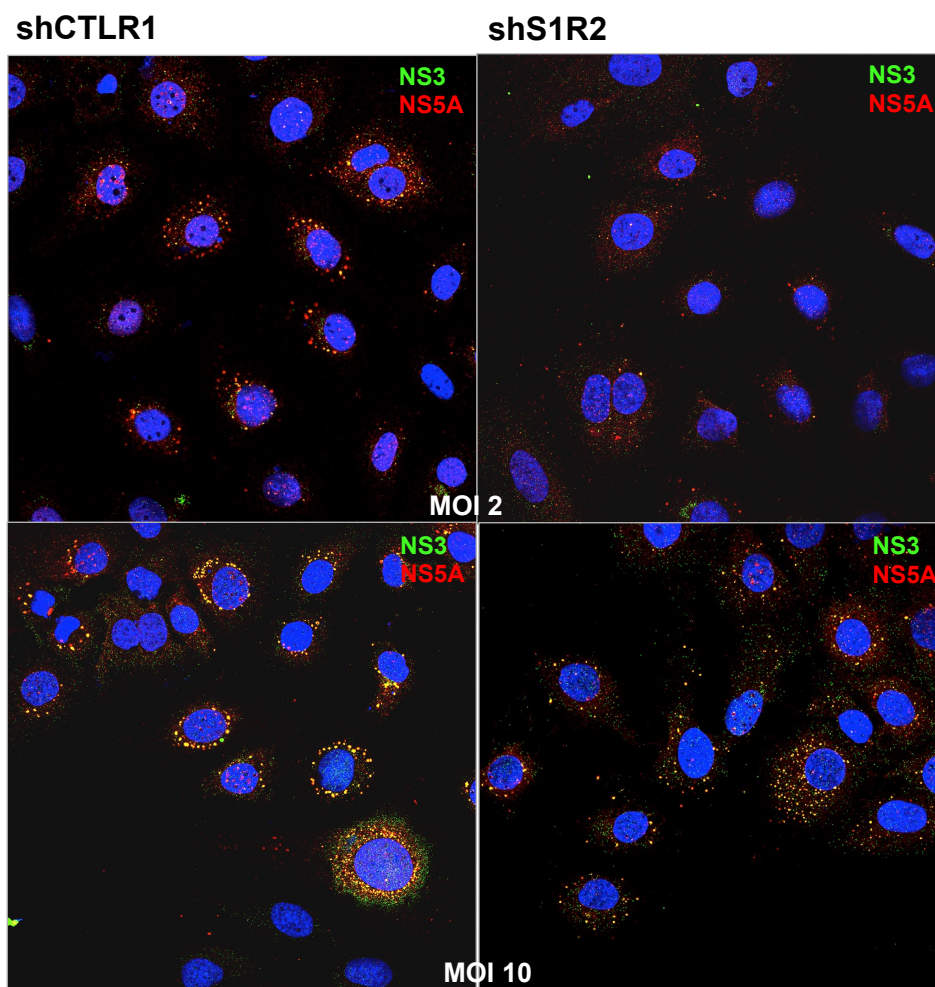


Figura 7.2.3 Co-inmunotinción de las proteínas no estructurales de HCV NS3 y NS5A en células deficientes en SIGMAR1 y células control infectadas con MVA-HCV a MOI 2 y MOI 10. Imágenes de microscopía de fluorescencia de un campo representativo de la inmunotinción de las proteínas virales NS3 y NS5A de HCV en las células deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) y células control (shCTRL1) infectadas con MVA-HCV a MOI 2 (paneles superiores) o MOI 10 (paneles inferiores).

El análisis estadístico de las áreas de co-localización de NS3-NS5A en 300 células de cada línea celular indica que las células deficientes en SIGMAR1 y las células control muestran diferencias en la distribución de tamaños de estos sitios de co-localización, con las mayores diferencias entre las estructuras de mayores tamaños (**Figura 7.2.4 B**). Estos resultados sugieren que, a pesar de la expresión de poliproteína funcional (al menos hasta la región NS3/4A) en las células deficientes en SIGMAR1, éstas células muestran una deficiencia en la acumulación de algunas de las proteínas virales, que podría llevar, o bien ser una consecuencia, de un retraso en la formación y desarrollo de las estructuras

de membranas donde se forman los complejos de replicación viral.

Además, como se muestra en la figura 7.2.4, en la condición de mayor multiplicidad (MOI 10), las células control muestran un patrón anillado perinuclear de colocalización de NS3 y NS5A, mientras en las células deficientes en SIGMAR1 no se observa ese patrón anillado, sino más bien las estructuras de colocalización son más pequeñas y muestran una distribución aparente más difusa en el citoplasma (**Figura 7.2.4 A**). Este distinto patrón de tinción sugiere un efecto adicional de la deficiencia de SIGMAR1 sobre la distribución y localización intracelular de estas proteínas virales.

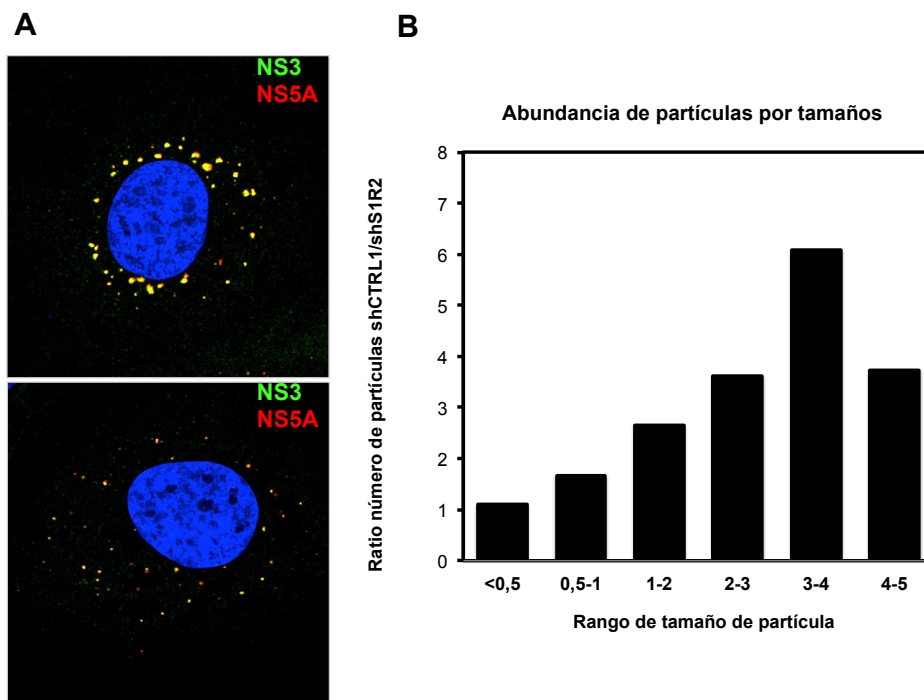


Figura 7.2.4 Co-inmunotinción de las proteínas no estructurales de HCV NS3 y NS5A en células deficientes en SIGMAR1 y células control infectadas con MVA-HCV a MOI 10. **A)** Imágenes de microscopía de fluorescencia de una célula representativa de la inmunotinción de las proteínas virales NS3 y NS5A de HCV e **B)** histograma de la cuantificación (en 300 células) de la cantidad frente al área de las partículas de co-localización NS3-NS5A en las células deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) y células control (shCTRL1) infectadas con MVA-HCV a MOI 10.

En conjunto, estos resultados sugieren que SIGMAR1 tiene un papel en la regulación de la proteostasis y localización de las proteínas virales de HCV independiente de la replicación viral que pudiera estar en la base de su función proviral en el establecimiento de la replicación viral.

7.3 Perfil transcriptómico y proteómico diferencial de células Huh-7 deficientes en SIGMAR1

La proteína Receptor SIGMAR1 ha sido relacionada con diversas funciones fisiológicas centrales como la respuesta a estrés y la supervivencia celular (Sección 4.3.4) y está asociada genéticamente con enfermedades neurodegenerativas humanas como enfermedad lateral amiloide (ALS), enfermedad de Huntington (HD) y enfermedad de Alzheimer (AD)(revisado en (Nguyen, Lucke-Wold *et al.* 2015) (Sección 4.3.5). Más recientemente en nuestro laboratorio se ha revelado que SIGMAR1 tiene un papel proviral en el establecimiento de la infección por el virus de la hepatitis C (HCV) (Friesland, Mingorance *et al.* 2013), posiblemente modulando el destino de las proteínas virales requeridas para la formación de la replicasa viral (Sección 7.2). Además, hemos postulado que SIGMAR1 modula negativamente la respuesta antiviral innata frente a virus (Sección 7.1). Sin embargo, los mecanismos moleculares de sus funciones se desconocen.

En este trabajo hemos realizado un estudio no sesgado del transcriptoma y proteoma diferencial de las células Huh-7 deficientes en SIGMAR1 para obtener nuevos conocimientos sobre las funciones celulares de SIGMAR1, sus posibles mecanismos de regulación de los procesos celulares con los que se ha relacionado previamente, así como los descritos en las Secciones 7.1 y 7.2 de esta tesis doctoral.

7.3.1 Estudio transcriptómico y proteómico y diferencial de células Huh-7 deficientes en SIGMAR1

Con el objetivo de obtener nuevas nociones sobre las funciones de la proteína SIGMAR1 se realizó un estudio transcriptómico mediante secuenciación masiva de RNA (RNAseq) de células deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) o células control (shCTRL1) (n=2) (Sección 6.29). El análisis de las secuencias de RNA celular de las células shS1R2 y shCTRL1 permitió identificar 60675 transcritos (Sección 7.3.1). Imponiendo un valor de corte de probabilidad de falsos negativos (FDR, del inglés *false discovery rate*, cuantificado como valor p ajustado y denotado como q) para la detección de diferencias significativas menor que 0,05 se hallaron 3373 transcritos diferencialmente abundantes entre las líneas celulares deficientes en SIGMAR1 y las control (**Figura 7.3.1 A; en azul**): 3304 secuencias codificantes anotadas, 1 secuencia codificante de

proteína no caracterizada (H3BQ85) y 67 secuencias no codificantes. De las secuencias codificantes, 1911 se encontraron en niveles mayores y 1394 en niveles menores en células deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) respecto a las células control (shCTRL1). Por brevedad en la definición, éstos son referidos en el texto como **inducidos** o **reprimidos** respectivamente. El diagrama de la figura 7.3.1 A muestra los resultados del análisis de transcriptómica diferencial expresados como *ratio* de la abundancia (denotado en la figura como FC, del inglés *fold change*) de cada transcrito identificado en las células shS1R2 respecto a las células shCTRL1. En color azul se destacan los 3373 transcritos que resultaron en diferencias estadísticamente significativas entre las células deficientes en SIGMAR1 y las células control ($q < 0,05$) (**Figura 7.3.1 A**). Los cambios de niveles de expresión que resultaron estadísticamente significativos para el valor de q seleccionado, variaron en el rango de -3,95 a + 4,92 veces. Los niveles de mRNA de SIGMAR1 aparecieron disminuídos tres veces en las células shS1R2 respecto a los valores de las células shCTRL1.

Como complemento a este estudio se realizó en paralelo un estudio proteómico cuantitativo mediante marcaje isobárico con iTRAQ-8plex y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (Sección 6.30) a partir de extractos totales células de células deficientes en SIGMAR1 shS1R2 y células control shCTRL1 ($n=4$). El análisis proteómico permitió identificar inequívocamente 3502 proteínas tanto en las células shS1R2 como en las shCTRL1. La proteína SIGMAR1 no fue identificada en el proteoma de ninguna de las dos líneas celulares, debido probablemente a su relativamente baja abundancia en el proteoma celular, por lo que no fue posible cuantificar por este método los niveles de silenciamiento de SIGMAR1 obtenidos con el silenciador shS1R2, que fueron comprobados mediante *Western blot* (**Figura 7.3.1 D**). Este hecho ejemplifica una desventaja de esta técnica: cambios muy relevantes pueden ser inapreciables debido a la sensibilidad relativamente baja de la técnica de identificación. De las 3502 proteínas identificadas 208 (5,9%) se encontraron en niveles significativamente diferentes entre células deficientes en SIGMAR1 y sus controles, considerando un valor de corte $q < 0,05$. De estas 208 proteínas, 148 presentaron niveles mayores y 60 niveles menores en las células deficientes en SIGMAR1 shS1R2 que en células control shCTRL1. El diagrama de la figura 7.3.1 B muestra los resultados del análisis de proteómica diferencial expresados como *ratio* de la abundancia (denotado en la figura como FC) de cada proteína identificada en las células shS1R2 respecto a las células shCTRL1. En color azul se destacan las 208 identificaciones que resultaron en diferencias estadísticamente significativas ($q < 0,05$). Como se ob-

serva en el diagrama, los cambios en los niveles de proteínas que resultaron estadísticamente significativos con el valor de q impuesto fueron de magnitud moderada, variando entre 0,3 y 2,3 veces en las células shS1R2 respecto a las células control shCTRL1 (**Figura 7.3.1 B**).

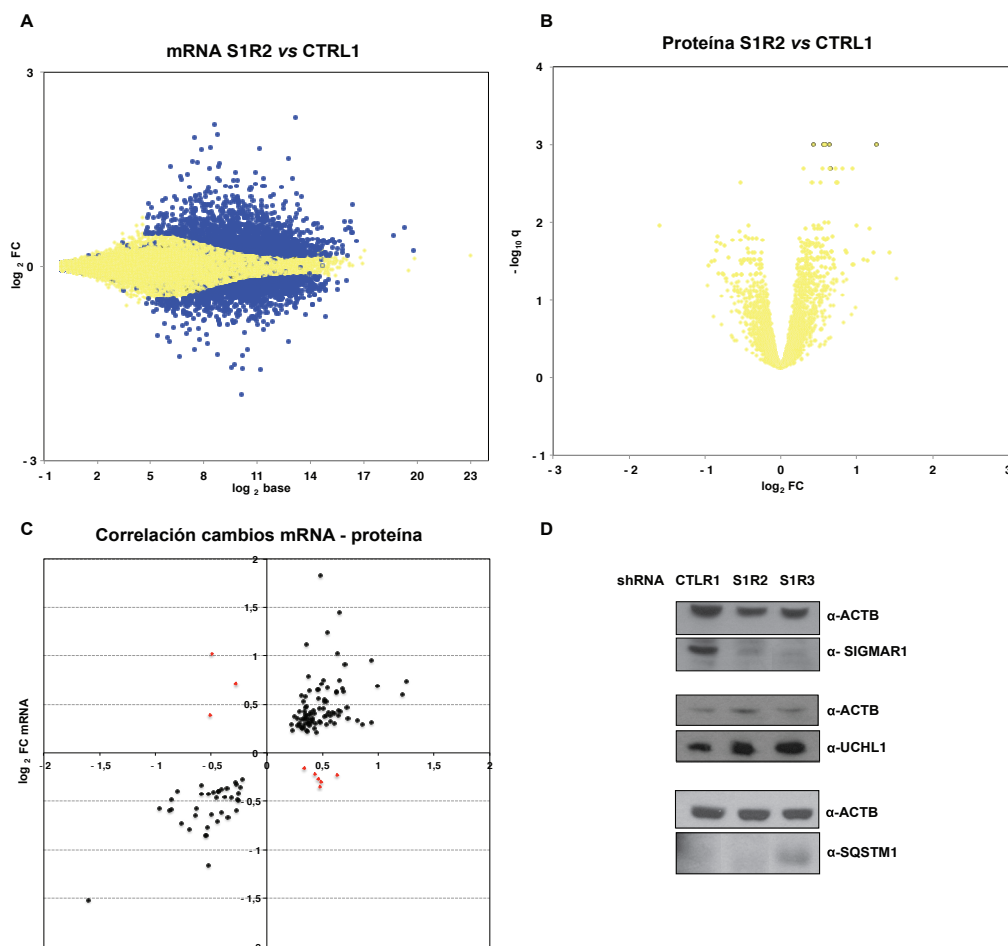


Figura 7.3.1 Datos de transcriptómica y proteómica diferencial de células deficientes en SIGMAR1

A) Gráfico de magnitud (FC: *fold change*) y significancia estadística de las diferencias (base: valor que representa la abundancia de lecturas por millón); q : valor de FDR en los niveles celulares de los transcritos de RNA y **B)** proteínas identificadas en los experimentos de transcriptómica y proteómica diferencial de células deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) y células control (shCTRL1) expresados como *ratio* shS1R2/shCTRL1. Cada punto representa transcrito de RNA o proteína. En color azul se representan los transcritos de RNA y las proteínas con cambios significativos entre las células shS1R2 y las células shCTRL1 ($q < 0,05$). **C)** Gráfico de correlación entre la magnitud de las diferencias a nivel de RNA y de proteína y de las proteínas que presentaron cambios significativos entre las células shS1R2 y las células shCTRL1 a ambos niveles ($q < 0,05$). P: coeficiente de correlación de Pearson. **D)** *Western blot* frente a proteínas SIGMAR1, UCHL1 y SQSTM1 y β -actina (ACTB) de extractos de células deficientes en SIGMAR1 (shS1R2 o shS1R3) y células control (shCTRL2).

En el análisis de transcriptómica diferencial 140 de las 208 proteínas con cambios significativos en la proteómica también presentaron diferencias significativas a nivel de mRNA entre las células deficientes en SIGMAR1 y las células control. La correlación existente entre las magnitudes de los cambios (\log_2FC) a nivel de proteína y mRNA de estas 140 proteínas (**Figura 7.3.1C**) (coeficiente de Pearson=0,78) muestra que en la mayoría de estas proteínas (131 de 140), los cambios de niveles de proteína se relacionan directamente con cambios a nivel de mRNA. Estas proteínas, que en adelante y por simplificar la nomenclatura son referidas como **reguladas transcripcionalmente**, representan la mayoría de las proteínas que presentan cambios significativos en sus niveles en las células deficientes en SIGMAR1 (131 de 208), apuntando a que, probablemente, parte de los fenotipos de las células deficientes en SIGMAR1 responden a una regulación a nivel transcripcional.

La minoría restante de las proteínas que muestran una acumulación diferencial tanto a nivel de mRNA como de proteína (9/140), sin embargo, mostró cambios de expresión en sentidos opuestos a los cambios en mRNA (**Figura 7.3.1 C; en rojo**), que deben responder a una regulación post-transcripcional. Además, un tercer grupo de proteínas (77 de las 208), mostró cambios de abundancia sin mostrar cambios significativos de los niveles de los transcritos de su mRNA ($q>0,05$), lo que también sugiere una regulación post-transcripcional. Para limitar el número de falsos negativos en el análisis de este último grupo de proteínas, de estas 77 proteínas se seleccionaron aquellas que en las pruebas estadísticas del análisis transcriptómico resultaron con una $q>0,5$ (61/77) y un mínimo de 1000 lecturas por millón. Estas 61 proteínas con cambios en proteómica sin cambios significativos en mRNA, junto a las 9 anteriormente mencionadas donde los cambios de mRNA y de proteínas resultaron opuestos, en adelante y por simplificar se referirán como **reguladas post-transcripcionalmente** (70 de 208).

Entre las 131 proteínas **reguladas post-transcripcionalmente** se incluyen 93 proteínas cuyos niveles de mRNA y proteína son mayores, que en lo adelante se refieren como **sobre-reguladas**, y 38 proteínas cuyos niveles tanto de mRNA como de proteína son menores, y se refieren como **sub-reguladas**, en las células deficientes en SIGMAR1 respecto a las células control (**Anexos Tabla I**).

Por su parte, el grupo de las 70 proteínas **reguladas post-transcripcionalmente** incluye 51 proteínas **sobre-reguladas** y 19 **sub-reguladas** en las células deficientes en SIGMAR1 (**Anexos Tabla II**).

Los datos de transcriptómica y proteómica correlacionan notablemente ($P=0,78$) a pesar de provenir de técnicas muy distintas en cuanto a sensibilidad y rango dinámico y partir de réplicas biológicas independientes, validando mutuamente los cambios identificados con ambas técnicas. Como validación independiente de estos datos se verificó mediante *Western blot* la expresión diferencial de UCHL1 y SQSTM1, dos proteínas cuya expresión diferencial fue identificada en los experimentos de proteómica y transcriptómica. Como se muestra en la figura 7.3.1 D los niveles de la proteína UCHL1 son mayores en células deficientes en SIGMAR1 shS1R2 que en células control shCTRL1. De manera análoga, los niveles de SQSTM1 son mayores en células deficientes en SIGMAR1 shS1R3, donde el silenciamiento es más pronunciado que en las células shS1R2, en la que los niveles de SQSTM1 resultaron indetectables, como en células shCTRL1. Estos datos validan con una técnica independiente que el análisis del estudio de proteómica diferencial de acuerdo al criterio seguido para considerar diferencias significativas permite encontrar candidatos con diferencias apreciables mediante técnicas menos sensibles. Además, las diferencias mostradas por los silenciadores shS1R2 y shS1R3 en *Western blot* sugieren que la magnitud de los cambios observados es dependiente del nivel de silenciamiento de SIGMAR1 (**Figura 7.3.1 D**).

7.3.2 Análisis funcional de datos de la proteómica y transcriptómica diferencial de células Huh-7 deficientes en SIGMAR1

Como punto de partida del análisis funcional de los resultados obtenidos en [Sección 7.3.1](#) las identificaciones se clasificaron según el sistema de clasificación PANTHER (del inglés *protein analysis through evolutionary relationships*) del Gene Ontology (GO) Consortium, atendiendo a los términos GO de PROCESOS BIOLÓGICOS, FUNCIONES MOLECULARES, CLASES DE PROTEÍNAS Y COMPONENTES CELULARES. De esta manera, los grupos de proteínas clasificadas en *términos GO* se sometieron a pruebas de sobre-representación (ORA, del inglés *over-representation analysis*) usando la base de datos de anotaciones funcionales GO-Slim y tomando como referencia la base de datos de proteínas humanas de UniProt (*Universal Protein Resource*) (The Uniprot Consortium 2008), con el fin de identificar procesos biológicos, funciones moleculares, clases de proteínas y componentes celulares sobre-representados en el grupo de proteínas diferencialmente reguladas ([Sección 6.31](#)).

En primer lugar se analizaron las proteínas para las que se verificó regulación diferencial tanto a nivel de péptidos como de RNA ($q<0,05$). En se-

gundo lugar, se analizaron las proteínas que presentaron una abundancia relativa diferencial ($q < 0,05$) sin evidencias de regulación transcripcional ($q > 0,5$). Finalmente, con el fin de aprovechar la información encerrada en los datos de transcriptómica, se analizaron todos los datos de transcritos significativamente regulados en el estudio de RNAseq ($q < 0,05$). Para la representación de los resultados de las pruebas ORA se ajustaron los parámetros ajuste de valor de p y número de componentes por categorías, en función del tamaño de la muestra y del número de categorías obtenidas en el análisis a fin de que éste resultara informativo (Sección 6.31)(Sección 7.3.2a).

En un paso subsiguiente del análisis, se examinaron las categorías que resultaron sobre-representadas a ambos niveles transcriptómico y proteómico, mediante la interrogación de bases de anotaciones más amplias así como bases de anotaciones especializadas, con el objetivo de obtener información más detallada de los procesos que subyacen a las categorías sobre-representadas e identificar los componentes asociados a cada una de estas categorías (Sección 6.31)(Sección 7.3.2b).

7.3.2a Análisis de sobre-representación de términos GO

Las 131 proteínas **reguladas transcripcionalmente** se sometieron a análisis de sobre-representación (ORA) frente a las anotaciones de términos GO asociados a proteínas humanas de la base de datos GO-Slim. En la figura 7.3.2 se muestran los resultados de las pruebas ORA de PROCESOS BIOLÓGICOS, FUNCIONES MOLECULARES y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN en función de la significancia estadística.

La gráfica de PROCESOS BIOLÓGICOS, muestra los resultados sin ajuste de valor de p que están representados por al menos 5 y hasta 50 proteínas y tienen una sobre-representación de al menos 2 veces con respecto a la incidencia esperada en el proteoma referencia. Esta prueba reveló una sobre-representación significativa de las categorías BIOGÉNESIS Y ORGANIZACIÓN DE COMPONENTES CELULARES, METABOLISMO DE LÍPIDOS Y METABOLISMO DE PROTEÍNAS entre las proteínas reguladas transcripcionalmente (**Figura 7.3.2**), que resultaron asimismo sobre-representadas en los análisis independientes de las 208 proteínas y los 3305 transcritos codificantes diferencialmente regulados (**Anexos Tabla III**).

El análisis de FUNCIONES MOLECULARES, empleando la corrección de Bonferroni para el ajuste del valor de p reveló la sobre-representación estadística-

mente significativa de las categorías UNIÓN A ACTINA y ACTIVIDAD PEPTIDASA (Figura 7.3.2).

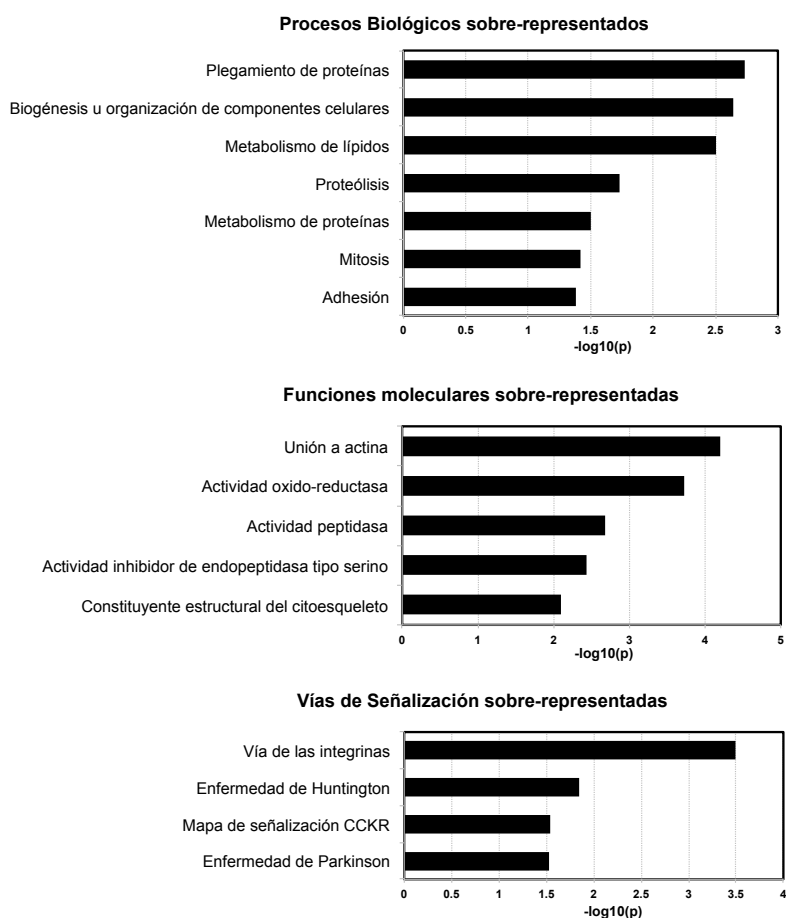


Figura 7.3.2 Procesos biológicos, funciones moleculares y vías de señalización sobre-representados significativamente entre las 131 proteínas transcripcionalmente reguladas en las células deficientes en SIGMAR1 respecto a las células control. Gráfico que representa los resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$) de las pruebas de sobre-representación (ORA) de términos GO de las bases de anotaciones GO-Slim y Panther Pathways de las proteínas transcripcionalmente reguladas en las células deficientes (shS1R2) en SIGMAR1 respecto a las células control (shCTRL1) frente a la base de datos de referencia del genoma humano de Uniprot.

El análisis de **VÍAS DE SEÑALIZACIÓN** constituidas por al menos 3 proteínas y sobre-representadas al menos 2 veces con un valor de p no ajustado menor que 0,05 (Figura 7.3.2) reveló que **VÍA DE LAS INTEGRINAS**, las categorías **MAPA DE SEÑALIZACIÓN DE CCKR** y **ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**, las cuales comparten algunas componentes con la vía de las integrinas, y la categoría **ENFERMEDAD DE PARKINSON** aparecen sobre-representadas en la regulación diferencial.

Por otra parte, la prueba de sobre-representación de **PROCESOS BIOLÓGICOS** de las 70 proteínas **reguladas post-transcripcionalmente** verifica una regulación diferencial de las categorías de procesos biológicos **BIOGÉNESIS U ORGANIZACIÓN DE COMPONENTES CELULARES** y **METABOLISMO DE LÍPIDOS** entre los genes regulados a nivel post-transcripcional (**Figura 7.3.4**), que destaca la relevancia de estas categorías que aparecen reguladas tanto transcripcional como post-transcripcionalmente en las células deficientes en SIGMAR1. Además, aparecen categorías que no resultaron sobre-representadas entre las reguladas transcripcionalmente: **TRADUCCIÓN**, **MOVIMIENTO DE COMPONENTES CELULARES** y **CICLO CELULAR** (**Figura 7.3.4**).

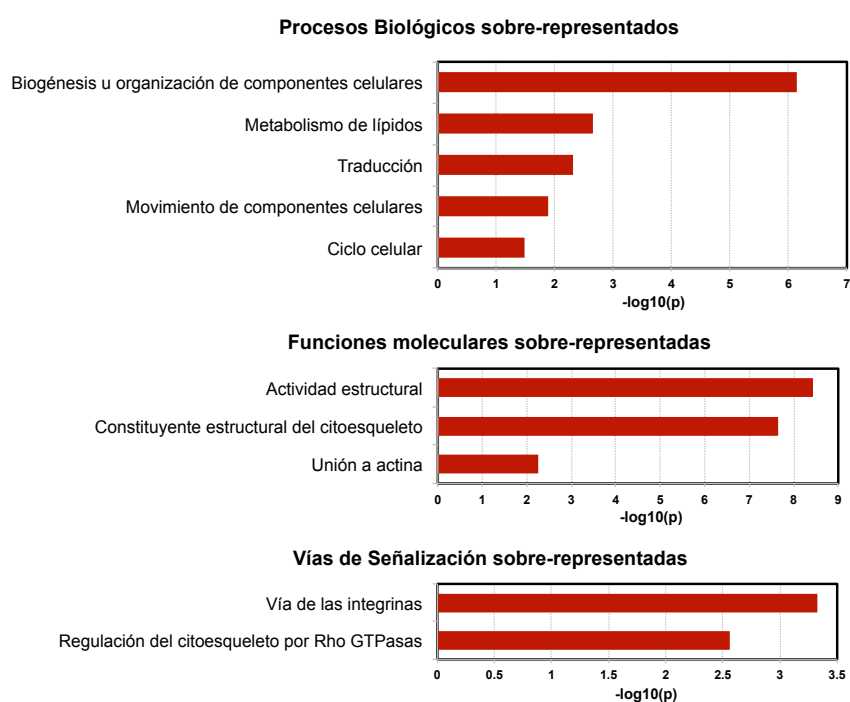


Figura 7.3.3 Procesos biológicos, funciones moleculares y vías de señalización sobre-representados significativamente entre las 70 proteínas reguladas post-transcripcionalmente en células deficientes en SIGMAR1 respecto a las células control. Gráfico que representa los resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$) de las pruebas de sobre-representación (ORA) de términos GO de las bases de anotaciones GO-Slim y Panther Pathways de las proteínas post-transcripcionalmente reguladas en las células deficientes (shS1R2) en SIGMAR1 respecto a las células control (shCTRL1) frente a la base de datos de referencia del genoma humano de Uniprot.

Asimismo, en las pruebas ORA de **FUNCIONES MOLECULARES** y **CLASES DE PROTEÍNAS** de las proteínas **reguladas post-transcripcionalmente** se verifica la sobre-representación de la función molecular **UNIÓN A ACTINA** y aparece una nueva categoría significativa, **CONSTITUYENTE ESTRUCTURAL DEL CITOESQUELETO DE**

ACTINA (**Figura 7.3.3**), que está constituida fundamentalmente por las clases de proteínas PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DEL CITOESQUELETO DE ACTINA, FILAMENTOS INTERMEDIARIOS y PROTEÍNAS DE UNIÓN A ACTINA (**Anexos Tabla V**).

El análisis de las VÍAS DE SEÑALIZACIÓN reveló la sobre-representación las vías de VÍA DE LAS INTEGRINAS y VÍA DE REGULACIÓN DEL CITOESQUELETO POR LAS RHO GTPASAS (**Figura 7.3.4**), que resultaron asimismo sobre-representadas en los análisis independientes de las 208 proteínas y los 3305 transcritos codificantes diferencialmente regulados (**Anexos Tabla V**).

En conjunto, el análisis funcional de los genes que resultaron significativamente regulados tanto en transcriptómica como en proteómica de las células deficientes en SIGMAR1 apuntan a una regulación diferencial de elementos de la organización celular, y en especial del citoesqueleto de actina, en las células deficientes en SIGMAR1, que podrían implicar la desregulación de proteínas de unión a actina y las vías de señalización de las integrinas y las Rho GTPasa (**Anexos Ficha B**).

Dada la profundidad de secuencia que ofrecen los estudios de secuenciación masiva de RNA (RNAseq) es posible obtener una gran cantidad de información de secuencias de RNA inalcanzable por técnicas de identificación de proteínas. Así, a pesar de las limitaciones que presenta no poder verificar a nivel de proteína el impacto de todos los cambios de mRNA, esta información adicional constituye un importante material complementario para ampliar el estudio de los procesos que se han identificado en la proteómica o estudios fenotípicos previos como posibles dianas de regulación por SIGMAR1. Además, dada la excelente correlación que mostraron los datos de proteómica y transcriptómica (**Figura 7.3.1 C**), pensamos que este análisis nos permite validar los procesos candidatos más relevantes, mediante la identificación de un mayor número de mediadores de estos, así como profundizar en los mecanismos que subyacen a la regulación diferencial de los genes validados por ambas técnicas.

Así, el total de los 3305 RNA codificantes diferencialmente regulados en las células deficientes en SIGMAR1 (**Sección 7.3.1**) se sometieron a pruebas de sobre-representación (ORA). En la figura 7.3.4 se representan las categorías que resultaron significativas en la prueba ORA frente a la base de anotaciones GO-Slim de PROCESOS BIOLÓGICOS que aparecieron representados por un mínimo de 5 y un máximo de 200 proteínas y con una sobre-representación de al menos 1,3 veces y de VÍAS DE SEÑALIZACIÓN frente a la base de anotaciones Panther Pathways que aparecieron representados por más de 20 proteínas y con una

sobre-representación de al menos 1,5 veces. Cuando más de una categoría de la misma familia cumplió estas premisas, se representó la más amplia (**Figura 7.3.4**).

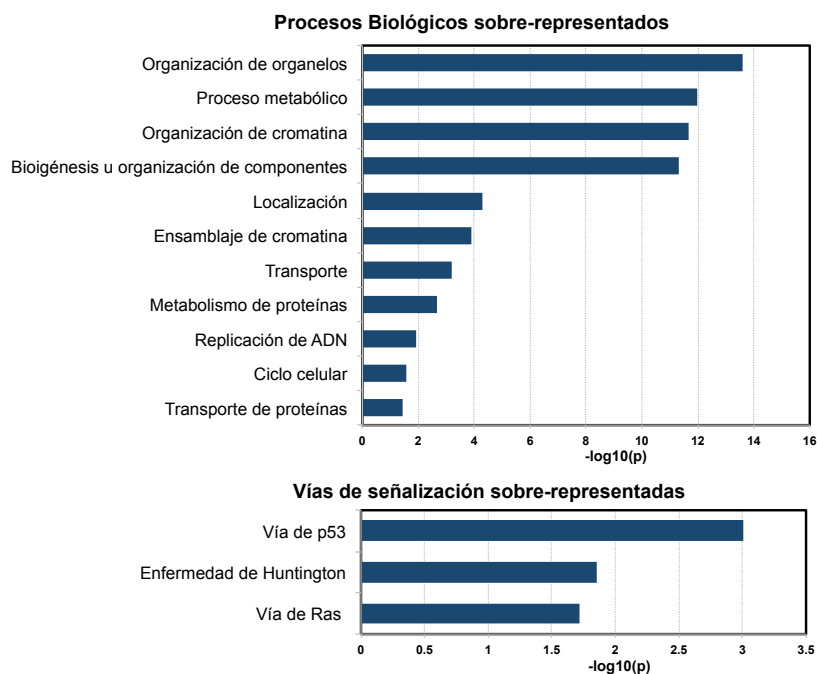


Figura 7.3.5 Procesos biológicos y vías de señalización sobre-representados significativamente entre los 3305 transcritos codificantes diferencialmente regulados en las células deficientes en SIGMAR1 respecto a las células control. Gráfico que representa los resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$) de las pruebas de sobre-representación (ORA) de términos GO de las bases de anotaciones GO-Slim y Panther Pathways de los transcritos codificantes regulados en las células deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) respecto a las células control (shCTRL1) frente a la base de datos de referencia del proteoma humano de Uniprot.

Es notable que, en acuerdo con los resultados de la proteómica diferencial, entre los transcritos de RNA diferencialmente regulados se verifica la sobre-representación de las categorías BIOGÉNESIS U ORGANIZACIÓN DE ORGANELOS y BIOGÉNESIS U ORGANIZACIÓN DE COMPONENTES CELULARES, así como categorías relacionadas con el metabolismo de proteínas. Adicionalmente aparecen sobre-representadas en este grupo de datos las categorías ORGANIZACIÓN DE CROMATINA y REPLICACIÓN DE DNA (**Figura 7.3.4**), relacionadas con la categoría CICLO CELULAR que resultó sobre-representada en el grupo de proteínas reguladas post-transcripcionalmente (**Figura 7.3.3**).

Con el objetivo de identificar vías de señalización diferencialmente reg-

uladas a nivel transcripcional en las células deficientes en SIGMAR1, se realizó una prueba de sobre-representación de VÍAS DE SEÑALIZACIÓN de la base de anotaciones Panther Pathways tomando como referencia la lista de proteínas humanas de la base de datos de Uniprot.

La categoría de la VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE RAS resultó sobre-representada. Entre los componentes de esta categoría se encontraron componentes de señalización de las Rho GTPasas, que también resultó significativamente sobre-representada a nivel de proteína (**Figura 7.3.3**), apoyando la noción de que la vía de señalización de las Rho GTPasas está regulada por la actividad de SIGMAR1. Adicionalmente, los transcritos de mRNA de otros miembros de la superfamilia Ras, la Rho GTPasa CDC42 y la Ras GTPasa HRAS (revisado en (Mitin, Rossman *et al.* 2005)), aparecieron **reprimidos**, mientras *RHOB* apareció **inducido**. También apareció sobre-representada entre los transcritos diferencialmente abundantes en transcriptómica la VÍA DE P53 (TP53), estrechamente relacionada con el proceso biológico CICLO CELULAR (**Figura 7.3.4**), que también resultó significativo entre los datos de proteómica diferencial (**Figuras 7.3.2 y 7.3.3**).

7.3.2b Análisis de los genes diferencialmente regulados en las diferentes categorías funcionales significativamente sobre-representadas.

Para conocer en más detalle las relaciones funcionales entre genes diferencialmente regulados dentro de categorías estadísticamente significativas en las pruebas de sobre-representación (**Sección 7.3.2a**) se interrogaron bases de anotaciones más extensas, como GO-Complete para PROCESOS BIOLÓGICOS, FUNCIONES MOLECULARES y COMPONENTES CELULARES y KEGG y Reactome para VÍAS DE SEÑALIZACIÓN empleando la herramienta de análisis en línea GENETRAIL2 (<https://genetrail2.bioinf.uni-sb.de>). Asimismo, se interrogaron las bases de anotaciones de regulación génica TRANSFAC TF, TRANSFAC TFfam, y TRANSFAC mirRNA y de familias de proteínas Pfam. Frente a cada una de éstas los datos de transcriptómica y proteómica diferencial se sometieron a pruebas de sobre-representación empleando la corrección de Bonferroni para el ajuste del valor de p (**Sección 6.31**). Este análisis permitió identificar procesos específicos asociados a cada categoría de PROCESOS BIOLÓGICOS y FUNCIONALES MOLECULARES, que son comunes a los genes regulados en la proteómica y la transcriptómica diferencial (**Anexos Tabla III**), así como revelar la sobre-representación de familias de proteínas (**Anexos Tablas V y VII**) y dianas de factores de transcripción y miRNA (**Anexos Tabla XII**).

Dada la complejidad de los resultados obtenidos la descripción de los resultados se complementa con una breve discusión sobre la posible relación existente entre la regulación de los diferentes genes identificados en las categorías sobre-representadas en la transcriptómica y/o proteómica diferencial (Sección 7.3.2a) en base a la literatura previa. Para ilustrar los elementos más interesantes encontrados en estas relaciones, además, se han introducido una serie de breves fichas bibliográficas en forma de anexos (Sección 11.1) que reúnen de manera simplificada algunas de las principales relaciones entre los procesos biológicos sobre-representados y descritos en los siguientes epígrafes.

7.3.2.1 Organización del citoesqueleto

El perfil proteómico y transcriptómico de las células deficientes en SIGMAR1 muestra cambios muy importantes en el proceso de reorganización del citoesqueleto de actina y miosina, el transporte mediado por microtúbulos, el citoesqueleto cortical y las adhesiones celulares, y en la vía reguladora del citoesqueleto mediada por las Rho GTPasas (Anexos Tabla V). Los cambios en estas categorías en las células deficientes en SIGMAR1 sugieren una deficiencia en los procesos dependientes de la reorganización del citoesqueleto de actina y la desregulación de procesos dependientes de las adhesiones celulares.

Las alteraciones observadas en los componentes de la vía de la Rho GTPasa sugieren una disfunción de ésta en las células deficientes en SIGMAR1. Varias proteínas activadoras de las Rho GTPasas se encuentran **sobre-reguladas transcripcionalmente**, mientras su inhibidor GDI2 está **sobre-regulado post-transcripcionalmente**, apuntando a un defecto funcional acompañado de una regulación transcripcional pro-homeostática de la célula hacia la activación de la señalización de esta vía. Por el contrario, la Arf GTPasa ARF1, que activa y coopera con la actividad efectora de la vía de las Rho GTPasas RAC1 y CDC42 (Norman, Jones *et al.* 1998; Dubois, Paléotti *et al.* 2005; Koronakis, Hume *et al.* 2011; Lewis-Saravalli, Campbell *et al.* 2013) (Anexos Ficha B), se encuentra **sub-regulada transcripcionalmente** en las células deficientes en SIGMAR1. Sin embargo, de acuerdo con una deficiencia de la señalización de las Rho GTPasas RAC1 y CDC42, los transcritos de mRNA de numerosas proteínas de la vía de señalización de éstas aparecen diferencialmente **inducidos** en las células deficientes en SIGMAR1, incluyendo la quinasa efectora PAK3 y efectores como el complejo de nucleación de actina ARPC1B, mientras el inhibidor endógeno de la quinasa efectora PAK3, NF2, está **reprimido**. Adi-

cionalmente, algunos mediadores de funciones dependientes del citoesqueleto y de la regulación por Rho GTPasas muestran cambios a nivel de proteína en las células deficientes en SIGMAR1 con respecto a las células control ([Anexos Tabla IV](#)). Por ejemplo, los mediadores de la señalización de RAC1/CDC42, EZR y PFN1, están **sobre-regulados post-transcripcionalmente** en las células deficientes en SIGMAR1, lo que pudiera denotar una localización y acumulación aberrante con el consecuente defecto en las funciones de éstas ([Anexos Fichas B y D](#)).

EZR, una proteína remodeladora central del citoesqueleto que enlaza el citoesqueleto de actina con la membrana y media su remodelación en coordinación con proteínas de unión a actina y la proteína scaffold IQGAP1 (Marion, Hoffmann *et al.* 2011; Matsumoto, Inden *et al.* 2014; Nammalwar, Heil *et al.* 2015)(revisado en (Hughes y Fehon 2007)), depende para su activación de las Ras GTPasas de la familia de las Arf y las Rho GTPasas, esencialmente de la acumulación de PI4,5P2 en membranas, para su reclutamiento a membranas y función ([Anexos Ficha B](#)). Así, los niveles disminuídos de ARF1 y la deficiencia de la señalización de las Rho GTPasas RAC1/CDC42 en las células deficientes en SIGMAR1, y el subsiguiente efecto en el microambiente de fosfoinosítidos ([Sección 7.3.2.3](#)), sugieren una deficiencia en la activación y localización de EZR (Auvinen, Kivi *et al.* 2007, Shabardina, Kramer *et al.* 2016) y en la dinámica de actina (revisado en (Hughes y Fehon 2007)).

En acuerdo con la deslocalización de EZR, o el predominio de su forma citosólica inactiva (revisado en (Ponuwei 2016)), las células deficientes en SIGMAR1 presentan una regulación diferencial de las parejas de interacción y funcionales de EZR, S100P y AHNAK, y de factores que dependen de la función de EZR e IQGAP1 como los mediadores del movimiento basado en filamentos de actina MYH10, MYH9, MYO1B, ACTN1, ACTN2 y ACTN4, y la quinesina de transporte mediado por microtúbulos KIF5B (revisado en (Hughes y Fehon 2007) y (Myers y Casanova 2008)).

En conjunto, estos cambios apuntan a un defecto en la organización del citoesqueleto mediada por las Rho GTPasas, y sugieren que otros procesos dependientes de ésta, como la generación y transporte de vesículas, la maduración de endosomas y la biogénesis de lisosomas ([Anexos Ficha C](#)), podrían estar afectados en las células deficientes en SIGMAR1. Ciertamente es posible verificar ciertas diferencias en la distribución de la actina polimerizada y los lisosomas en las células deficientes en SIGMAR1 ([Sección 7.3.3 Figura 7.3.5](#)), que deberán ser estudiadas en más detalle.

En acuerdo con la aparente desregulación de la vía de las Rho GTPasas y EZR, también algunos componentes del córtex celular como las integrinas y componentes de las adhesiones de cadherinas aparecen regulados diferencialmente en las células deficientes en SIGMAR1. Las integrinas ITGB1, ITGA6 e ITGAV y la cadherina CHD1, están **sobre-reguladas transcripcionalmente**. Además, las cateninas CTNNB1, CTNNA1, aparecen **sobre-reguladas post-transcripcionalmente**. Este hecho podría implicar consecuencias en la regulación de vías de señalización dependientes de las adhesiones celulares, como la vía de Wnt/CTNNB1 (Anexos Ficha E).

7.3.2.2 Transporte mediado por vesículas y establecimiento de la localización intracelular

Las células deficientes en SIGMAR1 muestran una regulación/ expresión diferencial de varios mediadores de la maduración y transporte de vesículas y la localización de proteínas en membranas, incluyendo mediadores de fusión de membranas y proteínas SNARE (del inglés *soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion protein (NSF) attachment protein receptor*) (Rab6, Rab14, USO1, NSF, SEC22B), componentes del complejo retrómero para el transporte retrógrado de cargos (SNX2, SNX3, SNX5) y del complejo de distribución endosomal ESCRT (CHMP1B), adaptadores o moduladores del citoesqueleto y de la unión del citoesqueleto la membrana celular (EZR, PDLIM1, CALM1, ACTN2, KRT18, ITGB1, GSN, SPTA1, ANXA2, MYH9, SEPT14, TWF1, STATHMIN), proteínas de anclaje a balsas lipídicas (AHNAK, CKAP4), proteínas especializadas en la biogénesis y maduración de vesículas (GABARAPL1, IGF2R, LAMP2, SQSTM1) y reguladores del tráfico vesicular (ARF1, SEC24C, SNX3, NSF, AP2B1, USO1, ANXA2) (Anexos Tabla VI). En general, la regulación diferencial de estas proteínas (Dubois, Paléotti *et al.* 2005) sugiere una deficiencia en el transporte de endomembranas (Popoff, Langer *et al.* 2011, Kondo, Hanai *et al.* 2012; Chen, Garcia-Santos *et al.* 2013; Nakai, Kondo *et al.* 2013).

La pequeña GTPasa ARF1, regulador central del transporte de intracelular mediado por vesículas dependientes de COPI, COPII, SNX y clatrina, se encuentra **sub-regulada transcripcionalmente** en las células deficientes en SIGMAR1. La vía Rho GTPasas/forminas, que coopera con ARF1 para la remodelación de haces de actina local en los sitios de formación de vesículas (Chi, Wang *et al.* 2013), parece ser disfuncional en las células deficientes en SIGMAR1 (Sección 7.3.4.1)(Anexos Ficha B).

En acuerdo con esto, la función de los sistemas retrómeros SNX3 y

SNX-BAR para el transporte retrógrado dependiente de ARF1 parece estar comprometida en las células deficientes en SIGMAR1. La proteína central del complejo retrómero-SNX3, SNX3, se encuentra **sobre-regulada transcripcionalmente** en las células deficientes en SIGMAR1, al igual que los componentes deformadores de membrana del complejo retrómero-SNX-BAR, SNX2 y SNX5. Además, el cliente prototípico del sistema retrómero SNX-BAR, IGF2R (Arighi, Hartnell *et al.* 2004)(revisado en (Burd y Cullen 2014), se encuentra **sub-regulado post-transcripcionalmente**, a pesar de estar inducido a nivel transcripcional, lo que está en acuerdo con el supuesto de que la disfunción del sistema retrómero causa la deslocalización de IGF2R hacia los lisosomas (Carlton, Bujny *et al.* 2004). Como IGF2R, los mRNA de la oxidoreductasa LPR1, otro cliente del retrómero SNX-BAR desde endosomas a red *trans* de Golgi, así como el receptor de transferrina TFRC y el receptor de neuropéptidos SORCS2, que dependen del complejo retrómero SNX3 (Chen, Garcia-Santos *et al.* 2013), así como el receptor TNFRSF10A, las integrinas (ITGAV, ITGB5, ITGA5, ITGA6) y el receptor VLDLR, que dependen del retrómero SNX27 para su reciclaje a membrana plasmática también se encuentran **sobre-regulados transcripcionalmente o inducidos** a nivel de mRNA.

La transcriptómica y proteómica diferencial evidenciaron también una sobre-representación de proteínas implicadas en el tráfico desde el ER hacia Golgi, incluyendo componentes del adaptador principal de cargos de COPII, SEC24A, C y D, (Anexos Tabla VI). SEC24C, aparece **sub-regulado post-transcripcionalmente**, mientras los componentes SEC24A y SEC24D aparecen **inducidos** a nivel de mRNA sin cambios en la expresión de proteína. Asimismo, los niveles mRNA de la ARF GTPasa SAR1A y SAR1B, principales reguladoras de la formación de vesículas COPII en los ERES (del inglés, *endoplasmic reticulum exit sites*), del componente del complejo heterotetrámero de las vesículas COPII, SEC31A, y de las proteínas co-receptoras de cargos específicos de las vesículas COPII, MCFD2 (Multiple coagulation factor deficiency protein 2) y AREG (Amphiregulin) están **inducidos** en las células deficientes en SIGMAR1. Asimismo la USO1, responsable del anclaje y fusión de las vesículas COPII con la membranas diana, la proteína t-SNARE SEC22B de Golgi y el factor de fusión de vesículas de Golgi, NSF, están **sobre-regulados transcripcionalmente**.

Por otra parte, varios efectores del sistema de membranas cargo de la red *trans*-Golgi y de endosomas resultaron también **sobre-regulados transcripcionalmente** (SQSTM1) (Sección 7.3.2.5, Figura 7.3.1 D), o al menos

inducidos a nivel de mRNA en el estudio de transcriptómica, (CLTC (clatrina), AP1G2 (componente del complejo AP-1), AP3B1 (componente del complejo AP-3), VPS39, SNX16 y SNX2) ([Anexos Tabla VI](#)).

Por otro lado, la **sobre-regulación transcripcional** de la quinesina 1 (KIF5B) y la **inducción** de dineína (DYNC1H1, DNAH5,6,14) en las células deficientes en SIGMAR1, proteínas motoras dependientes de microtúbulos (Cardoso, Groth-Pedersen *et al.* 2009; Schmidt, Maritzen *et al.* 2009; Caviston, Zajac *et al.* 2011; Hunt, Townley *et al.* 2013), sugiere una deficiencia de la función de los sistemas de distribución de vesículas y endosomas en las células deficientes en SIGMAR1.

En conjunto, el análisis estadístico de sobre-representación de las funciones de las proteínas de estas categorías reguladas en las células deficientes en SIGMAR1, sugieren que SIGMAR1 regula el tráfico de endomembranas de ER a Golgi y en la red *trans* de Golgi, lo que pudiera conducir a la deficiencia de la organización y localización subcelular de cargos y afectar la homeostasis de orgánulos celulares (Ackema, Hench *et al.* 2014) ([Sección 7.3.3 Figura 7.3.5](#)) ([Anexos Ficha B](#)).

7.3.2.3 Metabolismo de lípidos

La categoría METABOLISMO DE LÍPIDOS apareció significativamente sobre-representada en las proteínas reguladas en ambos estudios, de proteómica y transcriptómica diferencial de las células deficientes en SIGMAR1. Estas células presentan alteraciones en el metabolismo de esteroides, acilglicérols, glicérolípidos y fosfolípidos, y dentro de esta última, particularmente el metabolismo de los fosfoinosítidos ([Anexos Tabla VII](#)).

El METABOLISMO DE FOSFOINOSÍTIDOS es un proceso clave para la regulación de la dinámica del sistema de endomembranas y varios procesos celulares como la síntesis de lípidos complejos, la dinámica del citoesqueleto de actina y el ciclo celular ([Anexos Fichas A, B, C y E](#)). Las células deficientes en SIGMAR1 mostraron una **inducción** diferencial de los transcritos de mRNA de enzimas del metabolismo de fosfoinosítidos, incluyendo PI-3 y PI-4 quinasas (que median la formación de diversos PIPs como PI3P, PI4P, PI3,4P2), la 5 fosfatasa OCRL (que media la desfosforilación de PI(4,5)P2 a PI4P), así como de las proteínas de intercambio de PI4Ps: OSBP, OSBP2 y PITPNM1. Sin embargo, la PI4P fosfatasa INPP5F, que desforforila PI4P a PI (van Rahden, Brand *et al.* 2012), se encuentra **reprimida** a nivel de mRNA. Estos cambios de mRNA apuntan hacia una regulación diferencial del metabolismo y/o distri-

bución de fosfoinosítidos en las células deficientes en SIGMAR1. Esta noción es apoyada también por la **sub-regulación transcripcional** de los niveles de proteína ARF1, que estimula la acumulación local del fosfolípido PI4,5P2, y la sobre-representación de proteínas con dominios de unión a PIs entre las significativamente reguladas en las células deficientes en SIGMAR1, donde se encuentran varias proteínas asociadas a la organización del citoesqueleto de actina (Sección 7.3.2.1), la estructuración de las membranas (ARF1, PIs-Ks), la formación de vesículas y membranas cargo dependientes de unión a VAPA/VAPB y ARF1 (PLEKHA8, OSBP, PITMN1, GLTP, PLEKHA8), la formación de vesículas COPII (SEC24C) y de los sistemas de generación de vesículas de exportación de cargos asociados a membranas y del sistema del retrómero (SNX3, PLEKHA8) (Sección 7.3.2.2)(Anexos Tabla VII)(Anexos Fichas A-C).

En especial, es llamativo que las proteínas transportadoras de lípidos (LTPs, del inglés *lipid transfer proteins*) OSBP, OSBP2, PITPNM1 y PLEKHA8, responsables del mantenimiento de la distribución de lípidos y la función de Golgi (Anexos Fichas A y C) muestran una **inducción** en los niveles de mRNA sin aumento de sus niveles de expresión de proteína y, en particular, PITPNM1, incluso presenta una tendencia a niveles reducidos de proteína (un 33%, $q=0,075$; $p < 0,01$) en las células deficientes en SIGMAR1 respecto a las células control. Estos datos sugieren que los intercambiadores de PI4P pudieran estar desestabilizados post-transcripcionalmente y sus funciones (Anexos Ficha A) podrían estar comprometidas en las células deficientes en SIGMAR1. El déficit de PI podría provocar una reducción local de sus derivados, incluido PI4P en Golgi, con lo cual, éste constituye una posible causa de la regulación de enzimas quinasas de PI.

Las células deficientes en SIGMAR1 muestran además una **sobre-regulación transcripcional** de enzimas de la biosíntesis de esteroides como FDPS e IDI1, así como de acilglicéridos (CAT, CPT1A, FABP1, HSD17B12 y SLC25A1) (Anexos Tabla VII), lo que está en acuerdo con los niveles incrementados del mRNA de los factores de transcripción SREBF1 y de PPARA que se verifica en las células deficientes en SIGMAR1 respecto a sus controles. La **inducción** de algunos genes diana de SREBF1 y SREBF2 y PPARA, implicados en la regulación del metabolismo de esteroides, fosfolípidos y ácidos grasos (TM7SF2, HSD17B7, SCARB1, FDPS, FASN, LIPN1, PNPLA3, MTTP, ACADM, CPT1A) y en la biogénesis de gotas de lípidos (PLIN2) se verificó por proteómica y transcriptómica, y son consistentes con una activación transcripcional de los genes diana de estos factores de transcripción (Anexos Tabla XII).

7.3.2.4 Estrés y respuestas a estrés celular

De acuerdo a su perfil transcriptómico y proteómico, las células deficientes en SIGMAR1 muestran diferencias en los niveles basales de estrés de ER y la activación de algunos mecanismos en respuesta a éste respecto a sus controles.

El PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS resultó significativamente sobre-representado en las células deficientes en SIGMAR1. El análisis de GO-Complete de esta categoría reveló los procesos de RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL PLEGADAS, PROCESAMIENTO DE PROTEÍNAS EN EL ER, VÍA DE LA UPR DEPENDIENTE DE IRE1 Y ACTIVACIÓN DE GENES DE CHAPERONAS POR XBP1 están significativamente sobre-representadas en la proteínas reguladas diferencialmente en las células deficientes en SIGMAR1 (Anexos Tabla VIII y XII).

Además, los mRNA de mediadores de la respuesta UPR de la rama de XBP1, incluyendo las protein-disulfidrilisomerasas P4HB, PDIA5, responsables del correcto plegamiento de proteínas luminales, los mediadores de ERAD, EDEM 1, 2 y 3, responsables de la salida de proteínas mal plegadas del ciclo de calnexina y su disposición para la degradación (Molinari, Calanca *et al.* 2003) y el componente del complejo gamma-secretasa, APH1B, responsable del corte proteolítico de las proteínas integrales de membrana (Ohta, Mizuno *et al.* 2011), aparecen **inducidos** en las células deficientes en SIGMAR1 (Anexos Tabla VIII).

Por otra parte, mediadores de procesos como la exportación de vesículas cargo del ER y la biosíntesis de lípidos por factores SREBFs (Sección 7.3.2.3) que aparecen **inducidos**, son también mecanismos comúnmente activados durante la respuesta a estrés de ER.

7.3.2.5 Sistemas celulares de degradación de proteínas

El perfil de las células deficientes en SIGMAR1 sugiere una potenciación de la activación de los sistemas de degradación de proteínas (Anexos Tabla IX), aparejada a un defecto en la disposición de cargos de la vía autofago-lisosomal (Sección 7.3.2.2).

Las células deficientes en SIGMAR1 muestran una **sobre-regulación transcripcional** del receptor de cargos ubiquitinados y sustrato de autofagia SQSTM1 (Sección 7.3.1 Figura 7.3.1 D) que podría reflejar una activación de los mecanismos de disposición de cargos de la vía autofago-lisosomal, depen-

diente de la UPR (Sección 7.3.2.3). Además, la transcriptómica diferencial evidenció una **inducción** de los mRNA de factores necesarios para la formación de autofagosomas ATG4A, ATG16L2, PIK3C3, y de factores necesarios para la fusión de autofagosomas y lisosomas como la proteína SNARE (del inglés *soluble NSF-attachment protein receptor*) STX17, el factor VPS39 del complejo HOPS (del inglés *homotypic fusion and protein sorting*), la proteína tipo quinesina SNX23 (KIF16B) y *FYCO1*, el efector de Rab7 que permite el transporte por mediado por quinesina 1 de vesículas cubiertas de LC3B (MAP1LC3B) (Pankiv, Alemu *et al.* 2010; Diao, Liu *et al.* 2015)(revisado en (Lystad y Simonsen 2016))(Mauvezin, Neisch *et al.* 2016) (Anexos Tabla IX). La existencia de defectos en el flujo autofágico en las células Huh-7 deficientes en SIGMAR se verificó experimentalmente en estudios preliminares sobre los fenotipos de estas células (Sección 7.3.3 Figura 7.3.5 A y B).

Por otra parte, los datos de la transcriptómica diferencial apuntan a la **inducción** transcripcional de los procesos PROTEÓLISIS DEPENDIENTE DE UPS, UBIQUITINACIÓN DE K48 y ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE XPB1, incluyendo varios mediadores de la UPS y componentes de la ERAD (EDEM1, 2 y 3, YOD1, NEDD4), lo cual pudiera reflejar una regulación pro-homeostática frente a la acumulación de cargos no degradados (Anexos Tabla VIII).

7.3.4.6 Ciclo celular

El CICLO CELULAR aparece estadísticamente sobre-representado en los cambios tanto de la transcriptómica como de la proteómica diferencial de las células deficientes en SIGMAR1 (Sección 7.3.1). El transcriptoma diferencial de células shS1R2 es compatible con una condición de arresto celular, con un déficit de varios mediadores y efectores centrales de la división celular con respecto a las células control y una regulación diferencial (a nivel de mRNA) de las vías de TP53 y la vía de Wnt/CTNNB1, dos vías centrales de control de la proliferación celular (Anexos Tablas X y XI). Esta posibilidad está en acuerdo con el hecho de que las células deficientes en SIGMAR1 muestran una capacidad proliferativa levemente reducida en las células shS1R2 y muy disminuida en las células shS1R3, coincidiendo con la magnitud de la reducción de los niveles SIGMAR1 y su cinética de desaparición (datos no mostrados).

Los niveles de proteína CTNNB1, el coactivador transcripcional de la vía canónica Wnt/CTNNB1, se encuentran incrementados (2x) en las células deficientes en SIGMAR1 sin mostrar cambios en los niveles de mRNA, lo que sugiere una **sobre-regulación post-transcripcional**. Sin embargo, a pesar de

los niveles incrementados de CTNNB1, los niveles de mRNA de los algunos de sus genes diana (MYCN, CCND1, JAG1) (Anexos Tabla XII) están **reprimidos** en las células deficientes en SIGMAR1 respecto a las células control, indicando un defecto en la actividad transcripcional de la vía.

Por el contrario, y en acuerdo con los roles antagonistas y la regulación cruzada de la vía de CTNNB1 y TP53 (Damalas, Ben-Ze'ev *et al.* 1999), los transcritos de mRNA de TP53 y algunos de sus genes diana (TP53INP2, TP53BP1, TP53BP2, TP53TG1) (Anexos Tabla XII) y los transcritos de sus RNA no codificantes diana, el micro-RNA miR-134 (Tarasov, Jung *et al.* 2007) y el RNA largo no codificante NEAT1 (Blume, Hotz-Wagenblatt *et al.* 2015) se encuentran en mayores niveles en las células deficientes en SIGMAR1.

En conjunto, el perfil transcriptómico de las células deficientes en SIGMAR1 muestran una activación de parte del programa transcripcional del supresor tumoral TP53 y una supresión de la señalización de la vía pro-oncogénica Wnt/CTNNB1. La regulación diferencial de las vías opuestas CTNNB1 y TP53 en las células deficientes en SIGMAR1 conducen a una menor actividad transcripcional de los genes esenciales para la entrada en la fase S del ciclo celular como CCND1 y factores de transcripción E2F1 y MYCN (Anexos Tabla XII), lo cual podría conllevar un arresto celular en la transición G1/S (Joyce, Bouzahzah *et al.* 1999; Liu, Zhang *et al.* 2014) y podría contribuir al fenotipo de arresto celular observado en células silenciadas que presentan niveles muy limitantes de SIGMAR1 (shS1R3).

7.3.2.7 Enfermedades neurodegenerativas

La pérdida de función de SIGMAR1 se ha asociado a varias enfermedades neurodegenerativas: esclerosis lateral amiloide (ALS) (revisado en (Prause, Goswami *et al.* 2013; Mavlyutov, Guo *et al.* 2015), enfermedad del lóbulo fronto-temporal (FTLD)/ enfermedad de la motoneurona (MND) (Luty, Kwok *et al.* 2010), enfermedad de Alzheimer (AD) (Mishina, Ohyama *et al.* 2008; Huang, Zheng *et al.* 2011), enfermedad de Parkinson (PD) (Mishina, Ishiwata *et al.* 2005) y enfermedad de Huntington (HD) (Miki, Tanji *et al.* 2015)(revisado en (Tsai, Pokrass *et al.* 2014), (Miki, Mori *et al.* 2014) y (Nguyen, Lucke-Wold *et al.* 2015)).

Se ha propuesto que en las enfermedades neurodegenerativas las células neuronales sufren apoptosis inducida por estrés de ER, debido a la acumulación de proteínas mal plegadas en el ER que colapsan la respuesta UPR (Kaneko, Ishiguro *et al.* 2002). El papel protector de SIGMAR1 frente

a la apoptosis en condiciones de estrés celular que se ha evidenciado *in vitro* (Wang, Eldred *et al.* 2012; Wang, Saul *et al.* 2016; Wang y Duncan 2006; Hayashi y Su 2007; Meunier y Hayashi 2010) y el efecto de su déficit en las enfermedades neurodegenerativas parecen reflejar una función de SIGMAR1 en el alivio de la carga del ER.

Es interesante que entre las proteínas diferencialmente expresadas en la proteómica de células deficientes en SIGMAR1 aparecen sobre-representadas algunas enfermedades neurodegenerativas con las que SIGMAR1 se ha asociado (AD, HT, PD) (Sección 7.3.1).

Para ampliar esta observación y obtener nuevas nociones sobre la posible regulación o interacción funcional de SIGMAR1 con otras proteínas asociadas a las enfermedades neurodegenerativas con las que ésta se ha relacionado (AD, ALS, PD, MND, FTLD y HD), confrontamos las proteínas diferencialmente expresadas en la proteómica de las células deficientes en SIGMAR1 (Sección 7.3.1) con todas las anotaciones para estas enfermedades, depositadas en la base de datos de enfermedades humanas DisGeNET (www.disgenet.org), empleando la herramienta en línea Venny v 2.1.0 (bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/) (Anexo Tabla XI).

Entre las 208 proteínas reguladas diferencialmente 62 (30 %) están asociadas genéticamente con las enfermedades neurodegenerativas AD, ALS, PD, MND, FTLD o HD. En particular, es relevante que entre estas proteínas reguladas por los niveles de SIGMAR1 se encuentran 2 proteínas, CAT y SQSTM1, que son frecuentemente asociadas a las cuatro enfermedades neurodegenerativas, dos proteínas IGF2R y GSTO1, asociada en común a AD, ALS y PD, 9 proteínas que son frecuentemente asociadas a ambas AD y PD (A2M, IGF2R, MAOB, SQSTM1, CTSD, UCHL1, GSTO1, CAT, FARP1), y 2 proteínas, UCHL1 y MAOB, asociadas comúnmente a PD y HD (anotaciones de DisGeNET).

La regulación por SIGMAR1 de los niveles de las proteínas mediadoras de la vía autofago-lisosomal (IGF2R, SQSTM1, CAT), apoya la noción de la probable implicación de SIGMAR1 en la degradación de agregados de proteínas que es deficitario en estas enfermedades (Nixon 2013; Vollrath, Sechi *et al.* 2014; Ciechanover y Kwon 2015; Miki, Tanji *et al.* 2015). Además, la regulación de las proteínas de la reorganización del citoesqueleto (GSTO1 y PFN1), sugieren un posible mecanismo de SIGMAR1 a este nivel (revisado en (Cairns, Lee *et al.* 2004))(Plácido, Pereira *et al.* 2016).

Finalmente, deficiencias en las vías de señalización de las Rho y Arf GTPasas como las descritas para células deficientes en SIGMAR1 en la sección 7.3.3.1 de esta tesis doctoral, se han asociado directamente con procesos de neurodegeneración (Sección 7.3.2.1)(Anexos Ficha D).

7.3.3 Estudios preliminares sobre los fenotipos de las células Huh-7 deficientes en SIGMAR1

Para verificar independientemente el estado del flujo autofágico en estas células, se realizó una evaluación de la acumulación del marcador de autofagosomas LC3B (MAP1LC3B) conjugada a fosfatidiletanolamina (LC3B-II) en células deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) y células control (shCTRL1) en condiciones basales, así como la conversión a la forma no lipidada (LC3B-I) a la forma lipidada LC3B-II como resultado de la inducción de autofagia con el inductor de estrés taspigargina, y el flujo autofágico, evaluado como el cambio del ratio LC3B-II/ LC3B-I en presencia o ausencia del inhibidor de degradación lisosomal hidroxiclороquina. Este ensayo mostró una mayor acumulación de la forma LC3B-II, marcador de autofagosomas, tanto en condiciones basales como tras la inducción de la autofagia en las células deficientes en SIGMAR1 respecto a las células control (**Figura 7.3.5 A**), lo que sugiere un defecto en la disposición de cargos ubiquitinados, que está en acuerdo con los niveles también incrementados en estas células del receptor de cargos ubiquitinados SQSTM1 (Sección 7.3.1 Figura 7.3.1 D). Estos resultados apuntan a una disminución del flujo de la ruta autofago-lisosomal (revisado en (Klionsky, Abdelmohsen *et al.* 2016)) en las células deficientes en SIGMAR1. También con el objetivo de verificar esta hipótesis, se observó el número, tamaño y distribución de compartimentos lisosomales en células mediante microscopia confocal, empleando la sonda fluorescente LysoTracker para teñir dichos compartimentos en células deficientes en SIGMAR1 (shS1R2 y shS1R3) y células control (shCTRL1). En la figura 7.3.5 C y D se puede observar que el patrón de distribución de la señal de LysoTracker (en rojo) presenta una notable alteración en células shS1R3, donde se producen acúmulos de señal citoplásmica de mayor tamaño e intensidad que en las células control shCTRL1 (**Figura 7.3.5 C y D, en rojo**). Estos datos, aunque preliminares, sostienen la hipótesis planteada en base a los datos anteriores de que el transporte autofago-lisosomal podría estar alterado en las células deficientes en SIGMAR1.

Por otro lado, con el objetivo de contrastar la hipótesis planteada en la Sección 7.3.2.1 sobre posibles alteraciones en la organización del citoesqueleto de actina en las células deficientes en SIGMAR1, se observó la distribución

de la actina polimerizada mediante la tinción con faloidina conjugada al grupo fluorescente Alexa-488 (en verde). La figura 7.3.5 C y D muestra micrografías representativas de células shCTRL1 y shS1R3 donde se aprecia, en acuerdo con la hipótesis derivada de las observaciones de la [Sección 7.3.2.1](#), que las células deficientes en SIGMAR1 presentan un patrón de distribución de fibras de actina polimerizada alterado (**Figura 7.3.5 C y D, en verde**).

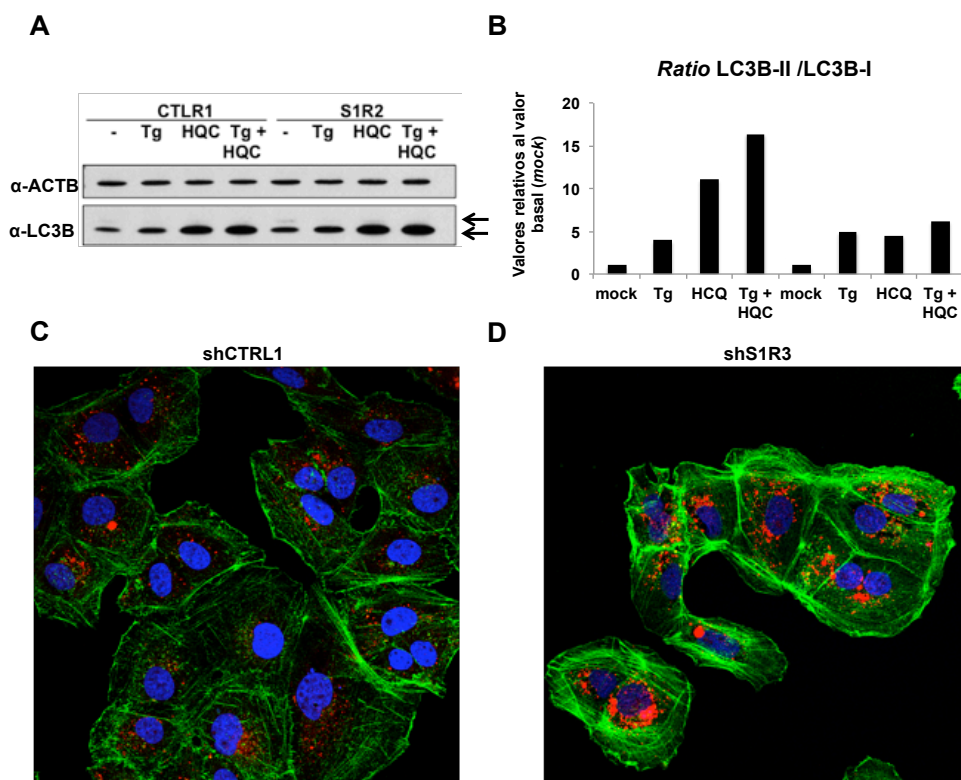


Figura 7.3.5 Ensayos preliminares de fenotipos de las células deficientes en SIGMAR1. Evaluación del flujo autofágico mediante inducción/inhibición farmacológica de la formación/degradación de autofagosomas **A)** *Western Blot* frente LC3B (MAP1LC3B) y β -actina (ACTB) y **B)** representación de los valores relativos a la condición basal de los *ratios* de la señal normalizada de la forma de LC3B lipidada respecto a la no lipidada (LC3B-II/LC3B-I) en condiciones basales, de inducción de autofagia (tapsigargina 10 μ M) y/o bloqueo de la degradación lisosomal (25 μ M hidroxyclorequina) en células deficientes en SIGMAR1 shS1R2 y células control shCTRL1 de un experimento representativo. Las flechas en el panel A indican la forma no lipidada LC3B-I (superior) y la forma lipidada (LC3B-II). tg: tapsigargina; HQC: hidroxyclorequina. **C)** Imagen de microscopía confocal células deficientes en SIGMAR1 shS1R2 y células control shCTRL1 mostrando actina polimerizada marcada con la sonda fluorescente faloidina-Alexa 488 (verde) y **D)** compartimentos ácidos marcados con Lysotracker (rojo). 245 X 245 μ m.

7.4 Estudio de interacciones físicas de SIGMAR1 con complejos proteicos celulares

La composición de los complejos proteicos celulares que contienen SIGMAR1 no ha sido estudiado sistemáticamente en células humanas, y aunque se han descrito algunas potenciales parejas de interacción (HSPA5) o “clientes” (ANK2, IP3R), estos no han permitido explicar todas las funciones fisiológicas mediadas por SIGMAR1. El conocimiento de las interacciones que SIGMAR1 establece en la célula podría ayudar en la comprensión de los mecanismos moleculares por los que esta proteína celular media las funciones que se le han atribuido y las descritas en [Secciones 7.1, 7.2 y 7.3](#).

7.4.1 Proteómica de complejos que contienen la proteína de fusión SIGMAR1-TAP en células Huh-7

Como aproximación al estudio de las proteínas interactuantes de SIGMAR1 se realizó un análisis cuantitativo de la composición proteómica de complejos moleculares de SIGMAR1 parcialmente purificados. Para ello, se generaron mediante transducción con construcciones lentivirales líneas de células Huh-7 con expresión estable de la proteína de fusión SIGMAR1-TAP (con la secuencia TAP fusionada al extremo C-terminal de SIGMAR1) y líneas control con expresión estable de la proteína de fusión irrelevante APOE-TAP o sólo la secuencia TAP ([Sección 6.14](#)). Lisados totales de estas tres líneas celulares se sometieron a un proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad a estreptavidina ([Sección 6.32](#)). La calidad de las purificaciones se monitorizó mediante electroforesis de proteínas con tinción con Ag de las eluciones finales ([Sección 6.6](#)) (**Figura 7.4.1 A**).

En la figura 7.4.1 A se muestran los resultados de una purificación representativa donde se aprecian las bandas correspondientes al tamaño de las proteínas de fusión y patrones de bandas distintivos correspondientes a proteínas endógenas específicamente asociadas a cada construcción: TAP, SIGMAR1-TAP y APOE-TAP (**Figura 7.4.1 A**).

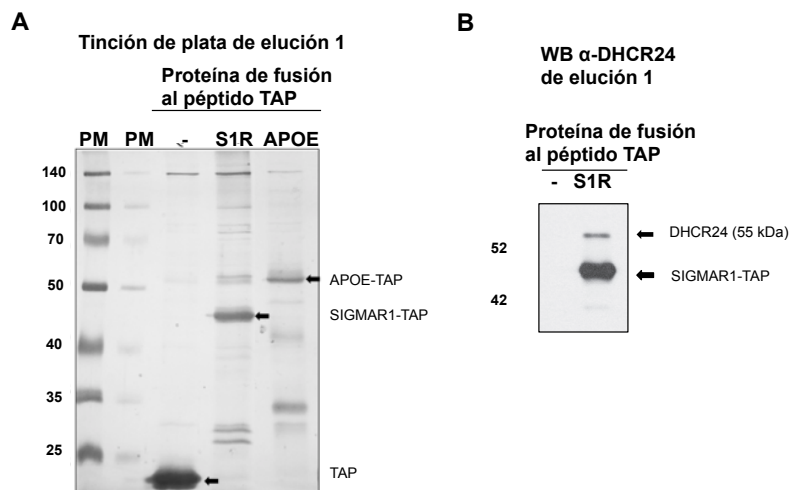


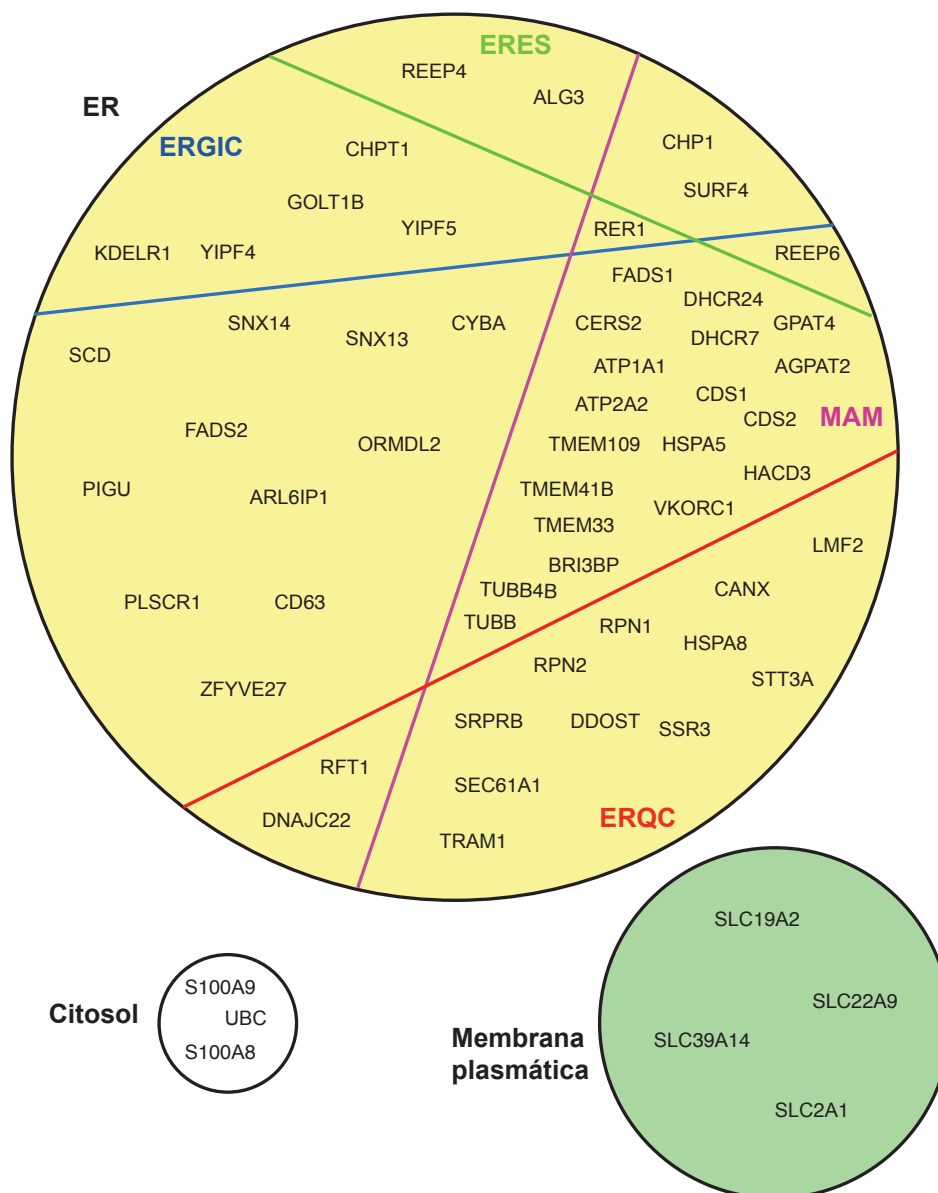
Figura 7.4.1: Composición de complejos purificados de SIGMAR1-TAP y de los controles de especificidad APOE-TAP y TAP. SDS-PAGE. A) Tinción de plata del gel de SDS-PAGE de los eluidos (elución 1) de la purificación por cromatografía de afinidad a estreptavidina de SIGMAR1-TAP y los controles de especificidad APOE-TAP y TAP. Las flechas señalan la banda de migración electroforética de las proteínas de fusión. **B)** *Western blot* frente a DHCR24 de los eluidos (elución 1) de la purificación por cromatografía de afinidad a estreptavidina de SIGMAR1-TAP y el control TAP. Las flechas señalan la banda de migración electroforética DHCR24 y la banda de SIGMAR1-TAP que es reconocida mediante la unión del anticuerpo secundario a la proteína G de la construcción TAP.

La composición proteómica de cada uno de estos estos complejos en tres purificaciones independientes se analizó mediante LC-MS-MS (Sección 6.33). Los péptidos inferidos de las tres réplicas biológicas de cada condición se analizaron con una metodología de cuantificación libre de marca (*label-free*) que permite la comparación de la abundancia relativa entre las muestras. En este análisis las diferencias de cada proteína identificada en las muestras de purificados respecto al control TAP se cuantificaron como tasa de enriquecimiento (FC, del inglés *fold change*) y la significación estadística de estas diferencias se determinó como FDR (del inglés, *false discovery rate*) (Sección 6.33).

Tomando como valor de corte para la significancia de las diferencias entre muestras de $q < 0,05$ se obtuvo un listado de 62 interactuantes candidatos (Anexos Tabla XIII) (Figura 7.4.2). La presencia específica de una de las proteínas candidatos identificadas (DHCR24), con un valor de $q < 0,01$, se verificó adicionalmente mediante *Western blot* (Figura 7.4.1 B).

La figura 7.4.2 muestra la composición en componentes subcelulares de las proteínas enriquecidas en los purificados de SIGMAR1-TAP. Destaca la presencia de 23 proteínas previamente descritas como proteínas de las MAM

(Poston, Duong *et al.* 2011)(Zhang, Williamson *et al.* 2011)(Poston, Krishnan *et al.* 2013)(Sala-Vila, Navarro-Lérida *et al.* 2016) (**Figura 7.4.2**).



Resultados

Figura 7.4.2: Composición de los complejos de SIGMAR1-TAP. Diagrama representativo de las proteínas identificadas específicamente en complejos SIGMAR1-TAP clasificadas de acuerdo a su localización subcelular: en amarillo, ER; en verde, membrana plasmática y en blanco citosol. Dentro del compartimento ER, se especifican subcompartimentos de esta estructura. En azul ERGIC: compartimento intermedio ER-Golgi; en rosa MAM: membranas del ER asociadas a mitocondrias; en verde claro ERES: sitios de salida del ER; en rojo ERQC: compartimento de control de la calidad del ER.

Estos resultados indican que los purificados de SIGMAR1-TAP están enriquecidos en componentes de las MAM, y valida que la proteína de fusión se localiza de manera similar a la proteína SIGMAR1 endógena (Lewis, Tsai *et al.* 2016). Cabe destacar además, que entre las proteínas identificadas en los purificados de SIGMAR1-TAP se hallan la chaperona BiP/Grp78 (HSPA5), previamente descrita como pareja de interacción de SIGMAR1, y la enzima de la biosíntesis de colesterol, HMGCR, cliente potencial de complejos SIGMAR1-INSIG1 (Hayashi, Hayashi *et al.* 2012), indicando que la aproximación experimental seguida permite identificar interacciones potencialmente relevantes.

La lista de 62 interactuantes se sometió a pruebas de sobre-representación (ORA) de términos de GO de PROCESOS BIOLÓGICOS, FUNCIONES MOLECULARES, COMPONENTES CELULARES de la base de anotaciones GO-Slim/GO-Complete y de VÍAS DE SEÑALIZACIÓN de las bases de anotaciones de PANTHER de manera similar a la descrita en Sección 6.31.

Este análisis reveló que la mayoría de las proteínas identificadas en los complejos asociados a SIGMAR1-TAP (53/62; 85.5%) son componentes integrales de membrana, con un enriquecimiento significativo ($q < 0,01$) en proteínas del ER y del compartimento intermedio ER-Golgi (ERGIC, del inglés *ER-Golgi intermediate compartment*) (anotaciones de GO) (**Figura 7.4.2**). El TRANSPORTE Y LOCALIZACIÓN, y especialmente de proteínas, resultaron los procesos biológicos más sobre-representados entre los interactuantes específicos de SIGMAR1-TAP, seguidos de GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS y METABOLISMO DE GLICEROLÍPIDOS (**Anexos Tabla XIII**).

Dentro de la categoría TRANSPORTE/LOCALIZACIÓN, se distinguen tres categorías de proteínas: una primera categoría que agrupa factores transportadores de iones y biomoléculas de bajo peso molecular a través de membranas (**transportadores**), una segunda categoría que incluye factores de la maquinaria de translocación/ inserción de proteínas a través de la membrana del ER, (**complejo translocon**) y un tercer grupo implicado en el transporte vesicular de proteínas (**transporte vesicular**).

Dentro del subgrupo de **transportadores** se encuentran proteínas formadoras de canales iónicos (Zn^{2+} , SLC39A14; Na^+/K^+ , ATP1A1; Ca^{2+} , AT2A2; K^+/Ca^{2+} , TMEM109) y transportadores activos de biomoléculas de bajo peso molecular (tiamina, SLC19A2; glucosa SLC2A2; conjugados sulfatados de xenobióticos y esteroides y ácidos grasos cortos ($n < 5$), SLC22A9). El hallazgo de este grupo de canales es interesante teniendo en cuenta que previamente se

ha descrito la capacidad de SIGMAR1 de modular la actividad de ciertos canales iónicos, incluyendo receptor de inositol-3 fosfato 3 (ITPR3) en neuronas, responsable del tránsito de Ca^{2+} de ER hacia las mitocondrias a través de las MAM en situaciones de estrés (revisado en (Su, Su *et al.* 2016)). En este contexto, es interesante que los niveles de mRNA de ITPR1, 2 y 3 están aumentados en las células deficientes en SIGMAR1 (Sección 7.1), lo que podría reflejar un mecanismo compensatorio frente a una deficiencia de la función de éstos (n.d en proteómica). En este sentido, la presencia del canal de calcio ATP2A2 entre los interactuantes de SIGMAR1, permite especular que SIGMAR1 podría tener también un papel en la modulación de la recuperación de Ca^{2+} al ER. Sin embargo, los niveles de mRNA de ATP2A2 no se encuentran alterados en las células deficientes en SIGMAR1 (Sección 7.1), si bien los niveles de proteína tienden a ser algo menores (-12%; $p=0,021$; $q=0,112$), aunque no significativo para el valor de corte impuesto de $q<0,05$.

Un hallazgo sorprendente en los complejos de SIGMAR1-TAP es la presencia de varios componentes del **complejo translocón**, una estructura esencial para la translocación de proteínas nascentes a través de la membrana del ER. Entre estos componentes se encuentran la proteína SSR3, necesaria para el reclutamiento al ER de péptidos nascentes asociados a complejos de traducción citosólicos a través de la SRP (del inglés *signal recognition particle*), SEC61A1, el componente estructural mayoritario del canal de traslocación, así como TRAM1, esencial para la translocación de los péptidos nascentes al lumen del ER (revisado en (Dudek, Pfeffer *et al.* 2015)).

En la categoría sobre-representada GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS aparecen asimismo varias proteínas componentes del complejo OST (del inglés *accharyl transferase complex*), estrechamente relacionado física y funcionalmente con el translocón para la glicosilación co-traducciona de los polipéptidos que son translocados hacia el lumen del ER (Chavan, Yan *et al.* 2005), con un papel esencial en el control de la calidad de proteínas en el ER (ERQC, del inglés *ER quality control*) (Anexos Tabla XIII).

También relacionadas con el complejo translocon, aparecen también en los complejos de SIGMAR1-TAP chaperonas del ER que asisten el proceso de plegamiento co-traducciona de proteínas y el ERQC (CANX, HSPA5, HSPA8 DNAJC22, LMF2) (revisado en (Dudek, Pfeffer *et al.* 2015)).

Muchos de los componentes del translocón y factores del ERQC identificados, son a su vez componentes del **retrotranslocón**, una estructura que

permite la traslocación del lumen del ER al citosol de proteínas terminalmente mal plegadas cuyo destino es la degradación proteosomal asociada a ER (ERAD, del inglés *ER-associated degradation*) (Kadowaki, Nagai *et al.* 2015). La presencia de SIGMAR1 en complejos que participan en la ERAD estaría en acuerdo con algunas de sus funciones atribuidas, en particular la modulación de la vida media de IRE1 (ERN1) durante la inducción de estrés ER (Mori, Hayashi *et al.* 2013) y proteínas implicadas en el metabolismo de esteroides (Hayashi, Hayashi *et al.* 2012). Esta noción es reforzada también por la presencia de ubiquitina (UBC) en los complejos purificados.

La posible participación de SIGMAR1 en estos complejos macromoleculares implicados en la biosíntesis de proteínas de membrana y su control de calidad post-traducciona permite especular que SIGMAR1 podría cooperar en la regulación del destino de proteínas que son sintetizadas en el ER (revisado en (Anelli y Sitia 2008))(Kakoi, Yorimitsu *et al.* 2013)(Le Fourn, Park *et al.* 2013).

Finalmente, dentro de la categoría TRANSPORTE/LOCALIZACIÓN, destaca la presencia de componentes celulares implicados en el **transporte vesicular** de proteínas entre el ER, ERGIC y cis-Golgi. Dentro de esta categoría encontramos factores implicados en el reciclaje de proteínas del ER como RER1 y KDELR1 (revisado en (Gomez-Navarro y Miller 2016) y (Cancino, Jung *et al.* 2013)), así como proteínas relacionadas con el sistema de transporte de vesículas COPII, como SURF4, YIPF4 y las proteínas REEP4 y REEP6, que se encuentran enriquecidas en zonas de salida de vesículas COPII, sitios de salida del ER (ERES, del inglés *ER exit site*), y se han postulado como factores determinantes de la capacidad de carga de este tipo de vesículas (Mitrovic, Ben-Tekaya *et al.* 2008)(revisado en (Gomez-Navarro y Miller 2016)). También aparece en estos complejos de SIGMAR1-TAP la proteína del ERGIC GOLT1B, potencialmente implicada en la fusión de las vesículas de transporte provenientes del ER con la membrana del Golgi.

La figura 7.4.3 muestra algunas de las interacciones previamente descritas entre las proteínas identificadas en los complejos purificados de SIGMA-TAP (**Figura 7.4.3**).

Cabe destacar que las interacciones físicas o el co-fraccionamiento de SURF4 con YIPF4, HSPA5, S100A9 y VKORC1 (Havugimana, Hart *et al.* 2012, Hein, Hubner *et al.* 2015) han sido reportadas previamente, lo que refuerza que estas interacciones reflejan complejos funcionales con los que interacciona

SIGMAR1 (**Figura 7.4.3**). En este sentido, es interesante que el ortólogo de levaduras de SURF4, ERV29, interactúa con las esteroisomerasas, ERG25, ERG11, interactuantes de la C7-esteroisomerasa ERG2 (anotaciones de BIOGRID), la proteína evolutivamente más próxima a SIGMAR1 (Hanner, Moebius *et al.* 1996), lo que refuerza la noción de que SIGMAR1 y SURF4 podrían pertenecer a un complejo fisiológica y evolutivamente relevante. Asimismo, ERV29 (el ortólogo en levadura de SURF4) interactúa con las proteínas de la familia de p24, ERP1, ERP5, ERV25 y EMP24 (anotaciones de BIOGRID), implicadas en el control de calidad de proteínas de exportación a Golgi (glicosiladas o GPI) (revisado en (Strating y Martens 2009) y (Pastor-Cantizano, Montesinos *et al.* 2016)), con las subunidades GPI2 y GPI8 (anotaciones de BIOGRID) del complejo GPI transamidasa, responsable de la transferencia de anclaje GPI a proteínas recién sintetizadas en el lumen del ER (revisado en (Pastor-Cantizano, Montesinos *et al.* 2016) y (Kinoshita, Maeda *et al.* 2013)), con la ARF ATPasa que media la formación de vesículas COPII, SAR1A (Aridor, Fish *et al.* 2001) y otros factores asociados con las vesículas COPII (GOT1, EMP47) (anotaciones de BIOGRID), así como con componentes del traslocón (SEC61, SSH1) (Chavan, Yan *et al.* 2005)(Tarassov, Messier *et al.* 2008) (anotaciones de BIOGRID), por lo que se puede especular que complejos que contienen SIGMAR1 podrían estar asociados a áreas del ER de producción de proteínas que han de ser exportadas a Golgi. ERV29 también interactúa con ARF1 (Tarassov, Messier *et al.* 2008), la ARF GTPasa que media el transporte retrógrado de vesículas COPI de Golgi a ER (revisado en (Cherfils 2014)) y con el componente de vesículas COPI, RET2, que refleja el papel de las vesículas COPI en la recuperación de los mediadores del transporte de COPII (Zhao, Claude *et al.* 2006).

El transporte vesicular entre ER y Golgi está mediado por microtúbulos (revisado en (Gurel, Hatch *et al.* 2014)). Así, resulta interesante el hallazgo en estos complejos de las tubulinas (TUBB y TUBB4B) y de proteínas adaptadoras que median el acoplamiento de las vesículas COPII con estas estructuras, como la proteína CHP1 y la proteína ZFYVE27 (anotaciones Uniprot). En particular, se ha descrito que ZFYVE27 es capaz de unir proteínas REEP4/6 y SURF4, enlazando estas estructuras con con elementos motores del citoesqueleto como la kinesina 1 (KIF5A, KIF5B) (Matsuzaki, Shirane *et al.* 2011) (**Figura 7.4.3**).

También presentes en los complejos purificados de SIGMAR1-TAP se encontraron las proteínas TMEM33 y ARL6IP1, dos proteínas relacionadas que

participan junto a la familia de proteínas Rtn (del inglés *reticulon*) en la modelación de la arquitectura tubular del ER (Urade, Yamamoto *et al.* 2014; Yamamoto; Yoshida *et al.* 2014). Cabe destacar que el ortólogo de levadura de TMEM33 (POM33) interacciona también con los de los interactuantes de SIGMAR1-TAP, REEP6 (YOP1) y SURF4 (ERV29), así como con otros componentes de la formación de vesículas COPII en levaduras, YIP3, GOT1 y SEC12 y con el factor modificador de membranas RTN1 (Miller, Lo *et al.* 2005) (**Figura 7.4.3**).

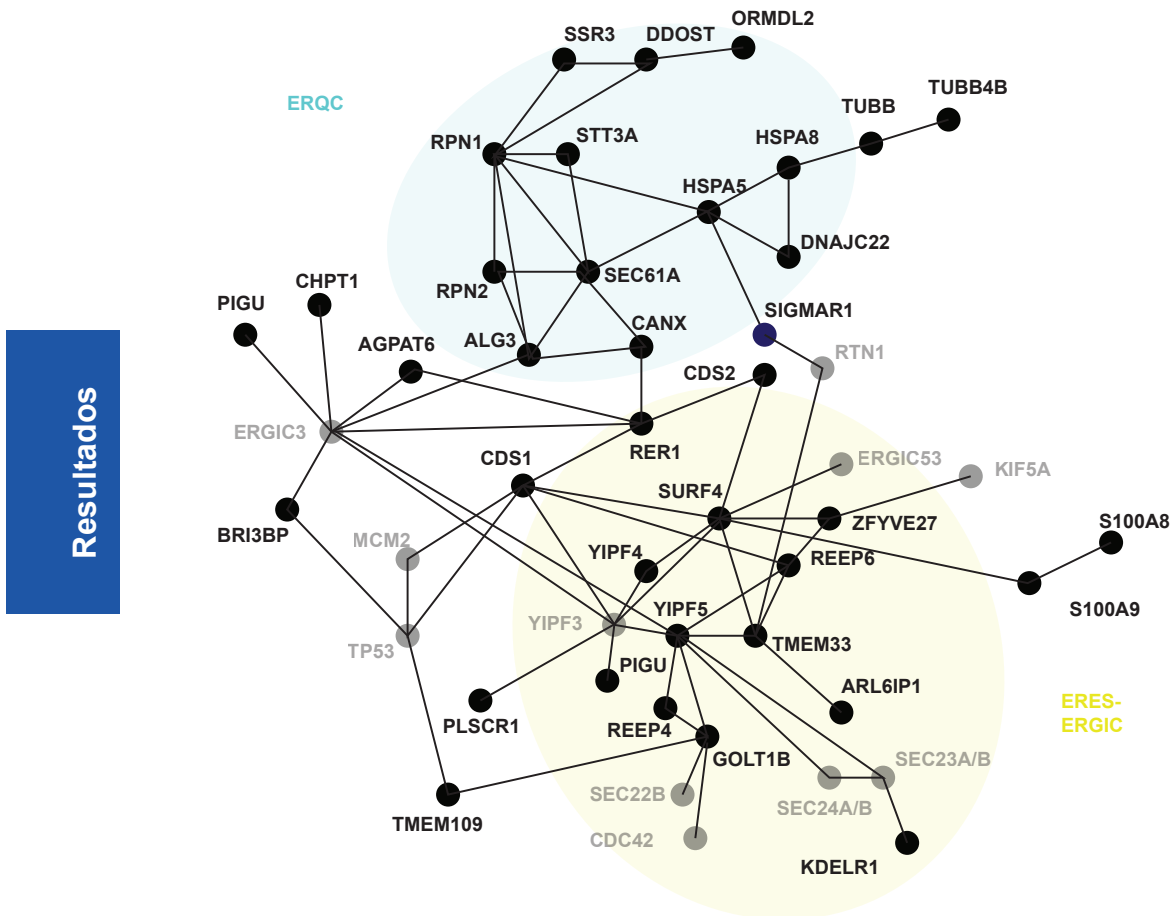


Figura 7.4.3: Interacciones físicas previamente descritas entre las proteínas identificadas en los complejos de SIGMAR1-TAP (Anotaciones de BIOGRID y STRING). Diagrama representativo de las interacciones previamente descritas entre las proteínas identificadas específicamente en complejos SIGMAR1-TAP o sus ortólogos en ratón y levadura. En menor opacidad se representan algunos interactuantes clave de estas proteínas que no fueron identificados en este trabajo. SIGMAR1 se representa en color violeta.

También en la co-purificación con SIGMAR1-TAP aparecen los componentes de la calprotectina (S100A8 y S100A9). Estas proteínas forman un complejo con función biológica pleiotrópica, aunque cabe señalar en este caso

su implicación a nivel molecular en la polimerización de microtúbulos y su interacción con SURF4 (Havugimana, Hart *et al.* 2012) (**Figura 7.4.3**).

Finalmente, y dados los resultados descritos en [Sección 7.3.2.6](#), donde se observa una sobre-representación de genes de la vía de TP53, regulados tras el silenciamiento de SIGMAR1, cabe destacar el hallazgo en los complejos SIGMAR1-TAP de la proteína BRI3BP, pareja de interacción que estabiliza TP53, y de la proteína TMEM109 (Transmembrane protein 109), que interacciona con TP53 y participa en la respuesta a daño de DNA mediada por éste (Yamazaki, Sasaki *et al.* 2010).

Con el objetivo de conocer mejor la relación de SIGMAR1 con sus potenciales parejas de interacción identificadas en este estudio ([Anexos Tabla XIII](#)), examinamos los cambios de abundancia de éstas en células Huh-7 deficientes en SIGMAR1 (shS1R2) con respecto a células control (shCTRL1) en los datos de proteómica diferencial ([Sección 7.3.2](#)), así como los cambios de los niveles de expresión de sus mRNA verificados en la transcriptómica diferencial ([Sección 7.3.1](#)).

De las 62 proteínas específicamente asociadas a SIGMAR1-TAP ($q < 0,05$), sólo 14 fueron identificadas en la proteómica de extractos totales, lo que indica que éstas están enriquecidas en los purificados de SIGMAR1-TAP y no son necesariamente componentes mayoritarios de las células Huh-7. De éstas, las proteínas REEP6, CHP1, ATP1A1, ATP2A2 y FADS2 se encuentran **sub-reguladas post-transcripcionalmente** en las células deficientes en SIGMAR1 ($p < 0,05$ proteómica; $q > 0.5$ en transcriptómica), mientras HACD3 se encuentra **sobre-regulada post-transcripcionalmente** ($p < 0,05$ proteómica; $q > 0.5$ en transcriptómica). Estos datos sugieren una regulación diferencial de la acumulación postraduccional de proteínas en las células deficientes en SIGMAR1. Además, entre los interactuantes de SIGMAR1-TAP, los transcritos de DHCR7, CD63, FADS1, FADS2, HSPA5 y GOLT1B, se encuentran **inducidos** a nivel de mRNA ($q < 0.0001$), sin que se observe un incremento concomitante a nivel de proteína ($p > 0.5$; cuantificadas con al menos 3 péptidos). En el caso de FADS2, ésta aparece en menores niveles de proteína a pesar de esta inducción a nivel de mRNA. Por el contrario, HSPA8, CANX y TUBB se encontraron **reprimidas** a nivel de mRNA sin cambios a nivel de proteína. Esta discrepancia entre transcriptómica y proteómica, podría implicar que estas proteínas podrían estar **reguladas post-transcripcionalmente**, aunque este extremo debe ser confirmado, ya que no se puede descartar que obedezca a la menor sensibilidad de esta técnica. En conjunto, se identificaron 6 proteínas, REEP6,

CHP1, FADS2, ATP1A1, ATP2A2 y potencialmente CD63, FADS1, DHCR7, SCD y GOLT1B del complejo SIGMAR1-TAP que podrían ser **sub-reguladas post-transcripcionalmente** por SIGMAR1. Estos datos sugieren que algunas proteínas asociadas o vecinas de SIGMAR1 podrían depender de SIGMAR1 para su localización y estabilización. En todo caso, esta circunstancia no aplica a todas las proteínas asociadas a SIGMAR1-TAP, ya que HACD3 parece por el contrario estar estabilizada ($p=0,025$) en las células deficientes en SIGMAR1. Además, los transcritos de otras proteínas de estos complejos se encontraron **inducidos** ($q<0,05$) en la transcriptómica pero no fueron detectados en la proteómica (o fueron cuantificados con menos de 3 péptidos): YIPF5, SNX13, SNX14, TRAM1, SLC22A9, CYBA, SSR3; mientras otros como RER1, SLC19A2, TUBB4B **reprimidos**, lo que sugiere la función de estos componentes podría estar comprometida por la reducción de los niveles de SIGMAR1 en estos complejos.

Es interesante, además, que otras proteínas del ERES/ERGIC, relacionadas física y funcionalmente con los interactuantes de SIGMAR1-TAP (**Figura 7.4.3, en opacidad reducida**) como SEC22B, SEC24A, SEC24C, SEC24D y SEC31A se encuentran regulados a nivel de proteína y/o RNA en las células deficientes en SIGMAR1 ([Sección 7.3.2.2](#)), lo que sugiere que la localización de SIGMAR1 en estas estructuras podría subyacer a su papel en la regulación de los niveles y presumiblemente en la función de estas proteínas clave en la exportación de cargos del ER.

8. Discusi3n

SIGMAR1 es una proteína celular residente en el ER, predominantemente en zonas de contacto entre ER y las mitocondrias (MAM) (Hayashi y Fujimoto 2010), y cuyas funciones poco conocidas se han asociado a un papel en la homeostasis y la supervivencia celular frente a diversas situaciones de estrés (revisado en (Hayashi 2015)). Paradigmas de esta noción son la asociación de la pérdida de su función con una mayor incidencia o severidad del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad del Parkinson (PD) (revisado en (Nguyen, Lucke-Wold *et al.* 2015)), mientras la sobre-expresión de sus niveles es patente en varios tipos de cáncer (Sun, Kawahara *et al.* 2014, Xu, Yi *et al.* 2014). Las funciones de SIGMAR1 implicadas en estas condiciones y en la respuesta al tratamientos con sus ligandos, así como los mecanismos moleculares de éstas son objeto de investigación por su interés en clínica para terapias analgésicas (revisado en (Davis 2015)), neurorestauradoras (revisado (Ruscher y Wieloch 2015)) y antitumorales (revisado en (van Waarde, Rybczynska *et al.* 2015)). Recientemente nuestro grupo ha descrito por primera vez que SIGMAR1 funciona como un factor celular proviral en el inicio de la infección por el virus de la Hepatitis C (HCV), regulando un paso posterior a la entrada y conducente a la replicación viral, que es distinto de la traducción primaria y que no altera la maquinaria de replicación viral persistente (Friesland, Mingorance *et al.* 2013).

En este trabajo hemos abordado el estudio de la función de SIGMAR1 en la infección por HCV, empleando aproximaciones tanto mecanísticas como sistémicas. Por un lado, hemos estudiado el papel de SIGMAR1 en la regulación de la respuesta innata antiviral frente a virus de RNA y en el destino de las proteínas virales en ausencia de replicación, siguiendo hipótesis de trabajo derivadas de nuestros estudios previos. Además, hemos realizado estudios no sesgados del perfil proteómico y transcriptómico diferencial de células deficientes en SIGMAR1. Los datos de transcriptómica y proteómica diferencial de genes codificantes permitieron validar por dos técnicas independientes la regulación de una alta proporción de proteínas a ambos niveles, en las que la magnitud de la regulación del RNA correlacionó muy bien con los cambios a nivel de proteínas (Sección 7.3.1), lo que refuerza la validez de los resultados para la predicción de la regulación transcripcional o post-transcripcional de las proteínas identificadas en la proteómica. Además, el perfil de regulación diferencial transcriptómico y proteómico encontrado en este trabajo en las células Huh-7 deficientes en SIGMAR1 mostró un notable solapamiento con los procesos regulados en el único trabajo previo de transcriptómica de células defi-

cientes en SIGMAR1, un microarreglo de RNA de cultivo primario de neuronas silenciadas mediante vectores adenovirales para la expresión de siRNA (small interfering RNA) (Tsai y Rothman 2012). La combinación de los resultados de estos dos trabajos validan la regulación por SIGMAR1 de procesos como la regulación del citoesqueleto, el metabolismo de lípidos y el transporte vesicular. En cualquier caso, los datos de transcriptómica diferencial que no han sido validados por la proteómica se trataron cautelosamente y se consideraron como información complementaria en conjunto con los datos contrastados por ambas técnicas. Más adelante, la validez de estos datos deberá ser evaluada mediante técnicas alternativas. El perfil transcriptómico también produjo datos de RNA no codificantes regulados diferencialmente en células deficientes en SIGMAR1 que aún no han sido validados por otros métodos y, con pocas excepciones, no fueron considerados en este trabajo y deberán ser estudiados posteriormente. Por otra parte, hemos estudiado el mapa de interacciones mediante la caracterización proteómica de complejos que contienen la proteína de fusión SIGMAR1-TAP. Este sistema nos permitió identificar interacciones estadísticamente significativas de complejos potencialmente asociados a SIGMAR1, validados por la identificación específica de proteínas previamente descritas como interactuantes de SIGMAR1 como GRP78 (HSPA5), así como proteínas enriquecidas en las MAM como las proteínas de la biosíntesis del fosfatidil-inositol (PI) (Sección 7.4.1). Los resultados de este estudio además revelaron la posible interacción o co-distribución de SIGMAR1 con proteínas de la salida del ER (ERES), y las membranas del compartimento intermedio ER-Golgi (ERGIC). Los resultados obtenidos por las diferentes aproximaciones experimentales se integraron a fin de tener en cuenta las nociones producidas por cada uno de ellas en la elaboración de un modelo e hipótesis de trabajo para futuros estudios sobre detalles del ciclo viral poco conocidos, y potencialmente susceptibles de tratamiento antiviral, de HCV y quizá otros virus de RNA similares y sobre las funciones fisiológicas de SIGMAR1 que subyacen a su papel en otras importantes enfermedades humanas.

8.1 SIGMAR1 regula la respuesta innata antiviral mediada por los RLRs

El papel proviral más transitorio de SIGMAR1 en células con la variante mutante defectiva de RIG-I, Huh-7.5.1, respecto a sus parentales Huh-7 sugirió un posible papel de SIGMAR1 en la regulación de la vía antiviral mediada por los RLRs (Friesland, Mingorance *et al.* 2013). Esta posibilidad era interesante además por la localización preferencial de SIGMAR1 en las MAM, que funcionan como plataformas de la señalización de la vía de los RLRs (Horner, Liu *et*

al. 2011)(revisado en (Belgnaoui, Paz *et al.* 2011)). En este trabajo hemos abordado el estudio del papel de SIGMAR1 en la regulación de la respuesta innata antiviral mediante el silenciamiento génico en distintas líneas celulares humanas y hemos verificado un papel de SIGMAR1 en el control de la respuesta de inducción de genes estimulados por virus (VSGs) frente a estímulos virales de la vía de los RLRs. Además, mediante la disección en etapas de la vía hemos aprendido que los niveles de SIGMAR1 regulan la respuesta a estímulos de la vía de los RLRs a la altura de RIG-I y MAVS, pero no al final de la cascada, empleando la variante constitutivamente activa de IRF3, IRF35D (Sección 7.1.5). Estos resultados sugieren que los niveles de SIGMAR1 regulan la vía a un nivel compatible con la formación de los “signalosomas” que median la transducción de la señal entre MAVS, los mediadores ulteriores TRAF3, TRAF6, TBK1, NEMO (IKBKKG) y los efectores IRF3 y NFκB (NFKB1). Alternativamente, la regulación por SIGMAR1 podría afectar selectivamente la activación de NFκB, o bien, la activación de factores de transcripción auxiliares de la vía, como AP1, EP300, CTNNB1, TP53, STAT1, STAT3, que son sensibles a diversas condiciones de estrés celular. Esta posibilidad no ha sido abordada sistemáticamente en este trabajo y deberá ser explorada más adelante. Los datos de proteómica y transcriptómica diferencial de las células deficientes en SIGMAR1, sugieren que la confluencia de más de uno de estos factores podría contribuir a la regulación por SIGMAR1 de esta vía de la respuesta innata, pero la posible contribución de cada uno de estos procesos en los aspectos cualitativos y cinéticos de la activación de la respuesta en las células deficientes en SIGMAR1 deberá ser validada experimentalmente en futuros experimentos.

En este trabajo, y previamente (Vollrath, Sechi *et al.* 2014) (MacVicar, Mannack *et al.* 2015), se ha observado que las células deficientes en SIGMAR1 presentan un defecto de la degradación autofago-lisosomal (Sección 7.3.2.5), lo cual se asocia con una respuesta antiviral exacerbada ante estímulos antivirales (Tal, Sasai *et al.* 2009), presumiblemente a través del papel de la autofagia en el aclaramiento de las plataformas de señalización y de los mediadores antivirales (revisado en (Tal y Iwasaki 2009)). Teniendo en cuenta las posibles funciones de SIGMAR1 en el flujo autofágico (Vollrath, Sechi *et al.* 2014) (MacVicar, Mannack *et al.* 2015)(Sección 7.3.2.5) y las funciones reguladoras de la autofagia sobre la vía de los RLRs (Tal, Sasai *et al.* 2009), es razonable hipotetizar que las células deficientes en SIGMAR1 contengan un mayor número de plataformas de señalización a causa de la acumulación de mitocondrias no degradadas y pudieran mostrar un incremento en la velocidad de formación y/o número de los “signalosomas” respecto a las células control. La agregación de

MAVS en las membranas, el reclutamiento hacia el “signalosoma” y activación de mediadores como TRAF3/TRAF6 y TBK1 y la transducción de la señal hacia IRF3 o NF κ B estarían potenciados en estas condiciones (revisado en (Tal y Iwasaki 2009)), facilitándose así la a formación de complejos “enhanceosomas” para la regulación de promotores de genes antivirales. Mecanísticamente, SIGMAR1 parece tener un papel en el mantenimiento de la estructura y función de las MAM (Watanabe, Ilieva *et al.* 2016), cuya integridad física y funcional es necesaria para la biogénesis de los autofagosomas al menos en algunos tipos de autofagia (Hamasaki, Furuta *et al.* 2013) y la maduración de la vía autofago-lisosomal mediante la relocalización específica de ATG14 y STX17 (Diao, Liu *et al.* 2015, Liu, Zhi *et al.* 2015). Además, los resultados de este trabajo sugieren un papel de SIGMAR1 en la salida de vesículas del ER (Sección 8.3). Es razonable, por lo tanto, especular que la función de SIGMAR1 en las MAM podría mediar la correcta composición de las membranas de los autofagosomas, modulando así la velocidad del flujo autofágico. De esta manera, las células deficientes en SIGMAR1, con un flujo autofágico reducido, tardarían más en disponer de las plataformas de membranas relacionadas con la señalización antiviral (Tal, Sasai *et al.* 2009, Muppirala, Gupta *et al.* 2011, van Zuylen, Doyon *et al.* 2012). Por otro lado, las MAM son sitios claves en la biosíntesis de fosfatidilinositol (PI), el precursor de los fosfoinosítidos (PIs), fosfolípidos señal cuya distribución en las vesículas autofágicas regula la maduración de la vía autofago-lisosomal (Cullen y Carlton 2012). En este sentido, es interesante que los resultados de la proteómica y transcriptómica de las células deficientes en SIGMAR1 apuntan a una regulación diferencial en el metabolismo o disposición de PIs (Sección 7.3.4.3) y que varias proteínas de la biosíntesis del PI (AGPAT2, GPAT4, CDS1, CDS2) aparecen entre los componentes de los complejos moleculares asociados a la proteína de fusión SIGMAR1-TAP (Sección 7.4). También en la proteómica de complejos de la proteína de fusión SIGMAR1-TAP, se identificó la proteína SURF4 (Sección 7.4), pareja de interacción de la STING (TMEM173) (Li, Wang *et al.* 2011), proteína moduladora antiviral residente en las MAM (revisado en (Vance 2014)) que modula la activación y translocación nuclear de IRF3 (revisado en (Maringer y Fernandez-Sesma 2014)). Este hallazgo refuerza la noción sobre la proximidad de SIGMAR1 y las plataformas de señalización antiviral, y el hecho de que la afectación de estructuras que contienen SIGMAR1 podría afectar la estructura y función de estas plataformas. Se ha descrito que la salida de STING (TMEM173) del ER es limitante para su actividad en la potenciación de la respuesta antiviral (Dobbs, Burnaevskiy *et al.* 2015). Así, el papel de SIGMAR1 en la regulación del transporte de vesículas de salida del ER (Sección 7.3)(Sección 8.3) podría regular la composición y

así el destino de membranas derivadas de las MAM que conforman los “signalosomas” antivirales. En acuerdo con esto, la transcriptómica y la proteómica diferencial de las células deficientes en SIGMAR1 sugieren una afectación de la morfología y función de las mitocondrias. Por ejemplo, varios mediadores de la mitofagia, incluyendo ARF1, AFMR, MFN1 y PGAM5, PINK, y PARK2 aparecen diferencialmente regulados en las células deficientes en SIGMAR1 (Sección 7.3). Esta posible relación de SIGMAR1 con la regulación de la mitofagia está en acuerdo con los estudios previos que atribuyen a SIGMAR1 un papel protector sobre la función mitocondrial (Shioda, Ishikawa *et al.* 2012) (revisado en (Tsai, Hayashi *et al.* 2009) y (Fukunaga, Shinoda *et al.* 2015)).

Es interesante que, recientemente se ha descrito que SIGMAR1 podría inhibir la actividad de ELMOD2 (*Engulfment and cell motility domain 2*), un GAP de Arf y Arl-GTPasas que se ha relacionado con una función activadora sobre la inducción de IFN-I y III frente a estímulo viral (Pulkkinen, Bruce *et al.* 2010), lo que sugiere que SIGMAR1 podría modular la actividad de las pequeñas GTPasas y que esta función molecular podría subyacer a su papel regulador de la respuesta innata (Yang, Qu *et al.* 2011).

Alternativa o adicionalmente, la formación de los complejos “enhanceosomas” para la regulación de los promotores de genes antivirales pudiera estar potenciada en las células deficientes en SIGMAR1, ya que, de acuerdo a los resultados de proteómica y transcriptómica diferencial, éstas células podrían tener una regulación diferencial de programas transcripcionales relacionados con diversos tipos de estrés celular que funcionan como vías auxiliares para la potenciación de la respuesta antiviral (revisado en (Collins y Mossman 2014)) (Kim y Yoon 2016)(Youlyouz-Marfak, Gachard *et al.* 2007)(Yan, Wei *et al.* 2015). Así, la desregulación de la señalización de las Rho GTPasas (Sección 7.3.2.1) (Anexos Tabla IV) el posible incremento de la actividad transcripcional de TP53, NFκB y AP-1 (ATF-2 y JUN) en las células deficientes en SIGMAR1 (Sección 7.3)(Anexos Tabla XII) pudiera primar la magnitud de la respuesta antiviral mediante la regulación de la cinética de formación del “enhanceosoma” de los VSGs (revisado en (Collins y Mossman 2014)). Asimismo, los datos de proteómica diferencial indican que CTNNB1 se encuentra en mayores niveles en las células deficientes en SIGMAR1 (Sección 7.3.1) y sin embargo su función de cofactor transcripcional sobre genes diana de la vía canónica Wnt/CTNNB1 parece estar comprometida (Sección 7.3.2.6)(Anexos Tabla XII), La deficiencia de la vía Wnt/CTNNB1 o la incapacidad de CTNNB1 para su localización o sus funciones nucleares en las células deficientes en SIGMAR1 también pudiera

contribuir a una respuesta antiviral incrementada de estas células frente a la infección con SeV, ya que la activación de este coactivador transcripcional parece tener un papel regulador sobre la respuesta antiviral mediada por IRF3 y NF- κ B (Zhu, Coyne *et al.* 2011, Baril, Es-Saad *et al.* 2013, Khan, Dô *et al.* 2015, Marcató, Luron *et al.* 2016). Por su parte, la actividad incrementada de la vía de TP53 (Sección 7.3.2.6)(Anexos Tabla XII)(Sección 8.7), también podría suponer una potenciación de la respuesta antiviral (Takaoka, Hayakawa *et al.* 2003, Rivas, Aaronson *et al.* 2010, Muñoz-Fontela, Pazos *et al.* 2011).

8.2 SIGMAR1 regula la replicación viral mediante la regulación del destino de las proteínas de HCV traducidas en el ER y probablemente limita la formación de las plataformas de replicación viral

SIGMAR1 es un factor limitante en los inicios de la infección por HCV en las células Huh-7, pero no tras el establecimiento de la infección o en una infección persistente, y tiene un efecto más transitorio en células hiperpermissivas Huh-7.5.1 (Friesland, Mingorance *et al.* 2013), que es independiente de su defecto en la respuesta antiviral (Sección 7.1.6).

La restricción de la función de SIGMAR1 al inicio del ciclo replicativo viral, en un paso posterior a la entrada, diferente de la traducción primaria y anterior a la replicación viral *per se*, apunta a pasos poco estudiados del ciclo viral inmediatamente posteriores a la entrada, incluyendo el transporte de las proteínas y genoma virales hacia su localización correcta en el ER y pasos inmediatamente posteriores a la síntesis de la poliproteína viral que incluyen su correcta inserción, procesamiento y modificación co- y post-traduccionales, conformación, estabilidad e interacciones con factores hospedadores para la formación de complejos de replicación funcionales.

Considerando el carácter limitante de la formación de los complejos de replicación viral para el establecimiento de la infección, en este trabajo quisimos abordar el estudio del destino de la poliproteína viral tras su síntesis en las células deficientes en SIGMAR1, específicamente la estabilidad y localización de las proteínas no estructurales que constituyen los complejos de replicación viral, como mecanismo potencial de regulación por SIGMAR1 del inicio de la infección por HCV.

El estudio de la acumulación y distribución de proteínas virales de HCV en ausencia de replicación mediante sistemas de expresión de plásmidos pTM y pT7 (Romero-Brey, Merz *et al.* 2012) o virus vaccinia recombinante (Gómez, Perdiguero *et al.* 2013) muestra que las proteínas de la replicasa NS3 y NS5A

pero no la proteína estructural core se acumulan en menor grado (Sección 7.2.2 Figura 7.2.2 A) y parecen distribuirse de manera diferente (Sección 7.2.2 Figura 7.2.4 A) en las células deficientes en SIGMAR1 respecto a las células control. En conjunto, los datos sugieren que SIGMAR1 regula el destino de las proteínas virales en una etapa del ciclo conducente a la replicación viral, apuntando a un posible papel de SIGMAR1 en la correcta distribución y funcionalidad de las proteínas formadoras de los complejos de replicación, que podría estar a la base de su papel como factor de permisividad. Teniendo en cuenta que la fase exponencial de la replicación depende de la formación de estructuras especiales de membranas (redes membranosas) que aislan los complejos de replicación viral, es especulable que SIGMAR1 medie la distribución de las proteínas virales hacia determinados dominios o regula la deformación de las membranas para la formación de estas estructuras. Esta hipótesis deberá ser abordada más adelante mediante el estudio detallado del destino subcelular de las proteínas de HCV y de la formación de complejos de replicación en las células deficientes en SIGMAR1.

Atendiendo al papel recientemente propuesto de SIGMAR1 en la autofagia (Vollrath, Sechi *et al.* 2014, MacVicar, Mannack *et al.* 2015), y la relevancia de algunos factores del inicio de la autofagia en el establecimiento de la infección viral, estudiamos la autofagia en las células Huh-7 deficientes en SIGMAR1, midiendo los marcadores de autofagosomas SQSTM1 y la forma conjugada a fosfatidiletanolamina (PE) de LC3B (MAP1LC3B), LC3-II, en condiciones basales, bajo situaciones de estrés como el tratamiento con tapsigargina (Sección 7.3.3 Figura 7.3.5 A) o la sobre-expresión de proteína viral en el ER (datos no mostrados), así como la cinética de aclaramiento de cargos de autofagosomas o flujo autofágico, verificando que las células deficientes en SIGMAR1 muestran niveles basales incrementados de cargos de autofagosomas y un flujo autofágico ralentizado respecto a las células control. Estos resultados están en acuerdo con los estudios que apuntan una autofagia defectiva en las células deficientes en SIGMAR1 (Vollrath, Sechi *et al.* 2014, MacVicar, Mannack *et al.* 2015). En adición al efecto de la deficiencia genética de factores de inducción de la autofagia, se ha descrito que la inhibición farmacológica de la degradación lisosomal mediante tratamiento con cloroquina (CQ) (Mizui, Yamashina *et al.* 2010)(Ke y Chen 2011) o bafilomicina A-1 (Ke y Chen 2011) limita la iniciación de la replicación de HCV, aunque el mecanismo queda por establecer. Una posibilidad que unifica ambas observaciones es que la deficiencia en estos procesos afecte la biogénesis de las estructuras membranosas que soportan la replicación viral (Berger, Romero-Brey *et al.* 2014), que

requieren para su formación de factores de la maquinaria de autofagia (Dreux, Gastaminza *et al.* 2009) y factores celulares de curvatura de membrana y de formación de vesículas cargo como ARF1, PI4KA, PLEKHA8, OSPB (Matto, Sklan *et al.* 2011, Khan, Katikaneni *et al.* 2014, Wang, Perry *et al.* 2014, Harak, Meyrath *et al.* 2016), afectando así estabilidad de las proteínas virales de los complejos de replicación.

Los estudios de transcriptómica y proteómica diferencial así como la proteómica de los complejos purificados de SIGMAR1 apuntan un papel de SIGMAR1 en la regulación de la exportación de vesículas del ER (Sección 8.3), que podrían implicar una función de SIGMAR1 en la biogénesis de los complejos de replicación virales y estar en la base del requerimiento de SIGMAR1 para el establecimiento de la infección. La dependencia de factores de las MAM (SIGMAR1) (Friesland, Mingorance *et al.* 2013) y ERGIC (ARF1, PI4KA, PIAKB) (Goueslain, Alsaleh *et al.* 2010, Farhat, Goueslain *et al.* 2013) para el inicio de la infección de HCV y la presencia de proteínas virales y ARN en estas membranas, sugieren que las MWs podrían nutrirse de las membranas de estos compartimentos (Serafino, Valli *et al.* 2003, Neufeldt, Joyce *et al.* 2016), que también parecen colaborar en procesos como la autofagia (Tan, Cai *et al.* 2013) (revisado en (Tooze y Yoshimori 2010)), la respuesta innata antiviral (van Zuylen, Doyon *et al.* 2012) y la biogénesis de LDs (Soni, Mardones *et al.* 2009). Una deficiencia en la localización de las proteínas virales en estas estructuras, o en el sistema de salida de membranas del ER (Sección 7.3)(Sección 8.3) podrían repercutir en la biogénesis *de novo* de los complejos de replicación virales. En favor de esta posibilidad, recientemente se ha reportado que el ajuste de los niveles de actividad de la PI4KA, quinasa específica de las membranas de ERES (Farhan, Weiss *et al.* 2008) y de las membranas de replicación de HCV (Vaillancourt, Pilote *et al.* 2009), es un factor esencial para la permisividad a la infección por este virus (Harak, Meyrath *et al.* 2016). En este sentido, es interesante el hallazgo en los complejos de SIGMA-TAP de ZFYVE27, una proteína de acoplamiento de vesículas del ER a microtúbulos (Matsuzaki, Shirane *et al.* 2011) que además, interacciona con la chaperona FKBP8 que interacciona con la proteína de la replicasa NS5A y regula la replicación de HCV (Okamoto, Nishimura *et al.* 2006), que refuerza la noción de que la proximidad entre los eventos de salida del ER y la formación de los complejos de replicación viral.

En este contexto, se puede especular que la menor acumulación de las proteínas de la replicasa en las células deficientes en SIGMAR1 pudiera

responder a un incremento de la degradación de éstas como resultado del fallo en su distribución hacia las estructuras de membranas adecuadas. En acuerdo con esto, varios procesos relacionados con el catabolismo de proteínas, incluyendo componentes de ERAD, el complejo gamma-secretasa y proteínas de ubiquitinación, resultaron regulados diferencialmente en las células deficientes en SIGMAR1 (Sección 7.3.2.5)(Anexos Tabla IX). Esta posibilidad está en acuerdo con el papel propuesto de mecanismos de degradación asociados al ER en condiciones de déficit de degradación autofágica (Kakoi, Yorimitsu *et al.* 2013, Le Fourn, Park *et al.* 2013, Wang, Yu *et al.* 2013). En línea con esto (Wang, Yu *et al.* 2013), también el estudio transcriptómico de neuronas de rata deficientes en SIGMAR1 reveló la inducción transcripcional de algunas subunidades proteosomales (Tsai y Rothman 2012). Nuestros resultados preliminares sobre la contribución de las vías de degradación en la acumulación diferencial de proteínas virales no-estructurales en las células deficientes en SIGMAR1, indican que si existiera una degradación exacerbada de éstas sería mediada por la vía proteosomal y no por degradación lisosomal (datos no mostrados). Sin embargo, parece que la calidad más que la cantidad de las proteínas podría estar afectada en las células deficientes en SIGMAR1. Las diferencias en acumulación que no pueden ser recuperadas por inhibición de la degradación proteosomal o lisosomal también pudieran ser resultado de una insolubilización de proteínas que no pueden ser degradadas. La tendencia a menores áreas y distinto patrón de distribución de las proteínas de la replicasa viral (Sección 7.2 Figura 7.2.4) también sugiere la posibilidad de que éstas formen agregados intracelulares. La posibilidad de que las células deficientes SIGMAR1 conduzca a la respuesta de deposición de agregosomas a causa de una deficiencia de degradación de proteínas estaría en acuerdo con las observaciones de que la deficiencia de SIGMAR1 conducen a la formación de cuerpos de inclusión de proteínas insolubilizadas que forman de agregados de alto peso molecular (Tagashira, Shinoda *et al.* 2014, Miki, Tanji *et al.* 2015, Wong, Hristova *et al.* 2016). La colocalización de SIGMAR1 con los agregados de la variante mutante de HTT (Miki, Tanji *et al.* 2015) y la interacción con RAC1 común a SIGMAR1 (Tsai, Hayashi *et al.* 2009, Natsvlshvili, Gogvadze *et al.* 2015) y la HTT nativa (Tourette, Li *et al.* 2014) junto a la estabilización post-transcripcional de algunos de los interactuantes y moduladores de HTT efectores de RAC1 (PFN1, EZR) y la regulación transcripcional de su interactuante y modulador, la enzima del metabolismo de PIs PIK3R1 (Kaltenbach, Romero *et al.* 2007, Tourette, Li *et al.* 2014) en células deficientes en SIGMAR1 (Sección 7.3)(Sección 8.3), sugieren que el sugiere que SIGMAR1 podría interactuar funcionalmente con esta proteína indirectamente a través de la regulación de la actividad local de sus

reguladores PFN1, EZR, PAK2, que modulan su actividad en el transporte de vesículas mediado por microtúbulos (Shao, Welch *et al.* 2008; Ma, Yang *et al.* 2012; Tourette, Li *et al.* 2014) (Anexos Ficha D). En acuerdo con esta hipótesis las células deficientes en SIGMAR1 muestran una estabilización post-transcripcional aberrante de PFN1 y, posiblemente de SQSTM1 y UCHL1, marcadores de agregados de cargos ubiquitinados no degradados, frecuentemente asociados a enfermedades neurodegenerativas (Smith, Vance *et al.* 2015; Tanaka y Hasegawa 2016) (Sección 8.5).

El perfil transcriptómico y proteómico de las células deficientes en SIGMAR1 evidencia una regulación diferencial del transporte vesicular (Sección 7.3.2b), incluyendo procesos centrales como la actividad de ARF1 y las Rho GTPasas (Sección 7.3.2.1)(Anexos Ficha A y B), la función de proteínas SNARE (SEC22B, NSF, USO1), proteínas de distribución de cargos (SNX13, SNX14), componentes del sistema de vesículas de salida del ER, COPII, (SAR1A y B, SEC24C), y de vesículas de reciclaje desde Golgi a ER y el transporte intra-Golgi mediante el sistema COPI (ARF1) (Sección 7.3.2.2)(Anexos Ficha C).

La función de SIGMAR1 sobre la actividad de las Rho GTPasas se refuerza en datos previos que indican que SIGMAR1 podría asociarse físicamente con RAC1 en las MAM y la regular su actividad (Tsai, Hayashi *et al.* 2009)(Tsai y Rothman 2012)(Natsvlishvili, Gogvadze *et al.* 2015). Con respecto a la actividad de las ARF GTPasas, es interesante que, recientemente, se ha descrito que SIGMAR1 interacciona funcionalmente con ELMOD2, una proteína de la familia de las ELMOD (del inglés *engulfment and cell motility (ELMO)-containing domain*) relacionada con la familia ELMO de intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF, del inglés *guanine nucleotide exchange factor*) de RAC1 y ARF6, funciona como activadora de la actividad GTPasa (GAP, del inglés *GTPase activating protein*) sobre varias Arf y Arl (del inglés *ARF-like*) GTPasas, incluyendo ARF1 (Ivanova, East *et al.* 2014). Se ha descrito que SIGMAR1 interactúa con ELMOD2 inhibiendo su actividad GAP sobre ARF1 (Ivanova, East *et al.* 2014).

En particular, la salida de vesículas COPII fue uno de los procesos biológicos diferencialmente regulados en las células deficientes en SIGMAR1. El hecho de que los componentes de vesículas COPII (SEC24C, D, A, 31A, SAR1A y SAR1B) estén inducidos a nivel de mRNA, apoya la noción de una función de SIGMAR1 en la salida de vesículas COPII. La subregulación post-transcripcional de SEC24C podría implicar que esta isoforma del heterotetramero del complejo COPII podría ser estabilizada por SIGMAR1. Este hecho

podría subyacer a una función de SIGMAR1 en la regulación de la exportación de vesículas del ER, ya que, el acoplamiento de las distintas isoformas de la subunidad de selección de cargos SEC24 es responsable del reconocimiento y localización hacia las vesículas COPII de distintas proteínas cargo transmembrana (Mancias y Goldberg 2008). Por ejemplo, en levaduras, las proteínas transmembrana de gran volumen y los oligómeros como los canales iónicos, los GPCRs, son reconocidos por la isoforma de SEC24, SFB3 (revisado en (Gomez-Navarro y Miller 2016)). El ensamblaje de vesículas COPII adecuadas para distintos cargos, probablemente involucra la modificación post-traducciona de los componentes del complejo COPII (Saito y Katada 2015) y la asociación de las subunidades SEC24 a distintos SNAREs (Mancias y Goldberg 2008), un proceso que depende del reconocimiento por los SNARE de regiones de membranas ricas en PIs (James, Khodthong *et al.* 2008) y de la regulación por la chaperona HSPA8 (Joglekar y Hay 2005) identificada en los complejos de SIGMAR1-TAP. La noción de que SIGMAR1 podría regular eventos a la salida del ER es reforzada por la identificación de proteínas relacionadas con la salida del ER y el transporte de vesículas de ERGIC en los complejos purificados de la proteína de fusión SIGMAR1-TAP (Sección 7.4.1). De manera significativa, la interacción con el receptor de cargo de COPII, SURF4, y otros componentes de los ERES y ERGIC como REEP4, REPP6, YIPF4, ALG3, CHP1, sugiere la localización de SIGMAR1 en sitios de formación de vesículas COPII (Sección 7.4.1). Asimismo, la chaperona HSPA8, encontrada en los complejos purificados de la proteína de fusión SIGMAR1-TAP, regula y se asocia físicamente con mediadores de la fusión de las vesículas derivadas del ER con las membranas de Golgi (Joglekar y Hay 2005).

Teniendo en cuenta el papel de las vesículas COPII en la biogénesis de autofagosomas en condiciones de estrés (Ge, Zhang *et al.* 2014; Davis, Wang *et al.* 2016; Lemus, Ribas *et al.* 2016), esta función de SIGMAR1 podría explicar los defectos del flujo autofágico en células deficientes en SIGMAR1 (Vollrath, Sechi *et al.* 2014; MacVicar, Mannack *et al.* 2015) (Sección 7.3.3 Figura 7.3.5 B). Además, un papel de SIGMAR1 en el tráfico vesicular entre el ER y Golgi estaría en acuerdo con las observaciones de que la deficiencia de SIGMAR1 conlleva afectaciones de la estructura de Golgi (Vollrath, Sechi *et al.* 2014) (Prause, Goswami *et al.* 2013). Este fenotipo es común a la deficiencia de otras proteínas que median el transporte hacia y desde cis-Golgi, responsable de la biogénesis y mantenimiento de las estructuras ERGIC y Golgi como GBF1, ARF1 y SURF4 (Mitrovic, Ben-Tekaya *et al.* 2008).

Dado que el establecimiento de la infección por HCV conlleva la formación de estructuras de membranas especiales que soportan las factorías virales, la presencia y requerimiento en la función de los complejos de replicación virales de ARF1, ARFGAP1, PI4KA, OSBP y PLEKHA8 sustentan el papel establecido de la acumulación local de PI4P en la infección viral (revisado en (Bishé, Syed *et al.* 2012) y (Wang y Tai 2016)) y el papel del sistema de transporte COPI y de las membranas del Golgi en la formación de las membranas que soportan la replicación exponencial de HCV (Serafino, Valli *et al.* 2003, Tai, Benita *et al.* 2009).

No se conoce si SIGMAR1 recicla entre Golgi y ER. Sin embargo, en algunos estudios se ha descrito la localización de SIGMAR1 en ERGIC (así como varios de los interactuantes de la construcción SIGMAR-TAP (STT3A, CANX, RPN2, HSPA8, SRPRB, SURF4, SEC61B, TRAM1, VKORC1, KDELR, RER1 encontrados en este trabajo) (Gilchrist, Au *et al.*). La presencia en el extremo N-terminal de SIGMAR1 de un motivo de doble arginina se ha asociado a su retención en el ER o en las LD asociadas a ER (Hayashi y Su 2003). Sin embargo, en el modelo de topología más aceptado actualmente el extremo N-terminal de SIGMAR1 es luminal (Schmidt, Zheng *et al.* 2016), incompatible con la interacción con los componentes del complejo COPI que median el reciclaje desde Golgi hacia el ER. Si el motivo de doble arginina luminal tiene un mecanismo diferente para la retención en ER éste queda por elucidar. Sin embargo, a día de hoy no es descartable que la topología de SIGMAR1 sea tipo tipo II (N-terminal citosólico y C-terminal luminal) o tipo III con ambos extremos N y C-terminal citosólico, como sugieren los resultados de algunos estudios (Aydar, Palmer *et al.* 2002), lo cual sería compatible con un reciclaje de SIGMAR1 entre ER y Golgi.

8.3 El papel de SIGMAR1 en el transporte vesicular podría estar relacionado por su capacidad de unión y transporte de lípidos en membranas y su función en la formación de balsas lipídicas

El perfil de las células deficientes en SIGMAR1 mostró una regulación diferencial del metabolismo lipídico, incluyendo el metabolismo de glicolípidos y esteroides (Sección 7.3.2.3)(Anexos Tabla VII). Este hallazgo resulta esperable dada la relación de SIGMAR1 con los esteroides y las balsas lipídicas (Hayashi y Su 2003)(Ramachandran, Chu *et al.* 2009)(Palmer, Mahen *et al.* 2007). Más intrigante resulta quizá la regulación diferencial del metabolismo de los fosfoinosítidos. Varias enzimas de la síntesis y distribución de PIs aparecen diferencialmente reguladas en las células deficientes en SIGMAR1 (Sección

7.3.2.3)(Anexos Tabla VII). Además, la proteómica de purificados de la proteína de fusión SIGMAR1-TAP reveló la posible asociación de SIGMAR1 con enzimas de la biosíntesis del fosfatidilinositol (PI) (Sección 7.4). Si bien algunos estudios tempranos sugirieron que SIGMAR1 podría regular el metabolismo de los fosfoinosítidos (Bowen, Kirschner *et al.* 1988; Candura, Coccini *et al.* 1990; Bowen, Tolentino *et al.* 1993; Romero, Pérez *et al.* 2000), esta posibilidad no ha sido reportada ulteriormente. Aunque hasta la fecha no se ha reportado la presencia de dominios de unión a fosfoinosítidos en la estructura de SIGMAR1, su motivo de doble arginina N-terminal cercano a la hélice hidrofóbica, es un motivo potencial de unión a fosfoinosítidos (Ingelmo-Torres, González-Moreno *et al.* 2009; Johnson, Erickson *et al.* 2012), especialmente en una conformación oligomérica (Gromek, Suchy *et al.* 2014; Schmidt, Zheng *et al.* 2016).

La posible regulación de fosfoinosítidos por SIGMAR1 es muy interesante a la luz de que varios de los procesos regulados diferencialmente en las células deficientes en SIGMAR1 (remodelación local del citoesqueleto de actina, vía de las Rho GTPasas, actividad Arf GTPasa y tráfico vesicular) son íntimamente dependientes de las fluctuaciones locales de PIs (Sección 7.3.2.1 y 7.3.2.2)(Anexos Fichas B y C) y el hallazgo de proteínas del metabolismo de PIs (CDS1, CDS2, AGPAT2, GPAT4, PIGU), y proteínas con dominios de unión a PIs (SNX13, SNX14) entre los factores asociados a los complejos purificados de SIGMAR1-TAP (Sección 7.4.1). Estos hallazgos sugieren que SIGMAR1 podría regular el transporte vesicular mediante la regulación de la distribución de PIs (Anexos Fichas A y C).

En particular, la regulación del transporte vesicular desde el ER, uno de los procesos de transporte vesicular más regulado en la proteómica y transcriccional diferencial y representado en la proteómica de interacciones de SIGMAR1 (Sección 8.3), depende de la acumulación local de determinados PIs. La PI4KA reside específicamente en ERES y la acumulación local de PI4P permite la formación de dominios de salida del ER y la regulación de la salida de vesículas COPII (Wakana, Koyama *et al.* 2005)(Blumental-Perry, Haney *et al.* 2006)(Okamoto, Kurokawa *et al.* 2012). Los niveles locales elevados de PI4P son requeridos para la formación de dominios de membrana de alta curvatura requeridos para la salida de vesículas (Okamoto, Kurokawa *et al.* 2012), para el reclutamiento de efectores como PITPNM1, PLEKHA8 y OSBP que permiten la acumulación de lípidos como ácido fosfatídico, glicerolípidos y colesterol en los sitios de salida de vesículas (Tuuf y Mattjus 2014) y para la nucleación de actina implicada en la gemación de las vesículas COPII (Anexos Fichas B y C).

Además, el PI4P juega un papel en el reclutamiento específico de componentes del complejo COPII, el mantenimiento de los contactos de COPII y, posiblemente, en el reclutamiento a las vesículas de proteínas SNARE que permiten la fusión homotípica de las vesículas COPII y la fusión con la membrana del Golgi en levaduras (Lorente-Rodríguez y Barlowe 2011). En particular, los factores de biogénesis de las vesículas COPII, SEC16A y SEC23IP pudieran ser reclutados hacia los ERES en respuesta a PI4P (Klinkenberg, Long *et al.* 2014). En este contexto es interesante que también ERG2 de levaduras, la proteína genéticamente más próxima a SIGMAR1 (Hanner, Moebius *et al.* 1996), se ha relacionado genéticamente con el translocon (SEC63) la actividad de COPII (SEC12, SHR3, YIP3, ERP1), la biosíntesis y metabolismo de PI (PIK1, PIS1) y de ceramida (LAG1) y la síntesis de GPI (GPI13) (Schuldiner, Collins *et al.* 2005, Jonikas, Collins *et al.* 2009, Szappanos, Kovacs *et al.* 2011, Costanzo, VanderSluis *et al.* 2016).

Cabe destacar que las proteína TMEM33 y ARL6IP1, que hemos encontrado asociada a complejos de SIGMAR1-TAP, se han relacionado con la formación de curvatura de membrana en el ER (Urade, Yamamoto *et al.* 2014, Yamamoto, Yoshida *et al.* 2014), lo que en este contexto sugiere una función estructural de SIGMAR1 en la formación de dominios especiales de membrana en las regiones de salida del ER. Teniendo en cuenta el papel de SIGMAR1 en organización de las LRs, este papel podría tener especial significancia para proteínas ancladas por GPI que requieren el acoplamiento de dominios de LRs a los sitios de salida de las vesículas COPII, por lo que resulta interesante también la identificación en complejos de SIGMAR1-TAP de la enzima del complejo GPI transamidasa, PIGU, implicada en el acoplamiento de GPI a proteínas recién sintetizadas en el ER (Hong, Ohishi *et al.* 2003).

El posible papel de SIGMAR1 en la regulación de los PIs y del transporte vesicular de las vesículas COPII, podría estar a la base de la deficiencia en el flujo autofágico en las células deficientes en SIGMAR1 (Ge, Zhang *et al.* 2014; Vollrath, Sechi *et al.* 2014) (Sección 7.3.2.5)(Anexos Ficha C) así como contribuir a la biogénesis de las estructuras de membrana que soportan la replicación exponencial de HCV (Sección 8.2). Asimismo, un papel de SIGMAR1 en la distribución de PIs en los sitios de salida del ER podría explicar la regulación por SIGMAR1 de varios receptores acoplados a proteína G (GPCRs) y canales iónicos (revisado en (Su, Su *et al.* 2016)), cuyo transporte vesicular asociado al control de su activación específica depende de la distribución de PIs en las membranas de las vesículas de transporte y membranas diana (revisado en

(Hille, Dickson *et al.* 2015) y (Logothetis, Petrou *et al.* 2015)).

8.4 Un papel de SIGMAR1 en la interfase ERES-ERGIC podría subyacer a su papel en la UPR y la autofagia

SIGMAR1 se ha considerado una proteína de respuesta a estrés (Ha, Dun *et al.* 2011, Ha, Shanmugam *et al.* 2014). Se ha descrito que su localización, interacciones y funciones responden a estímulos inductores de estrés de ER como el tratamiento con el antagonista de ATP2A2 tapsigargina o el inhibidor de la glicosilación de proteínas tunicamicina (Ono, Tanaka *et al.* 2013) y la activación de la rama PERK/ATF4 induce su expresión (Mitsuda, Omi *et al.* 2011).

En acuerdo con esto, el perfil transcripcional y proteómico de células deficientes en SIGMAR1 sugiere existencia en estas células de un mayor nivel de estrés basal con una deficiencia en el aclaramiento de cargos asociado a un defecto en la maduración de la vía autofago-lisosomal (Sección 7.3.2.5) y una activación diferencial de la vía de IRE1/XBP1 (Sección 7.3.2.4)(Anexos Tabla XII).

La posible regulación por SIGMAR1 de la exportación de vesículas COPII del ER (Sección 8.3) podría estar a la base de su papel en la UPR. Mediante la regulación de la maquinaria de exportación de cargos del ER, SIGMAR1 podría participar en la resolución del estrés de ER. Entre las medidas de la UPR para disponer de los cargos acumulados en el ER se incluyen el incremento del tamaño y la capacidad del ER, el ajuste del número y tamaño de los ERES y la activación de la exportación de vesículas COPII (Higashio y Kohno 2002) (revisado en (Brandizzi y Barlowe 2013) y (Szul y Sztul 2011)), incluyendo la sobre-regulación y relocalización de factores de ensamblaje del complejo COPII y sus receptores de cargo (Watson, Townley *et al.* 2006)(Qin, Kawasaki *et al.* 2012)(Sprangers y Rabouille 2015)(Kuiper, Bouw *et al.* 2001)(Iwasaki, Yorimitsu *et al.* 2015) y la relocalización de PI4P y de la proteína de andamiaje de las vesículas COPII SEC16 (Watson, Townley *et al.* 2006)(Sprangers y Rabouille 2015).

Además, durante situaciones de sobrecarga de ER, las vesículas COPII parecen funcionar como fuentes de membranas para la formación de autofagosomas (Kakoi, Yorimitsu *et al.* 2013, Tan, Cai *et al.* 2013, Davis, Wang *et al.* 2016). Se ha descrito que en los compartimentos asociados a ER en condiciones de sobrecarga de ER (ERAC, del inglés *ER-associated compartments*), relacionadas con la autofagia selectiva de proteínas mal plegadas y agregados

resistentes a ERAD, presentan componentes del complejo COPII (Tan, Cai *et al.* 2013). Es posible que ajustes en el tamaño y composición de las vesículas de exportación del ER tengan un papel en estos fenómenos (Davis, Wang *et al.* 2016).

8.5 Las regulación por SIGMAR1 del metabolismo de los Pls, la actividad de las ARF, Rho GTPasas pudiera contribuir a su papel protector frente a enfermedades neurodegenerativas

SIGMAR1 se ha relacionado con varias enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la acumulación de cargos no degradados incluyendo ALS, HD y AD (revisado en (Jin, Fang *et al.* 2015, Mavlyutov, Guo *et al.* 2015) y (Mishina, Ishiwata *et al.* 2005)) (Sección 4.3.5).

El perfil de transcriptómica y proteómica diferencial de las células deficientes en SIGMAR1 mostró un enriquecimiento en proteínas asociadas enfermedades neurodegenerativas con las que la deficiencia de SIGMAR1 se ha relacionado previamente (Sección 7.3.2.7). De manera especial, las células deficientes en SIGMAR1 muestran una desregulación del metabolismo de Pls y la vía de las Arf y Rho GTPasas (Secciones 7.3.2.3 y 7.3.2.1), importantes eventos de la señalización celular cuya deficiencias se asocian con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Anexos Ficha D).

En particular, la deficiencia de la actividad de la Rho GTPasa RAC1 y de varios de sus activadores y efectores en la remodelación del citoesqueleto de actina se asocia con enfermedades neurodegenerativas como AD, PK y ALS, con las que se ha relacionado también la deficiencia de SIGMAR1 (Smith, Vance *et al.* 2015; Marei y Malliri 2016). El papel de las Rho GTPasas en la regulación del citoesqueleto de actina es esencial para el transporte de vesículas y la maduración de la vía endolisosomal y la autofagia, procesos ampliamente relacionados con la función neuronal y la neuroprotección, así como para el mantenimiento de las MAM y Golgi (Chi, Wang *et al.* 2013), cuyo colapso es un rasgo común de varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo ALS (revisado en (Watanabe, Iliava *et al.* 2016)) (Anexos Ficha D).

La posible deficiencia de la vía de las Rho GTPasas en las células deficientes en SIGMAR1 está en acuerdo con estudios previos que han mostrado que SIGMAR1 podría interactuar con RAC1 en las MAM (Natsvlishvili, Gogua-dze *et al.* 2015), regular la estabilidad de su factor intercambiador de nucleótidos de Guanina (GEF), TIAM1, y mediar sus funciones neuroprotectivas (Tsai, Hayashi *et al.* 2009). Recientemente, además, se ha propuesto que la regu-

lación de la dinámica de p35 (CDK5R1) por SIGMAR1 podría estar en la base de su papel neuroprotectivo (Tsai, Pokrass *et al.* 2015), lo cual a su vez indica un posible nexo funcional entre la actividad de SIGMAR1 y la vía de RAC1 (Posada-Duque, López-Tobón *et al.* 2015)(Anexos Ficha D). En este sentido es interesante que el mutante de SIGMAR1 asociado a ALS induce la formación agregados de TDP-43 que son comúnmente asociados a la agregación de PFN1 (Tanaka y Hasegawa 2016), lo cual podría subyacer a una asociación funcional de SIGMAR1 con los sitios de activación de Rho GTPasas y sus efectores. En acuerdo con esto, PFN1 aparece sobre-regulada post-transcripcionalmente, lo cual compatible con una estabilización aberrante por formación de agregados en las células deficientes en SIGMAR1, como la PFN1 mutante asociada a ALS (Smith, Vance *et al.* 2015; Tanaka y Hasegawa 2016).

En conjunto, estos hallazgos sugieren un papel de la regulación por SIGMAR1 de la función en remodelación del citoesqueleto de las Rho GTPasas en su asociación a la neuroprotección. Dado el papel potencial de SIGMAR1 en la regulación del metabolismo de PIs (Sección 7.3.2.3 y Sección 7.4.1), y el papel de los PIs en la regulación de la vía de las Rho GTPasas (Anexos Ficha A) es especulable que la regulación local de PIs por SIGMAR1 pudiera subyacer como mecanismo a su regulación sobre la función de RAC1, mediante la regulación del reclutamiento de sus GEFs.

8.6 La regulación de vías centrales de proliferación y supervivencia celular pudiera estar en la base de la asociación de SIGMAR1 con el desarrollo tumoral

Los datos de proteómica y transcriptómica diferencial de las células deficientes en SIGMAR1 indican una regulación diferencial del ciclo celular (Sección 7.3.2.6), incluyendo la desregulación de varios mediadores como ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas y mediadores de la segregación cromosomas, entre otros (Anexos Tabla X). De una relevancia singular resulta la regulación diferencial de las vías de TP53 y Wnt/CTNBB1 (Sección 7.3.2.6) (Anexos Tabla XI), que sugiere una deficiencia en la actividad transcripcional de la vía Wnt/CTNBB1 y una sobre-activación de la vía de TP53 que podría conducir a un arresto celular en la transición G1/S (Joyce, Bouzahzah *et al.* 1999; Liu, Zhang *et al.* 2014), que concuerdan con la pérdida progresiva de la capacidad proliferativa en células con niveles limitantes de SIGMAR1 (células Huh-7 shS1R3 a partir del cuarto día de silenciamiento; datos no mostrados) (Wang y Duncan 2006; Mavlyutov, Nickells *et al.* 2011). Estos datos sugieren un papel en la regulación de éstas vías antagónicas de regulación de destino celu-

lar que podría contribuir al fenotipo pro-tumoral asociado a la sobre-expresión de SIGMAR1 en algunos tipos de cáncer.

Es presumible que, mecanísticamente, la regulación diferencial de las vías de Wnt/CTNNB1 y TP53 por SIGMAR1 pudiera involucrar por su papel en el metabolismo o distribución de PIs (Sección 8.3), a través de la regulación de eventos dependientes de unión a PIs como la actividad de las GTPasas protumorales ARF1 y RAC1 (revisado en (Alan y Lundquist 2013) y (Rathinam y Berrier 2011))(Morgan, Lewis *et al.* 2015)(revisado en (Casalou, Faustino *et al.* 2016)) (Anexos Ficha D), que funcionan como mediadores la translocación a núcleo y función transcripcional de CTNNB1 (Rossol-Allison, Stemmler *et al.* 2009) (Anexos Fichas A y E). Por otro lado, la posible interacción de SIGMAR1 con los reguladores de TP53, BRI3PB y TMEM09 (Sección 7.4.1 Figura 7.4.3) y la localización previamente descrita de TP53 en las MAM, sugiere que la función de SIGMAR1 podría contribuir a la regulación de la vía de TP53 a nivel proximal.

8.8 Comentarios finales

Los estudios mecanísticos sobre el papel de SIGMAR1 en la respuesta innata antiviral frente a virus realizados en este trabajo a partir de hipótesis derivadas de los resultados de nuestro estudio previo (Sección 4.3.7) han develado un papel limitante de los niveles de SIGMAR1 en la regulación de la respuesta innata antiviral frente a virus de RNA mediada por la vía de los RLRs (Sección 8.1). Este papel limitante de la respuesta de VSGs/ISGs, aunque no es responsable del papel proviral en el caso de HCV, por otro lado esperable dado el eficiente bloqueo de la vía por este virus (Sección 4.2.5), pudiera ser relevante en el caso de virus sensibles a IFN-I/III, como sugiere el efecto en el crecimiento de VSV (Sección 8.1). En este sentido, el estudio de esta función de SIGMAR1 es interesante en el campo de la terapia antiviral dado el carácter modulable SIGMAR1, y la existencia de fármacos agonistas y antagonistas ya evaluados en clínica (Sección 4.3.3).

Los resultados de estudios sobre la función de SIGMAR1 al inicio de la infección de HCV nos indican una función de SIGMAR1 en la regulación del destino de las proteínas de la replicasa viral NS3/4A y NS5A (Sección 8.2), que podría mediar el efecto proviral de esta proteína celular en la formación de los complejos de replicación virales. Esta función en la regulación de las proteínas de HCV se suma a un número de observaciones sobre un posible papel de SIGMAR1 en la regulación de la acumulación, distribución o función de pro-

teínas celulares (Sección 4.3.3), que conducen a la obligada hipótesis de que único mecanismo pudiera subyacer a la regulación por SIGMAR1 del destino de determinadas proteínas virales y celulares, cuyos criterios de selectividad parecen incluir la asociación a membrana del ER. Así, es posible que el estudio de la proteostasis de poliproteína viral de HCV nos permita a aprender nuevos detalles sobre la relación de SIGMAR1 con otras condiciones dependientes de la proteostasis como las enfermedades neurodegenerativas (Sección 4.3.5) (Sección 8.5).

Los resultados de aproximaciones tanto mecanísticas como no sesgadas, identifican a SIGMAR1 como un factor de regulación de la homeostasis de proteínas en el ER (Secciones 8.2 y 8.4). Entre las proteínas diferencialmente reguladas en las células deficientes en SIGMAR1 y entre los candidatos a interactuantes de SIGMAR1 se encuentran sobre-representados procesos relacionados con el control de calidad de proteínas en el ER y de la exportación de proteínas cargo del ER, lo que sugiere que SIGMAR1 podría localizarse en sitios de biosíntesis y control de calidad de proteínas que han de ser exportadas del ER (Sección 8.4).

La presencia estadísticamente sobre-representada de proteínas del metabolismo y la distribución de PIs, de proteínas con dominios de unión a PIs y de procesos dependientes de PIs como la remodelación del citoesqueleto de actina por la vía de las Rho GTPasas y el tráfico vesicular entre las proteínas reguladas diferencialmente en las células deficientes en SIGMAR1 sugiere que SIGMAR1 podría mediar sus funciones a través de la regulación de la dinámica de estos glicolípidos señal (Sección 8.3), permitiendo hipotetizar la existencia de nuevo nivel de regulación de las funciones de los fosfoinosítidos en señalización (Anexos Ficha A) y el destino celular (Sección 8.5) (Anexos Ficha E).

9. Conclusiones

9. CONCLUSIONES

1. El silenciamiento génico de SIGMAR1 conduce a una respuesta innata antiviral exacerbada frente a estímulos de la vía RIG-I/MAVS.
2. El silenciamiento génico de SIGMAR1 reduce la acumulación de las proteínas no estructurales del virus de la hepatitis C en ausencia de replicación, lo cual podría limitar la formación de complejos de replicación viral funcionales al comienzo de la infección aguda.
3. El perfil de expresión génica de células deficientes en SIGMAR1 sugiere alteraciones de mecanismos efectores de la reorganización del citoesqueleto de actina y el tráfico vesicular, lo que podría alterar el destino de proteínas cargo de la vía secretora y los mecanismos de proteostasis celular.
4. La composición de los complejos de proteínas celulares asociadas a la proteína de fusión SIGMAR1-TAP sugiere que SIGMAR1 podría participar en procesos de distribución de proteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico, presumiblemente mediante la regulación de la exportación de vesículas COPII.
5. El silenciamiento génico de SIGMAR1 influye en la expresión génica y los niveles de proteínas reguladoras de la biosíntesis y distribución de fosfolípidos, así como de sus proteínas efectoras. Esto, junto a la interacción de algunos de estos factores con SIGMAR1-TAP sugiere un papel de SIGMAR1 en la regulación de la distribución local y la función de estos lípidos señal en membranas, que podría estar en la base de los fenotipos observados en las células deficientes en SIGMAR1.

10. Referencias bibliográficas

Ackema, K. B., J. Hench, S. Bockler, S. C. Wang, U. Sauder, H. Mergentaler, B. Westermann, F. Bard, S. Frank and A. Spang (2014). "The small GTPase Arf1 modulates mitochondrial morphology and function." The EMBO Journal **33**(22): 2659-2675.

Al-Saif, A., F. Al-Mohanna and S. Bohlega (2011). "A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis." Annals of neurology **70**(6): 913-919.

Alan, J. K. and E. A. Lundquist (2013). "Mutationally activated Rho GTPases in cancer." Small GTPases **4**(3): 159-163.

Anders, S., P. T. Pyl and W. Huber (2015). "HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data." Bioinformatics **31**(2): 166-169.

Anelli, T. and R. Sitia (2008). "Protein quality control in the early secretory pathway." The EMBO Journal **27**(2): 315-327.

Aridor, M., K. N. Fish, S. Bannykh, J. Weissman, T. H. Roberts, J. Lippincott-Schwartz and W. E. Balch (2001). "The Sar1 Gtpase Coordinates Biosynthetic Cargo Selection with Endoplasmic Reticulum Export Site Assembly." The Journal of Cell Biology **152**(1): 213-230.

Arighi, C. N., L. M. Hartnell, R. C. Aguilar, C. R. Haft and J. S. Bonifacino (2004). "Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor." The Journal of Cell Biology **165**(1): 123-133.

Arsenault, D., A. Dal-Pan, C. Tremblay, D. A. Bennett, M. J. Guitton, Y. De Koninck, S. Tonegawa and F. Calon (2013). "PAK Inactivation Impairs Social Recognition in 3xTg-AD Mice without Increasing Brain Deposition of Tau and A β ." The Journal of Neuroscience **33**(26): 10729-10740.

Auvinen, E., N. Kivi and A. Vaheri (2007). "Regulation of ezrin localization by Rac1 and PIPK in human epithelial cells." Experimental Cell Research **313**(4): 824-833.

Aydar, E., C. P. Palmer, V. A. Klyachko and M. B. Jackson (2002). "The Sigma Receptor as a Ligand-Regulated Auxiliary Potassium Channel Subunit." Neuron **34**(3): 399-410.

Balla, T. (2013). "Phosphoinositides: Tiny Lipids With Giant Impact on Cell Regulation." Physiological Reviews **93**(3): 1019-1137.

Baril, M., S. Es-Saad, L. Chatel-Chaix, K. Fink, T. Pham, V.-A. Raymond, K. Audette, A.-S. Guenier, J. Duchaine, M. Servant, M. Bilodeau, É. Cohen, N. Grandvaux and D. Lamarre (2013). "Genome-wide RNAi Screen Reveals a New Role of a WNT/CTNNB1 Signaling Pathway as Negative Regulator of Virus-induced Innate Immune Responses." PLoS Pathogens **9**(6): e1003416.

Barr, F. A. (2013). "Rab GTPases and membrane identity: Causal or inconsequential?" The Journal of Cell Biology **202**(2): 191.

Bartenschlager, R., V. Lohmann and F. Penin (2013). "The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection." Nature Reviews Microbiology **11**(7): 482-496.

Bauhofer, O., A. Summerfield, Y. Sakoda, J.-D. Tratschin, M. A. Hofmann and N. Ruggli (2007).

"Classical Swine Fever Virus Npro Interacts with Interferon Regulatory Factor 3 and Induces Its Proteasomal Degradation." Journal of Virology **81**(7): 3087-3096.

Baum, A. and A. García-Sastre (2011). "Differential recognition of viral RNA by RIG-I." Virulence **2**(2): 166-169.

Behnia, R. and S. Munro (2005). "Organelle identity and the signposts for membrane traffic." Nature **438**(7068): 597-604.

Belgnaoui, S. M., S. Paz and J. Hiscott (2011). "Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter." Current Opinion in Immunology **23**(5): 564-572.

Belzil, V. V., H. Daoud, W. Camu, M. J. Strong, P. A. Dion and G. A. Rouleau (2013). "Genetic analysis of SIGMAR1 as a cause of familial ALS with dementia." European journal of human genetics : EJHG **21**(2): 237-239.

Bender, M., S. Stritt, P. Nurden, J. M. M. van Eeuwijk, B. Zieger, K. Kentouche, H. Schulze, H. Morbach, D. Stegner, K. G. Heinze, S. Dütting, S. Gupta, W. Witke, H. Falet, A. Fischer, J. H. Hartwig and B. Nieswandt (2014). "Megakaryocyte-specific Profilin1-deficiency alters microtubule stability and causes a Wiskott–Aldrich syndrome-like platelet defect." Nature Communications **5**: 4746.

Benedicto, I., V. Gondar, F. Molina-Jiménez, L. García-Buey, M. López-Cabrera and P. L. Majano (2015). "Clathrin mediates infectious hepatitis C virus particle egress." **89**(8): 4180-4190.

Benjamini, Y. and Y. Hochberg (1995). "Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing." Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological) **57**(1): 289-300.

Berger, C., I. Romero-Brey, D. Radujkovic, R. Terreux, M. Zayas, D. Paul, C. Harak, S. Hoppe, M. Gao, F. Penin, V. Lohmann and R. Bartenschlager (2014). "Daclatasvir-like inhibitors of NS5A block early biogenesis of hepatitis C virus-induced membranous replication factories, independent of RNA replication." Gastroenterology **147**(5): 1094-1105 e1025.

Bishé, B., G. Syed and A. Siddiqui (2012). "Phosphoinositides in the Hepatitis C Virus Life Cycle." Viruses **4**(12): 2340-2358.

Blackham, S., A. Baillie, F. Al-Hababi, K. Remlinger, S. You, R. Hamatake and M. J. McGarvey (2010). "Gene Expression Profiling Indicates the Roles of Host Oxidative Stress, Apoptosis, Lipid Metabolism, and Intracellular Transport Genes in the Replication of Hepatitis C Virus." Journal of Virology **84**(10): 5404-5414.

Blasio, A., M. Valenza, M. R. Iyer, K. C. Rice, L. Steardo, T. Hayashi, P. Cottone and V. Sabino (2015). "Sigma-1 receptor mediates acquisition of alcohol drinking and seeking behavior in alcohol-preferring rats." Behavioural brain research **287**: 315-322.

Blero, D., B. Payrastra, S. Schurmans and C. Erneux (2007). "Phosphoinositide phosphatases in a network of signalling reactions." Pflügers Archiv - European Journal of Physiology **455**(1): 31-44.

Blight, K. J., J. A. McKeating and C. M. Rice (2002). "Highly Permissive Cell Lines for Subgenomic and Genomic Hepatitis C Virus RNA Replication." Journal of Virology **76**(24): 13001-13014.

Blume, C. J., A. Hotz-Wagenblatt, J. Hullein, L. Sellner, A. Jethwa, T. Stolz, M. Slabicki, K. Lee, A. Sharathchandra, A. Benner, S. Dietrich, C. C. Oakes, P. Dreger, D. te Raa, A. P. Kater, A. Jauch, O. Merkel, M. Oren, T. Hielscher and T. Zenz (2015). "p53-dependent non-coding RNA networks in chronic lymphocytic leukemia." Leukemia **29**(10): 2015-2023.

Blumental-Perry, A., C. J. Haney, K. M. Weixel, S. C. Watkins, O. A. Weisz and M. Aridor (2006). "Phosphatidylinositol 4-Phosphate Formation at ER Exit Sites Regulates ER Export." Developmental Cell **11**(5): 671-682.

Bode, J. G., E. D. Brenndorfer and D. Haussinger (2007). "Subversion of innate host antiviral strategies by the hepatitis C virus." Arch Biochem Biophys **462**(2): 254-265.

Bok, E., A. Hryniewicz-Jankowska and A. F. Sikorski (2009). "[The interactions of actin cell and membrane skeleton proteins with lipids]." Postepy biochemii **55**(2): 207-222.

Boulay, P.-L., M. Cotton, P. Melançon and A. Claing (2008). "ADP-ribosylation Factor 1 Controls the Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway to Regulate Epidermal Growth Factor-dependent Growth and Migration of Breast Cancer Cells." The Journal of Biological Chemistry **283**(52): 36425-36434.

Bowen, W. D., B. N. Kirschner, A. H. Newman and K. C. Rice (1988). "Sigma receptors negatively modulate agonist-stimulated phosphoinositide metabolism in rat brain." European journal of pharmacology **149**(3): 399-400.

Bowen, W. D., P. J. Tolentino, B. N. Kirschner, P. Varghese, B. R. de Costa and K. C. Rice (1993). "Sigma receptors and signal transduction: negative modulation of signaling through phosphoinositide-linked receptor systems." NIDA research monograph **133**: 69-93.

Brandizzi, F. and C. Barlowe (2013). "Organization of the ER–Golgi interface for membrane traffic control." Nature Reviews Molecular Cell Biology **14**(6): 382-392.

Briggs, M. W. and D. B. Sacks (2003). "IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation." EMBO Rep **4**(6): 571.

Brune, S., S. Pricl and B. Wunsch (2013). "Structure of the σ_1 receptor and its ligand binding site." Journal of Medicinal Chemistry **56**(24): 9809-9819.

Bukong, T. N., K. Kodys and G. Szabo (2013). "Human ezrin-moesin-radixin proteins modulate hepatitis C virus infection." Hepatology, Vol. 00, No. X, 2013 Bukong, Kodys, and Szabo **58**(5): 1569-1579.

Burckstummer, T., K. L. Bennett, A. Preradovic, G. Schutze, O. Hantschel, G. Superti-Furga and A. Bauch (2006). "An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells." Nat Meth **3**(12): 1013-1019.

Burd, C. and P. J. Cullen (2014). "Retromer: A Master Conductor of Endosome Sorting." Cold

Spring Harbor Perspectives in Biology **6**(2): a016774-a016774.

Cairns, N. J., V. M. Y. Lee and J. Q. Trojanowski (2004). "The cytoskeleton in neurodegenerative diseases." The Journal of pathology **204**(4): 438-449.

Cancino, J., J. E. Jung and A. Luini (2013). "Regulation of Golgi signaling and trafficking by the KDEL receptor." Histochemistry and Cell Biology **140**(4): 395-405.

Candura, S. M., T. Cocchini, L. Manzo and L. G. Costa (1990). "Interaction of sigma-compounds with receptor-stimulated phosphoinositide metabolism in the rat brain." Journal of neurochemistry **55**(5): 1741-1748.

Cao, L., M. P. Walker, N. K. Vaidya, M. Fu, S. Kumar and A. Kumar (2016). "Cocaine-Mediated Autophagy in Astrocytes Involves Sigma 1 Receptor, PI3K, mTOR, Atg5/7, Beclin-1 and Induces Type II Programed Cell Death." Molecular neurobiology **53**(7): 4417-4430.

Cárdenas, W. B., Y.-M. Loo, M. Gale, A. L. Hartman, C. R. Kimberlin, L. Martínez-Sobrido, E. O. Saphire and C. F. Basler (2006). "Ebola Virus VP35 Protein Binds Double-Stranded RNA and Inhibits Alpha/Beta Interferon Production Induced by RIG-I Signaling." Journal of Virology **80**(11): 5168-5178.

Cardoso, C. M. P., L. Groth-Pedersen, M. Høyer-Hansen, T. Kirkegaard, E. Corcelle, J. S. Andersen, M. Jäättelä and J. Nylandsted (2009). "Depletion of Kinesin 5B Affects Lysosomal Distribution and Stability and Induces Peri-Nuclear Accumulation of Autophagosomes in Cancer Cells." PLoS ONE **4**(2): e4424-4411.

Carlton, J., M. Bujny, B. J. Peter, V. M. J. Oorschot, A. Rutherford, H. Mellor, J. Klumperman, H. T. McMahon and P. J. Cullen (2004). "Sorting nexin-1 mediates tubular endosome-to-TGN transport through coincidence sensing of high- curvature membranes and 3-phosphoinositides." Current Biology **14**(20): 1791-1800.

Casalou, C., A. Faustino and D. C. Barral (2016). "Arf proteins in cancer cell migration." Small GTPases **7**(4): 270-282.

Caviston, J. P., A. L. Zajac, M. Tokito and E. L. F. Holzbaur (2011). "Huntingtin coordinates the dynein-mediated dynamic positioning of endosomes and lysosomes." Molecular Biology of the Cell **22**(4): 478-492.

Chang, J., J.-T. Guo, D. Jiang, H. Guo, J. M. Taylor and T. M. Block (2008). "Liver-Specific MicroRNA miR-122 Enhances the Replication of Hepatitis C Virus in Nonhepatic Cells." Journal of Virology **82**(16): 8215-8223.

Chatel-Chaix, L., M. Cortese, I. Romero-Brey, S. Bender, Christopher J. Neufeldt, W. Fischl, P. Scaturro, N. Schieber, Y. Schwab, B. Fischer, A. Ruggieri and R. Bartenschlager (2016). "Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses." Cell Host & Microbe **20**(3): 342-356.

Chattopadhyay, S. and G. C. Sen (2014). "dsRNA-Activation of TLR3 and RLR Signaling: Gene Induction-Dependent and Independent Effects." Journal of Interferon & Cytokine Research **34**(6): 427-436.

- Chavan, M., A. Yan and W. J. Lennarz (2005). "Subunits of the translocon interact with components of the oligosaccharyl transferase complex." *Journal of Biological Chemistry* **280**(24): 22917-22924.
- Chen, C., D. Garcia-Santos, Y. Ishikawa, A. Seguin, L. Li, K. H. Fegan, G. J. Hildick-Smith, D. I. Shah, J. D. Cooney, W. Chen, M. J. King, Y. Y. Yien, I. J. Schultz, H. Anderson, A. J. Dalton, M. L. Freedman, P. D. Kingsley, J. Palis, S. M. Hattangadi, H. F. Lodish, D. M. Ward, J. Kaplan, T. Maeda, P. Ponka and B. H. Paw (2013). "Snx3 regulates recycling of the transferrin receptor and iron assimilation." *Cell metabolism* **17**(3): 343-352.
- Cherfils, J. (2014). "Arf GTPases and their effectors: assembling multivalent membrane-binding platforms." *Catalysis and regulation / Multi-protein assemblies in signalling* **29 IS -**: 67-76.
- Chevallier, N., E. Keller and T. Maurice (2011). "Behavioural phenotyping of knockout mice for the sigma-1 (σ_1) chaperone protein revealed gender-related anxiety, depressive-like and memory alterations." *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* **25**(7): 960-975.
- Chi, X., S. Wang, Y. Huang, M. Stamnes and J.-L. Chen (2013). "Roles of Rho GTPases in Intracellular Transport and Cellular Transformation." *International journal of molecular sciences* **14**(4): 7089-7108.
- Childs, K. S., R. E. Randall and S. Goodbourn (2013). "LGP2 plays a critical role in sensitizing mda-5 to activation by double-stranded RNA." *PLoS ONE* **8**(5): e64202.
- Chisari, F. V. (2005). "Unscrambling hepatitis C virus–host interactions." *Nature* **436**(7053): 930-932.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Analytical Biochemistry* **162**(1): 156-159.
- Chu, U. B. and A. E. Ruoho (2016). "Biochemical Pharmacology of the Sigma-1 Receptor." *Molecular Pharmacology* **89**(1): 142-153.
- Chukkapalli, V., K. L. Berger, S. M. Kelly, M. Thomas, A. Deiters and G. Randall (2015). "Daclatasvir inhibits hepatitis C virus NS5A motility and hyper-accumulation of phosphoinositides." *Virology* **476**: 168-179.
- Ciechanover, A. and Y. T. Kwon (2015). "Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies." *Exp Mol Med* **47**: e147.
- Ciesielski, J., T.-P. Su and S.-Y. Tsai (2016). "Myristic acid hitchhiking on sigma-1 receptor to fend off neurodegeneration." *Receptors & Clinical Investigation* **3**(1).
- Cobos, E. J., J. M. Entrena, F. R. Nieto, C. M. Cendán and E. Del Pozo (2008). "Pharmacology and Therapeutic Potential of Sigma(1) Receptor Ligands." *Current Neuropharmacology* **6**(4): 344-366.
- Collins, S. E. and K. L. Mossman (2014). "Danger, diversity and priming in innate antiviral immunity." *Cytokine & Growth Factor Reviews* **25**(5): 525-531.

Costanzo, M., B. VanderSluis, E. N. Koch, A. Baryshnikova, C. Pons, G. Tan, W. Wang, M. Usaj, J. Hanchard, S. D. Lee, V. Pelechano, E. B. Styles, M. Billmann, J. van Leeuwen, N. van Dyk, Z.-Y. Lin, E. Kuzmin, J. Nelson, J. S. Piotrowski, T. Srikumar, S. Bahr, Y. Chen, R. Deshpande, C. F. Kurat, S. C. Li, Z. Li, M. M. Usaj, H. Okada, N. Pascoe, B.-J. San Luis, S. Sharifpoor, E. Shuteriqi, S. W. Simpkins, J. Snider, H. G. Suresh, Y. Tan, H. Zhu, N. Malod-Dognin, V. Janjic, N. Przulj, O. G. Troyanskaya, I. Stagljar, T. Xia, Y. Ohya, A.-C. Gingras, B. Raught, M. Boutros, L. M. Steinmetz, C. L. Moore, A. P. Rosebrock, A. A. Caudy, C. L. Myers, B. Andrews and C. Boone (2016). "A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function." Science **353**(6306).

Cottone, P., X. Wang, J. W. Park, M. Valenza, A. Blasio, J. Kwak, M. R. Iyer, L. Steardo, K. C. Rice, T. Hayashi and V. Sabino (2012). "Antagonism of sigma-1 receptors blocks compulsive-like eating." Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology **37**(12): 2593-2604.

Croisé, P., C. Estay-Ahumada, S. Gasman and S. Ory (2014). "Rho GTPases, phosphoinositides, and actin: A tripartite framework for efficient vesicular trafficking." Small GTPases **5**: e29469.

Crottes, D., H. Guizouarn, P. Martin, F. Borgese and O. Soriani (2013). "The sigma-1 receptor: a regulator of cancer cell electrical plasticity?" Front Physiol **4**: 175.

Crottès, D., S. Martial, R. Rapetti-Mauss, D. F. Pisani, C. Loriol, B. Pellissier, P. Martin, E. Chevet, F. Borgese and O. Soriani (2011). "Sig1R Protein Regulates hERG Channel Expression through a Post-translational Mechanism in Leukemic Cells." The Journal of biological chemistry **286**(32): 27947-27958.

Crottès, D., R. Rapetti-Mauss, F. Alcaraz-Perez, M. Tichet, G. Gariano, S. Martial, H. Guizouarn, B. Pellissier, A. Loubat, A. Popa, A. Paquet, M. Presta, S. Tartare-Deckert, M. L. Cayuela, P. Martin, F. Borgese and O. Soriani (2016). "SIGMAR1 Regulates Membrane Electrical Activity in Response to Extracellular Matrix Stimulation to Drive Cancer Cell Invasiveness." Cancer research **76**(3): 607-618.

Cullen, P. J. (2008). "Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(7): 574-582.

Cullen, P. J. and J. G. Carlton (2012). "Phosphoinositides in the mammalian endo-lysosomal network." Sub-cellular biochemistry **59**: 65-110.

Cullen, P. J., G. E. Cozier, G. Banting and H. Mellor (2001). "Modular phosphoinositide-binding domains: their role in signalling and membrane trafficking." Current Biology **11**(21): R882-R893.

D'Souza-Schorey, C. and P. Chavrier (2006). "ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(5): 347-358.

D'Angelo, G., M. Vicinanza, C. Wilson and M. A. De Matteis (2012). Phosphoinositides in Golgi Complex Function. Phosphoinositides II: The Diverse Biological Functions. T. Balla, M. Wymann and J. D. York. Dordrecht, Springer Netherlands: 255-270.

Damalas, A., A. Ben-Ze'ev, I. Simcha, M. Shtutman, J. F. Leal, J. Zhurinsky, B. Geiger and M. Oren (1999). "Excess beta-catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53." The EMBO Journal **18**(11): 3054-3063.

Dash, S., S. Chava, Y. Aydin, P. K. Chandra, P. Ferraris, W. Chen, L. A. Balart, T. Wu and R. F. Garry (2016). "Hepatitis C Virus Infection Induces Autophagy as a Prosurvival Mechanism to Alleviate Hepatic ER-Stress Response." Viruses **8**(5): 150.

Davis, M. P. (2015). "Sigma-1 receptors and animal studies centered on pain and analgesia." Expert opinion on drug discovery **10**(8): 885-900.

Davis, S., J. Wang, M. Zhu, K. Stahmer, R. Lakshminarayan, M. Ghassemian, Y. Jiang, E. A. Miller and S. Ferro-Novick (2016). "Sec24 phosphorylation regulates autophagosome abundance during nutrient deprivation." eLife **5**: e21167.

de Lartigue, J., H. Polson, M. Feldman, K. Shokat, S. A. Tooze, S. Urbé and M. J. Clague (2009). "PIKfyve Regulation of Endosome-Linked Pathways." Traffic (Copenhagen, Denmark) **10**(7): 883-893.

Denizot, F. and R. Lang (1986). "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival." Journal of Immunological Methods **89**(2): 271-277.

Di Paolo, G. and P. De Camilli (2006). "Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics." Nature **443**(7112): 651-657.

Di Paolo, G. and T.-W. Kim (2011). "Linking Lipids to Alzheimer's Disease: Cholesterol and Beyond." Nature Reviews. Neuroscience **12**(5): 284-296.

Diao, J., R. Liu, Y. Rong, M. Zhao, J. Zhang, Y. Lai, Q. Zhou, L. M. Wilz, J. Li, S. Vivona, R. A. Pfuetzner, A. T. Brunger and Q. Zhong (2015). "ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes." Nature **520**(7548): 563-566.

Dixit, E., S. Boulant, Y. Zhang, A. S. Y. Lee, C. Odendall, B. Shum, N. Hacohen, Z. J. Chen, S. P. Whelan, M. Fransen, M. L. Nibert, G. Superti-Furga and J. C. Kagan (2010). "Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity." Cell **141**(4): 668-681.

Do, W., C. Herrera, J. Mighty, M. Shumskaya, S. M. Redenti and M. Sauane (2013). "Sigma 1 Receptor plays a prominent role in IL-24-induced cancer-specific apoptosis." Biochemical and biophysical research communications **439**(2): 215-220.

Dobbs, N., N. Burnaevskiy, D. Chen, V. K. Gonugunta, N. M. Alto and N. Yan (2015). "STING activation by translocation from the ER is associated with infection and autoinflammatory disease." Cell host & microbe **18**(2): 157-168.

Dong, H., Y. Ma, Z. Ren, B. Xu, Y. Zhang, J. Chen and B. Yang (2016). "Sigma-1 Receptor Modulates Neuroinflammation After Traumatic Brain Injury." Cellular and molecular neurobiology **36**(5): 639-645.

Dreux, M., P. Gastaminza, S. F. Wieland and F. V. Chisari (2009). "The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(33): 14046-14051.

Du, Q. and D. A. Geller (2010). "Cross-Regulation Between Wnt and NF- κ B Signaling Pathways." Forum on immunopathological diseases and therapeutics **1**(3): 155-181.

Dubois, T., O. Paléotti, A. A. Mironov, V. Fraasier, T. E. B. Stradal, M. A. De Matteis, M. Franco and P. Chavrier (2005). "Golgi-localized GAP for Cdc42 functions downstream of ARF1 to control Arp2/3 complex and F-actin dynamics." *Nature Cell Biology* **7**(4): 353-364.

DuBridgE, R. B., P. Tang, H. C. Hsia, P. M. Leong, J. H. Miller and M. P. Calos (1987). "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system." *Molecular and Cellular Biology* **7**(1): 379-387.

Dubuisson, J. and F.-L. Cosset (2014). "Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – An update." *Journal of Hepatology* **61**(Supplement): S3-S13.

Dudek, J., S. Pfeffer, P.-H. Lee, M. Jung, A. Cavalié, V. Helms, F. Förster and R. Zimmermann (2015). "Protein Transport into the Human Endoplasmic Reticulum." *Journal of Molecular Biology* **427**(6, Part A): 1159-1175.

Dull, T., R. Zufferey, M. Kelly, R. J. Mandel, M. Nguyen, D. Trono and L. Naldini (1998). "A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System." *Journal of Virology* **72**(11): 8463-8471.

Eira, J., C. S. Silva, M. M. Sousa and M. A. Liz (2016). "The cytoskeleton as a novel therapeutic target for old neurodegenerative disorders." *Progress in Neurobiology* **141**: 61-82.

Estrabaud, E., S. De Muynck and T. Asselah (2011). "Activation of unfolded protein response and autophagy during HCV infection modulates innate immune response." *J Hepatol* **55**(5): 1150-1153.

Everett, R. D., D. F. Young, R. E. Randall and A. Orr (2008). "STAT-1- and IRF-3-Dependent Pathways Are Not Essential for Repression of ICP0-Null Mutant Herpes Simplex Virus Type 1 in Human Fibroblasts." *Journal of Virology* **82**(17): 8871-8881.

Farhan, H., M. Weiss, K. Tani, R. J. Kaufman and H.-P. Hauri (2008). "Adaptation of endoplasmic reticulum exit sites to acute and chronic increases in cargo load." *The EMBO Journal* **27**(15): 2043-2054.

Farhat, R., L. Goueslain, C. Wychowski, S. Belouzard, L. Fénéant, C. L. Jackson, J. Dubuisson and Y. Rouillé (2013). "Hepatitis C Virus Replication and Golgi Function in Brefeldin A-Resistant Hepatoma-Derived Cells." *PLoS ONE* **8**(9): e74491.

Fehér, Á., A. Juhász, A. László, M. Pákáski, J. Kálmán and Z. Janka (2012). "Association between a variant of the sigma-1 receptor gene and Alzheimer's disease." *Neuroscience letters* **517**(2): 136-139.

Feng, Q., M. A. Langereis, M. Lork, M. Nguyen, S. V. Hato, K. Lanke, L. Emdad, P. Bhoopathi, P. B. Fisher, R. E. Lloyd and F. J. M. van Kuppeveld (2014). "Enterovirus 2Apro Targets MDA5 and MAVS in Infected Cells." *Journal of Virology* **88**(6): 3369-3378.

Ferreira, A. R., A. C. Magalhães, F. Camões, A. Gouveia, M. Vieira, J. C. Kagan and D. Ribeiro (2016). "Hepatitis C virus NS3-4A inhibits the peroxisomal MAVS-dependent antiviral signalling response." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **20**(4): 750-757.

Ferreon, J. C., A. C. M. Ferreon, K. Li and S. M. Lemon (2005). "Molecular Determinants of TRIF Proteolysis Mediated by the Hepatitis C Virus NS3/4A Protease." Journal of Biological Chemistry **280**(21): 20483-20492.

Fontanilla, D., A. R. Hajipour, A. Pal, U. B. Chu, M. Arbabian and A. E. Ruoho (2008). "Probing the steroid binding domain-like I (SBDLI) of the sigma-1 receptor binding site using N-substituted photoaffinity labels." Biochemistry **47**(27): 7205-7217.

Forrest, S., A. Chai, M. Sanhueza, M. Marescotti, K. Parry, A. Georgiev, V. Sahota, R. Mendez-Castro and G. Pennetta (2013). "Increased levels of phosphoinositides cause neurodegeneration in a Drosophila model of amyotrophic lateral sclerosis." Human Molecular Genetics **22**(13): 2689-2704.

Francardo, V., F. Bez, T. Wieloch, H. Nissbrandt, K. Ruscher and M. A. Cenci (2014). "Pharmacological stimulation of sigma-1 receptors has neurorestorative effects in experimental parkinsonism." Brain : a journal of neurology **137**(Pt 7): 1998-2014.

Fraser, C. S. and J. A. Doudna (2007). "Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation." Nat Rev Micro **5**(1): 29-38.

Frecska, E., A. Szabo, M. J. Winkelman, L. E. Luna and D. J. McKenna (2013). "A possibly sigma-1 receptor mediated role of dimethyltryptamine in tissue protection, regeneration, and immunity." J Neural Transm (Vienna) **120**(9): 1295-1303.

Friesland, M., L. Mingorance, J. Chung, F. V. Chisari and P. Gastaminza (2013). "Sigma-1 Receptor Regulates Early Steps of Viral RNA Replication at the Onset of Hepatitis C Virus Infection." Journal of Virology **87**(11): 6377-6390.

Fujimoto, M., T. Hayashi and T. P. Su (2012). "The role of cholesterol in the association of endoplasmic reticulum membranes with mitochondria." Biochem Biophys Res Commun **417**(1): 635-639.

Fujimoto, M., T. Hayashi, R. Urfer, S. Mita and T.-P. Su (2012). "Sigma-1 receptor chaperones regulate the secretion of brain-derived neurotrophic factor." Synapse (New York, N.Y.) **66**(7): 630-639.

Fukunaga, K., Y. Shinoda and H. Tagashira (2015). "The role of SIGMAR1 gene mutation and mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis." J Pharmacol Sci **127**(1): 36-41.

Gack, M. U., R. A. Albrecht, T. Urano, K.-S. Inn, I. C. Huang, E. Carnero, M. Farzan, S. Inoue, J. U. Jung and A. García-Sastre (2009). "Influenza A Virus NS1 Targets the Ubiquitin Ligase TRIM25 to Evade Recognition by the Host Viral RNA Sensor RIG-I." Cell Host & Microbe **5**(5): 439-449.

Gack, M. U., A. Kirchhofer, Y. C. Shin, K.-S. Inn, C. Liang, S. Cui, S. Myong, T. Ha, K.-P. Hopfner and J. U. Jung (2008). "Roles of RIG-I N-terminal tandem CARD and splice variant in TRIM25-mediated antiviral signal transduction." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(43): 16743-16748.

Gack, M. U., Y. C. Shin, C.-H. Joo, T. Urano, C. Liang, L. Sun, O. Takeuchi, S. Akira, Z. Chen, S. Inoue and J. U. Jung (2007). "TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity." Nature **446**(7138): 916-920.

- Gale, M. and E. M. Foy (2005). "Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus." Nature **436**(7053): 939-945.
- Gao, C., G. Xiao and J. Hu (2014). "Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by posttranslational modifications." Cell & Bioscience **4**(1): 1-20.
- Gardner, B., L. X. Zhu, M. D. Roth, D. P. Tashkin, S. M. Dubinett and S. Sharma (2004). "Cocaine modulates cytokine and enhances tumor growth through sigma receptors." Journal of neuroimmunology **147**(1-2): 95-98.
- Ge, L., M. Zhang and R. Schekman (2014). "Phosphatidylinositol 3-kinase and COPII generate LC3 lipidation vesicles from the ER-Golgi intermediate compartment." eLife **3**: e04135.
- Gerold, G. and T. Pietschmann (2014). "The HCV life cycle: in vitro tissue culture systems and therapeutic targets." Digestive Diseases **32**(5): 525-537.
- Giard, D. J., S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, H. Dosik and W. P. Parks (1973). "In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors." Journal of the National Cancer Institute **51**(5): 1417-1423.
- Gilchrist, A., C. E. Au, J. Hiding, A. W. Bell, J. Fernandez-Rodriguez, S. Lesimple, H. Nagaya, L. Roy, S. J. C. Gosline, M. Hallett, J. Paiement, Robert E. Kearney, T. Nilsson and J. J. M. Bergeron "Quantitative Proteomics Analysis of the Secretory Pathway." Cell **127**(6): 1265-1281.
- Gokhale, N. S., C. Vazquez and S. M. Horner (2014). "Hepatitis C Virus. Strategies to Evade Antiviral Responses." Future Virol **9**(12): 1061-1075.
- Gómez, C. E., B. Perdiguero, M. V. Cepeda, L. Mingorance, J. García-Arriaza, A. Vandermeeren, C. Ó. S. Sorzano and M. Esteban (2013). "High, Broad, Polyfunctional, and Durable T Cell Immune Responses Induced in Mice by a Novel Hepatitis C Virus (HCV) Vaccine Candidate (MVA-HCV) Based on Modified Vaccinia Virus Ankara Expressing the Nearly Full-Length HCV Genome." Journal of Virology **87**(13): 7282-7300.
- Gomez-Navarro, N. and E. Miller (2016). "Protein sorting at the ER-Golgi interface." The Journal of Cell Biology.
- Goode, B. L. and M. J. Eck (2007). "Mechanism and Function of Formins in the Control of Actin Assembly." Annual Review of Biochemistry **76**(1): 593-627.
- Goueslain, L., K. Alsaleh, P. Horellou, P. Roingard, V. Descamps, G. Duverlie, Y. Ciczora, C. Wy-chowski, J. Dubuisson and Y. Rouille (2010). "Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication." J Virol **84**(2): 773-787.
- Goulet, M.-L., D. Olganier, Z. Xu, S. Paz, S. M. Belgnaoui, E. I. Lafferty, V. Janelle, M. Arguello, M. Paquet, K. Ghneim, S. Richards, A. Smith, P. Wilkinson, M. Cameron, U. Kalinke, S. Qureshi, A. Lamarre, E. K. Haddad, R. P. Sekaly, S. Peri, S. Balachandran, R. Lin and J. Hiscott (2013). "Systems Analysis of a RIG-I Agonist Inducing Broad Spectrum Inhibition of Virus Infectivity." PLoS Pathogens **9**(4): e1003298-1003219.
- Grassi, G. (2016). "Hepatitis C virus relies on lipoproteins for its life cycle." World Journal of Gas-

gastroenterology **22**(6): 1953-1914.

Gris, G., E. J. Cobos, D. Zamanillo and E. Portillo-Salido (2016). "Sigma-1 receptor and inflammatory pain." Inflammation Research **64**(6): 1-5.

Gris, G., E. Portillo-Salido, B. Aubel, Y. Darbaky, K. Deseure, J. M. Vela, M. Merlos and D. Zamanillo (2016). "The selective sigma-1 receptor antagonist E-52862 attenuates neuropathic pain of different aetiology in rats." Nature Publishing Group **6**: 24591.

Gromek, K. A., F. P. Suchy, H. R. Meddaugh, R. L. Wrobel, L. M. LaPointe, U. B. Chu, J. G. Primm, A. E. Ruoho, A. Senes and B. G. Fox (2014). "The oligomeric states of the purified sigma-1 receptor are stabilized by ligands." The Journal of biological chemistry **289**(29): 20333-20344.

Grossmann, A. H., J. H. Yoo, J. Clancy, L. K. Sorensen, A. Sedgwick, Z. Tong, K. Ostanin, A. Rogers, K. F. Grossmann, S. R. Tripp, K. R. Thomas, C. D'Souza-Schorey, S. J. Odelberg and D. Y. Li (2013). "The Small GTPase ARF6 Stimulates β -Catenin Transcriptional Activity During WNT5A-Mediated Melanoma Invasion and Metastasis." Sci. Signal. **6**(265): ra14.

Gu, L., A. Fullam, R. Brennan and M. Schröder (2013). "Human DEAD Box Helicase 3 Couples I κ B Kinase ϵ to Interferon Regulatory Factor 3 Activation." Molecular and Cellular Biology **33**(10): 2004-2015.

Gurel, Pinar S., Anna L. Hatch and Henry N. Higgs (2014). "Connecting the Cytoskeleton to the Endoplasmic Reticulum and Golgi." Current Biology **24**(14): R660-R672.

Ha, Y., Y. Dun, M. Thangaraju, J. Duplantier, Z. Dong, K. Liu, V. Ganapathy and S. B. Smith (2011). "Sigma receptor 1 modulates endoplasmic reticulum stress in retinal neurons." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(1): 527-540.

Ha, Y., A. Saul, A. Tawfik, E. P. Zorrilla, V. Ganapathy and S. B. Smith (2012). "Diabetes accelerates retinal ganglion cell dysfunction in mice lacking sigma receptor 1." Molecular vision **18**: 2860-2870.

Ha, Y., A. K. Shanmugam, S. Markand, E. Zorrilla, V. Ganapathy and S. B. Smith (2014). "Sigma receptor 1 modulates ER stress and Bcl2 in murine retina." Cell and Tissue Research **356**(1): 15-27.

Haase, G. and C. Rabouille (2015). "Golgi Fragmentation in ALS Motor Neurons. New Mechanisms Targeting Microtubules, Tethers, and Transport Vesicles." Frontiers in Neuroscience **9**: 448.

Hamasaki, M., N. Furuta, A. Matsuda, A. Nezu, A. Yamamoto, N. Fujita, H. Oomori, T. Noda, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, A. Amano and T. Yoshimori (2013). "Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites." Nature **495**(7441): 389-393.

Hanner, M., F. F. Moebius, A. Flandorfer, H. G. Knaus, J. Striessnig, E. Kempner and H. Glossmann (1996). "Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(15): 8072-8077.

Harak, C., M. Meyrath, I. Romero-Brey, C. Schenk, C. Gondeau, P. Schult, K. Esser-Nobis, M.

Saeed, P. Neddermann, P. Schnitzler, D. Gotthardt, S. Perez-del-Pulgar, C. Neumann-Haefelin, R. Thimme, P. Meuleman, F. W. R. Vondran, R. D. Francesco, C. M. Rice, R. Bartenschlager and V. Lohmann (2016). "Tuning a cellular lipid kinase activity adapts hepatitis C virus to replication in cell culture." Nature Microbiology **2**: 16247.

Hare, D. and K. L. Mossman (2013). "Novel paradigms of innate immune sensing of viral infections." Cytokine: 1-8.

Harterink, M., F. Port, M. J. Lorenowicz, I. J. McGough, M. Silhankova, M. C. Betist, J. R. T. van Weering, R. G. H. P. van Heesbeen, T. C. Middelkoop, K. Basler, P. J. Cullen and H. C. Korswagen (2011). "A SNX3-dependent retromer pathway mediates retrograde transport of the Wnt sorting receptor Wntless and is required for Wnt secretion." Nature Cell Biology **13**(8): 914-923.

Hashimoto, K. (2015). "Activation of sigma-1 receptor chaperone in the treatment of neuropsychiatric diseases and its clinical implication." Journal of pharmacological sciences **127**(1): 6-9.

Havugimana, Pierre C., G. T. Hart, T. Nepusz, H. Yang, Andrei L. Turinsky, Z. Li, Peggy I. Wang, Daniel R. Boutz, V. Fong, S. Phanse, M. Babu, Stephanie A. Craig, P. Hu, C. Wan, J. Vlasblom, V.-u.-N. Dar, A. Bezginov, Gregory W. Clark, Gabriel C. Wu, Shoshana J. Wodak, Elisabeth R. M. Tillier, A. Paccanaro, Edward M. Marcotte and A. Emili (2012). "A Census of Human Soluble Protein Complexes." Cell **150**(5): 1068-1081.

Hayashi, T. (2015). "Sigma-1 receptor: The novel intracellular target of neuropsychotherapeutic drugs." Journal of Pharmacological Science **127**(1): 2-5.

Hayashi, T. and M. Fujimoto (2010). "Detergent-Resistant Microdomains Determine the Localization of σ -1 Receptors to the Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Junction." Molecular Pharmacology **77**(4): 517.

Hayashi, T., E. Hayashi, M. Fujimoto, H. Sprong and T.-P. Su (2012). "The lifetime of UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase is controlled by a distinct endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) regulated by sigma-1 receptor chaperones." The Journal of biological chemistry **287**(51): 43156-43169.

Hayashi, T. and T.-P. Su (2003). "Intracellular dynamics of sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) in NG108-15 cells." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **306**(2): 726-733.

Hayashi, T. and T.-P. Su (2003). "Sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **306**(2): 718-725.

Hayashi, T. and T.-P. Su (2004). "Sigma-1 receptors at galactosylceramide-enriched lipid microdomains regulate oligodendrocyte differentiation." Proceedings of the National Academy of Sciences **101**(41): 14949-14954.

Hayashi, T. and T.-P. Su (2005). "The potential role of sigma-1 receptors in lipid transport and lipid raft reconstitution in the brain: Implication for drug abuse." Life Sciences **77**(14): 1612-1624.

Hayashi, T. and T. P. Su (2001). "Regulating ankyrin dynamics: Roles of sigma-1 receptors." Proc

Natl Acad Sci U S A **98**(2): 491-496.

Hayashi, T. and T. P. Su (2005). "The Sigma Receptor: Evolution of the Concept in Neuropsychopharmacology." Current Neuropharmacology **3**(4): 267-280.

Hayashi, T. and T. P. Su (2007). "Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival." Cell **131**(3): 596-610.

Hehny, H. and M. Stamnes (2007). "Regulating cytoskeleton-based vesicle motility." FEBS letters **581**(11): 2112-2118.

Hein, Marco Y., Nina C. Hubner, I. Poser, J. Cox, N. Nagaraj, Y. Toyoda, Igor A. Gak, I. Weisswange, J. Mansfeld, F. Buchholz, Anthony A. Hyman and M. Mann (2015). "A Human Interactome in Three Quantitative Dimensions Organized by Stoichiometries and Abundances." Cell **163**(3): 712-723.

Higashio, H. and K. Kohno (2002). "A genetic link between the unfolded protein response and vesicle formation from the endoplasmic reticulum." Biochemical and Biophysical Research Communications **296**(3): 568-574.

Hille, B., E. J. Dickson, M. Kruse, O. Vivas and B.-C. Suh (2015). "Phosphoinositides regulate ion channels." Biochimica et biophysica acta **1851**(6): 844-856.

Hillesheim, A., C. Nordhoff, Y. Boergeling, S. Ludwig and V. Wixler (2014). "□-catenin promotes the type I IFN synthesis and the IFN-dependent signaling response but is suppressed by influenza A virus-induced RIG-I/NF-?B signaling." Cell Communication and Signaling **12**(1): 1-18.

Hirokawa, N. and Y. Noda (2008). "Intracellular Transport and Kinesin Superfamily Proteins, KIFs: Structure, Function, and Dynamics." Physiological Reviews **88**(3): 1089.

Hiscott, J. (2007). "Convergence of the NF-kappaB and IRF pathways in the regulation of the innate antiviral response." Cytokine & Growth Factor Reviews **18**(5-6): 483-490.

Hong, Y., K. Ohishi, J. Y. Kang, S. Tanaka, N. Inoue, J.-i. Nishimura, Y. Maeda and T. Kinoshita (2003). "Human PIG-U and Yeast Cdc91p Are the Fifth Subunit of GPI Transamidase That Attaches GPI-Anchors to Proteins." Molecular Biology of the Cell **14**(5): 1780-1789.

Horner, S. M., H. M. Liu, H. S. Park, J. Briley and M. Gale (2011). "Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(35): 14590-14595.

Hornung, V., J. Ellegast, S. Kim, K. Brzózka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K.-K. Conzelmann, M. Schlee, S. Endres and G. Hartmann (2006). "5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I." Science **314**(5801): 994-997.

Hou, F., L. Sun, H. Zheng, B. Skaug, Q.-X. Jiang and Z. J. Chen (2011). "MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response." Cell **146**(3): 448-461.

Huang, Y., L. Zheng, G. Halliday, C. Dobson-Stone, Y. Wang, H.-D. Tang, L. Cao, Y.-L. Deng, G.

- Wang, Y.-M. Zhang, J.-H. Wang, M. Hallupp, J. Kwok and S.-D. Chen (2011). "Genetic polymorphisms in sigma-1 receptor and apolipoprotein E interact to influence the severity of Alzheimer's disease." Current Alzheimer research **8**(7): 765-770.
- Hughes, S. C. and R. G. Fehon (2007). "Understanding ERM proteins--the awesome power of genetics finally brought to bear." Current Opinion in Cell Biology **19**(1): 51-56.
- Hunt, S. D., A. K. Townley, C. M. Danson, P. J. Cullen and D. J. Stephens (2013). "Microtubule motors mediate endosomal sorting by maintaining functional domain organization." Journal of Cell Science **126**(11): 2493-2501.
- Hutagalung, A. H. and P. J. Novick (2011). "Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology." Physiological Reviews **91**(1): 119-149.
- Ingelmo-Torres, M., E. González-Moreno, A. Kassan, M. Hanzal-Bayer, F. Tebar, A. Herms, T. Grewal, J. F. Hancock, C. Enrich, M. Bosch, S. P. Gross, R. G. Parton and A. Pol (2009). "Hydrophobic and Basic Domains Target Proteins to Lipid Droplets." Traffic (Copenhagen, Denmark) **10**(12): 1785-1801.
- Irie, T., K. Kiyotani, T. Igarashi, A. Yoshida and T. Sakaguchi (2012). "Inhibition of Interferon Regulatory Factor 3 Activation by Paramyxovirus V Protein." Journal of Virology **86**(13): 7136-7145.
- Ivanova, A. A., M. P. East, S. L. Yi and R. A. Kahn (2014). "Characterization of recombinant EL-MOD (cell engulfment and motility domain) proteins as GTPase-activating proteins (GAPs) for ARF family GTPases." The Journal of biological chemistry **289**(16): 11111-11121.
- Iwasaki, H., T. Yorimitsu and K. Sato (2015). "Distribution of Sec24 isoforms to each ER exit site is dynamically regulated in *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Letters **589**(11): 1234-1239.
- Jacobs, J. L., J. Zhu, S. N. Sarkar and C. B. Coyne (2014). "Regulation of Mitochondrial Antiviral Signaling (MAVS) Expression and Signaling by the Mitochondria-associated Endoplasmic Reticulum Membrane (MAM) Protein Gp78." The Journal of biological chemistry **289**(3): 1604-1616.
- Jain, A., T. Lamark, E. Sjøttem, K. Bowitz Larsen, J. Atesoh Awuh, A. Øvervatn, M. McMahon, J. D. Hayes and T. Johansen (2010). "p62/SQSTM1 Is a Target Gene for Transcription Factor NRF2 and Creates a Positive Feedback Loop by Inducing Antioxidant Response Element-driven Gene Transcription." Journal of Biological Chemistry **285**(29): 22576-22591.
- James, D. J., C. Khodthong, J. A. Kowalchuk and T. F. J. Martin (2008). "Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates SNARE-dependent membrane fusion." The Journal of Cell Biology **182**(2): 355-366.
- Jeschke, A. and A. Haas (2016). "Deciphering the roles of phosphoinositide lipids in phagolysosome biogenesis." Communicative & Integrative Biology **9**(3): e1174798.
- Jin, J.-L., M. Fang, Y.-X. Zhao and X.-Y. Liu (2015). "Roles of sigma-1 receptors in Alzheimer's disease." International journal of clinical and experimental medicine **8**(4): 4808-4820.
- Joglekar, A. P. and J. C. Hay (2005). "Evidence for regulation of ER/Golgi SNARE complex formation by hsc70 chaperones." European Journal of Cell Biology **84**(5): 529-542.

Johnson, J. L., J. W. Erickson and R. A. Cerione (2012). "C-terminal Di-arginine Motif of Cdc42 Protein Is Essential for Binding to Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate-containing Membranes and Inducing Cellular Transformation." The Journal of Biological Chemistry **287**(8): 5764-5774.

Jonikas, M. C., S. R. Collins, V. Denic, E. Oh, E. M. Quan, V. Schmid, J. Weibezahn, B. Schwappach, P. Walter, J. S. Weissman and M. Schuldiner (2009). "Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum." Science **323**(5922): 1693-1697.

Jorba, N., S. Juarez, E. Torreira, P. Gastaminza, N. Zamarréño, J. P. Albar and J. Ortín (2008). "Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors." PROTEOMICS **8**(10): 2077-2088.

Jounai, N., F. Takeshita, K. Kobiyama, A. Sawano, A. Miyawaki, K. Q. Xin, K. J. Ishii, T. Kawai, S. Akira, K. Suzuki and K. Okuda (2007). "The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(35): 14050-14055.

Joyce, D., B. Bouzahzah, M. Fu, C. Albanese, M. D'Amico, J. Steer, J. U. Klein, R. J. Lee, J. E. Segall, J. K. Westwick, C. J. Der and R. G. Pestell (1999). "Integration of Rac-dependent Regulation of Cyclin D1 Transcription through a Nuclear Factor- κ B-dependent Pathway." Journal of Biological Chemistry **274**(36): 25245-25249.

Kadowaki, H., A. Nagai, T. Maruyama, Y. Takami, P. Satrimafitrah, H. Kato, A. Honda, T. Hatta, T. Natsume, T. Sato, H. Kai, H. Ichijo and H. Nishitoh (2015). "Pre-emptive Quality Control Protects the ER from Protein Overload via the Proximity of ERAD Components and SRP." CELREP **13**(5): 944-956.

Kafri, T., U. Blomer, D. A. Peterson, F. H. Gage and I. M. Verma (1997). "Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors." Nat Genet **17**(3): 314-317.

Kakoi, S., T. Yorimitsu and K. Sato (2013). "COPII machinery cooperates with ER-localized Hsp40 to sequester misfolded membrane proteins into ER-associated compartments." Molecular Biology of the Cell **24**(5): 633-642.

Kalantari, F., J. J. M. Bergeron and T. Nilsson (2010). "Biogenesis of lipid droplets – how cells get fatter." Molecular Membrane Biology **27**(8): 462-468.

Kaltenbach, L. S., E. Romero, R. R. Becklin, R. Chettier, R. Bell, A. Phansalkar, A. Strand, C. Torcassi, J. Savage, A. Hurlburt, G.-H. Cha, L. Ukani, C. L. Chepanoske, Y. Zhen, S. Sahasrabudhe, J. Olson, C. Kurschner, L. M. Ellerby, J. M. Peltier, J. Botas and R. E. Hughes (2007). "Huntingtin Interacting Proteins Are Genetic Modifiers of Neurodegeneration." PLoS Genetics **3**(5): e82.

Kaneko, M., M. Ishiguro, Y. Niinuma, M. Uesugi and Y. Nomura (2002). "Human HRD1 protects against ER stress-induced apoptosis through ER-associated degradation." FEBS Letters(532): 147-152.

Kang, X., X. Chen, Y. He, D. Guo, L. Guo, J. Zhong and H.-B. Shu (2013). "DDB1 is a cellular substrate of NS3/4A protease and required for hepatitis C virus replication." Virology **435**(2): 385-394.

Kato, H., O. Takeuchi, E. Mikamo-Satoh, R. Hirai, T. Kawai, K. Matsushita, A. Hiiragi, T. S. Dermody, T. Fujita and S. Akira (2008). "Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5." The

Journal of Experimental Medicine **205**(7): 1601-1610.

Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C.-S. Koh, C. Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita and S. Akira (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." Nature **441**(7089): 101-105.

Kato, N., K. Sugiyama, K. Namba, H. Dansako, T. Nakamura, M. Takami, K. Naka, A. Nozaki and K. Shimotohno (2003). "Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro." Biochemical and biophysical research communications **306**(3): 756-766.

Ke, P.-Y. and S. S. L. Chen (2011). "Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro." The Journal of clinical investigation **121**(1): 37-56.

Kekuda, R., P. D. Prasad, Y. J. Fei, F. H. Leibach and V. Ganapathy (1996). "Cloning and functional expression of the human type 1 sigma receptor (hSigmaR1)." Biochemical and biophysical research communications **229**(2): 553-558.

Khachatoorian, R. (2016). "Chaperones in hepatitis C virus infection." World Journal of Hepatology **8**(1): 9-28.

Khan, I., D. S. Katikaneni, Q. Han, L. Sanchez-Felipe, K. Hanada, R. L. Ambrose, J. M. Mackenzie and K. V. Konan (2014). "Modulation of hepatitis C virus genome replication by glycosphingolipids and four-phosphate adaptor protein 2." Journal of Virology **88**(21): 12276-12295.

Khan, K. A., F. Dô, A. Marineau, P. Doyon, J.-F. Clément, J. R. Woodgett, B. W. Doble and M. J. Servant (2015). "Fine-Tuning of the RIG-I-Like Receptor/Interferon Regulatory Factor 3-Dependent Antiviral Innate Immune Response by the Glycogen Synthase Kinase 3/ β -Catenin Pathway." Molecular and Cellular Biology **35**(17): 3029-3043.

Khawaja, A., V. Vopalensky and M. Pospisek (2014). "Understanding the potential of hepatitis C virus internal ribosome entry site domains to modulate translation initiation via their structure and function." Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA **6**(2): 211-224.

Kim, S. J. and S. Yoon (2016). "Activated Rac1 regulates the degradation of I κ B α and the nuclear translocation of STAT3-NF κ B complexes in starved cancer cells." Experimental & molecular medicine **48**(5): e231.

Kim, W., S. Y. Kim, T. Kim, M. Kim, D. J. Bae, H. I. Choi, I. S. Kim and E. Jho (2013). "ADP-ribosylation factors 1 and 6 regulate Wnt/ β -catenin signaling via control of LRP6 phosphorylation." Oncogene **32**(28): 3390-3396.

Kim, Y.-M., M. Stone, Tae H. Hwang, Y.-G. Kim, Jane R. Dunlevy, Timothy J. Griffin and D.-H. Kim (2012). "SH3BP4 Is a Negative Regulator of Amino Acid-Rag GTPase-mTORC1 Signaling." Molecular Cell **46**(6): 833-846.

King, P. and S. Goodbourn (1992). "A method for sequence-specific deletion mutagenesis." Nucleic Acids Research **20**(5): 1039-1044.

Kinoshita, M., Y. Matsuoka, T. Suzuki, J. Mirrieles and J. Yang (2012). "Sigma-1 receptor alters the kinetics of Kv1.3 voltage gated potassium channels but not the sensitivity to receptor ligands." Brain research **1452**: 1-9.

Kinoshita, T., Y. Maeda and M. Fujita (2013). "Transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins from the endoplasmic reticulum." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1833**(11): 2473-2478.

Klinkenberg, D., K. R. Long, K. Shome, S. C. Watkins and M. Aridor (2014). "A cascade of ER exit site assembly that is regulated by p125A and lipid signals." Journal of Cell Science **127**(8): 1765.

Klionsky, D. J., (....) and S. M. Zugaier (2016). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)." Autophagy **12**(1): 1-222.

Komuro, A., D. Bamming and C. M. Horvath (2008). "Negative Regulation of Cytoplasmic RNA-Mediated Antiviral Signaling." Cytokine **43**(3): 350-358.

Konan, K. V., T. H. Giddings, M. Ikeda, K. Li, S. M. Lemon and K. Kirkegaard (2003). "Nonstructural Protein Precursor NS4A/B from Hepatitis C Virus Alters Function and Ultrastructure of Host Secretory Apparatus." Journal of Virology **77**(14): 7843-7855.

Kondo, Y., A. Hanai, W. Nakai, Y. Katoh, K. Nakayama and H.-W. Shin (2012). "ARF1 and ARF3 are required for the integrity of recycling endosomes and the recycling pathway." Cell Structure and Function **37**(2): 141-154.

Koronakis, V., P. J. Hume, D. Humphreys, T. Liu, O. Hørning, O. N. Jensen and E. J. McGhie (2011). "WAVE regulatory complex activation by cooperating GTPases Arf and Rac1." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(35): 14449-14454.

Krauss, M. and V. Haucke (2007). "Phosphoinositides: Regulators of membrane traffic and protein function." FEBS Letters **581**(11): 2105-2111.

Kuiper, R. P., G. Bouw, K. P. Janssen, J. Rötter, F. van Herp and G. J. Martens (2001). "Localization of p24 putative cargo receptors in the early secretory pathway depends on the biosynthetic activity of the cell." Biochemical Journal **360**(Pt 2): 421-429.

La Rocca, S. A., R. J. Herbert, H. Crooke, T. W. Drew, T. E. Wileman and P. P. Powell (2005). "Loss of Interferon Regulatory Factor 3 in Cells Infected with Classical Swine Fever Virus Involves the N-Terminal Protease, Npro." Journal of Virology **79**(11): 7239-7247.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Laggner, C., C. Schieferer, B. Fiechtner, G. Poles, R. D. Hoffmann, H. Glossmann, T. Langer and F. F. Moebius (2005). "Discovery of High-Affinity Ligands of σ 1 Receptor, ERG2, and Emopamil Binding Protein by Pharmacophore Modeling and Virtual Screening." Journal of Medicinal Chemistry **48**(15): 4754-4764.

Lai, C. K., K. S. Jeng, K. Machida and M. M. C. Lai (2008). "Association of Hepatitis C Virus Replication Complexes with Microtubules and Actin Filaments Is Dependent on the Interaction of NS3

and NS5A." *Journal of Virology* **82**(17): 8838-8848.

Langa, F., X. Codony, V. Tovar, A. Lavado, E. Gimenez, P. Cozar, M. Cantero, A. Dordal, E. Hernandez, R. Perez, X. Monroy, D. Zamanillo, X. Guitart and L. Montoliu (2003). "Generation and phenotypic analysis of sigma receptor type I (sigma1) knockout mice." *The European journal of neuroscience* **18**(8): 2188-2196.

Langmead, B., C. Trapnell, M. Pop and S. L. Salzberg (2009). "Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome." *Genome Biology* **10**(3): R25.

Lassus, P., P. Roux, O. Zugasti, A. Philips, P. Fort and U. Hibner (2000). "Extinction of Rac1 and Cdc42Hs signaling defines a novel p53-dependent apoptotic pathway." *Oncogene* **19**: 2277-2385.

Le Fourn, V., S. Park, I. Jang, K. Gaplovska-Kysela, B. Guhl, Y. Lee, J. W. Cho, C. Zuber and J. Roth (2013). "Large protein complexes retained in the ER are dislocated by non-COPII vesicles and degraded by selective autophagy." *Cellular and Molecular Life Sciences* **70**(11): 1985-2002.

Lee, S. H. and R. Dominguez (2010). "Regulation of Actin Cytoskeleton Dynamics in Cells." *Molecules and cells* **29**(4): 311-325.

Lemus, L., J. L. Ribas, N. Sikorska and V. Goder (2016). "An ER-Localized SNARE Protein Is Exported in Specific COPII Vesicles for Autophagosome Biogenesis." *CELREP* **14**(7): 1710-1722.

Leonova, K. I., L. Brodsky, B. Lipchick, M. Pal, L. Novototskaya, A. A. Chenchik, G. C. Sen, E. A. Komarova and A. V. Gudkov (2013). "p53 cooperates with DNA methylation and a suicidal interferon response to maintain epigenetic silencing of repeats and noncoding RNAs." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**(1): E89-E98.

Lewis, A., S.-Y. Tsai and T.-P. Su (2016). "Detection of Isolated Mitochondria-Associated ER Membranes Using the Sigma-1 Receptor." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1376**(Chapter 11): 133-140.

Lewis-Saravalli, S., S. Campbell and A. Claing (2013). "ARF1 controls Rac1 signaling to regulate migration of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells." *Cellular Signalling* **25**(9): 1813-1819.

Li, C., S. Z. A. Shah, D. Zhao and L. Yang (2016). "Role of the Retromer Complex in Neurodegenerative Diseases." *Frontiers in Aging Neuroscience* **8**: e92648-92612.

Li, C.-C., K. Le, J. Kato, J. Moss and M. Vaughan (2016). "Enhancement of β -catenin activity by BIG1 plus BIG2 via Arf activation and cAMP signals." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**(21): 5946-5951.

Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin and S. Genome Project Data Processing (2009). "The Sequence Alignment/Map format and SAMtools." *Bioinformatics* **25**(16): 2078-2079.

Li, K., E. Foy, J. C. Ferreon, M. Nakamura, A. C. M. Ferreon, M. Ikeda, S. C. Ray, M. Gale and S. M. Lemon (2005). "Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(8): 2992-2997.

- Li, S., L. Wang, M. Berman, Y.-Y. Kong and Martin E. Dorf (2011). "Mapping a Dynamic Innate Immunity Protein Interaction Network Regulating Type I Interferon Production." *Immunity* **35**(3): 426-440.
- Li, X.-D., L. Sun, R. B. Seth, G. Pineda and Z. J. Chen (2005). "Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**(49): 17717-17722.
- Lim, Y. S. and S. B. Hwang (2011). "Hepatitis C virus NS5A protein interacts with phosphatidylinositol 4-kinase type IIIalpha and regulates viral propagation." *J Biol Chem* **286**(13): 11290-11298.
- Liu, L., H. Zhang, L. Shi, W. Zhang, J. Yuan, X. Chen, J. Liu, Y. Zhang and Z. Wang (2014). "Inhibition of Rac1 activity induces G1/S phase arrest through the GSK3/cyclin D1 pathway in human cancer cells." *Oncology Reports* **32**(4): 1395-1400.
- Liu, R., X. Zhi and Q. Zhong (2015). "ATG14 controls SNARE-mediated autophagosome fusion with a lysosome." *Autophagy* **11**(5): 847-849.
- Liu, S., J. Chen, X. Cai, J. Wu, X. Chen, Y.-T. Wu, L. Sun and Z. J. Chen (2013). "MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades." *eLife* **2**: 2217-2224.
- Liu, Y., Y. Su and X. Wang (2013). Phosphatidic Acid-Mediated Signaling. *Lipid-mediated Protein Signaling*. D. G. S. Capelluto. Dordrecht, Springer Netherlands: 159-176.
- Logothetis, D. E., V. I. Petrou, M. Zhang, R. Mahajan, X.-Y. Meng, S. K. Adney, M. Cui and L. Baki (2015). "Phosphoinositide Control of Membrane Protein Function: A Frontier Led by Studies on Ion Channels." *Annual review of physiology* **77**: 81-104.
- Lohmann, V. and R. Bartenschlager (2014). "On the history of hepatitis C virus cell culture systems." *Journal of Medicinal Chemistry* **57**(5): 1627-1642.
- Lorente-Rodríguez, A. and C. Barlowe (2011). "Requirement for Golgi-localized PI(4)P in fusion of COPII vesicles with Golgi compartments." *Molecular Biology of the Cell* **22**(2): 216-229.
- Love, M. I., W. Huber and S. Anders (2014). "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." *Genome Biology* **15**(12): 550.
- Lovrecic, L., I. Slavkov, S. Dzeroski and B. Peterlin (2010). "ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2 (ARFGEF2): a new potential biomarker in Huntington's disease." *J Int Med Res* **38**(5): 1653-1662.
- Luty, A. A., J. B. J. Kwok, C. Dobson-Stone, C. T. Loy, K. G. Coupland, H. Karlström, T. Sobow, J. Tchorzewska, A. Maruszak, M. Barcikowska, P. K. Panegyres, C. Zekanowski, W. S. Brooks, K. L. Williams, I. P. Blair, K. A. Mather, P. S. Sachdev, G. M. Halliday and P. R. Schofield (2010). "Sigma nonopioid intracellular receptor 1 mutations cause frontotemporal lobar degeneration-motor neuron disease." *Annals of neurology* **68**(5): 639-649.
- Lystad, A. H. and A. Simonsen (2016). "Phosphoinositide-binding proteins in autophagy." *FEBS Letters* **590**(15): 2454-2468.

Ma, B. and M. O. Hottiger (2016). "Crosstalk between Wnt/ β -Catenin and NF- κ B Signaling Pathway during Inflammation." Frontiers in Immunology **7**: 378.

Ma, Q.-L., F. Yang, S. A. Frautschy and G. M. Cole (2012). "PAK in Alzheimer disease, Huntington disease and X-linked mental retardation." Cellular Logistics **2**(2): 117-125.

MacVicar, T. D., L. V. Mannack, R. M. Lees and J. D. Lane (2015). "Targeted siRNA Screens Identify ER-to-Mitochondrial Calcium Exchange in Autophagy and Mitophagy Responses in RPE1 Cells." Int J Mol Sci **16**(6): 13356-13380.

Mancias, J. D. and J. Goldberg (2008). "Structural basis of cargo membrane protein discrimination by the human COPII coat machinery." The EMBO Journal **27**(21): 2918.

Marcato, V., L. Luron, L. M. Laqueuvre, D. Simon, Z. Mansuroglu, M. Flamand, J.-J. Panthier, S. Souès, C. Massaad and E. Bonnefoy (2016). " β -Catenin Upregulates the Constitutive and Virus-Induced Transcriptional Capacity of the Interferon Beta Promoter through T-Cell Factor Binding Sites." Molecular and Cellular Biology **36**(1): 13-29.

Marei, H. and A. Malliri (2016). "Rac1 in human diseases: The therapeutic potential of targeting Rac1 signaling regulatory mechanisms." Small GTPases: 1-25.

Mari, Y., C. Katnik and J. Cuevas (2015). " σ -1 Receptor Inhibition of ASIC1a Channels is Dependent on a Pertussis Toxin-Sensitive G-Protein and an AKAP150/Calcineurin Complex." Neurochemical research **40**(10): 2055-2067.

Maringer, K. and A. Fernandez-Sesma (2014). "Message in a bottle: lessons learned from antagonism of STING signalling during RNA virus infection." Cytokine & Growth Factor Reviews **25**(6): 669-679.

Marion, S., E. Hoffmann, D. Holzer, C. Le Clairche, M. Martin, M. Sachse, I. Ganeva, P. Mangeat and G. Griffiths (2011). "Ezrin Promotes Actin Assembly at the Phagosome Membrane and Regulates Phago-Lysosomal Fusion." Traffic **12**(4): 421-437.

Marrazzo, A., F. Caraci, E. T. Salinaro, T.-P. Su, A. Copani and G. Ronsisvalle (2005). "Neuroprotective effects of sigma-1 receptor agonists against beta-amyloid-induced toxicity." Neuroreport **16**(11): 1223-1226.

Matsumoto, Y., M. Inden, A. Tamura, R. Hatano, S. Tsukita and S. Asano (2014). "Ezrin mediates neuritogenesis via down-regulation of RhoA activity in cultured cortical neurons." PLoS ONE **9**(8): e105435.

Matsuzaki, F., M. Shirane, M. Matsumoto and K. I. Nakayama (2011). "Protrudin serves as an adaptor molecule that connects KIF5 and its cargoes in vesicular transport during process formation." Molecular biology of the cell **22**(23): 4602-4620.

Matteis, M. A. D. and A. Godi (2004). "PI-3-kinase membrane traffic." Nat Cell Biol **6**(6): 487-492.

Matto, M., E. H. Sklan, N. David, N. Melamed-Book, J. E. Casanova, J. S. Glenn and B. Aroeti (2011). "Role for ADP ribosylation factor 1 in the regulation of hepatitis C virus replication." J Virol **85**(2): 946-956.

- Maurice, T. and T.-P. Su (2009). "The pharmacology of sigma-1 receptors." *Pharmacology & therapeutics* **124**(2): 195-206.
- Mauvezin, C., A. L. Neisch, C. I. Ayala, J. Kim, A. Beltrame, C. R. Braden, M. K. Gardner, T. S. Hays and T. P. Neufeld (2016). "Coordination of autophagosome–lysosome fusion and transport by a Klp98A–Rab14 complex in *Drosophila*." *Journal of Cell Science* **129**(5): 971.
- Mavlyutov, T. A., L.-W. Guo, M. L. Epstein and A. E. Ruoho (2015). "Role of the Sigma-1 receptor in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)." *Journal of pharmacological sciences* **127**(1): 10-16.
- Mavlyutov, T. A., R. W. Nickells and L.-W. Guo (2011). "Accelerated retinal ganglion cell death in mice deficient in the Sigma-1 receptor." *Molecular vision* **17**: 1034-1043.
- McCrea, H. J. and P. De Camilli (2009). "Mutations in Phosphoinositide Metabolizing Enzymes and Human Disease." *Physiology (Bethesda, Md.)* **24**: 8-16.
- McLauchlan, J., M. K. Lemberg, G. Hope and B. Martoglio (2002). "Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets." *The EMBO Journal* **21**(15): 3980-3988.
- Mégalizzi, V., C. Decaestecker, O. Debeir, S. Spiegl-Kreinecker, W. Berger, F. Lefranc, R. E. Kast and R. Kiss (2009). "Screening of anti-glioma effects induced by sigma-1 receptor ligands: potential new use for old anti-psychiatric medicines." *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **45**(16): 2893-2905.
- Mei, J. and G. W. Pasternak (2001). "Molecular cloning and pharmacological characterization of the rat sigma1 receptor." *Biochemical pharmacology* **62**(3): 349-355.
- Meunier, J. and T. Hayashi (2010). "Sigma-1 receptors regulate Bcl-2 expression by reactive oxygen species-dependent transcriptional regulation of nuclear factor kappaB." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **332**(2): 388-397.
- Meyers, N. L., K. A. Fontaine, G. R. Kumar and M. Ott (2016). "ScienceDirect Entangled in a membranous web: ER and lipid droplet reorganization during hepatitis C virus infection." *Current Opinion in Cell Biology* **41**: 117-124.
- Mi, H., A. Muruganujan, J. T. Casagrande and P. D. Thomas (2013). "Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system." *Nat. Protocols* **8**(8): 1551-1566.
- Miki, Y., F. Mori, T. Kon, K. Tanji, Y. Toyoshima, M. Yoshida, H. Sasaki, A. Kakita, H. Takahashi and K. Wakabayashi (2014). "Accumulation of the sigma-1 receptor is common to neuronal nuclear inclusions in various neurodegenerative diseases." *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* **34**(2): 148-158.
- Miki, Y., K. Tanji, F. Mori and K. Wakabayashi (2015). "Sigma-1 receptor is involved in degradation of intranuclear inclusions in a cellular model of Huntington's disease." *Neurobiol Dis* **74**: 25-31.
- Miller, J. P., R. S. Lo, A. Ben-Hur, C. Desmarais, I. Stagljar, W. S. Noble and S. Fields (2005). "Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions." *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America **102**(34): 12123-12128.

Mishina, M., K. Ishiwata, K. Ishii, S. Kitamura, Y. Kimura, K. Kawamura, K. Oda, T. Sasaki, O. Sakayori, M. Hamamoto, S. Kobayashi and Y. Katayama (2005). "Function of sigma1 receptors in Parkinson's disease." Acta neurologica Scandinavica **112**(2): 103-107.

Mishina, M., M. Ohyama, K. Ishii, S. Kitamura, Y. Kimura, K.-i. Oda, K. Kawamura, T. Sasaki, S. Kobayashi, Y. Katayama and K. Ishiwata (2008). "Low density of sigma1 receptors in early Alzheimer's disease." Annals of nuclear medicine **22**(3): 151-156.

Mishra, A. K., T. Mavlyutov, D. R. Singh, G. Biener, J. Yang, J. A. Oliver, A. Ruoho and V. Raicu (2015). "The sigma-1 receptors are present in monomeric and oligomeric forms in living cells in the presence and absence of ligands." Biochemical Journal **466**(2): 263-271.

Mitin, N., K. L. Rossman and C. J. Der (2005). "Signaling Interplay in Ras Superfamily Function." Current Biology **15**(14): R563-R574.

Mitrovic, S., H. Ben-Tekaya, E. Koegler, J. Gruenberg and H.-P. Hauri (2008). "The Cargo Receptors Surf4, Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment (ERGIC)-53, and p25 Are Required to Maintain the Architecture of ERGIC and Golgi." Molecular Biology of the Cell **19**(5): 1976-1990.

Mitsuda, T., T. Omi, H. Tanimukai, Y. Sakagami, S. Tagami, M. Okochi, T. Kudo and M. Takeda (2011). "Sigma-1Rs are upregulated via PERK/eIF2 α /ATF4 pathway and execute protective function in ER stress." Biochemical and biophysical research communications **415**(3): 519-525.

Miyinari, Y., K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata and K. Shimotohno (2007). "The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production." Nat Cell Biol **9**(9): 1089-1097.

Mizui, T., S. Yamashina, I. Tanida, Y. Takei, T. Ueno, N. Sakamoto, K. Ikejima, T. Kitamura, N. Enomoto, T. Sakai, E. Kominami and S. Watanabe (2010). "Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy." J Gastroenterol **45**(2): 195-203.

Moebius, F. F., R. J. Reiter, M. Hanner and H. Glossmann (1997). "High affinity of sigma1-binding sites for sterol isomerization inhibitors: evidence for a pharmacological relationship with the yeast sterol C8-C7 isomerase." British journal of pharmacology **121**(1): 1-6.

Molinari, M., V. Calanca, C. Galli, P. Lucca y P. Paganetti (2003). "Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle". Science **299**(5611): 1397-1400.

Moon, J. Y., D. H. Roh, S. Y. Yoon, S. R. Choi, S. G. Kwon, H. S. Choi, S. Y. Kang, H. J. Han, A. J. Beitz, S. B. Oh and J. H. Lee (2014). " σ 1 receptors activate astrocytes via p38 MAPK phosphorylation leading to the development of mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain." British journal of pharmacology **171**(24): 5881-5897.

Moradpour, D., R. Gosert, D. Egger, F. Penin, H. E. Blum and K. Bienz (2003). "Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex." Proceedings of the Tenth International Symposium on Viral Hepatitis **60**(2): 103-109.

Moreau, K., M. Renna and D. C. Rubinsztein (2013). "Connections between SNAREs and autophagy." Trends in Biochemical Sciences **38**(2): 57-63.

Moresco, E. M. Y. and B. Beutler (2010). "LGP2: positive about viral sensing." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**(4): 1261-1262.

Morgan, C., P. D. Lewis, L. Hopkins, S. Burnell, H. Kynaston and S. H. Doak (2015). "Increased expression of ARF GTPases in prostate cancer tissue." SpringerPlus **4**: 342.

Mori, T., T. Hayashi, E. Hayashi and T.-P. Su (2013). "Sigma-1 Receptor Chaperone at the ER-Mitochondrion Interface Mediates the Mitochondrion-ER-Nucleus Signaling for Cellular Survival." PLoS ONE **8**(10): e76941.

Morikawa, K., J. Gouttenoire, C. Hernandez, V. L. Dao Thi, H. T. L. Tran, C. M. Lange, M. T. Dill, M. H. Heim, O. Donzé, F. Penin, M. Quadroni and D. Moradpour (2014). "Quantitative proteomics identifies the membrane-associated peroxidase GPx8 as a cellular substrate of the hepatitis C virus NS3-4A protease." Hepatology **59**(2): 423-433.

Mueller, B. H., Y. Park, H.-Y. Ma, A. Dibas, D. Z. Ellis, A. F. Clark and T. Yorio (2014). "Sigma-1 receptor stimulation protects retinal ganglion cells from ischemia-like insult through the activation of extracellular-signal-regulated kinases 1/2." Experimental eye research **128**: 156-169.

Munoz-Fontela, C., M. Pazos, I. Delgado, W. Murk, S. K. Mungamuri, S. W. Lee, A. García-Sastre, T. M. Moran and S. A. Aaronson (2011). "p53 Serves as a Host Antiviral Factor That Enhances Innate and Adaptive Immune Responses to Influenza A Virus." The Journal of Immunology **187**(12): 6428-6436.

Muppirala, M., V. Gupta and G. Swarup (2011). "Syntaxin 17 cycles between the ER and ERGIC and is required to maintain the architecture of ERGIC and Golgi." Biology of the Cell **103**(7): 333-350.

Murphy, D. J. and J. Vance (1999). "Mechanisms of lipid-body formation." Trends in biochemical sciences **24**(3): 109-115.

Myers, K. R. and J. E. Casanova (2008). "Regulation of actin cytoskeleton dynamics by Arf-family GTPases." Trends in Cell Biology **18**(4): 184-192.

Nakabayashi, H., K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane and J. Sato (1982). "Growth of Human Hepatoma Cell Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium." Cancer Research **42**(9): 3858.

Nakai, W., Y. Kondo, A. Saitoh, T. Naito, K. Nakayama and H. W. Shin (2013). "ARF1 and ARF4 regulate recycling endosomal morphology and retrograde transport from endosomes to the Golgi apparatus." Molecular Biology of the Cell **24**(16): 2570-2581.

Nammalwar, R. C., A. Heil and V. Gerke (2015). "Ezrin interacts with the scaffold protein IQGAP1 and affects its cortical localization." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1853**(9): 2086-2094.

Natsvlshvili, N., N. Gogvadze, E. Zhuravliova and D. Mikeladze (2015). "Sigma-1 receptor di-

rectly interacts with Rac1-GTPase in the brain mitochondria." *BMC Biochem* **16**: 11.

Navone, F., P. Genevini and N. Borgese (2015). "Autophagy and Neurodegeneration: Insights from a Cultured Cell Model of ALS." *Cells* **4**(3): 354-386.

Nejedla, M., S. Sadi, V. Sulimenko, F. N. de Almeida, H. Blom, P. Draber, P. Aspenström and R. Karlsson (2016). "Profilin connects actin assembly with microtubule dynamics." *Molecular Biology of the Cell* **27**(15): 2381-2393.

Neufeldt, C. J., M. A. Joyce, N. Van Buuren, A. Levin, K. Kirkegaard, M. Gale Jr, D. L. J. Tyrrell and R. W. Wozniak (2016). "The Hepatitis C Virus-Induced Membranous Web and Associated Nuclear Transport Machinery Limit Access of Pattern Recognition Receptors to Viral Replication Sites." *PLOS Pathogens* **12**(2): e1005428.

Nguyen, L., B. P. Lucke-Wold, S. A. Mookerjee, J. Z. Cavendish, M. J. Robson, A. L. Scandinaro and R. R. Matsumoto (2015). "Role of sigma-1 receptors in neurodegenerative diseases." *Journal of pharmacological sciences* **127**(1): 17-29.

Nikolic, M., M. M. Chou, W. Lu, B. J. Mayer and L.-H. Tsai (1998). "The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity." *Nature* **395**(6698): 194-198.

Nistal-Villán, E., M. U. Gack, G. Martínez-Delgado, N. P. Maharaj, K.-S. Inn, H. Yang, R. Wang, A. K. Aggarwal, J. U. Jung and A. García-Sastre (2010). "Negative role of RIG-I serine 8 phosphorylation in the regulation of interferon-beta production." *The Journal of biological chemistry* **285**(26): 20252-20261.

Nixon, R. A. (2013). "The role of autophagy in neurodegenerative disease." *Nat Med* **19**(8): 983-997.

Nobre, L., D. Wise, D. Ron and R. Volmer (2015). "Modulation of Innate Immune Signalling by Lipid-Mediated MAVS Transmembrane Domain Oligomerization." *PLoS ONE* **10**(8): e0136883-0136814.

Norman, J. C., D. Jones, S. T. Barry, M. R. Holt, S. Cockcroft and D. R. Critchley (1998). "ARF1 mediates paxillin recruitment to focal adhesions and potentiates Rho-stimulated stress fiber formation in intact and permeabilized Swiss 3T3 fibroblasts." *The Journal of Cell Biology* **143**(7): 1981-1995.

Ogawara, Y., S. Kishishita, T. Obata, Y. Isazawa, T. Suzuki, K. Tanaka, N. Masuyama and Y. Gotoh (2002). "Akt Enhances Mdm2-mediated Ubiquitination and Degradation of p53." *Journal of Biological Chemistry* **277**(24): 21843-21850.

Ohta, K., A. Mizuno, S. Li, M. Itoh, M. Ueda, E. Ohta, Y. Hida, M.-x. Wang, M. Furoi, Y. Tsuzuki, M. Sobajima, Y. Bohmoto, T. Fukushima, M. Kobori, T. Inuzuka and T. Nakagawa (2011). "Endoplasmic reticulum stress enhances γ -secretase activity." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **416**(3-4): 362-366.

Okamoto, M., K. Kurokawa, K. Matsuura-Tokita, C. Saito, R. Hirata and A. Nakano (2012). "High-curvature domains of the ER are important for the organization of ER exit sites in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Cell Science* **125**(14): 3412.

Okamoto, T., Y. Nishimura, T. Ichimura, K. Suzuki, T. Miyamura, T. Suzuki, K. Moriishi and Y. Matsuura (2006). "Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90." The EMBO Journal **25**(20): 5015-5025.

Omi, T., H. Tanimukai, D. Kanayama, Y. Sakagami, S. Tagami, M. Okochi, T. Morihara, M. Sato, K. Yanagida, A. Kitasyoji, H. Hara, K. Imaizumi, T. Maurice, N. Chevallier, S. Marchal, M. Takeda and T. Kudo (2014). "Fluvoxamine alleviates ER stress via induction of Sigma-1 receptor." Cell death & disease **5**(7): e1332.

Ono, Y., H. Tanaka, M. Takata, Y. Nagahara, Y. Noda, K. Tsuruma, M. Shimazawa, I. Hozumi and H. Hara (2014). "SA4503, a sigma-1 receptor agonist, suppresses motor neuron damage in vitro and in vivo amyotrophic lateral sclerosis models." Neuroscience letters **559**: 174-178.

Ono, Y., H. Tanaka, K. Tsuruma, M. Shimazawa and H. Hara (2013). "A sigma-1 receptor antagonist (NE-100) prevents tunicamycin-induced cell death via GRP78 induction in hippocampal cells." Biochemical and biophysical research communications **434**(4): 904-909.

Ortega-Roldan, J. L., F. Ossa and J. R. Schnell (2013). "Characterization of the human sigma-1 receptor chaperone domain structure and binding immunoglobulin protein (BiP) interactions." The Journal of biological chemistry **288**(29): 21448-21457.

Oshiumi, H., M. Miyashita, N. Inoue, M. Okabe, M. Matsumoto and T. Seya (2010). "The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection." Cell Host and Microbe **8**(6): 496-509.

Oshiumi, H., M. Miyashita, M. Matsumoto and T. Seya (2013). "A Distinct Role of Riplet-Mediated K63-Linked Polyubiquitination of the RIG-I Repressor Domain in Human Antiviral Innate Immune Responses." PLoS Pathogens **9**(8): e1003533.

Oshiumi, H., K. Sakai, M. Matsumoto and T. Seya (2010). "DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN-beta-inducing potential." European Journal of Immunology **40**(4): 940-948.

Pabba, M., A. Y. C. Wong, N. Ahlskog, E. Hristova, D. Biscaro, W. Nassrallah, J. K. Ngsee, M. Snyder, J.-C. Beique and R. Bergeron (2014). "NMDA receptors are upregulated and trafficked to the plasma membrane after sigma-1 receptor activation in the rat hippocampus." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **34**(34): 11325-11338.

Palmer, C. P., R. Mahen, E. Schnell, M. B. A. Djamgoz and E. Aydar (2007). "Sigma-1 receptors bind cholesterol and remodel lipid rafts in breast cancer cell lines." Cancer research **67**(23): 11166-11175.

Pankiv, S., E. A. Alemu, A. Brech, J.-A. Bruun, T. Lamark, A. Øvervatn, G. Bjørkøy and T. Johansen (2010). "FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport." The Journal of Cell Biology **188**(2): 253.

Pastor-Cantizano, N., J. C. Montesinos, C. Bernat-Silvestre, M. J. Marcote and F. Aniento (2016). "p24 family proteins: key players in the regulation of trafficking along the secretory pathway." Protoplasma **253**(4): 967-985.

Pawlotsky, J. M. (2014). "New Hepatitis C Therapies: The Toolbox, Strategies, and Challenges."

Gastroenterology **146**(5): 1176-1192.

Pedersen, E. and C. Brakebusch (2001). Rho GTPase Function in Cell Morphogenesis. Chichester, UK, John Wiley & Sons, Ltd.

Pedersen, I. M., G. Cheng, S. Wieland, S. Volinia, C. M. Croce, F. V. Chisari and M. David (2007). "Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism." Nature **449**(7164): 919-922.

Pérez-Berná, A. J., M. J. Rodríguez, F. J. Chichón, M. F. Friesland, A. Sorrentino, J. L. Carrascosa, E. Pereiro and P. Gastaminza (2016). "Structural Changes In Cells Imaged by Soft X-ray Cryo-Tomography During Hepatitis C Virus Infection." ACS Nano **10**(7): 6597-6611.

Pestova, T. V., S. de Breyne, A. V. Pisarev, I. S. Abaeva and C. U. T. Hellen (2008). "eIF2-dependent and eIF2-independent modes of initiation on the CSFV IRES: a common role of domain II." The EMBO Journal **27**(7): 1060-1072.

Peviani, M., E. Salvaneschi, L. Bontempi, A. Petese, A. Manzo, D. Rossi, M. Salmona, S. Collina, P. Bigini and D. Curti (2014). "Neuroprotective effects of the Sigma-1 receptor (S1R) agonist PRE-084, in a mouse model of motor neuron disease not linked to SOD1 mutation." Neurobiology of disease **62**: 218-232.

Pichlmair, A., O. Schulz, C. P. Tan, T. I. Näslund, P. Liljeström, F. Weber and C. Reis e Sousa (2006). "RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates." Science **314**(5801): 997-1001.

Piñeiro, D. and E. Martínez-Salas (2012). "RNA Structural Elements of Hepatitis C Virus Controlling Viral RNA Translation and the Implications for Viral Pathogenesis." Viruses **4**(12): 2233-2250.

Plácido, A. I., C. M. F. Pereira, S. C. Correia, C. Carvalho, C. R. Oliveira and P. I. Moreira (2016). "Phosphatase 2A Inhibition Affects Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Homeostasis Via Cytoskeletal Alterations in Brain Endothelial Cells." Molecular neurobiology.

Ploen, D. and E. Hildt (2015). "Hepatitis C virus comes for dinner: How the hepatitis C virus interferes with autophagy." World J Gastroenterol **21**(28): 8492-8507.

Poenisch, M., P. Metz, H. Blankenburg, A. Ruggieri, J.-Y. Lee, D. Rupp, I. Rebhan, K. Diederich, L. Kaderali, F. S. Domingues, M. Albrecht, V. Lohmann, H. Erfle and R. Bartenschlager (2015). "Identification of HNRNPK as Regulator of Hepatitis C Virus Particle Production." PLoS Pathogens **11**(1): e1004573.

Ponuwei, G. A. (2016). "A glimpse of the ERM proteins." Journal of biomedical science **23**(1): 35.

Popescu, C.-I., L. Riva, O. Vlaicu, R. Farhat, Y. Rouillé and J. Dubuisson (2014). "Hepatitis C Virus Life Cycle and Lipid Metabolism." Biology **3**(4): 892-921.

Popoff, V., J. D. Langer, I. Reckmann, A. Hellwig, R. A. Kahn, B. Brügger and F. T. Wieland (2011). "Several ADP-ribosylation Factor (Arf) Isoforms Support COPI Vesicle Formation." The Journal of biological chemistry **286**(41): 35634-35642.

Posada-Duque, R. A., A. López-Tobón, D. Piedrahita, C. González-Billault and G. P. Cardona-Gomez (2015). "p35 and Rac1 underlie the neuroprotection and cognitive improvement induced by CDK5 silencing." Journal of neurochemistry **134**(2): 354-370.

Posor, Y., M. Eichhorn-Grünig and V. Haucke (2015). "Phosphoinositides in endocytosis." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids **1851**(6): 794-804.

Poston, C. N., E. Duong, Y. Cao and C. R. Bazemore-Walker (2011). "Proteomic analysis of lipid raft-enriched membranes isolated from internal organelles." Biochemical and Biophysical Research Communications **415**(2): 355-360.

Poston, C. N., S. C. Krishnan and C. R. Bazemore-Walker (2013). "In-depth proteomic analysis of mammalian mitochondria-associated membranes (MAM)." Journal of Proteomics **79**: 219-230.

Prasad, P. D., H. W. Li, Y.-J. Fei, M. E. Ganapathy, T. Fujita, L. H. Plumley, T. L. Yang-Feng, F. H. Leibach and V. Ganapathy (1998). "Exon-Intron Structure, Analysis of Promoter Region, and Chromosomal Localization of the Human Type 1 σ Receptor Gene." Journal of Neurochemistry **70**(2): 443-451.

Prause, J., A. Goswami, I. Katona, A. Roos, M. Schnizler, E. Bushuven, A. Dreier, S. Buchkremer, S. Johann, C. Beyer, M. Deschauer, D. Troost and J. Weis (2013). "Altered localization, abnormal modification and loss of function of Sigma receptor-1 in amyotrophic lateral sclerosis." Hum Mol Genet **22**(8): 1581-1600.

Prosser, D. C., D. Tran, P.-Y. Gougeon, C. Verly and J. K. Ngsee (2008). "FFAT rescues VAPA-mediated inhibition of ER-to-Golgi transport and VAPB-mediated ER aggregation." Journal of Cell Science **121**(Pt 18): 3052-3061.

Pulkkinen, V., S. Bruce, J. Rintahaka, U. Hodgson, T. Laitinen, H. Alenius, V. L. Kinnula, M. Mylärniemi, S. Matikainen and J. Kere (2010). "ELMOD2, a candidate gene for idiopathic pulmonary fibrosis, regulates antiviral responses." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **24**(4): 1167-1177.

Qin, S.-Y., N. Kawasaki, D. Hu, H. Tozawa, N. Matsumoto and K. Yamamoto (2012). "Subcellular localization of ERGIC-53 under endoplasmic reticulum stress condition." Glycobiology **22**(12): 1709-1720.

Rahier, A., S. Pierre, G. Riveill and F. Karst (2008). "Identification of essential amino acid residues in a sterol 8,7-isomerase from *Zea mays* reveals functional homology and diversity with the isomerases of animal and fungal origin." Biochemical Journal **414**(2): 247-259.

Rajsbaum, R., R. A. Albrecht, M. K. Wang, N. P. Maharaj, G. A. Versteeg, E. Nistal-Villán, A. García-Sastre and M. U. Gack (2012). "Species-Specific Inhibition of RIG-I Ubiquitination and IFN Induction by the Influenza A Virus NS1 Protein." PLOS Pathogens **8**(11): e1003059.

Ramachandran, S., U. B. Chu, T. A. Mavlyutov, A. Pal, S. Pyne and A. E. Ruoho (2009). "The sigma1 receptor interacts with N-alkyl amines and endogenous sphingolipids." Eur J Pharmacol **609**(1-3): 19-26.

Randall, R. E. and S. Goodbourn (2008). "Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures." Journal of General Virology **89**(1):

1-47.

Raney, K. D., S. D. Sharma, I. M. Moustafa and C. E. Cameron (2010). "Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): a multifunctional antiviral target." The Journal of biological chemistry **285**(30): 22725-22731.

Rashid, T., M. Banerjee and M. Nikolic (2001). "Phosphorylation of Pak1 by the p35/Cdk5 Kinase Affects Neuronal Morphology." Journal of Biological Chemistry **276**(52): 49043-49052.

Rathinam, R. and A. Berrier (2011). "Role of Rho GTPases and their regulators in cancer progression." Frontiers in Bioscience **16**: 2561-2571.

Ray, U. and S. Das (2011). "Interplay between NS3 protease and human La protein regulates translation-replication switch of Hepatitis C virus." Nature Publishing Group **1**: 1.

Raychoudhuri, A., S. Shrivastava, R. Steele, H. Kim, R. Ray and R. B. Ray (2011). "ISG56 and IFITM1 proteins inhibit hepatitis C virus replication." Journal of Virology **85**(24): 12881-12889.

Rehwinkel, J., C. P. Tan, D. Goubau, O. Schulz, A. Pichlmair, K. Bier, N. Robb, F. Vreede, W. Barclay, E. Fodor and C. R. e. Sousa (2010). "RIG-I Detects Viral Genomic RNA during Negative-Strand RNA Virus Infection." Cell **140**(3): 397-408.

Reitz, C. (2015). "The Role of the Retromer Complex in Aging-Related Neurodegeneration: A Molecular and Genomic Review." Molecular genetics and genomics : MGG **290**(2): 413-427.

Reuter, A., A. Ackermann, S. Kothlow, M. Rinder, B. Kaspers and P. Staeheli (2010). "Avian Bornaviruses Escape Recognition by the Innate Immune System." Viruses **2**(4): 927-938.

Rivas, C., S. A. Aaronson and C. Munoz-Fontela (2010). "Dual Role of p53 in Innate Antiviral Immunity." Viruses **2**(1): 298-313.

Rivas-Aravena, A., P. Ramdohr, M. Vallejos, F. Valiente-Echeverría, V. Dormoy-Raclet, F. Rodríguez, K. Pino, C. Holzmann, J. P. Huidobro-Toro, I.-E. Gallouzi and M. López-Lastra (2009). "The Elav-like protein HuR exerts translational control of viral internal ribosome entry sites." Virology **392**(2): 178-185.

Robinson, J. T., H. Thorvaldsdóttir, W. Winckler, M. Guttman, E. S. Lander, G. Getz and J. P. Mesirov (2011). "Integrative Genomics Viewer." Nature biotechnology **29**(1): 24-26.

Romero, G., M. P. Pérez, A. Carceller, X. Monroy, A. J. Farré and X. Guitart (2000). "Changes in phosphoinositide signalling activity and levels of the alpha subunit of G(q/11) protein in rat brain induced by E-5842, a sigma(1) receptor ligand and potential atypical antipsychotic." Neuroscience letters **290**(3): 189-192.

Romero-Brey, I., A. Merz, A. Chiramel, J.-Y. Lee, P. Chlanda, U. Haselman, R. Santarella-Mellwig, A. Habermann, S. Hoppe, S. Kallis, P. Walther, C. Antony, J. Krijnse-Locker and R. Bartenschlager (2012). "Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus Replication." PLoS Pathogens **8**(12): e1003056.

Roohvand, F., P. Maillard, J.-P. Lavergne, S. Boulant, M. Walic, U. Andréo, L. Goueslain, F. Helle,

- A. Mallet, J. McLauchlan and A. Budkowska (2009). "Initiation of Hepatitis C Virus Infection Requires the Dynamic Microtubule Network: ROLE OF THE VIRAL NUCLEOCAPSID PROTEIN." The Journal of biological chemistry **284**(20): 13778-13791.
- Ross-Thriepland, D. and M. Harris (2015). "Hepatitis C virus NS5A: enigmatic but still promiscuous 10 years on!" Journal of General Virology **96**(4): 727-738.
- Ross-Thriepland, D., J. Mankouri and M. Harris (2015). "Serine phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein controls the establishment of replication complexes." Journal of Virology **89**(6): 3123-3135.
- Rossol-Allison, J., L. N. Stemmler, K. I. Swenson-Fields, P. Kelly, P. E. Fields, S. J. McCall, P. J. Casey and T. A. Fields (2009). "RHO GTPASE ACTIVITY MODULATES WNT3A/ β -CATENIN SIGNALING." Cellular Signalling **21**(11): 1559-1568.
- Ruoho, A. E., U. B. Chu, S. Ramachandran, D. Fontanilla, T. Mavlyutov and A. R. Hajipour (2012). "The Ligand Binding Region of the Sigma-1 Receptor: Studies Utilizing Photoaffinity Probes, Sphingosine and N-Alkylamines." Current pharmaceutical design **18**(7): 920-929.
- Ruscher, K. and T. Wieloch (2015). "The involvement of the sigma-1 receptor in neurodegeneration and neurorestoration." Journal of Pharmacological Science **127**(1): 30-35.
- Rusiñol, A. E., Z. Cui, M. H. Chen and J. E. Vance (1994). "A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins." Journal of Biological Chemistry **269**(44): 27494-27502.
- Sadigh-Eteghad, S., M. S. Askari-Nejad, J. Mahmoudi and A. Majdi (2016). "Cargo trafficking in Alzheimer's disease: the possible role of retromer." Neurological Sciences **37**(1): 17-22.
- Saito, K. and T. Katada (2015). "Mechanisms for exporting large-sized cargoes from the endoplasmic reticulum." Cellular and Molecular Life Sciences **72**(19): 3709-3720.
- Saito, T., D. M. Owen, F. Jiang, J. Marcotrigiano and M. Gale (2008). "Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of Hepatitis C virus RNA." Nature **454**(7203): 523-527.
- Sala-Vila, A., I. Navarro-Lérida, M. Sánchez-Alvarez, M. Bosch, C. Calvo, J. A. López, E. Calvo, C. Ferguson, M. Giacomello, A. Serafini, L. Scorrano, J. A. Enriquez, J. Balsinde, R. G. Parton, J. Vázquez, A. Pol and M. A. Del Pozo (2016). "Interplay between hepatic mitochondria-associated membranes, lipid metabolism and caveolin-1 in mice." Scientific Reports **6**: 27351.
- Santiago-Tirado, F. H. and A. Bretscher (2011). "Membrane-trafficking sorting hubs: cooperation between PI4P and small GTPases at the trans-Golgi network." Trends in Cell Biology **21**(9): 515-525.
- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini (2005). "Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex." Science **307**(5712): 1098.
- Sarnow, P. and S. M. Sagan (2016). "Unraveling the Mysterious Interactions Between Hepatitis C Virus RNA and Liver-Specific MicroRNA-122." Annual Review of Virology **3**(1).

- Satoh, T., H. Kato, Y. Kumagai, M. Yoneyama, S. Sato, K. Matsushita, T. Tsujimura, T. Fujita, S. Akira and O. Takeuchi (2010). "LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**(4): 1512-1517.
- Schaafhausen, A., S. Rost, J. Oldenburg and C. R. Müller (2011). "Identification of VKORC1 interaction partners by split-ubiquitin system and coimmunoprecipitation." Thrombosis and Haemostasis **105**(2): 285-294.
- Schlienger, S., S. Campbell, S. Pasquin, L. Gaboury and A. Claing (2016). "ADP-ribosylation factor 1 expression regulates epithelial-mesenchymal transition and predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancer." Oncotarget **7**(13): 15811-15827.
- Schmidt, H. R., S. Zheng, E. Gurpinar, A. Koehl, A. Manglik and A. C. Kruse (2016). "Crystal structure of the human σ 1 receptor." Nature **532**(7600): 527-530.
- Schmidt, M. R., T. Maritzen, V. Kukhtina, V. A. Higman, L. Doglio, N. N. Barak, H. Strauss, H. Oschkinat, C. G. Dotti and V. Haucke (2009). "Regulation of endosomal membrane traffic by a Gadkin/AP-1/kinesin KIF5 complex." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(36): 15344-15349.
- Schneider, C. A., W. S. Rasband and K. W. Eliceiri (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." Nature methods **9**(7): 671-675.
- Schneider, W. M., M. D. Chevillotte and C. M. Rice (2014). "Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses." Annual review of immunology **32**: 513-545.
- Schoggins, J. W., S. J. Wilson, M. Panis, M. Y. Murphy, C. T. Jones, P. Bieniasz and C. M. Rice (2011). "A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response." Nature **472**(7344): 481-485.
- Schröder, M., M. Baran and A. G. Bowie (2008). "Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKK ϵ -mediated IRF activation." The EMBO Journal **27**(15): 2147-2157.
- Schuldiner, M., S. R. Collins, N. J. Thompson, V. Denic, A. Bhamidipati, T. Punna, J. Ihmels, B. Andrews, C. Boone, J. F. Greenblatt, J. S. Weissman and N. J. Krogan (2005). "Exploration of the Function and Organization of the Yeast Early Secretory Pathway through an Epistatic Miniarray Profile." Cell **123**(3): 507-519.
- Schutze, M. P., P. A. Peterson and M. R. Jackson (1994). "An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum." The EMBO Journal **13**(7): 1696-1705.
- Serafino, A., M. B. Valli, F. Andreola, A. Crema, G. Ravagnan, L. Bertolini and G. Carloni (2003). "Suggested role of the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum for crucial sites of hepatitis C virus replication in human lymphoblastoid cells infected in vitro." Journal of Medical Virology **70**(1): 31-41.
- Seth, P., Y.-J. Fei, H. W. Li, W. Huang, F. H. Leibach and V. Ganapathy (1998). "Cloning and Functional Characterization of a σ Receptor from Rat Brain." Journal of Neurochemistry **70**(3): 922-931.

- Seth, P., F. H. Leibach and V. Ganapathy (1997). "Cloning and Structural Analysis of the cDNA and the Gene Encoding the Murine Type 1 Sigma Receptor." Biochemical and Biophysical Research Communications **241**(2): 535-540.
- Shabardina, V., C. Kramer, B. Gerdes, J. Braunger, A. Cordes, J. Schäfer, I. Mey, D. Grill, V. Gerke and C. Steinem (2016). "Mode of Ezrin-Membrane Interaction as a Function of PIP2 Binding and Pseudophosphorylation." Biophysical journal **110**(12): 2710-2719.
- Shanmugam, A., J. Wang, S. Markand, R. L. Perry, A. Tawfik, E. Zorrilla, V. Ganapathy and S. B. Smith (2015). "Sigma receptor 1 activation attenuates release of inflammatory cytokines MIP1 γ , MIP2, MIP3 α , and IL12 (p40/p70) by retinal Müller glial cells." Journal of neurochemistry **132**(5): 546-558.
- Shao, J., W. J. Welch, N. A. DiProspero and M. I. Diamond (2008). "Phosphorylation of Profilin by ROCK1 Regulates Polyglutamine Aggregation." Molecular and Cellular Biology **28**(17): 5196-5208.
- Shi, P., A.-L. Ström, J. Gal and H. Zhu (2010). "Effects of ALS-related SOD1 mutants on dynein- and KIF5-mediated retrograde and anterograde axonal transport." Biochimica et biophysica acta **1802**(9): 707-716.
- Shiffman, M. L. and Y. Benhamou (2014). "Cure of HCV related liver disease." Liver International **35**: 71-77.
- Shimoike, T., S. A. McKenna, D. A. Lindhout and J. D. Puglisi (2009). "Translational insensitivity to potent activation of PKR by HCV IRES RNA." Antiviral Research **83**(3): 228-237.
- Shin, H.-W. and K. Nakayama (2004). "Dual control of membrane targeting by PtdIns(4)P and ARF." Trends in biochemical sciences **29**(10): 513-515.
- Shioda, N., K. Ishikawa, H. Tagashira, T. Ishizuka, H. Yawo and K. Fukunaga (2012). "Expression of a truncated form of the endoplasmic reticulum chaperone protein, sigma1 receptor, promotes mitochondrial energy depletion and apoptosis." J Biol Chem **287**(28): 23318-23331.
- Shrivastava, S., A. Raychoudhuri, R. Steele, R. Ray and R. B. Ray (2011). "Knockdown of autophagy enhances the innate immune response in hepatitis C virus-infected hepatocytes." Hepatology **53**(2): 406-414.
- Skrzycki, M. and H. Czeczot (2013). "Altered expression level of Sigma1 receptor gene in human colorectal cancer." Journal of receptor and signal transduction research **33**(5): 313-318.
- Smith, B. N., C. Vance, E. L. Scotter, C. Troakes, C. H. Wong, S. Topp, S. Maekawa, A. King, J. C. Mitchell, K. Lund, A. Al-Chalabi, N. Ticozzi, V. Silani, P. Sapp, R. H. Brown Jr, J. E. Landers, S. Al-Sarraj and C. E. Shaw (2015). "Novel mutations support a role for Profilin 1 in the pathogenesis of ALS." Neurobiology of Aging **36**(3): 1602.e1617-1602.e1627.
- Smith, J. A. (2014). "A new paradigm: innate immune sensing of viruses via the unfolded protein response." Frontiers in Microbiology **5**: 222.
- Soni, K. G., G. A. Mardones, R. Sougrat, E. Smirnova, C. L. Jackson and J. S. Bonifacino (2009).

- "Coatomer-dependent protein delivery to lipid droplets." Journal of Cell Science **122**(11): 1834.
- Soulat, D., T. Bürckstümmer, S. Westermayer, A. Goncalves, A. Bauch, A. Stefanovic, O. Hantschel, K. L. Bennett, T. Decker and G. Superti-Furga (2008). "The DEAD-box helicase DDX3X is a critical component of the TANK-binding kinase 1-dependent innate immune response." The EMBO Journal **27**(15): 2135-2146.
- Sprangers, J. and C. Rabouille (2015). "SEC16 in COPII coat dynamics at ER exit sites." Biochemical Society Transactions **43**(1): 97.
- Spruce, B. A., L. A. Campbell, N. McTavish, M. A. Cooper, M. V. L. Appleyard, M. O'Neill, J. Howie, J. Samson, S. Watt, K. Murray, D. McLean, N. R. Leslie, S. T. Safrany, M. J. Ferguson, J. A. Peters, A. R. Prescott, G. Box, A. Hayes, B. Nutley, F. Raynaud, C. P. Downes, J. J. Lambert, A. M. Thompson and S. Eccles (2004). "Small molecule antagonists of the sigma-1 receptor cause selective release of the death program in tumor and self-reliant cells and inhibit tumor growth in vitro and in vivo." Cancer research **64**(14): 4875-4886.
- Sridhar, S., B. Patel, D. Aphkhasava, F. Macian, L. Santambrogio, D. Shields and A. M. Cuervo (2012). "The lipid kinase PI4KIIIbeta preserves lysosomal identity." The EMBO Journal **32**(3): 324-339.
- Stankiewicz, T. R. and D. A. Linseman (2014). "Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration." Frontiers in Cellular Neuroscience **8**: 314.
- Steinmann, E., C. Brohm, S. Kallis, R. Bartenschlager and T. Pietschmann (2008). "Efficient trans-Encapsidation of Hepatitis C Virus RNAs into Infectious Virus-Like Particles." Journal of Virology **82**(14): 7034-7046.
- Strahle, L., D. Garcin and D. Kolakofsky (2006). "Sendai virus defective-interfering genomes and the activation of interferon-beta." Virology **351**(1): 101-111.
- Strating, J. R. P. M. and G. J. M. Martens (2009). "The p24 family and selective transport processes at the ER—Golgi interface." Biology of the Cell **101**(9): 495-509.
- Su, T.-P. and T. Hayashi (2003). "Understanding the molecular mechanism of sigma-1 receptors: towards a hypothesis that sigma-1 receptors are intracellular amplifiers for signal transduction." Current Medicinal Chemistry **10**(20): 2073-2080.
- Su, T.-P., T.-C. Su, Y. Nakamura and S.-Y. Tsai (2016). "The Sigma-1 Receptor as a Pluripotent Modulator in Living Systems." Trends in Pharmacological Sciences **37**(4): 262-278.
- Su, T. P. (1982). "Evidence for sigma opioid receptor: binding of [3H]SKF-10047 to etorphine-inaccessible sites in guinea-pig brain." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **223**(2): 284-290.
- Sullivan, C. P., A. G. Jay, E. C. Stack, M. Pakaluk, E. Wadlinger, R. E. Fine, J. M. Wells and P. J. Morin (2011). "Retromer disruption promotes amyloidogenic APP processing." Neurobiology of disease **43**(2): 338-345.
- Sun, B., M. Kawahara, S. Ehata and T. Nagamune (2014). "AAG8 promotes carcinogenesis by

activating STAT3." Cellular Signalling **26**(9): 1863-1869.

Sun, B., M. Kawahara and T. Nagamune (2014). "Modeling tandem AAG8-MEK inhibition in melanoma cells." Cancer medicine **3**(3): 710-718.

Suzuki, T. (2011). "Assembly of hepatitis C virus particles." Microbiology and Immunology **55**(1): 12-18.

Switzer, R. C., C. R. Merrill and S. Shifrin (1979). "A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels." Analytical Biochemistry **98**(1): 231-237.

Szappanos, B., K. Kovacs, B. Szamecz, F. Honti, M. Costanzo, A. Baryshnikova, G. Gelius-Dietrich, M. J. Lercher, M. Jelasity, C. L. Myers, B. J. Andrews, C. Boone, S. G. Oliver, C. Pal and B. Papp (2011). "An integrated approach to characterize genetic interaction networks in yeast metabolism." Nat Genet **43**(7): 656-662.

Szczepanowska, J. (2009). "Involvement of Rac/Cdc42/PAK pathway in cytoskeletal rearrangements." Acta biochimica Polonica **56**(2): 225-234.

Szul, T. and E. Sztul (2011). "COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface." Physiology (Bethesda, Md.) **26**(5): 348-364.

Tagashira, H., Y. Shinoda, N. Shioda and K. Fukunaga (2014). "Methyl pyruvate rescues mitochondrial damage caused by SIGMAR1 mutation related to amyotrophic lateral sclerosis." Biochim Biophys Acta **1840**(12): 3320-3334.

Tai, A. W., Y. Benita, L. F. Peng, S.-S. Kim, N. Sakamoto, R. J. Xavier and R. T. Chung (2009). "A Functional Genomic Screen Identifies Cellular Cofactors of Hepatitis C Virus Replication." Cell Host and Microbe **5**(3): 298-307.

Takaoka, A., S. Hayakawa, H. Yanai, D. Stoiber, H. Negishi, H. Kikuchi, S. Sasaki, K. Imai, T. Shibue, K. Honda and T. Taniguchi (2003). "Integration of interferon- α/β signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence." Nature **424**(6948): 516-523.

Takebayashi, M., T. Hayashi and T.-P. Su (2004). "Sigma-1 receptors potentiate epidermal growth factor signaling towards neuritogenesis in PC12 cells: potential relation to lipid raft reconstitution." Synapse (New York, N.Y.) **53**(2): 90-103.

Takeshita, F., K. Kobiyama, A. Miyawaki, N. Jounai and K. Okuda (2008). "The non-canonical role of Atg family members as suppressors of innate antiviral immune signaling." Autophagy **4**(1): 67-69.

Tal, M. C. and A. Iwasaki (2009). "Autophagic control of RLR signaling." Autophagy **5**(5): 749-750.

Tal, M. C., M. Sasai, H. K. Lee, B. Yordy, G. S. Shadel and A. Iwasaki (2009). "Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(8): 2770-2775.

Tan, D., Y. Cai, J. Wang, J. Zhang, S. Menon, H.-T. Chou, S. Ferro-Novick, K. M. Reinisch and T. Walz (2013). "The EM structure of the TRAPPIII complex leads to the identification of a require-

ment for COPII vesicles on the macroautophagy pathway." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **110**(48): 19432-19437.

Tanaka, Y. and M. Hasegawa (2016). "Profilin 1 mutants form aggregates that induce accumulation of prion-like TDP-43." Prion **10**(4): 283-289.

Tarasov, V., P. Jung, B. Verdoodt, D. Lodygin, A. Epanchintsev, A. Menssen, G. Meister and H. Hermeking (2007). "Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest." Cell Cycle **6**(13): 1586-1593.

Tarasov, K., V. Messier, C. R. Landry, S. Radinovic, M. M. S. Molina, I. Shames, Y. Malitskaya, J. Vogel, H. Bussey and S. W. Michnick (2008). "An in Vivo Map of the Yeast Protein Interactome." Science **320**(5882): 1465.

Tauchi-Sato, K., S. Ozeki, T. Houjou, R. Taguchi and T. Fujimoto (2002). "The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition." Journal of Biological Chemistry **277**(46): 44507-44512.

Tellinghuisen, T. L., K. L. Foss and J. Treadaway (2008). "Regulation of Hepatitis C Virion Production via Phosphorylation of the NS5A Protein." PLoS Pathogens **4**(3): e1000032.

Thakor, N. and M. Holcik (2011). "IRES-mediated translation of cellular messenger RNA operates in eIF2 α - independent manner during stress." Nucleic Acids Research.

The Uniprot Consortium (2008). "The Universal Protein Resource (UniProt)." Nucleic Acids Research **36**(Database issue): D190-D195.

Tooze, S. A. and T. Yoshimori (2010). "The origin of the autophagosomal membrane." Nat Cell Biol **12**(9): 831-835.

Tourette, C., B. Li, R. Bell, S. O'Hare, L. S. Kaltenbach, S. D. Mooney and R. E. Hughes (2014). "A Large Scale Huntingtin Protein Interaction Network Implicates Rho GTPase Signaling Pathways in Huntington Disease." The Journal of Biological Chemistry **289**(10): 6709-6726.

Tsai, S.-Y., T. Hayashi, B. K. Harvey, Y. Wang, W. W. Wu, R.-F. Shen, Y. Zhang, K. G. Becker, B. J. Hoffer and T.-P. Su (2009). "Sigma-1 receptors regulate hippocampal dendritic spine formation via a free radical-sensitive mechanism involving Rac1-GTP pathway." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(52): 22468-22473.

Tsai, S.-Y., T. Hayashi, T. Mori and T.-P. Su (2009). "Sigma-1 receptor chaperones and diseases." Central nervous system agents in medicinal chemistry **9**(3): 184-189.

Tsai, S.-Y. and R. K. Rothman (2012). "Insights into the Sigma-1 receptor chaperone's cellular functions: a microarray report." Synapse (New York, N.Y.) **66**(1): 42-51.

Tsai, S.-Y. A., M. J. Pokrass, N. R. Klauer, N. E. De Credico and T.-P. Su (2014). "Sigma-1 receptor chaperones in neurodegenerative and psychiatric disorders." Expert opinion on therapeutic targets **18**(12): 1461-1476.

Tsai, S. Y., M. J. Pokrass, N. R. Klauer, H. Nohara and T. P. Su (2015). "Sigma-1 receptor regulates Tau phosphorylation and axon extension by shaping p35 turnover via myristic acid." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(21): 6742-6747.

Tuuf, J. and P. Mattjus (2014). "Membranes and mammalian glycolipid transferring proteins." Chemistry and Physics of Lipids **178**: 27-37.

Uchida, N., H. Ujike, Y. Tanaka, A. Sakai, M. Yamamoto, Y. Fujisawa, A. Kanzaki and S. Kuroda (2005). "A variant of the sigma receptor type-1 gene is a protective factor for Alzheimer disease." The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry **13**(12): 1062-1066.

Upadhyay, G., W. Goessling, T. E. North, R. Xavier, L. I. Zon and V. Yajnik (2008). "Molecular association between β -catenin degradation complex and Rac guanine exchange factor DOCK4 is essential for Wnt/ β -catenin signaling." Oncogene **27**(44): 5845-5855.

Urade, T., Y. Yamamoto, X. Zhang, Y. Ku and T. Sakisaka (2014). "Identification and characterization of TMEM33 as a reticulon-binding protein." Kobe J Med Sci **60**(3): E57-65.

Uzri, D. and L. Gehrke (2009). "Nucleotide Sequences and Modifications That Determine RIG-I/ RNA Binding and Signaling Activities." Journal of Virology **83**(9): 4174-4184.

Vaillancourt, F. H., L. Pilote, M. Cartier, J. Lippens, M. Liuzzi, R. C. Bethell, M. G. Cordingley and G. Kukulj (2009). "Identification of a lipid kinase as a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication." Virology **387**(1): 5-10.

Valenza, M., A. DiLeo, L. Steardo, P. Cottone and V. Sabino (2016). "Ethanol-related behaviors in mice lacking the sigma-1 receptor." Behavioural brain research **297**: 196-203.

van Rahden, V. A., K. Brand, J. Najm, J. Heeren, S. R. Pfeffer, T. Bräulke and K. Kutsche (2012). "The 5-phosphatase OCRL mediates retrograde transport of the mannose 6-phosphate receptor by regulating a Rac1-cofilin signalling module." Human molecular genetics **21**(23): 5019-5038.

van Waarde, A., A. A. Rybczynska, N. K. Ramakrishnan, K. Ishiwata, P. H. Elsinga and R. A. J. O. Dierckx (2015). "Potential applications for sigma receptor ligands in cancer diagnosis and therapy." Biochimica et biophysica acta **1848**(10 Pt B): 2703-2714.

van Zuylen, W. J., P. Doyon, J.-F. Clément, K. A. Khan, L. M. D'Ambrosio, F. Dô, M. St-Amant-Verret, T. Wissanji, G. Emery, A.-C. Gingras, S. Meloche and M. J. Servant (2012). "Proteomic Profiling of the TRAF3 Interactome Network Reveals a New Role for the ER-to-Golgi Transport Compartments in Innate Immunity." PLoS Pathogens **8**(7): e1002747.

Vance, J. E. (2014). "MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids **1841**(4): 595-609.

Vasallo, C. and P. Gastaminza (2015). "Cellular stress responses in hepatitis C virus infection: Mastering a two-edged sword." Virus Res **209**: 100-117.

Vidal-Torres, A., B. Fernández-Pastor, A. Carceller, J. M. Vela, M. Merlos and D. Zamanillo (2014).

"Effects of the selective sigma-1 receptor antagonist S1RA on formalin-induced pain behavior and neurotransmitter release in the spinal cord in rats." Journal of neurochemistry **129**(3): 484-494.

Vieyres, G., J. Dubuisson and T. Pietschmann (2014). "Incorporation of Hepatitis C Virus E1 and E2 Glycoproteins: The Keystones on a Peculiar Virion." Viruses **6**(3): 1149-1187.

Vollrath, J. T., A. Sechi, A. Dreser, I. Katona, D. Wiemuth, J. Vervoorts, M. Dohmen, A. Chandrasekar, J. Prause, E. Brauers, C. M. Jesse, J. Weis and A. Goswami (2014). "Loss of function of the ALS protein SigR1 leads to ER pathology associated with defective autophagy and lipid raft disturbances." Cell Death Dis **5**: e1290.

Volpicelli-Daley, L. and P. De Camilli (2007). "Phosphoinositides' link to neurodegeneration." Nat Med **13**(7): 784-786.

Wain, H. M., E. A. Bruford, R. C. Lovering, M. J. Lush, M. W. Wright and S. Povey (2002). "Guidelines for Human Gene Nomenclature." Genomics **79**(4): 464-470.

Wakana, Y., S. Koyama, K.-i. Nakajima, K. Hatsuzawa, M. Nagahama, K. Tani, H.-P. Hauri, P. Melançon and M. Tagaya (2005). "Reticulon 3 is involved in membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi." Biochemical and Biophysical Research Communications **334**(4): 1198-1205.

Wang, B., R. Rouzier, C. T. Albarracin, A. Sahin, P. Wagner, Y. Yang, T. L. Smith, F. M. Bernstam, A. C. Marcelo, G. N. Hortobagyi and L. Pusztai (2004). "Expression of sigma 1 receptor in human breast cancer." Breast cancer research and treatment **87**(3): 205-214.

Wang, H., J. W. Perry, A. S. Lauring, P. Neddermann, R. De Francesco and A. W. Tai (2014). "Oxysterol-binding protein is a phosphatidylinositol 4-kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking." Gastroenterology **146**(5): 1373-1385.e1371-1311.

Wang, H. and A. Tai (2016). "Mechanisms of Cellular Membrane Reorganization to Support Hepatitis C Virus Replication." Viruses **8**(5): 142-113.

Wang, J., A. Saul, P. Roon and S. B. Smith (2016). "Activation of the molecular chaperone, sigma 1 receptor, preserves cone function in a murine model of inherited retinal degeneration." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **113**(26): E3764-3772.

Wang, J., A. Shanmugam, S. Markand, E. Zorrilla, V. Ganapathy and S. B. Smith (2015). "Sigma 1 receptor regulates the oxidative stress response in primary retinal Müller glial cells via NRF2 signaling and system xc(-), the Na(+)-independent glutamate-cystine exchanger." Free Radical Biology and Medicine **86**: 25-36.

Wang, L. and G. (2006). "Silencing of sigma-1 receptor induces cell death in human lens cells." Experimental Cell Research **312**(8): 1439-1446.

Wang, L., J. A. Eldred, P. Sidaway, J. Sanderson, A. J. O. Smith, R. P. Bowater, J. R. Reddan and I. M. Wormstone (2012). "Sigma 1 receptor stimulation protects against oxidative damage through suppression of the ER stress responses in the human lens." Mechanisms of ageing and development **133**(11-12): 665-674.

Wang, P., L. Yang, G. Cheng, G. Yang, Z. Xu, F. You, Q. Sun, R. Lin, E. Fikrig and R. E. Sutton (2013). "UBXN1 interferes with Rig-I-like receptor-mediated antiviral immune response by targeting MAVS." *CELREP* **3**(4): 1057-1070.

Wang, X. J., J. Yu, S. H. Wong, A. S. Cheng, F. K. Chan, S. S. Ng, C. H. Cho, J. J. Sung and W. K. Wu (2013). "A novel crosstalk between two major protein degradation systems: regulation of proteasomal activity by autophagy." *Autophagy* **9**(10): 1500-1508.

Watanabe, S., H. Ilieva, H. Tamada, H. Nomura, O. Komine, F. Endo, S. Jin, P. Mancias, H. Kiyama and K. Yamanaka (2016). "Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in SIGMAR1 and SOD1-linked ALS." *EMBO Molecular Medicine*.

Watanabe, T., S. Wang and K. Kaibuchi (2015). "IQGAPs as Key Regulators of Actin-cytoskeleton Dynamics TI." *Cell Structure and Function* **40**(2): 69-77.

Watson, P., A. K. Townley, P. Koka, K. J. Palmer and D. J. Stephens (2006). "Sec16 Defines Endoplasmic Reticulum Exit Sites and is Required for Secretory Cargo Export in Mammalian Cells." *Traffic* **7**(12): 1678-1687.

Weernink, P. A. O., K. Meletiadis, S. Hommeltenberg, M. Hinz, H. Ishihara, M. Schmidt and K. H. Jakobs (2004). "Activation of Type I Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase Isoforms by the Rho GTPases, RhoA, Rac1, and Cdc42." *Journal of Biological Chemistry* **279**(9): 7840-7849.

Weiss, U. (2005). "Hepatitis C." *Nature* **436**(7053): 929-929.

Wies, E., M. K. Wang, N. P. Maharaj, K. Chen, S. Zhou, R. W. Finberg and M. U. Gack (2013). "Dephosphorylation of the RNA sensors RIG-I and MDA5 by the phosphatase PP1 is essential for innate immune signaling." *Immunity* **38**(3): 437-449.

Wojnacki, J., G. Quassollo, M.-P. Marzolo and A. Cáceres (2014). "Rho GTPases at the crossroad of signaling networks in mammals: Impact of Rho-GTPases on microtubule organization and dynamics." *Small GTPases* **5**: e28430.

Wong, A. Y., E. Hristova, N. Ahlskog, L.-A. Tasse, J. Ngsee, P. Chudalayandi and R. Bergeron (2016). "ABERRANT SUBCELLULAR DYNAMICS OF SIGMA-1 RECEPTOR MUTANTS UNDERLYING NEUROMUSCULAR DISEASES." *Molecular Pharmacology*: mol.116.104018.

Wong, A. Y. C., E. Hristova, N. Ahlskog, L.-A. Tasse, J. K. Ngsee, P. Chudalayandi and R. Bergeron (2016). "Aberrant Subcellular Dynamics of Sigma-1 Receptor Mutants Underlying Neuromuscular Diseases." *Molecular Pharmacology* **90**(3): 238.

Xia, M., P. Gonzalez, C. Li, G. Meng, A. Jiang, H. Wang, Q. Gao, K.-M. Debatin, C. Beltinger and J. Wei (2014). "Mitophagy Enhances Oncolytic Measles Virus Replication by Mitigating DDX58/RIG-I-Like Receptor Signaling." *Journal of Virology* **88**(9): 5152-5164.

Xu, D., W. Yi, Y. Chen, L. Ma, J. Wang and G. Yu (2014). "Overexpression of Sig1R is closely associated with tumor progression and poor outcome in patients with hilar cholangiocarcinoma." *Medical oncology (Northwood, London, England)* **31**(12): 261-267.

Yamamoto, Y., A. Yoshida, N. Miyazaki, K. Iwasaki and T. Sakisaka (2014). "Arl6IP1 has the ability to shape the mammalian ER membrane in a reticulon-like fashion." Biochemical Journal **458**(1): 69-79.

Yamazaki, T., N. Sasaki, M. Nishi and H. Takeshima (2010). "Facilitation of DNA damage-induced apoptosis by endoplasmic reticulum protein mitsugumin23." Biochemical and Biophysical Research Communications **392**(2): 196-200.

Yan, W., J. Wei, X. Deng, Z. Shi, Z. Zhu, D. Shao, B. Li, S. Wang, G. Tong and Z. Ma (2015). "Transcriptional analysis of immune-related gene expression in p53-deficient mice with increased susceptibility to influenza A virus infection." BMC Medical Genomics **8**(1): 1-10.

Yang, Hee W., M.-G. Shin, S. Lee, J.-R. Kim, Wei S. Park, K.-H. Cho, T. Meyer and W. Do Heo (2012). "Cooperative Activation of PI3K by Ras and Rho Family Small GTPases." Molecular Cell **47**(2): 281-290.

Yang, K., H. Shi, R. Qi, S. Sun, Y. Tang, B. Zhang and C. Wang (2006). "Hsp90 regulates activation of interferon regulatory factor 3 and TBK-1 stabilization in Sendai virus-infected cells." Molecular Biology of the Cell **17**(3): 1461-1471.

Yang, Y.-K., H. Qu, D. Gao, W. Di, H.-W. Chen, X. Guo, Z.-H. Zhai and D.-Y. Chen (2011). "ARF-like protein 16 (ARL16) inhibits RIG-I by binding with its C-terminal domain in a GTP-dependent manner." Journal of Biological Chemistry **286**(12): 10568-10580.

Yang, Z., X. Wang, X. Chi, F. Zhao, J. Guo, P. Ma, J. Zhong, J. Niu, X. Pan and G. Long (2016). "Neglected but Important Role of Apolipoprotein E Exchange in Hepatitis C Virus Infection." Journal of Virology **90**(21): 9632-9643.

Yao, L., X. Yan, H. Dong, D. R. Nelson, C. Liu and X. Li (2011). "Expression of an IRF-3 fusion protein and mouse estrogen receptor, inhibits hepatitis C viral replication in RIG-I-deficient Huh 7.5 cells." Virology journal **8**: 445.

Youlyouz-Marfak, I., N. Gachard, C. Le Cloennec, I. Najjar, F. Baran-Marszak, L. Reminieras, E. May, G. W. Bornkamm, R. Fagard and J. Feuillard (2007). "Identification of a novel p53-dependent activation pathway of STAT1 by antitumour genotoxic agents." Cell Death and Differentiation **15**(2): 376-385.

Zayas, M., G. Long, V. Madan and R. Bartenschlager (2016). "Coordination of Hepatitis C Virus Assembly by Distinct Regulatory Regions in Nonstructural Protein 5A." PLoS Pathogens **12**(1): e1005376.

Zhang, A., C. D. Williamson, D. S. Wong, M. D. Bullough, K. J. Brown, Y. Hathout and A. M. Colberg-Poley (2011). "Quantitative Proteomic Analyses of Human Cytomegalovirus-Induced Restructuring of Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Contacts at Late Times of Infection." Molecular & Cellular Proteomics **10**(10).

Zhang, X. (2016). "Direct anti-HCV agents." Acta Pharmaceutica Sinica. B **6**(1): 26-31.

Zhang, Y., Y. Shi, L. Qiao, Y. Sun, W. Ding, H. Zhang, N. Li and D. Chen (2012). "Sigma-1 receptor agonists provide neuroprotection against gp120 via a change in bcl-2 expression in mouse neuronal cultures." Brain research **1431**: 13-22.

Zhao, X., A. Claude, J. Chun, D. J. Shields, J. F. Presley and P. Melançon (2006). "GBF1, a cis-Golgi and VTCs-localized ARF-GEF, is implicated in ER-to-Golgi protein traffic." Journal of Cell Science **119**(Pt 18): 3743-3753.

Zhong, J., P. Gastaminza, G. Cheng, S. Kapadia, T. Kato, D. R. Burton, S. F. Wieland, S. L. Uprichard, T. Wakita and F. V. Chisari (2005). "Robust hepatitis C virus infection in vitro." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(26): 9294-9299.

Zhu, J., C. B. Coyne and S. N. Sarkar (2011). "PKC alpha regulates Sendai virus-mediated interferon induction through HDAC6 and β -catenin." The EMBO Journal **30**(23): 4838-4849.

Zhu, L. X., S. Sharma, B. Gardner, B. Escudro, K. Atianzar, D. P. Tashkin and S. M. Dubinett (2003). "IL-10 mediates sigma 1 receptor-dependent suppression of antitumor immunity." The Journal of Immunology **170**(7): 3585-3591.

11. Anexos

11.1 Fichas

FICHA A: Papel de los fosfoinosítidos en la identidad de de biomembranas y la señalización. Relación con las Arf y Rho GTPasas.

Los fosfoinosítidos (PIs) son fosfolípidos funcionan como marcas moleculares de identidad y reguladores de la señalización gracias a su diversidad y distribución diferencial en membranas, su rápida síntesis a partir de un precursor relativamente abundante, el fosfatidilinositol (PI, del inglés *phosphatidylinositol*), la expedita interconversión entre especies mediante eventos fosforilación y desfosforilación, que garantiza un gran disponibilidad de PIs en dominios con capacidad para reclutar un gran número de distintas proteínas de unión a PIs a una membrana o dominio de membrana (revisado en (Cullen, Cozier *et al.* 2001) y (Matteis and Godi 2004)). La regulación del balance local de especies de PIs depende de la compartimentalización y activación regulada de enzimas y mediadores de la distribución de los PIs (mediadores de transporte vesicular, proteínas citosólicas transferidoras, quinasas, fosfatasas), determinada por el acoplamiento temporal de eventos de mediados por factores con dominios de reconocimiento de PIs (revisado en (Balla 2013)) (Figura A).

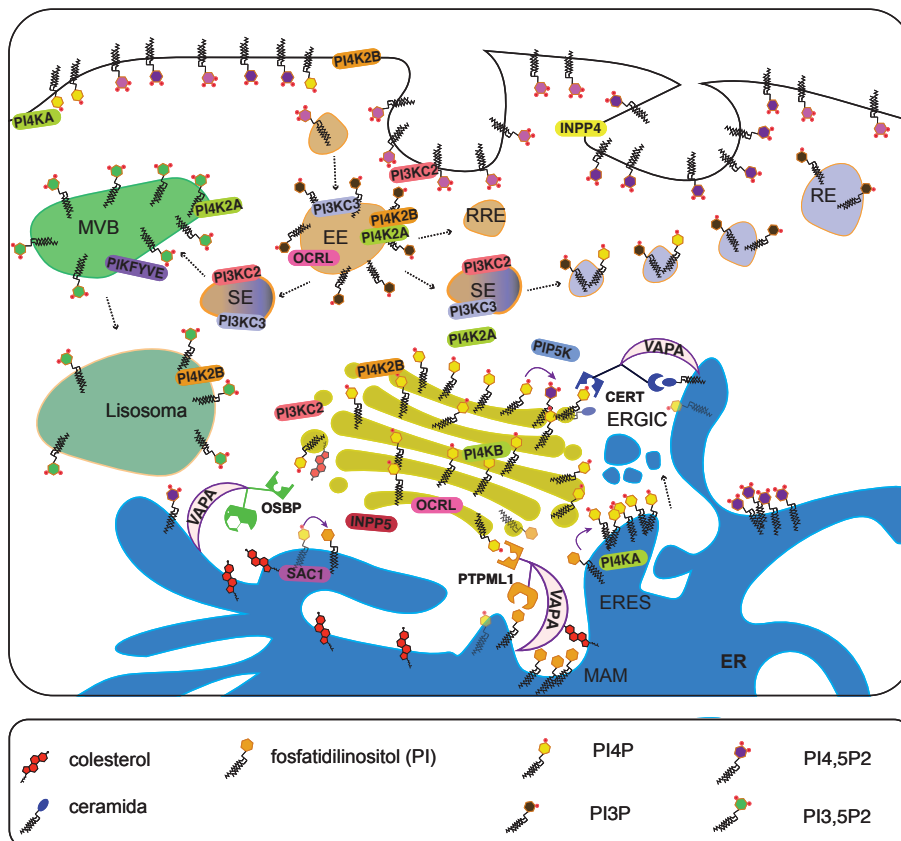


Figura A1: Distribución PIPs y mantenimiento de la localización de PIPs en las membranas celulares.

Así, el fosfatidil-inositol-3-fosfato (PI3P) marca las membranas de endosomas tempranos, donde abunda la fosfatidil-inositol kinasa C3 (PIK3C3), y permite el reclutamiento a endosomas de proteínas con dominios FYVE y PX reguladoras del transporte y distribución endosomal como EEA1, HRS, RBSN, y RUFY1, así como enzimas del metabolismo de PI3P como PIKFYVE que media la biosíntesis de PI3,5P2, requerido para la maduración de la ruta endocítica tardía (revisado en (de Lartigue, Polson *et al.* 2009)). Además PI3P permite el reclutamiento de proteínas SNAREs como SNAP25 y SNXs, que controlan la distribución de cargos (revisado en (Hutagalung and Novick 2011) y (Cullen 2008)) (**Figura B**). Además, la acumulación local de PI3P mediada por el complejo ULK1 y PI3KC3 es el primer paso en la formación de autofagosomas, la formación del omegasoma, donde PI3P permite el reclutamiento de proteínas con dominios FYVE o PX, como la 5-quinasa PIKFYVE y la 5-fosfatasa INNP5E, que controlan los niveles de PI3,5P2 que son requeridos para la maduración de los autofagosomas y la fusión a lisosomas, por ejemplo, mediante el reclutamiento y activación de cortactina (CTTN) (revisado en (Cullen and Carlton 2012)).

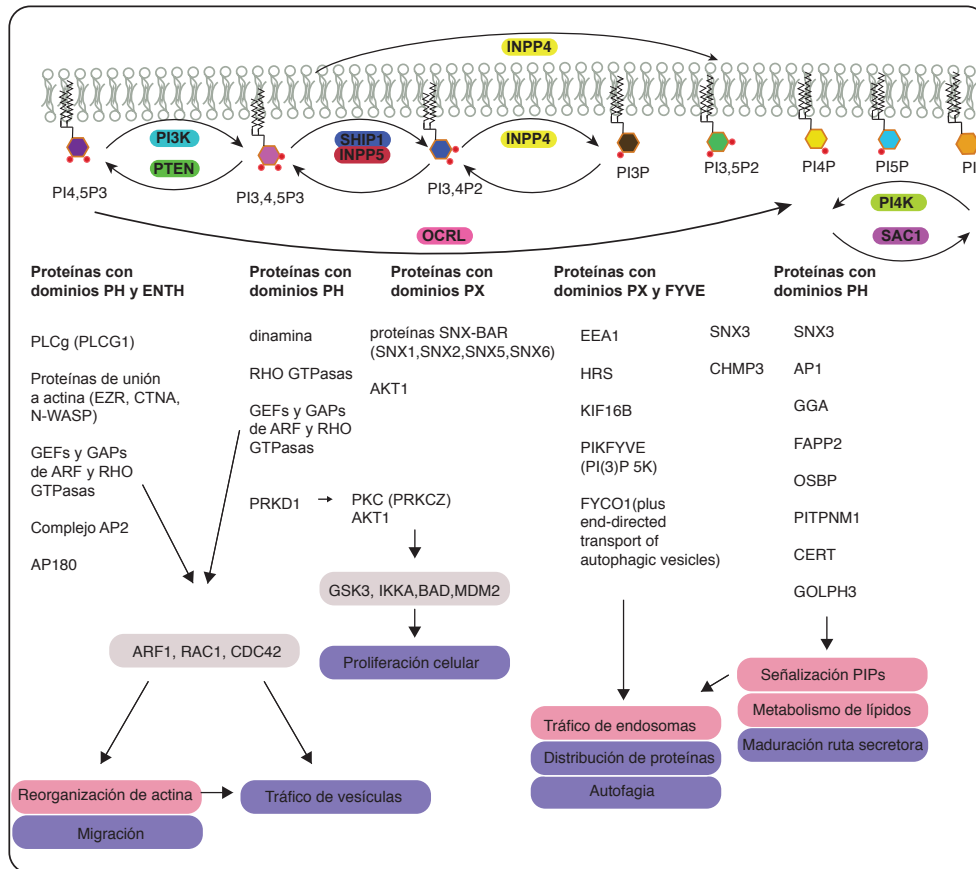


Figura A2: Proteínas efectoras/ procesos regulados por PIs

PI4P identifica las membranas del aparato de Golgi, donde reside la principal PI-4K celular, PI4KB. El reconocimiento de PI4P por las enzimas transferidoras de lípidos (LTPs), con dominios PH (PITPNM1, OSBP, CERT) media la distribución a Golgi

de lípidos sintetizados en el ER (PI/PC, colesterol y ceramida), garantizando el metabolismo de lípidos complejos, las funciones de distribución de Golgi y la maduración de la vía secretora (revisado en (Santiago-Tirado and Bretscher 2011) y (D'Angelo, Vicinanza *et al.* 2012)).

La acumulación local de PI4P (via PI3K4), PI4,5P2, (Moreau, Renna *et al.* 2013) PI3,4P, PI3,5P2 y PI5P regulan biogénesis y maduración de autofagosomas y la reformación de lisosomas (Sridhar, Patel *et al.* 2012), mediante la activación de Rab7, la activación de PLD1, y el reclutamiento de proteínas del sistema de distribución de membranas cargo y proteínas SNARE (revisado en (Cullen and Carlton 2012))(revisado en (Lystad and Simonsen 2016)).

La PI4KA se localiza en regiones minoritarias del ER (**Figura A1**) donde mantiene dominios funcionales espaciales que contribuyen a la formación de sitios de salida de ER (ERES), regulando la exportación desde el ER en condiciones de incremento agudo o crónico de la carga de cargos de ER. En estas regiones PI4P es necesario para el transporte de vesículas COPII de ER a Golgi, mediante su efecto en la curvatura de membrana y el reclutamiento/activación de adaptadores de la formación de vesículas cargo (revisado en (Lorente-Rodríguez and Barlowe 2011) y (Blumental-Perry, Haney *et al.* 2006))(Klinkenberg, Long *et al.* 2014). PI4KA también es un factor requerido en los sitios de formación de los complejos replicación de HCV. El PI4P permite la formación curvatura y el reclutamiento de factores que median la biogénesis de las estructuras de membrana que soportan la replicación viral (revisado en (Bishé, Syed *et al.* 2012)).

Junto a los PIs, las pequeñas GTPasas de las familias Rab y Arf garantizan una regulación espacio-temporal del reconocimiento de las membranas y actividad de los efectores de los PIs (revisado en (Barr 2013) y (Tuuf and Mattjus 2014)). Por ejemplo, el reconocimiento simultáneo de ARF1 y PI4P media el reconocimiento específico en las membranas de Golgi de efectores como las LTPs y PLEKHA8 (revisado en (Tuuf and Mattjus 2014) y (Shin and Nakayama 2004))(**Figura A1**), siendo determinante para la formación y mantenimiento de la estructura de Golgi (revisado en (D'Souza-Schorey and Chavrier 2006)).

Las Rho y Arf GTPasas además, funcionan como efectores y reguladores de los PIs. El PI4,5P2 y PI3,4,5P3 regulan el reclutamiento y actividad local de las Arf y Rho GTPasas mediante el reclutamiento de sus GEFs y GAPs a través de sus sitios de unión a PIs específicos (**Figura A2**). A su vez, las Arf y Rho GTPasas modulan la distribución de PIs mediante la activación de enzimas de la interconversión de PIs como PI4-K, PIP5K, PI 3-K tipo I, miembros de PIPasas como synaptojanins y OCRL y miembros de la familia de la PLC. De esta manera las Arf y Rho GTPasas estimulan la producción y acumulación local de PI(4,5)P2, activando un lazo de retroalimentación positiva en la acumulación local de estos PIs en las membranas (revisado en (Yang, Shin *et al.* 2012) y (Croisé, Estay-Ahumada *et al.* 2014)), y regulando así procesos

que dependen de este PIs, en especial la dinámica de actina (**Ficha B**) y el transporte de vesículas (**Ficha C**). A su vez, PI4,5P2 es el sustrato de la vía de PI3K para dar P3,4,5P3. De esta manera la actividad de las Rho y Arf GTPasas regulan la vía PI3K/AKT y la activación de la quinasa PKC, que dependen de P3,4,5P3 (Boulay, Cotton *et al.* 2008)(revisado en (Yang, Shin *et al.* 2012)) y así, la regulación de programas transcripcionales como los dependientes de GSK3 y NF κ B (**Figura A2**).

FICHA B: Fosfoinosítidos, RHO y ARF GTPasas en la regulación del citoesqueleto

Las Rho GTPasas son reguladores claves de la organización del citoesqueleto de actina (revisado en (Pedersen and Brakebusch 2001)). Las Rho GTPasas reorganizan el citoesqueleto de actina mediante efectores como WASP/WAVE, activador del complejo de nucleación/ramificación de actina ARP2/3, la quinasa PAK que activa las forminas como mDia, y complejos efectores como IQGAPs que dispone los filamentos de actina a sus modificadores (revisado en (Watanabe, Wang *et al.* 2015)). Mediante la acción de forminas como mDia, profilina y cortactina sobre los extremos de microtúbulos y el reclutamiento de proteínas motoras (quinasas), la actividad de las Rho GTPasa regula también el citoesqueleto de microtúbulos Rho GTPasas también regulan la dinámica de microtúbulos (revisado en (Goode and Eck 2007), (Wojnacki, Quassollo *et al.* 2014) y (Nejedla, Sadi *et al.* 2016)).

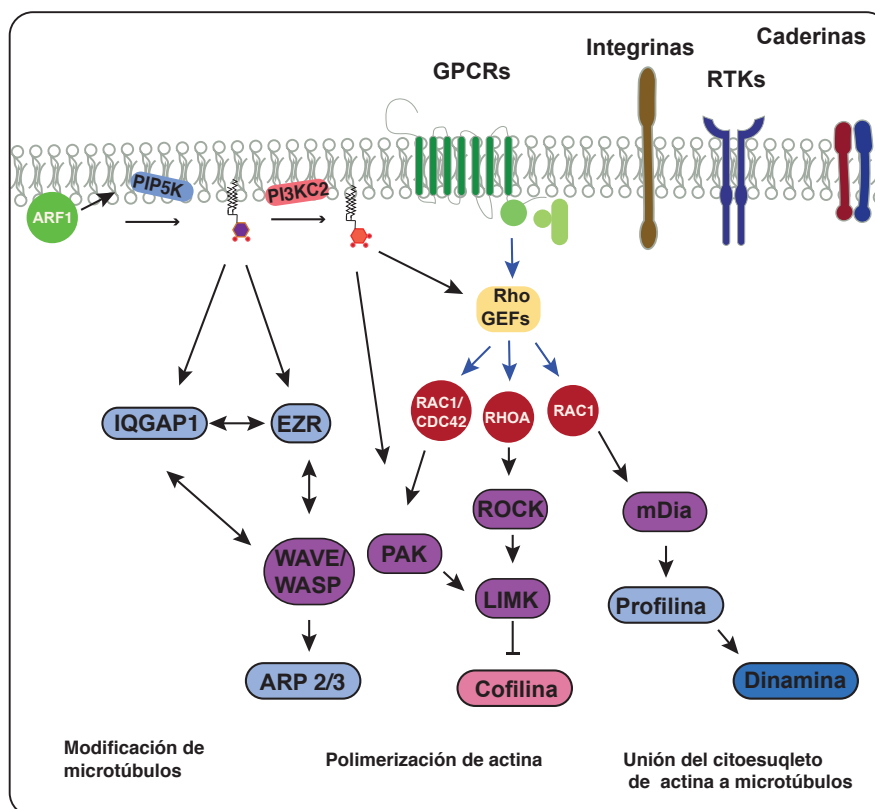


Figura B: Rho y ARF1 remodelación del citoesqueleto.

Los fosfoinosítidos tienen un papel clave en la regulación del citoesqueleto de actina, ya que la acumulación local de PI(4,5)P2 permite el reclutamiento y activación de proteínas reguladoras de actina (WASP/WAVE, ARP2/3, PFN1), y enlazadores de filamentos de actina a la membrana como (EZR, IQGAP, ACTN1, VCL) (Szczepanowska 2009) y reguladores de las Rho GTPasas (factores intercambiadores de nucleótidos

de Guanina como TIAM1, VAV, ARAP1 y DOCK180) (**Ficha A**). La activación de las Rho GTPasas (RHOA, RAC1 y CDC42) pueden regular la localización y actividad de las PIP-5K tipo I (PI4P-5K), potenciando la producción de PI4,5P2 y así el reclutamiento de sus efectores para la remodelación de actina (Weernink, Meletiadis *et al.* 2004).

Las ARF GTPasas activan y cooperan con la función de las Rho GTPasas en la remodelación del citoesqueleto, fundamentalmente mediante sus efectos sobre el microambiente de fosfoinosítidos (Dubois, Paléotti *et al.* 2005, Koronakis, Hume *et al.* 2011) (revisado en (Lee and Dominguez 2010)). ARF1/6 mediante la activación alostérica de PI4K y PI45K potenciando la acumulación local de PI4,5P2, contribuyendo al reclutamiento de efectores y la producción de PI3,4,5P, que funciona como activador de varios GEF de las Rho GTPasas (**Ficha A**). Además, ARF1 potencia la activación (estabilización en membrana mediante prenilación) de la Rho GTPasa RAC1, la asociación de RAC1 con sus GEFs y el acoplamiento de sus efectores, mediante la síntesis local y/o el tráfico de microdominios ricos en colesterol (LR, lipid rafts) (revisado en (Myers and Casanova 2008)).

FICHA C: Fosfoinosítidos y Arf y Rho GTPasas en el transporte endosomal y vesicular, la distribución de proteínas y la vía autofagolisosomal

Los fosfoinosítidos regulan la distribución de cargos endosomales, el transporte vesicular y la autofagia, mediante el metabolismo local de distintos PIs y el reclutamiento de factores con dominios de unión a PIs (Cullen and Carlton 2012, Lystad and Simonsen 2016) (**Ficha A**).

La formación de dominios de membranas cargo, la biogénesis y eventos de fisión y fusión de vesículas mediadas por los diversos tipos de sistemas de recubrimiento de vesículas está regulado por la interconversión de especies de PIs (revisado en (Krauss and Haucke 2007)) acoplada al reconocimiento y modificación por GTPasas de las familias de Rab y Arf (revisado en (Behnia and Munro 2005), (Di Paolo and De Camilli 2006) y (Santiago-Tirado and Bretscher 2011)). De esta manera, la formación, tráfico y maduración de vesículas de transporte en la rutas endocítica, exocítica y degradativa están reguladas por cooperación entre los PIs y las GTPasas (revisado en (Posor, Eichhorn-Grünig *et al.* 2015)).

Además, las Arf y Rho GTPasas son efectores de PIs (Ficha A) y moduladores maestros del transporte vesicular (**Figura C**).

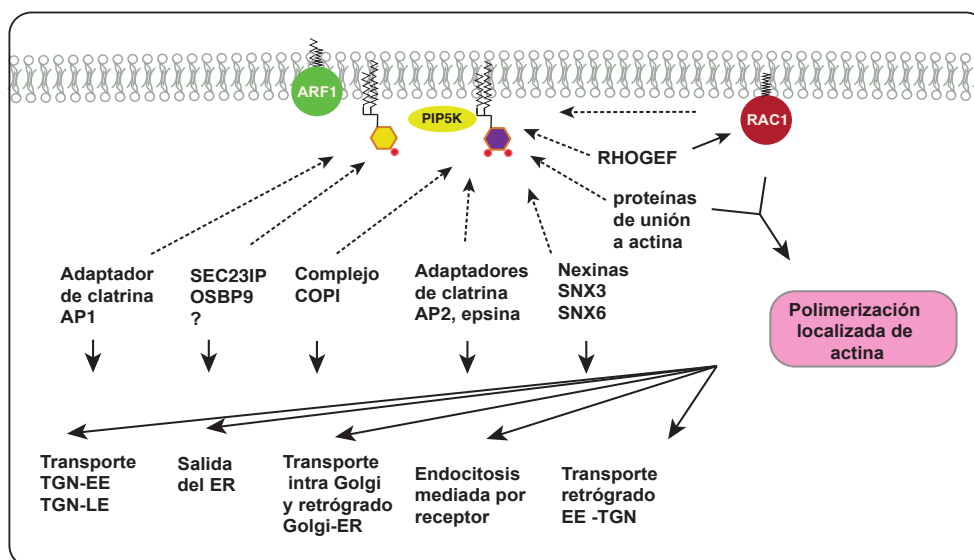


Figura C: Rho y ARF1 remodelación del citoesqueleto

Las ARF GTPasas son reguladores maestros del transporte vesicular. Mediante la regulación alostérica de las PI4K y PI4P-5K afectan la acumulación local de PIPs como PI4P y PI4,5P2, que permiten el reclutamiento de efectores con dominios PH, necesarios para biogénesis de membranas cargo mediante el ensamblaje de com-

plejos de proteínas de recubrimiento en sitios de formación de vesículas, que permiten la concentración de cargos y la deformación de membranas. Entre estos se incluyen los adaptadores de clatrina AP2, que reconocen específicamente P4,5P2 y AP1 y GGA que se unen simultáneamente a ARF1 y PI4P, y median el transporte mediado por clatrina desde Golgi, esencial para la distribución de proteínas a los compartimentos endosomales y lisosomales; los complejos coatámicos COPI (coat protein complex I) que median el transporte retrógrado Golgi-ER, intra-Golgi y el transporte anterógrado desde Golgi (revisado en (Myers and Casanova 2008)); y modulan el transporte anterógrado de ER a Golgi mediado por vesículas COPII (revisado en (Blumental-Perry, Haney *et al.* 2006

)). Estos procesos son facilitados además la activación alostérica por ARF1 y por de PLD1/2, que es reclutada por PI4,5P2 (mediante dominio PH) y produce PA que activa PIP5K, funcionando como un lazo de retroalimentación positiva para la producción local de PI4,5P2, y por las funciones del PA en el transporte vesicular (revisado en (Liu, Su *et al.* 2013)). Por su parte, la generación de vesículas COPII, en adición a su relación estrecha con ARF1 y las vesículas COPI, depende de PI4P para el reconocimiento de mediadores como SEC23IP (Klinkenberg, Long *et al.* 2014). Además, la producción local de PI4,5P2 regulada por ARFs permite la asociación a la membrana de varias proteínas del reguladoras de actina y cooperan con la vía de las Rho GTPasas en remodelación del citoesqueleto de actina (**Ficha A**) facilitando así la nucleación local de actina que facilita la salida de las vesículas (Chi, Wang *et al.* 2013).

FICHA D: El metabolismo de PIs y las Rho y Arf GTPasas en las enfermedades neurodegenerativas

Los PIs y la actividad de las ARF y RHO GTPasas tienen papeles importantes en la función neuronal y su disfunción se ha asociado al desarrollo de varias enfermedades neurodegenerativas. Los procesos regulados por éstas garantizan procesos importantes para la supervivencia y plasticidad neuronal como la autofagia, el reciclaje de receptores y neurotransmisores, el transporte axonal de vesículas y mitocondrias, y la formación del botón sináptico (Cairns, Lee *et al.* 2004, Eira, Silva *et al.* 2016).

La deficiencia en el metabolismo de los PIs se ha asociado con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (END) (Forrest, Chai *et al.* 2013)(revisado en (Volpicelli-Daley and De Camilli 2007)), (McCrea and De Camilli 2009) y (Di Paolo and Kim 2011)), presumiblemente mediante la desregulación de procesos dependientes de la unión a PIs (Blero, Payrastre *et al.* 2007) (**Ficha A**), fundamentalmente la organización del citoesqueleto (Bok, Hryniewicz-Jankowska *et al.* 2009)(**Ficha B**), la estructura de Golgi (Haase and Rabouille 2015) y el transporte vesicular y la distribución intracelular de cargos (Sullivan, Jay *et al.* 2011, Reitz 2015, Sadigh-Eteghad, Askari-Nejad *et al.* 2016) y la autofagia (Jeschke and Haas 2016) (Navone, Genevini *et al.* 2015, Lystad and Simonsen 2016) (**Ficha C**) (**Figura D1**). La disfunción de estos procesos provoca la forma agregados que bloquean el transporte axonal rápido anterógrado de mitocondrias, neurofilamentos, peroxisomas y vesículas de transporte de la proteína amiloide APP (Amyloid beta A4 protein) y afecta también el transporte retrógrado axonal de endosomas (revisado en (Cairns, Lee *et al.* 2004)).

Las Rho GTPasas se han asociado a un papel protector en frente a END que dan lugar a la acumulación de proteínas mal plegadas (revisado en (Marei and Malliri 2016)). De manera significativa, varias de las principales proteínas que se han asociado a ALS, alsina (ALS2) y SOD1, PFN1 y la proteína OCRL asociada a la síndrome de Lowe, son reguladores, o efectores de las Rho GTPasa RAC1/CDC42. ALS2 y OCRL son proteínas intercambiadoras de nucleótidos de Guanina (GEF) para RAC1 y SOD1 regula, mediante su interacción inhibitoria, la actividad GTPasa de RAC1 (revisado en (Stankiewicz and Linseman 2014))(revisado en (Tanaka and Hasegawa 2016)). Más importante, los defectos asociados a las mutaciones inactivantes de SOD1, ALS2 (ALS), OCRL1 (Síndrome de Lowe), y LRRK2 (Enfermedad de Parkinson) y la hiperactivación de CDK5 pueden ser recuperados por la expresión de RAC1 activa (revisado en (Marei and Malliri 2016)) (**Figura D2**). RAC1 a través de sus quinasas efectoras CDK5 y PAK1/2 y la proteína PFN1 (Nikolic, Chou *et al.* 1998, Rashid, Banerjee *et al.* 2001, Arsenault, Dal-Pan *et al.* 2013) regulan la dinámica de microtúbulos (PFN1, Tau, HTT, dinamina) (Bender, Stritt *et al.* 2014, Nejedla, Sadi *et al.* 2016) (**Ficha B**) y el acoplamiento de las proteínas motoras a vesículas cargo (dinactina, SNX) y el transporte vesicular mediado por microtúbulos (Hehnlly and Stamnes 2007, Hirokawa and Noda 2008)(revisado en (Eira, Silva *et al.* 2016)) (Shao, Welch *et al.* 2008) (**Figura D**).

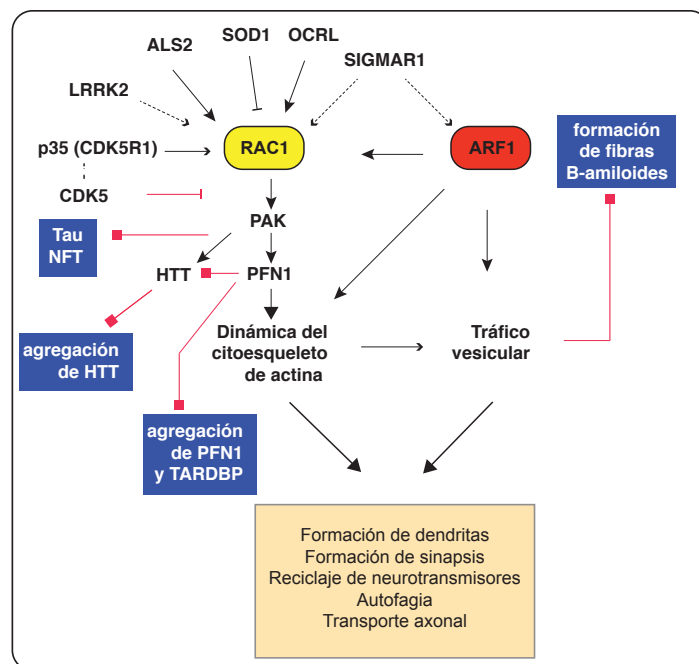


Figura D: Papel protector de la señalización por las Rho y Arf GTPasas frente a la neurodegeneración.

ARF1 se ha relacionado con las END (Lovrecic, Slavkov *et al.* 2010, Haase and Rabouille 2015), mediante su papel en el mantenimiento de la estructura de Golgi y el transporte de vesículas COPI de Golgi a ER (Haase and Rabouille 2015). En esto, las proteínas motoras (kinesinas y dineína) tienen un papel esencial, ya que median el mantenimiento de la estructura y posición de Golgi (transporte ER-Golgi), el transporte anterógrado/retrógrado desde Golgi, el transporte rápido axonal y la división celular, y sus funciones están frecuentemente afectadas tanto en END como ALS (Aridor, Fish *et al.* 2001, Prosser, Tran *et al.* 2008, Shi, Ström *et al.* 2010, Sullivan, Jay *et al.* 2011, Sadigh-Eteghad, Askari-Nejad *et al.* 2016)(revisado en (Li, Shah *et al.* 2016)) (revisado en (Eira, Silva *et al.* 2016)). ARF1 además regula el transporte mediado por microtúbulos puede además ser regulado por mediante el reclutamiento y activación de dinamina (DNM1, Dynamin-related protein DNM1) por PI4,5P2 y mediante la regulación local-temporal del reclutamiento de dineína (Hehnly and Stamnes 2007)). ARF1, además, regula el acoplamiento mediado por dinactina a otros con dominios de distribución de cargos como ERES (vesículas COPII) (Aridor, Fish *et al.* 2001), endosomas marcados con SNX (distribución endosomal, sistema retrómero) {Hunt:2013dm} y regiones marcadas con AP1 (vesículas recubiertas de clatrina de transporte intra-Golgi) (Schmidt, Maritzen *et al.* 2009).

FICHA E: Los fosfoinosítidos, Rho y Arf GTPasas en las vías Wnt/ β -catenina y TP53

ARF1/6 y RAC1 tiene un papel en el control del ciclo celular. Funcionan como como efectores y reguladores de la vía Wnt/ β -catenina (CTNNB1). Durante la estimulación por Wnt, ARF1/6 y RAC1 son activadas (Upadhyay, Goessling *et al.* 2008, Kim, Kim *et al.* 2013) e inducen la disociación de las uniones adherentes y la liberación y estabilización de CTNNB1 activa a citosol mediante modificaciones de la fosforilación de CTNNB1 y la inhibición del complejo de degradación de CTNNB1 por mecanismos dependientes de PI3K y ERK (Grossmann, Yoo *et al.* 2013, Li, Le *et al.* 2016, Schlienger, Campbell *et al.* 2016). Además, funciones la función dependiente de ARF1 y los PIs en el transporte por el sistema retrómero también regula la vía de Wnt/CTNNB1 mediante el reciclaje de su ligando WNT3A (Harterink, Port *et al.* 2011). Por su parte, la actividad de RAC1 regula la vía Wnt/CTNNB1 de mediante la fosforilación de CTNNB1 por las quinasas PAK/Fyn y mediante la actividad de IQGAP1 en la regulación de las uniones adherentes (revisado en (Briggs and Sacks 2003)).

Por otro lado las vías de ARF1 y RAC1 podrían colaborar en la inhibición del arresto y la apoptosis mediante la inhibición de la vía de TP53 (Lassus, Roux *et al.* 2000, Ogawara, Kishishita *et al.* 2002). La acumulación de CTNNB1, a su vez, promueve la degradación del factor de transcripción maestro TP53, liberando el arresto celular (Damalas, Ben-Ze'ev *et al.* 1999).

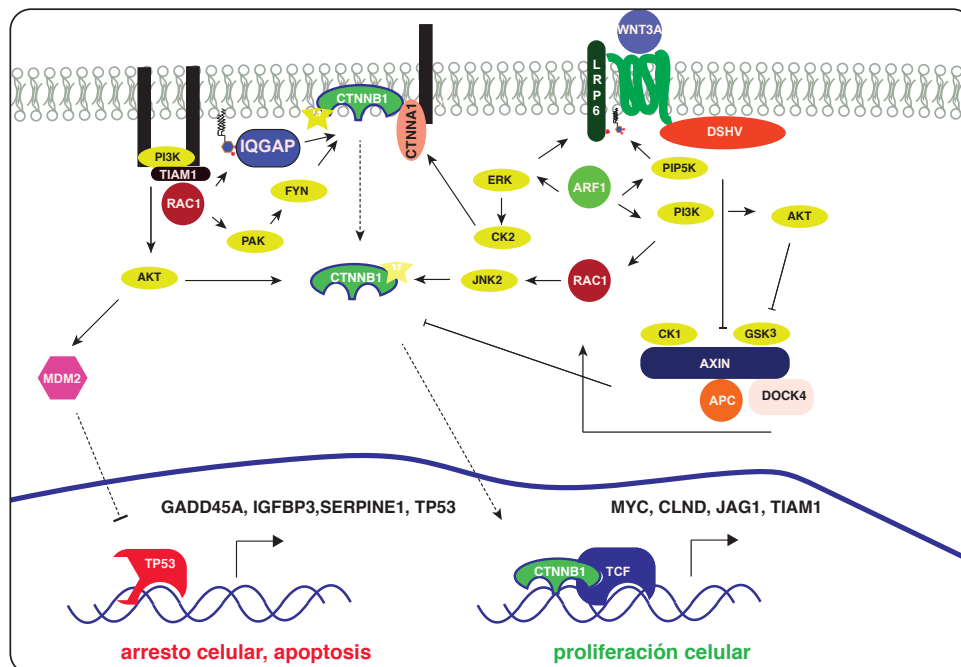


Figura E: Rho y Arf GTPasas modulan la actividad de la vía Wnt/CTNNB1.

11. 2 Tablas

Tabla I: Proteínas reguladas transcripcionalmente

Regulación	#	IDs
sobre-reguladas	93	A2M, ABAT, ACADM, ACTN4, AGT, AIFM1, AKR1C1, ALCAM, ALDH18A1, ANPEP, ANXA5, ARHGAP1, ATL3, CA2, CAT, CDH1, CKAP4, CPM, CPT1A, CRYZ, CTSA, CTSD, CXADR, DHRS7, DPP4, DUSP3, ERP29, FARP1, FDPS, FKBP10, FN1, FNDC3A, FTL, GAPDH, GGCX, GLB1, GNPDA1, GSN, HPGD, HSD17B12, IDH2, IDI1, ITGA6, ITGAV, ITGB1, ITIH2, LASP1, LYPLA2, MAOB, MYH10, MYL6, NAGK, OSTF1, P4HB, PDIA5, PDLIM1, PGM3, PLIN2, PLOD2, PLS3, PRDX4, PRDX5, PROSC, PTPN1, RTN4, SCARB1, SCARB2, SEC22B, SEPT2, SERPINA1, SERPINB6, SLC12A2, SLC25A1, SNX3, SPTAN1, SQSTM1, ST13, STAT1, SUMF2, TAGLN, TST, TWF1, UCHL1, USO1, VAT1, VIL1, VIM, ACTN1, NSF, MYO1B, SERPINH1, ADPGK, HNRNPAB
sub-reguladas	38	AASS, AHNAK, AHSA1, ALDH6A1, APIP, ARF1, BCAT1, CDK1, CORO1C, DNAJC7, ELAVL1, EML4, ENOPH1, FAM213A, GLO1, GPATCH4, H2AFZ, HNMT, HPRT1, HSP90AB1, HSPA13, KIF5B, NCL, PA2G4, PFAS, PFKM, PGAM5, RCC1, S100P, SHMT2, SLC2A1, TKT, TOMM20, TRIM71, TRMT6, TRMT61A, YWHAG, NUP210

Tabla II: Proteínas reguladas post-transcripcionalmente en células Huh-7 deficientes en SIGMAR1

Regulación	#	IDs
sobre-reguladas post-transcripcionalmente	51	ALDH1A1, ANXA2, ANXA3, AP2B1, CALM1*, CAND1, CSRP1, CTNNA1, CTNNB1, EEF1A2, EPHA2, EZR, FLNA, FLNB, G6PD, GDI2, GSS, GSTO1, HSPB1, IVD, KRT18, KRT19, MYH9, NES, PEX1, PFN1, PLAA, PLIN3, PLXNB2, PRDX1, PSMD5, PYGB, PZP, RPL4, RPS6, RPS9, S100A13, TAGLN2, TAX1BP3, TSN, UGGT1, VASP, YWHAH, ZYX, KRT8, RPL6, RPL7A, TPM4*, MYL12B, RPL8, PVRL2
sub-reguladas post-transcripcionalmente	19	ANXA6, ARHGAP5, COL2A1, CPS1, CPVL, DEK, DUSP12, KRT1, KRT10, LARP4, LSM14B, MTPP, OAT, PHGDH, SEC24C, SEC63, ARG1**, FABP1**, IGF2R**

* están, sin embargo, sub-reguladas transcripcionalmente

** están, sin embargo, sobre-reguladas transcripcionalmente

Nota: P4HA1 (probablemente sobre-regulada transcripcionalmente $q=0,05237781$). PITPNM1, SFT2D3 (están casi sub-expresadas $q=0,075$ ($p=0.009549523$); $q=0,072$ ($p=0.008681424$) mientras están sobre-reguladas transcripcionalmente)

Tabla III Categorías GO-Complete de procesos biológicos asociadas a las categorías GO-Slim significativas del ORA comunes en la proteómica y la transcriptómica diferencial (Anotaciones de GO-Complete)

Proceso Biológico GO-Slim	Procesos GO-Complete
1. Organización o Biogénesis de Componentes Celulares	Organización del aparato de Golgi, transporte vesicular en ER, Golgi y post-Golgi, regulación del citoesqueleto de actina, regulación del citoesqueleto de MT, organización de estructuras de actomiosina
2. Localización	Establecimiento de localización de proteínas, localización en membranas, transporte vesicular/ endosomal,
3. Transporte/movimiento componentes celulares	Localización de vesículas, regulación de transporte intracelular, transporte mediado por citoesqueleto
4. Plegamiento de proteínas	Respuesta a proteínas mal plegadas, rama IRE1/XBP1 de la UPR
5. Proteólisis	Vía de degradación de proteínas mediante UPS, actividad proteasa
6. Metabolismo de lípidos	Regulación de homeostasis de lípidos, biosíntesis de esteroides, biosíntesis de fosfolípidos, metabolismo de fosfoinosítidos
7. Ciclo celular	Regulación del paso de G0 a S del ciclo celular, replicación de DNA

Tabla IV: Vías de señalización diferencialmente en las células deficientes en SIGMAR1 (Anotaciones de GO-Complete)

Proceso/Vía celular	ID
Vía de las Rho GTPasas	A2M, ARHGAP1, MYL6, MYH10, ITGB1, MYH9, VASP, PFN1, EZR, NGEF, ARHGEF3, A2M, VAV3, AKAP13, ARHGAP18, OCRL, ARHGAP26, ARHGAP1, SRGAP3, RHOBTB1, RHOB, ARAP1, MYL6, PAK3, MYH14, MYH10, PPP2R5A, DAAM1, ITGB1, TUBA1A, DLC1, RACGAP1, CDC42, SYDE2, CHN1, ARHGAP11A, SRGAP1, FGD3, FGD4, NF2, MYLK, NUP98, PPP2R5D, RANGAP1, AURKB, KIF2C, SEH1L, INCENP, BUB1, TUBB6, SKA2, SKA1, BUB3, TUBB4B, ERCC6L, CENPO, CENPN, SGOL1, NF2, NUF2, CENPF, CASC5, CENPE, CDC20, MAD2L1, BUB1B, NUP107
Vía Wnt/CTNNB1	RIPK4, CTNNB1* , PZD3, PZD5, PZD7, DKK1, CSNK1E, FRAT2, RUVBL1, PRKX, AXIN1, GPRC6A, LPAR3, ROR1, MYCN, CCND1, PAK3

Vía de TP53&TP73	LASP1, CDK1, YWHAG, LASP, PHGDH, FDPS, HSP90AB1, EPHA2, PHDG, G6PD, PRDX1, PRDX5 , TP53, ZMAT3, SESN1, SESN2, SESN3, PTEN, CDK2, GTSE1, CCNB1, CCNE2, CASP3, CCND1, TNFRSF10B, CCNB2, SERPINE1, MDM2, APAF1, THBS1, PERP, IGFBP3, GADD45A, E2F1, E2F2, RPS27L, CX3CL1, PRMT1, PCBP4, NDRG1, COL18A1, TP53BP2, HTT, FOXA1, DDIT4, CASP10, AFP, DKK1, SP1, BTG2, JUN, CTSD, VCAN, TP53INP1, TP53INP2, TP53BP1, TP53BP2, TP53TG1, CCNB1, CDK6, CD4, CCND1, CCNB2, MDM2, CDK4, GTSE1, CDK2, ANKRD1, AXIN1, BANP, BLM, MAPKAPK5, PSME3, PTTG1IP, RFWD3, TP53I11
------------------	---

en **negrita** se señalan las proteínas reguladas transcripcionalmente; en *cursiva* las reguladas post-transcripcionalmente (aparecen en transcriptómica con más de 1000 lecturas por millón y q >0,5); en regular las reguladas a nivel de RNA (sólo detectadas en transcriptómica).

*IGFBP3, THBS1, SERPINE1 están sobre-regulados más de dos veces respecto al control, TP53INP2 más de 1,5 veces, interacciona con VIMP1, y funciona también como un regulador positivo de la autofagia.

Tabla V Categorías de procesos biológicos de proteínas de citoesqueleto reguladas diferencialmente (en proteómica y transcriptómica /GO Complete) en las células deficientes en SIGMAR1

Categoría	IDs
Constituyentes del citoesqueleto	<i>ACTN2,PFN1,EZR,FLNB, KRT8,KRT18,ZYX,TPM4,CRSP1,CTNNA1,KRT1,KRT19,MYH9,NES,</i>
Unión a actina	<i>PFN1,FLNA,ACTN2,FLNB,CTNNA1,TAGLN2, TAGLN, PDLIM1,SPTAN1,PLS3,TWNF1,CORO1C,ACTN1,ACTN4</i>
Proteínas con dominios GSN repeat	GSN, SEC24C, VIL1, CAPG, SEC24A, SEC24D
Regulación de haces de actina	A C T N 4 , AMOT, APOA1, ARAP1, ARHGEF10L, ASAP3, BAG4, BRAF, CDC42, CTGF, DLC1, DMTN, ESPN, FAM101B, LCP1, LPAR1, NEDD9, NF2, PARK2, PAWR, PIK3R1, PPFIA1, PPM1E, PTGER4, RDX, SDC4, SHROOM1, TTC8, VIL1
Organización de estructura de actomiosina	AMOT, ANKRD1, APOA1, ARAP1, ARHGEF10L, ASAP3, BAG4, BRAF, CTGF, DLC1, EDN1, EPB41L4B, F11R, ITGB1, KRT8 , LPAR1, LASP1, MYH10 , MYH14, NF2, OBSL1, PDGFRA, PIK3R1, PPFIA1, PPM1E, PROX1, PTGER4, RACGAP1, SDC4, TMOD1, TTC8, TTN
Movimiento basado en filamentos de actina	A C T N 4 , GJC1, GPD1L, JUP, MYH10 , MYH14, MYL6, MYO5A, MYO6, MYO7A, NEDD4L, NUP155, PDE4B, PKP2, SUN2, TMOD1, TPM2, TPM3, TPM4, TTN, VIL1 , VIM, WIPF3

Regulación del citoesqueleto de microtúbulos	AURKA, AURKB, BRCA1, CCNB1, CCNF, CDC42, CEP131, CHMP3, FES, FKBP4, GAS2L1, HDAC6, KIF11, KNSTRN, NEK2, NPM1, PSRC1, RACGAP1, RANBP1, RGS2, RPS3, SKA1, SKA2, SKA3, STMN3, TPX2, TRIM37, TUBGCP5
Transporte basado en microtúbulos	AP3B1, APP, BLOC1S2, CDC42, CEP131, HTT, ICK, KIF14, KIF1C, KIF4A, KIF5B , KLC2, MAP1B, NME7, RAB6A, SPG11, TTC21A, TUBA1A, TUBB, UCHL1 , VAMP7, WDR43
Señalización de las Rho GTPasas	ABCA1, AGTR1, AKAP13, ALS2CL, APOA1, APOC3, APOE, ARHGAP1 , ARHGEF10L, ARHGEF28, ARHGEF3, ARHGEF39, ARHGEF40, CDH2, CELSR1, DLC1, EPS8L2, FARP1 , FGD3, FGD4, FLOT1, ITGB1 , KANK1, LPAR1, NGEF, PAK3, PLEKHG6, RHOB, SRGAP1, VAV3, <u>VASP</u> , <u>MYH9</u> , <u>PFN1</u> , <u>EZR</u>
Citoesqueleto cortical	ACTN4 , CAP1, CDH1 , CDH2, DLC1, DMTN, EPB41, FLOT1, FLOT2, GSN , HFE, LASP1 , LLGL1, LLGL2, MED28, MYO1A, NF2, NSMF, PCLO, PLEKHH2, RDX, SLC2A1 , SPTAN1 , TMOD1, TPM4 , VCL, WIPF3
Organización de uniones adherentes	SCARB1 , SCARB2 , ITGAV , ITGA6 , ALCAM , ITGB1 , PLOD2 , CDC42, CDH1 , CDH17, CDH2, CDH6, CORO1C , DLC1, DLG5, DMTN, JUP, LAMA5, LIMS1, MLLT4, MMP14, PKP2, PTEN, PTPN23, PTPRJ, PVRL3, RAB8B, RDX, SDC4, THBS1, VCL, <u>PVRL2</u> , <u>CTNNB1</u>

Tabla VI Categorías de proteínas de transporte vesicular reguladas diferencialmente en las células deficientes en SIGMAR1

Categoría	Componentes
Organización de Golgi/ Transporte de vesículas en Golgi	AMN, ANKFY1, AP1G2, APP, ARFGEF2, ATP9A, AREG, ARF1 , ARL1, ATL2, ATL3 , ATP8B1, ATP8B2, C16ORF62, CLTC, COG6,, GCC2, CDC42, CDK1 , CUL7, FTL , F5, F8, GCC2, GOLGA3, GOLGA5, HACE1, HSPA8, HTT, INSIG1, ITM2B, KIF1C, KIFC3, LLGL1, MCFD2, MON2, MYO5A, <u>NSE</u> , OBSL1, OPTN, PKDCC, PRMT5, RAB14, RAB29, RAB31, RAB33B, RAB6A, RAB8A, RAB8B, RER1, RP2, SEC22B , SEC24A, <u>SEC24C</u> , SEC24D, SEC31A, SERPINA1 , SNX2, SNX8, STX17, SPPL2A, TAPBP, UBXN2B, USO1 , VAMP3, VAMP7, VRK1, YIPF5,

Transporte en TGN y endosomas	ABCA1, ANKFY1, ARF1 , ARL1, CD63, CDX2, CHMP3, DENND2A, DENND3, DENND5A, EEA1, EHD1, EVI5, GCC2, HOOK1, HTT, MON2, PTPN23, RAB14, RAB29, RAB6A, RDX, RHOB, RHOBTB3, SNX16, SNX2, SNX3 , SNX8, SQSTM1 , TRAK1, TRIM27, VAMP3, VAMP7, VPS39, WIPI1, CLTC, AP1G2, AP3B1, C3ORF58, NECAP1, SYNJ1, TF, VPS39
Proteínas de localización (<i>sorting</i>)/ <i>organización de vesículas</i>	KDEL1, KDEL3, SNX2, CHMP3, MVB12B, <u>ANNX2</u> , ABCA1, ANK-FY1, BLOC1S2, CADPS, CASC5, EEA1, F5, F8, GPR143, MYO7A, PIK3C2A, SERPINA1 , VAV3, <u>PVRL2</u> , <u>CTNNB1</u> , USO1 , RABAC1, RAB14, RAB29, RAB8A, RAB8B, LLGL2, UBXN2B, SYT11, SNX3 , SNX2, SNX8, SDC4, SDCBP, LLGL1, LLGL2, COPA, COPB2, COPZ1, SEC24A, <u>SEC24C</u> , SEC24D, SEC31A, VAMP3, VAMP7, SEC22B , SNAP25, STX17
Transporte mediado por microtúbulos	DNAH14, DYNC1H1, DNAH5, DNAH6, DYNC1LI2, KIF1C, KIF5B , ACTR1B, ASPM, KIF18B, KIF2C, KNSTRN, MAPRE2, MYO5A, HOOK1

en **negrita** se señalan las proteínas reguladas transcripcionalmente; en *cursiva* las reguladas post-transcripcionalmente (aparecen en transcriptómica con más de 1000 lecturas por millón y q >0,5); en regular las reguladas a nivel de RNA (sólo detectadas en transcriptómica).

Tabla VII Categorías de proteínas de metabolismo de lípidos reguladas diferencialmente en las células deficientes en SIGMAR1

Categoría	
Metabolismo de acilglicérols	ACOT12, ACSF2, ACSL1, ACSL4, APOA1, APOA2, APOB, APOC1, APOC3, APOE, APOH, C3, <u>CAT</u> , <u>CPS1</u> , CPT1A , ELOVL5, ELOVL6, ELOVL7, FABP1 , FASN, GK, GPAM, GPAT3, GPD1L, HACD2, HSD17B12 , INSIG1, INSIG2, LIPC, LPIN1, LPIN2, <u>MTTP</u> , PCSK9, PNPLA3, PPP1CA, PRKACB, SCARB1, SCD, SLC25A1 , SLC37A4, SCARB1 , SREBF1, TBL1XR1
Biosíntesis de fosfolípidos	ABHD3, ALG5, APOA1, APOA2, ARF1 , CDIPT, CPNE7, CRLS1, DOLPP1, DPM2, FADS1, FDPS , FIG4, GPAM, GPAT3, GPD1L, HADHA, HADHB, HEXB, IDI1 , LPCAT3, LPGAT1, LPIN1, LPIN2, MTMR6, MVD, OCRL, PDGFA, PI4K2B, PIGO, PIK3C2A, PIK3C2B, PIK3C2G, PIK3CD, PIK3R1, PLA2G4C, PLD1, PLD3, PNPLA3, PNPLA8, PTEN, PYURF, SERAC1, SERINC1, SPTLC2, SYNJ1
Biosíntesis de esteroides	ACAA2, APOA1, APOB, APOE, C14ORF1, CFTR, CYB5R2, DHCR7, FDPS , HMGCS1, HMGCS2, HSD17B7, IDI1 , INSIG1, INSIG2, LSS, MSMO1, MVD, NPC1L1, PEX2, PRKAA1, SC5D, SREBF1, TM7SF2
Metabolismo de PI y fosfoinosítidos (PIs)	ARF1 , PIP4K2A, PIK3IP1, PIK3R1, PIK3C2A, PIK3C2B, PIK3CD, PIK3C3(hVps34), PI4K2B, OCRL, PIP4K2B, PIK3C2G, CDIPT

Proteínas de unión a fosfatidil inositol (PI)/ proteínas con dominios de unión a Pls : PH (PI4P; PI4,5; PI3,4,5P3) PX, FYVE(PI3P)	ANKFY1, ARAP1, EEA1, EPB41, FES, GAB2, HIP1R, ITPR2, ITPR3, OSBP, OSBP2, PIK3C2A, PIK3C2B, PIK3C2G, PLD1, PLEKHA1, PLEKHA2, PLEKHA8, RACGAP1, SCARB1 , SESTD1, SGK1, SNX13, SNX14, SNX16, SNX2, SNX24, SNX3 , SNX8, TUB, TULP3, TWF1 , VIL1 , <u>PFN1</u> , <u>EZR</u> , WDFY1, WIPI1, ZCCHC, ZFYVE1 PITPNM1*
Proteínas de transporte de lípidos y fosfolípidos	GLTP, PLEKHA8, OSBP, OSBP2, PITPNM1*, FABP1, ABCA1, APOA1, APOA2, APOB, APOC1, APOC3, APOE, ATP10D, ATP8A1, ATP8B1, ATP8B2, ATP9A, SCARB1, TMEM30A, RBP4, SLC22A9, SLCO1B

en **negrita** se señalan las proteínas reguladas transcripcionalmente; *en cursiva* las reguladas post-transcripcionalmente (aparecen en transcriptómica con más de 1000 lecturas por millón y $q > 0,5$); en regular las reguladas a nivel de RNA (sólo detectadas en transcriptómica).

* PITPNM1 está inducida a nivel de RNA pero presenta niveles de proteína casi sub-expresados (0,67 $q=0,075$).

Tabla VIII Genes de respuesta a estrés de ER (UPR) diferencialmente en las células deficientes en SIGMAR1

Tipo de regulación	Componentes - Símbolo del Gen
Localización	(sobre-regulado) SEC62
Plegamiento de proteínas	(sobre-regulados) ERO1A*, ERP29 , P4HB , PDIA3, PDIA5 , PTPN1 , <u>UGGT1</u> , HSPA5, AARS, TMX4, ST13, HSP-90AB1, AHSA1, FKBP10
	(sub-regulados) DNAJB11, FKBP14, HYOU1 (via IRE1)
Exportación a Golgi	(sobre-regulados) SEC31A, KDELR3, YIF1A
Degradación proteolítica	(sobre-regulados) AIFM1 , EDEM1, EDEM2, EDEM3, CASP4, CUL7, PARK2, YOD1, UBE2G2, UBE2J2, DERL1, UBXN4, UFL1
	(sub-regulados) SGTA
Factores de transcripción	(sobre-regulados) JUN, TP53
	(sub-regulados) CREB3L1, NFE2L2 (vía PERK), HDGF (represor transcripcional, vía IRE1)

Otros (UPR)	(sobre-regulados)
	<p>CCND1, PIK3R1 (programa celular)</p> <p>ACADVL (homeostasis de lípidos)</p> <p>APAF1, TNFRSF10B (apoptosis)</p> <p>WIPI1 (autofagia, vía IRE1)</p> <p>EIF2AK3, CXCL8, FLOT1 (vía PERK)</p> <p>FAM129A, GFPT1, TPP1, TSPYL2 (vía IRE1), MBTPS1, THBS1, THBS4 (vía ATF6)</p> <p>TXNDC11</p>
	(sub-regulados)
	<p>LMNA (vía IRE1)</p> <p>SDF2 (ERQC?)</p>

en negrita se señalan las proteínas reguladas transcripcionalmente; *en cursiva* las reguladas post-transcripcionalmente (aparecen en transcriptómica con más de 1000 lecturas por millón y $q > 0,5$); en regular las reguladas a nivel de RNA (sólo detectadas en transcriptómica).

* ERO1 está inducida a nivel de RNA (1,38 $q=0.00000007$), y en proteómica 1,26 $q=0,062$.

Tabla IX Categorías de proteínas de proceso catabólico de proteínas reguladas diferencialmente en las células deficientes en SIGMAR1

Categoría	Componentes - Símbolo del Gen
Sistema autofago-lisosomal	SQSTM1, PIK3C3, PIK3IP1, PIK3R1, PIK3C2A, PIK3C2B, PIK3C2A, PIK3C2B, PIK3CD, PIK3C2G, ATG4A, ATG16L2, STX17, VPS39, SYNJ1, FYCO1, KIF16B
Sistema de degradación ubiquitín-proteosomal (UPS)	UBE2H, ITCH, UBE2G2, UBE2L6, NEDD4, WWP1, UBE2C, UBA2, PSMD8, NAE1, PSMD6, MDM2, HUWE1, UBE2T
Regulación de proceso catabólico proteosomal	ANAPC15, ANKIB1, AURKA, AXIN1, BUB1, BUB1B, BUB3, CCNB1, CDC20, CDC23, CDC27, CDC6, CEBPA, CENPE, CENPF, CLU, CSNK1E, DLGAP5, ESPL1, HFE, HSP90AB1, MAD2L1, MAD2L2, MDM2, NFE2L2, PARK2, PBK, PSME3, PTEN, RNF144A, SGTA, TRIB1, TTK, UBE2C, UFL1, USP11, USP16, USP32, USP40, USP49

Ubiquitinación para UPS	ANKIB1,AXIN1,CCNB1,CDC20,CDC23,CDC27,CDK1,CLU,DZIP3,FBXO45,HACE1,HFE,ITCH,KLHL15,KLHL28,KLHL3,KLHL7,MDM2,NEDD4,NEDD4L,PARK2,PSMB2,PSMB4,PSMD6,PSMD8,PSME3,PTEN,RNF11,RNF144A,RNF146,RNF24,RNF43,UBE2C,UBR4,WWP1
Ubiquitinación K48	HACE1, ITCH, KLHL3, NEDD4L, PARK2, RNF146, RNF152, TNFAIP3, TTC3, UBE2C, UBE2G2, UBE2H, UBE2T
ERAD	UBXN4, EDEM1, EDEM2, EDEM3, UBE2G2, DERL1, PARK2, YOD1, UBE2J2, SDF2

Tabla X: Proteínas relacionadas con el ciclo celular diferencialmente en las células deficientes en SIGMAR1 (Anotaciones de GO)

Proceso biológico	ID
Ciclo celular	ARF1, CDH1, CDK1, YWHAG, YWHAH, SEPT2, MYH10, RCC1, CKAP4, MYO1B, S100P, CALM1 , E2F1, E2F2, ANAPC13, TTK, TGFB1, CCNE2, CDC45, MCM7, BUB1, ORC6, ORC1, CCNA2, ORC2, BUB3, CDC7, CDC6, CDK1, TP53, CDC23, CDC20, CDK6, ESPL1, CDC25C, CDK4, CDK12, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, CDC27, WEE1, SMC3, MCM5, CDK2, CCNB1, MAD2L1, CCNB2, MDM2, BUB1B, MAD2L2, GADD45A, ORC1L, ORC1, TTK, BUB3, AUNIP, SMC3, CCNF, FGF19, CCNA2, KIF18B, SCML2, NAP1L1, CEP152, LIMK2, MYO1A, RCC1, CCND1, E2F8, MAPK4, SAMD11, TUBB, TUBB2C, TUBB4B, SET, CDC20, PPP2R4, XRCC2, TBRG4, MAD2L2, BRIP1, E2F1, E2F2, STK35, CDC23, UBE2C, EXO1, CDK2, TUBB2A, MAPK12, ESPL1, BCCIP, DLC1, DNCL1, DYNLL1, ORC6, PPP1CA, SAMD1, TOP2A, MAD2L1, MYCN, ICK, MCM4, TPX2, DSCC1, CCNB1, PCNT, ADAR, CDCA5, ESCO2, NUF2, EBF3, CDC27, CCNB2, NCAPG, LATS2, TUBB6, ERCC4, MCM7, ORC2, AKAP8, MCM8, CDC2

en **negrita** se señalan las proteínas reguladas transcripcionalmente; en *cursiva* las reguladas post -transcripcionalmente (aparecen en transcriptómica con más de 1000 lecturas por millón y $q > 0,5$); en regular las reguladas a nivel de RNA (sólo detectadas en transcriptómica).

Tabla XI: Proteínas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas encontradas diferencialmente expresadas ($q < 0,05$) en la proteómica diferencial de células deficientes en SIGMAR1 (Base de datos Disgenet).

Enfermedad	Proteínas reguladas por SIGMAR1
AD	A2M, AGT, AHSA1, ANXA5, CA2, CALM1, CAT, CDK1, CPT1A, <u>CTN-NB1*</u> , CTSD, CXADR, EEF1A2, FARP1, FDPS, FN1, GAPDH, GLB1, GLO1, GSN, GSTO1, HPGD, HSPB1, <u>IGF2R</u> , ITGAV, ITGB1, KRT8, MAOB, OSTF1, PDLIM1, PRDX1, PTPN1, PYGB, PZP, RPS6, RTN4, SCARB1, SEC24C, SERPINA1, SLC2A1, SQSTM1, UCHL1, VIM

ALS/ MND	AGT, CAT, ELAVL1, FNDC3A, GAPDH, GSTO1, HPGD, HSPB1, <u>IGF2R*</u> , P4HB, <u>PFN1*</u> , PHGDH, RTN4, SQSTM1, RPS6, VIM, <u>ANXA2*</u>
PD	A2M, ALDH1A1, CAT, CRYZ, CTSD, FARP1, FTL, GSTO1, HNMT, <u>IGF2R*</u> , MAOB, <u>NSF</u> , PRDX5, RPL6, SCARB2, SQSTM1, UCHL1, YWHAH
HD	ABAT, AIFM1, CAT, EEF1A2, FLNA, GAPDH, GLO1, MAOB, SERPINB6, SQSTM1, UCHL1

Excepto las proteínas subrayadas todas están reguladas transcripcionalmente, las q tienen asterisco son consideradas post-transcripcionalmente reguladas (más de 1000 lecturas por millón, q >0,5).

Tabla XII: Genes diana de factores de transcripción regulados diferencialmente en las células deficientes en SIGMAR1

Factor de transcripción (ID)	Genes diana (ID)
Sobre-representados en proteómica y transcriptómica	
SP3	ABCA2, ABCC6, AKR1C1 , ASPH, CDH2, CXCL1, <u>COL2A1</u> , CYP27A1, ENPP2, FCGRT, FN1 , GLTP, <u>G6PD</u> , HSD17B2, IGFBP3, IP6K2, ITGA5, ITGAV , KDM5B, MAOB , PDCD4, PLA2G7, PLD1, PROS1, SERPINE1, SLC47A1, STAT1 , TGFBI, TNIP1, TP53, VIM , ABCG2 , BRCA1 , CCND1 , CDC25C , CXCL5 , DLC1 , E2F1 , EXO1 , HMGA1 , ID4 , MYCN , SLC19A3 , SLC1A3 , SLC23A2 , SP1 , TGFBR2 , TOP2A , TXNRD1
SREBF2	ABCA1, CXCL8, FDPS , HSD17B7, LRP1, PCSK9, PON1, SCARB1 , TM7SF2, UCP2, <u>MTTP*</u>
JUN	ABCC3, APOA2, APP, CXCL8, CYBA, ENPP2, FN1 , <u>GSS</u> , HPGD , ITGA5 , JUN, LOX, NR0B2, NTS, PARK2, SERPINE1, SOD2, TP53, VCAN, VIM , APOM , BRCA1 , CCND1 , CDX2 , CTGF , EDN1 , MT2A , PEA15 , PES1 , SLC3A2 , <u>SULT2A1</u>
TP53	APAF1, APOB, APP, AREG, EPHA2, CX3CL1, FDPS , GADD45A, G6PD , IGFBP3, LASP1 , LRP1, NDRG1, PPARGC1A, PTEN, RPS27L, SESN1, TNFRSF10B, TP53, TP53INP1, <u>PRDX1</u> , PRDX5 , BANP , CDC20 , DKK1 , DUSP14 , DUSP4 , HRAS , HSP90AB1 , MDM2 , MFN2 , NEK2 , <u>PHGDH</u> , <u>SUB1</u> , TRPC6 , YWHAH
USF1	APOC3, APOE, APP, ASPH, CEACAM1, CEBPA, CTSD , DPP4 , IGF2R, PLA2G4C, SERPINE1, TNFAIP3, CCNB1 , CCND1 , CDK1 , ID4 , ISG20 , SLC1A3 , SLC23A2
NFYB	<u>ALDH1A1</u> , <u>TAX1BP3</u> , ALB, EPHX1, HMGCS1, PGM3 , PNRC1, PTPN6, RWDD2A, THBS1, CDC25C , CDK1 , MDC1 , TGFBR2 , TOP2A , <u>PHGDH</u>
PPARA	ACADM , AGT , CPT1A , FABP1* , PLIN2 , SULT2A1
Sobre-representados sólo en transcriptómica	

HIF1A	AGT, ATP1B1, CDH1, CEBPA, CLU, CXCL8, EGLN1, GPX8, ITGB1, KITLG, LPIN1, LRP1, NAMPT, NDRG1, NEDD9, PFKFB3, PGF, PGK1, PPP1R3C, PROX1, SERPINE1, SLC16A3, SREBF1, TF, TFRC, VLDLR, WSB1, <i>AURKA, EDN1, EIF3I</i>
SREBF1	CASP2, FASN, FDPS , FEM1B, HK2, HSD17B7, KCNJ3, LPIN1, LRP1, NR0B2, PCSK9, PNPLA3, SLC25A1, SREBF1
RELA	ALCAM, B2M, CX3CL1, CXCL1, CXCL10, CXCL8, CYBA, FN1 , GADD45A, HLA-A, LOX, MGMT, NAMPT, OPTN, PLA2G4C, PLD1, PTEN, PTPN6, SDC4, SERPINE1, SOX9, TNFAIP3, TNFRSF10B, TNFSF10, TNIP1, TP53, WNT5A, <i>ADAMTS9, CCND1, CDK2, CDX2, CTGF, ELAVL1, SLC1A3, SP1</i>
TFAP2A	ABCA1, ADM, APOB, APOE, APP, C3, CDH1, CEACAM1, CEBPA, CGA, ERBB2, FMR1, HTT, JUN, PTEN, SLC12A4, SOD2, VCAN, <i>CCNB1, FOXA1, FXR2, MT2A, ODC1</i>
HNF1A	AFP, AGT, ALB, AMBP, APOA2, APOB, F8, NPC1L1, SERPINA1, SERPING1, SLC22A9, SLCO1B1, <i>APOH, CDH17, CFTR, SI, SLC22A10</i>
HNF4A	AGT, AGTR1, AMBP, APOA1, APOB, APOC3, CD63, CEACAM1, CYP27A1, F10, F11, GK, HSD17B7, LIPC, MST1, PPARA, SERPINA1, TF, <i>APOM, CDX2</i>
NFYA	EPHX1, FDPS, GADD45A, LPIN1, PNRC1, PROS1, RHOB, SERPINE1, <i>CCNA2, CCNB1, CDC25C, CDK1, E2F1, ODC1, SLC23A2, TGFB2</i>
XBP1s	ACADVL, CUL7, EDEM1, GFPT1, KDELR3, PDIA5, SEC31A, SEC62, TPP1, TSPYL2, WIPI1, YIF1A, PTPN1, GFPT1, <i>DNAJB11, FKBP14, LMNA, HYOU1, HDGF</i>
SMAD3	ANKRD1, ATP1B1, CCL20, JUN, LPAR1, PLOD2 , RHOB, SERPINE1, TAGLN
AP-1 (ATF2-JUN)	ADM, APOE, CXCL8, DPYD, GBA, HPGD, ITGA5, JUN, MMP11, NTS, PDGFA, RBP4, SERPINE1, TGFB1, TIMP1, TP53
NR2F1 (NRF2)	AGT, APOA1, APOA2, APOB, APOC3, LIPC, TF
NFκB	ABCC6, APP, CCL20, CXCL1, CXCL10, CXCL8, F8, TNFAIP3, TP53, <i>CCND1, MYLK, NOLC1, SLC3A2</i>
STAT3	STAT3, ADM, AGT, CD46, GLIPR1, PGK1, PROS1, SERPINA1, <i>CCND1, CTGF, IL6ST, ROR1</i>
E2F1	APAF1, THBS1, <i>AURKA, AURKB, BRCA1, CCNB1, CCND1, CDC6, CDK2, DSCC1, DUSP4, HMGA1, KIF23, MYCN, PA2G4, POLE2, RACGAP1, RBM38, SP1</i>
E2F4	TP53, <i>AURKB, BRCA1, CCNB1, CDC6, CDK1, LPAR1, POLE2</i>
CREB1	AREG, ASAH1, CDH1, CGA, CXCL8, ENPP2, FN1, GC-H1, LAPTM4B, NTS, PGF, PPARGC1A, PTGER4, SERPINE1, SOD2, SOX9, <i>BRCA1, CCNA2, CCND1, CD55, CFTR, EXO1, FOXA1, NOLC1, PBK, S100P, SLC39A1</i>
MYC	CXCL8, ERBB2, SERPINI1, TNFRSF10B, <i>BRCA1, CCND1, CDK4, MCM7, NOP16, ODC1, PROM1</i>

FOXA1	AMBP, APOA1, APOB, CDH1, EPHX1, TF, UCP2, <i>CDC6</i>
SP1	<i>ARF1, IFNB1, ISG56, IRF9</i>
CTNNB1	<i>MYCN, JAG1, CCND1</i>

en **negrita** se señalan las proteínas reguladas transcripcionalmente; en regular las reguladas a nivel de RNA (sólo detectadas en transcriptómica); *en cursiva* se representan las sub-reguladas o reprimidas, en cada caso.

Tabla XIII: Componentes específicos de los purificados de SIGMAR1-TAP clasificados de acuerdo a sus funciones moleculares

Clasificación MF	ID
Canales de membrana	TMEM109, SLC19A2, SLC22A9, SLC39A14, ATP1A1, SLC2A2, ATP2A2
Chaperonas	HSPA8, CANX, HSPA5, DNAJC22, LMF2
Translocon/OST	SRPRB, TRAM1, SSR3, RPN2, SEC61A1, RPN1, RFT1, DDOST, STT3A, ALG3
Citoesqueleto	TUBB, TUBB4B
Metabolismo de lípidos	PIGU, CHPT1, ORMDL2, HACD3, CERS2, FADS2, HMGCR, CDS1, FADS1, PLSCR1, DHCR7, SCD, DHCR24, AGPAT2, GPAT4, CDS2
Transporte de vesículas	GOLT1B, REEP6, YIPF4, CD63, YIPF5, TMEM41B, RER1, REEP4, ARL6IP1, SNX14, KDELR1, CHP1, ZFYVE27, SURF4, SNX13, SNX14, TMEM33

