



Papel de la lectina C del Virus de la Peste Porcina
Africana en la evasión de la respuesta celular:
inhibición de apoptosis y modulación del complejo
mayor de histocompatibilidad

Carolina Hurtado Marcos

Departamento de Biología Molecular

Septiembre de 2007

Director de la Tesis Doctoral

Dr. Ángel López Carrascosa

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología Molecular

PAPEL DE LA LECTINA C DEL VIRUS DE LA PESTE
PORCINA AFRICANA EN LA EVASIÓN DE LA RESPUESTA
CELULAR: INHIBICIÓN DE APOPTOSIS Y MODULACIÓN
DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Memoria presentada por Carolina Hurtado Marcos
para optar al Grado de Doctor en Ciencias por la
Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 2007

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” bajo la dirección del Dr. Ángel López Carrascosa

Aquí va la cita
Pepito Pérez

dedicatoria

Agradecimientos

Abreviaturas

ActD: Actinomicina D

ADN: Ácido Desoxiribonucleico

ADNc: copia en ADN de un molde ARN

aprox: aproximadamente

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

BCA: Ácido bicinchonínico

Biol Actv.: Actividad Biológica

Campto: Camptotecina

cel: célula

cpm: cuentas por millón

C-terminal: Carbono terminal

CTLs: Linfocitos T Citotóxicos

DE: Desviación Estandar

DMEM: Medio de Eagle Modificado por Dulbecco

dNTPs: Nucleótidos trifosfato

EBV: Virus Epstein-Barr

EP: EP153R

GFP: Green Fluorescence Protein (Proteína Verde Fluorescente)

HEPES: Ácido N-2-hidroxietil piperacina-N-2-etanosulfónico

HMCV: Citomegalovirus Humano

hpi: horas post-infección

Ig: Inmunoglobulina

I κ B: Proteína inhibidora de NF κ B

IKK: Quinasa de I κ B

IL-2: Interleuquina 2

Ion: Ionóforo de calcio

IP: Ioduro de Propidio

mdi: multiplicidad de infección

MHC-I: Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I

Mitoc: Mitocondrias

NF κ B: Factor nuclear κ B

N-terminal: Amino terminal

NK: Células Natural Killer

pb: pares de bases

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

PC: pcDNA

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

PCNA: Antígeno Nuclear de Proliferación Celular

PKR: Proteína Kinasa R

PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato

RE: Retículo Endoplásmico

RLU: Unidad relativa de luminiscencia

rpm: revoluciones por minuto

RTPCR: Transcripción reversa-reacción en cadena de polimerasa

SC: Suero de Cerdo

SDS: Dodecilsulfato sódico

SF: Suero Fetal de Ternera

SH: Suero Humano

SLA-I: Complejo Mayor de Histocompatibilidad porcino de clase I

ST: Suero de Ternera recién nacida

Stauuro: Estaurosporina

TAP: Transportador asociado al procesamiento de antígeno

TBS: Solución salina tamponada con Trizma base

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

u.a.: unidades arbitrarias

Ub: Ubiquitinado

ufp: unidades formadoras de placa

UV: Ultravioleta

V: Virus BA71V

VPPA: Virus de la Peste Porcina Africana

VV: Virus Vaccinia

Δ: Virus ΔEP153R

Summary

The EP153R gene of African Swine Fever Virus (ASFV) encodes a protein that has a transmembrane region and a C-type lectin-like domain, it is expressed both at early and late times in the infection, and it is involved in the hemadsorption process characteristic of the ASFV infection. This virus also induces apoptosis in several virus-sensitive cells. In all of them the infection with a deletion mutant virus lacking the EP153R gene produced an increase in activated caspase-3, as compared to the level induced with the parental BA71V virus (detected either by the determination of biological activity, the proteolysis of the pp32 precursor to p17, or by the analysis of cell cycle by flow cytometry). These data proved that the EP153R gene has an important role in the inhibition of the apoptosis induced by ASFV infection. Moreover, the effect of EP153R expression out of context of the viral infection was studied in cell lines transfected with the EP153R gene in transient or stable expression. We observed a partial protection of the transfected lines from the apoptosis induced in response to virus infection or external stimuli, confirming the antiapoptotic properties of the viral gene also in heterologous expression.

To get further insights into the mechanism of apoptosis inhibition, we studied different steps in the apoptosis cascade, in cells infected with either the parental virus or the deletion mutant. The most important observation was that the p53 transcriptional activity, induced in cell cultures by staurosporine treatment or viral infection, was reduced by the presence of EP153R, apparently by interfering with the binding of p53 to the cellular DNA.

On the other hand, the homology of pEP153R to C-type lectins, its location in the endoplasmic reticulum (the protein pEP153R co-localized with ER markers in Vero cells transfected with the EGFP-labelled EP153R), and the prediction that its three-dimensional structure is similar to NK cell receptors, suggested a possible interaction between the ASFV lectin and MHC-I molecules. The experimental data obtained in different animal models (porcine, murine and human) demonstrated a reduction of MHC-I expression associated to the presence of EP153R both in ASFV infection and in cells transfected with the viral gene.

In conclusion, the ASFV lectin EP153R is, to our knowledge, the first viral C-type lectin with anti-apoptotic properties, which affects the p53 transcriptional activity, and with a role in the modulation of MHC-I expression.

Índice general

Agradecimientos	I
Abreviaturas	III
Summary	VII
1. Introducción	7
1.1. Interacción virus-huésped	7
1.1.1. Alteración del ciclo celular y regulación de la apoptosis	8
1.1.2. Modulación de la función de MHC (Complejo mayor de histocompatibilidad)	13
1.2. El virus de la peste porcina africana	17
1.2.1. EP153R y otras lectinas tipo C	21
2. Objetivos	23
3. Materiales y métodos	25
3.1. Células y virus	25
3.2. Transfección	26
3.3. Aislamiento de ARN y RTPCR	27
3.4. Western Blotting	27
3.5. Análisis de apoptosis	28
3.5.1. Detección del fragmento de 17 kDa de Caspasa-3	28
3.5.2. Actividad biológica de caspasas	28
3.5.3. Citometría de Flujo	28
3.6. Expresión de antígenos en la membrana celular	29
3.7. Actividad transactivante	29
3.8. Ensayo de unión a ADN	30
3.9. Actividad transcripcional	30

3.10. Inmunoprecipitación y marcaje radiactivo	31
3.11. Inmunofluorescencia	31
3.12. Clonaje y manipulación de ácidos nucleídos	32
3.12.1. Clonaje pcDNA 3.1 Myc/ His EP153R	32
3.12.2. Clonaje pEGFP-C2 EP153R	32
3.12.3. Clonaje pcDNA B (Myc/His)- Lectin C	32
3.13. Modelización bioinformática	35
3.14. Ensayo de citotoxicidad	36
3.15. Anexo de materiales y métodos	37
4. Resultados	39
4.1. Expresión de gen EP153R	39
4.1.1. El gen EP153R se expresa a tiempos tempranos en el ciclo de infección viral	39
4.1.2. El gen EP153R se transcribe en numerosos aislados de campo del VPPA	40
4.1.3. Inactivación del gen EP153R	40
4.2. El gen EP153R en el proceso apoptótico	41
4.2.1. Papel de EP153R en el ciclo de infección viral	41
4.2.2. Papel de EP153R en expresión heteróloga	47
4.2.3. Efecto del gen EP153R en la actividad de p53	50
4.2.4. Efecto de EP153R en otros componentes implicados en la cascada apoptótica	58
4.3. Modelización y localización de EP153R	60
4.3.1. Alineamiento de la secuencia de EP153R con moléculas CD69 de diverso origen	60
4.3.2. Modelo estructural de EP153R y de su interacción con MHC-I	62
4.3.3. La proteína EP153R se localiza en el RE	65
4.4. Efecto del gen EP153R en la expresión de MHC-I	67
4.4.1. El gen EP153R inhibe la síntesis de antígenos de histocompatibilidad de clase I porcinos (SLA-I)	67
4.4.2. El gen EP153R inhibe la expresión de moléculas murinas de MHC-I en la membrana plasmática	68
4.4.3. El dominio de lectina C es la región de EP153R implicada en la inhibición de la expresión de MHC-I	69

4.4.4. El gen EP153R inhibe también la expresión de moléculas de MHC-I en la membrana plasmática en un modelo humano	69
4.4.5. Efecto de EP153R sobre la actividad citotóxica de células NK	71
5. Discusión	73
5.1. El gen EP153R es un inhibidor de apoptosis	73
5.2. El gen EP153R inhibe la actividad transcripcional de p53	76
5.3. El gen EP153R es capaz de modular la expresión de antígenos MHC-I	79
6. Conclusiones	83
Bibliografía	85

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1.1. Ruta de activación y degradación de p53.	9
1.1.2. Vías de inducción de apoptosis.	10
1.1.3. Presentación de péptidos virales a linfocitos T citotóxicos (CTLs).	14
1.1.4. Presentación de péptidos virales a linfocitos T citotóxicos (CTLs) y células Natural Killer (NK)	15
1.2.1. Estructura y morfología del VPPA.	18
1.2.2. Proteínas del VPPA implicadas en la modulación de la apoptosis.	20
1.2.3. Secuencia de la proteína EP153R y secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos.	22
3.12.1. Homodímero de EP153R.	33
4.1.1. Expresión del gen EP153R en infección sincrónica o asincrónica de VPPA.	40
4.1.2. Expresión del ARNm de EP153R y p72 en macrófagos de cerdo infectados con diferentes aislados de VPPA.	41
4.2.1. Análisis de apoptosis en células Vero infectadas por VPPA.	42
4.2.2. Actividad de caspasa-3 y muerte celular en células Vero y macrófagos de cerdo.	44
4.2.3. Activación de caspasas en células Vero infectadas por VPPA.	45
4.2.4. Activación de caspasa-3 por distintos aislados del VPPA.	46
4.2.5. Análisis del ciclo celular en células sensibles a la infección por VPPA.	47
4.2.6. Expresión de ARNm en células Vero y COS transfectadas con el gen EP153R.	48
4.2.7. Actividad de caspasa-3 en células Vero transfectadas transitoriamente con el gen EP153R.	49
4.2.8. Actividad de caspasa-3 en células COS transfectadas establemente con el gen EP153R.	49
4.2.9. Tinción con Anexina V en células Vero transfectadas establemente con el gen EP153R.	50
4.2.10. La proteína p53 presenta una localización nuclear en células infectadas por VPPA.	51
4.2.11. Expresión de p53 en células Vero infectadas con Ba71V o Δ EP153R.	51

4.2.12. Actividad transcripcional de p53 en células Vero transfectadas establemente con pcDNA ó EP153R.	52
4.2.13. Actividad transcripcional de p53 en células infectadas con VPPA.	53
4.2.14. Actividad transcripcional de p53 en células Vero y Raw transfectadas establemente con diferentes construcciones derivadas del gen EP153R.	54
4.2.15. Actividad transactivante de p53 en células Vero transfectadas establemente con pcDNA o EP153R.	56
4.2.16. Actividad transactivante de p53 en células Vero infectadas con BA71V o EP153R.	56
4.2.17. Ensayo de unión de p53 a ADN.	57
4.2.18. Expresión de diferentes componentes involucrados en la cascada apoptótica.	58
4.2.19. Expresión de Mdm2 en células Vero infectadas por VPPA.	59
4.3.1. Alineamiento de la secuencia de EP153R con moléculas CD69 de diverso origen.	61
4.3.2. Estructura de EP153R modelada sobre la estructura tridimensional de otras moléculas que también presentan dominios tipo lectina C.	62
4.3.3. Modelo estructural de EP153R.	63
4.3.4. Modelo estructural de la interacción de EP153R-MHC-I.	64
4.3.5. Residuos de lisina (K) conservados en secuencias citoplásmicas de proteínas residentes en el Retículo Endoplásmico (RE).	65
4.3.6. Inmunofluorescencia en células Vero.	66
4.4.1. Síntesis de SLA-I en macrófagos de cerdo infectados por VPPA.	67
4.4.2. Expresión de antígenos de histocompatibilidad de clase I en células Raw transfectadas con EP153R e infectadas con virus.	68
4.4.3. Expresión de MHC-I, en células Raw transfectadas con distintas construcciones del gen EP153R e infectadas con virus.	70
4.4.4. Expresión de MHC-I en células Jurkat transfectadas con EP153R.	71
4.4.5. Efecto de EP153R en la citólisis de células Jurkat por NK.	72

Capítulo 1

Introducción

1.1 INTERACCIÓN VIRUS-HUÉSPED

Los virus son patógenos intracelulares obligados que utilizan las rutas metabólicas de células permisivas para reproducirse, generando un gran número de partículas virales que pueden diseminarse al resto de células susceptibles del organismo infectado.

Durante millones de años de coevolución, los vertebrados han desarrollado un complejo y adaptativo sistema inmune, con capacidad para reconocer y eliminar eficientemente a esos “patógenos”. Al mismo tiempo, los virus han desarrollado varias estrategias para evitar la respuesta defensiva del hospedador. Por ejemplo, los virus ARN presentan genomas relativamente pequeños, que replican muy rápido y se diseminan a otros organismos susceptibles antes de que el sistema inmune del hospedador los elimine. Además, la baja fidelidad de la ARN polimerasa facilita la utilización de posibles mutaciones para escapar del control del sistema inmune. Sin embargo, los virus ADN presentan un genoma mayor y replican lentamente, mutando relativamente poco. Como resultado, la mayoría de los virus ADN, especialmente aquellos que dan lugar a largas infecciones persistentes, codifican proteínas que alteran la respuesta defensiva del hospedador.

La mayoría de los mecanismos que utilizan los virus para escapar de la respuesta antiviral celular, están relacionados con:

- Regulación de moléculas inmunomoduladoras (interferones y otras citoquinas y quimioquinas) y de sus receptores.
- Alteración del ciclo celular y modulación de la muerte celular programada.
- Regulación de la función del MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad), implicada en el control de la respuesta de Linfocitos T Citotóxicos (CTLs) y de células Natural Killer (NK).

Principalmente nos centraremos en los dos últimos puntos.

1.1.1. ALTERACIÓN DEL CICLO CELULAR Y REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS

Alteración del ciclo celular

El supresor tumoral p53 juega un papel importante en la respuesta celular al daño del ADN, ya que controla la reparación del ácido nucleico, la parada del ciclo celular y la apoptosis (Levine et al., 1997). La principal diana de p53 es el gen p21, que codifica un inhibidor de quinasas dependiente de ciclina (cdks), y también se une al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), inhibiendo por tanto la replicación de ADN dependiente de PCNA (Gibs et al., 1997). La proteína p53 juega un importante papel en la regulación de la parada o progresión del ciclo celular, en la metilación del ADN, en la senescencia celular, en la apoptosis y en la diferenciación. Después del daño en el ADN, esta respuesta dependiente de p21 permite la oportunidad de reparar el daño antes de que la célula entre en fase S. Adicionalmente, p53 puede activar la apoptosis a través del control transcripcional de Bax y probablemente de otros inductores apoptóticos (Miyshita et al., 1994) (Figura 1.1.1).

En condiciones normales, p53 se mantiene en niveles basales por la interacción con Mdm2 y su consecuente degradación dependiente de ubiquitina (Mayo et al., 2002), pero en respuesta a una situación de estrés, tal como una activación oncogénica, una hipoxia, un daño en el ADN o una infección viral, p53 es activada (Chehab et al., 1999).

La activación de p53 puede ser modulada en tres niveles:

I) incremento de expresión, II) transformación de la forma inactiva a la activa, y III) translocación de p53 al núcleo, para actuar como factor transcripcional (Qian et al., 2002; Prives et al., 1999).

Para muchos virus, la replicación depende de la inducción de la fase S del ciclo celular, que permite con frecuencia incrementar los niveles de p53. Debido a que la activación de p53 puede activar apoptosis, algunos virus han desarrollado estrategias para contrarrestar la activación de p53 o la muerte celular programada. Así, por ejemplo, la proteína E6 del papilomavirus interacciona directamente con p53, promoviendo su degradación (Scheffner et al., 1990), y el virus Epstein-Barr también regula la función de p53 a través de la proteína temprana BZLF1 (Mauser et al., 2002).

Muchos miembros de la familia herpesvirus, por medio de proteínas específicas han desarrollado mecanismos de interacción con p53: la proteína K8 del herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (Park et al., 2000) y la proteína IE2 de citomegalovirus, estabilizan p53 por incremento de los niveles de este supresor tumoral, pero inhiben su transactivación (Jault et al., 1995). Una función similar también ha sido descrita para la proteína del adenovirus humano E4ORF6 (Dobner et al., 1996). Por otro lado, mencionar que la proteína X del virus de la hepatitis B inhibe la translocación nuclear de p53 (Takada et al., 1997) y su

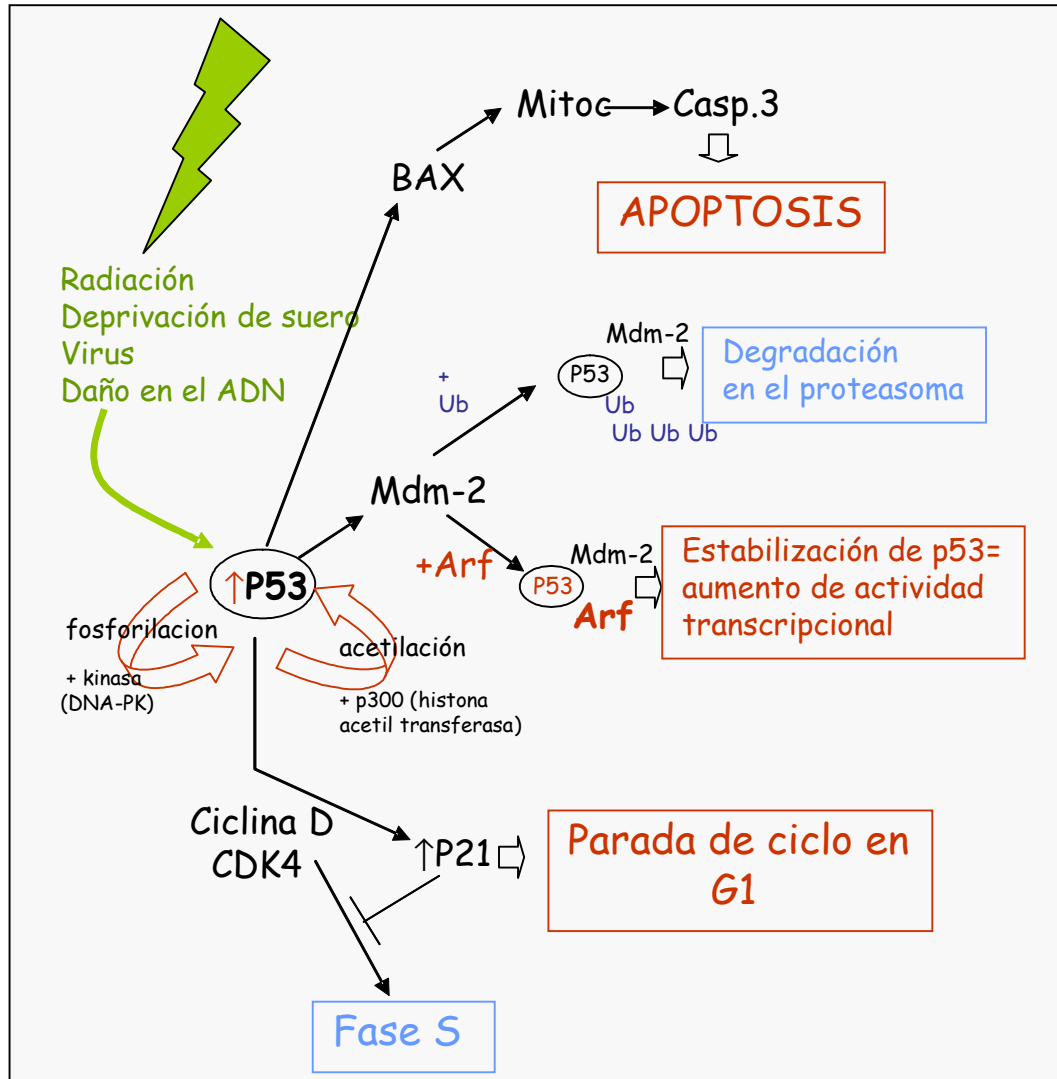


Figura 1.1.1 - Ruta de activación y degradación de p53.

unión al ADN (Wang et al., 1994).

El desarrollo de estas estrategias virales para regular la función de p53 fundamenta la idea de que la modulación de p53 debe ser un evento importante para la replicación viral.

Modulación de la muerte celular programada

La apoptosis es un proceso de suicidio celular programado, caracterizado por la fragmentación del ADN, la condensación y disgregación del núcleo y la vesiculación de la membrana plasmática, que provoca la fagocitosis de la célula sin inducir una respuesta inflamatoria. El proceso está finamente regulado, y se activa por una gran variedad de señales extra e intracelulares. Este suicidio celular es crítico en la

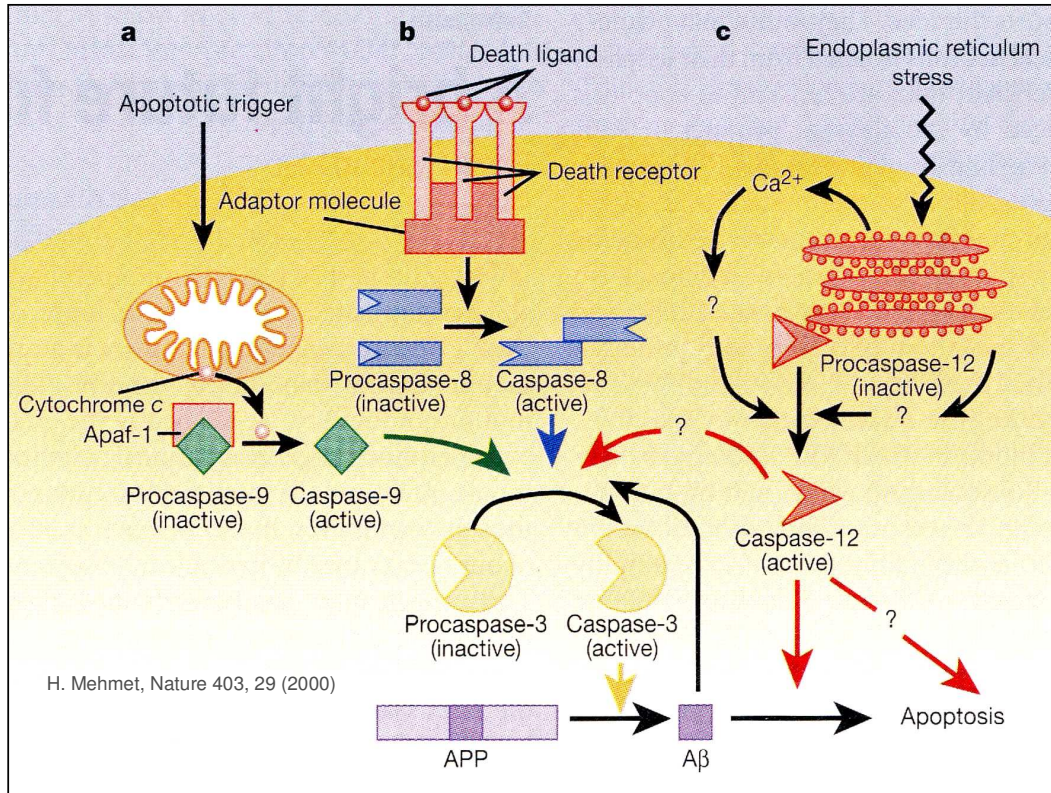


Figura 1.1.2 - Vías de inducción de apoptosis. (a) Vía Mitochondrial, (b) Vía de los receptores de muerte, (3) Vía del Retículo Endoplásmico.

formación (desarrollo embrionario) y mantenimiento (homeostasis tisular) de los organismos multicelulares, jugando un papel protector importante en la eliminación de células dañadas por irradiación, agentes químicos o infecciones virales.

La maquinaria apoptótica muestra una variedad de procesos coordinados que se inician con señales en sensores internos (vía intrínseca, dependiente del estrés citosólico) o por estímulos externos (vía extrínseca, mediada por receptores de muerte), existiendo otra tercera vía, menos estudiada, que se activa por el estrés del retículo endoplásmico y la pérdida de la homeostasis del calcio (Figura 1.1.2).

- Vía intrínseca mitocondrial: Señales producidas por sensores internos activados (por ejemplo, p53) son propagadas a la mitocondria por los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, tales como Bid, o complejos oligomerizados formados por Bax y Bak (Kroemer et al., 1997), que son proteínas que aumentan la permeabilización de la membrana mitocondrial, dando lugar a la liberación de citocromo C (Desagher et al., 2000). Cuando éste oligomeriza con Apaf-1 (Pan et al., 1998) y recluta a la pro-caspasa 9 (formando el apoptosoma) tiene lugar la conversión proteolítica de procaspasa 9 a caspasa 9, iniciándose una cascada de activación de caspasas citosólicas (familia de cistein-aspártico proteasas), que culmina con la conversión de la procaspasa 3 a su forma activa. La activación de las caspasas efectoras provoca la degradación de proteínas estructurales y del

ADN, concluyendo con la muerte de la célula (Budihardjo et al., 1999).

- **Vía extrínseca, mediada por receptores de muerte:** La vía extrínseca, o de los “receptores de muerte”, establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. Dos familias de receptores se han identificado con estas características: la proteína Fas y el factor de necrosis tumoral (TNF).

La proteína transmembrana Fas en su porción intracelular enlaza con un factor intermedio denominado FADD (factor associated death domain), activando las caspasas-8 y -10, a través de Bid, que induce cambios conformacionales en Bax que estimulan la liberación de citocromo C al citoplasma desde la mitocondria, desencadenándose toda la cascada de activación de caspasas que producen el colapso celular. En cambio, si la parte interna de la molécula se asocia a otro factor llamado DaXX, se activan proteín-kinasas que conducen al efecto contrario, es decir, estimulan el ciclo celular y la mitosis (Vaux et al., 1999)

Algo similar sucede con el receptor de membrana para el TNF. Su porción intracelular conecta con complejos intermedios como el Tradd (TNF receptor associated death domain) y Raidd (receptor associated interleukine death domain) que activan caspasas “iniciadoras” de la apoptosis. Pero si se asocian a otro complejo llamado Traf (TNF receptor associated factor) activan proteín-kinasas y estimulan la proliferación celular, es decir, el efecto contrario (Benedict et al., 2002; Gliniak et al., 1999)

- **Vía del Retículo Endoplásmico:** Las alteraciones en la homeostasis del calcio, y concretamente, la salida masiva del ión almacenado en el Retículo Endoplásmico (RE), ponen en marcha un programa propio de estrés celular que incluye vías de supervivencia y de muerte por apoptosis. La procaspasa-12 es una proteína de la membrana del RE que se activa específicamente en respuesta a estrés de este orgánulo, provocándose la activación de la cascada proteolítica de caspasas (Nakagawa et al., 2000).

Desde el punto de vista de la producción viral, la inducción del proceso apoptótico en la célula infectada puede ser considerada positiva y negativamente. En las primeras etapas del ciclo infectivo, el lanzamiento de la muerte celular programada puede ser un mecanismo de defensa de la célula para impedir la generación de partículas virales infectivas. Sin embargo, en tiempos más tardíos de la infección viral, la inducción de apoptosis podría afectar poco al rendimiento de viriones infectivos, pero favorecería la diseminación de éstos en ausencia de otras respuestas inflamatorias y de estrés celular.

Cabe esperar, por tanto, que los virus hayan desarrollado estrategias tanto para el bloqueo como para la inducción del proceso apoptótico, algunas de las cuales se detallan a continuación.

Estrategias virales para el bloqueo de la muerte celular programada: Las proteínas celulares implicadas en el control de apoptosis pueden ser diana para las acciones virales antiapoptóticas,

como ocurre en el caso de los virus que inhiben la activación de caspasas porque codifican homólogos de proteínas antiapoptóticas celulares (como el Bcl-2), o que bloquean señales apoptóticas producidas por la activación de miembros de la familia TNFR por codificación de proteínas que contienen dominios de efectores de muerte, o también que inactivan a PKR (Proteína Kinasa R) y al supresor de tumores p53, promotores ambos de apoptosis. Algunos ejemplos de virus que expresan proteínas inhibitoras de apoptosis, serían:

- Dentro de la familia de los Herpesvirus, el Citomegalovirus expresa los factores de transcripción IE1 e IE2, productos virales tempranos que inhiben apoptosis por represión de p53; el virus Epstein-Barr expresa LMP1, que incrementa la expresión de Bcl-2 y de p53, pero inhibe la apoptosis mediada por la vía FAS/TNF; los Herpes Virus Humano, Bovino y Equino expresan FLIPS virales que interaccionan con la proteína adaptadora FADD, previniendo la apoptosis mediada por receptores de muerte; también expresan la proteína KsBcl-2, homólogo a Bcl-2 (Hengel et al., 1998).
- En la familia de los Poxvirus, el virus Cowpox expresa crmA (cowpox cytokine response modifier gene product), un inhibidor específico de caspasas, que bloquea la apoptosis inducida por TNF α ó Fas; el virus Vaccinia expresa la proteína SPI-2 (homóloga a crmA), y también expresa E3L y K3E que producen una inhibición de PKR (Turner et al., 1998).
- Diversos Adenovirus expresan la proteína E1b cuyo fragmento de 19 KDa es homólogo, y su fragmento de 55 KDa antagonista, de p53, y la proteína E3 (14,7 KDa) que es un inhibidor de la vía FAS/TNF (Mahr et al., 1999).
- El virus del papiloma virus expresa la proteína E6, que se une a p53 y bloquea apoptosis.
- Los Baculovirus expresan las proteínas p35 e IAP viral, que inhiben apoptosis (Everett et al., 1999).
- El virus de la Hepatitis B induce la proteína pX que se acompleja con p53 e inhibe apoptosis, y el virus de la Hepatitis C expresa una proteína del core que también bloquea apoptosis (Alcamí et al., 2000).

Estrategias virales pro-apoptóticas: Un determinado virus puede expresar tanto proteínas inhibitoras de apoptosis como inductoras, dependiendo de la fase del ciclo infectivo en el que se encuentre. Algunos ejemplos de virus que expresan proteínas inductoras de apoptosis se describen a continuación:

- Los Adenovirus, expresan la proteína E1A que induce apoptosis si se expresa en líneas celulares en ausencia de otras proteínas virales; la inducción se produce tras la interacción en la membrana plasmática con el receptor celular para el virus. (Shao et al., 2005)

- La familia retrovirus también tiene representantes con proteínas que inducen apoptosis, por ejemplo, el HIV-1 expresa la proteína Tat, que induce FasL activando el Fas receptor, y reduce la expresión de Bcl-2 (Bartz et al., 1999); la proteínas gp120 (Brojasth et al., 1996) y gp41 (Garh et al., 2006) también inducen apoptosis, así como la proteasa del HIV que proteoliza Bcl-2 e induce apoptosis (Yang et al., 2005). Otro miembro de la familia, el virus del sarcoma-leucosis aviar, expresa CAR1, que está relacionado con receptores para TNF (Westendorp et al., 1995).
- El virus Vaccinia, miembro de la familia poxvirus, expresa la proteína LIR, que induce apoptosis en células CHO en presencia de cicloheximida y Ara-C, o con partículas virales inactivadas por irradiación con luz UV (Pogo et al., 2004).
- El parvovirus B19 humano expresa una proteína no estructural que induce apoptosis si se expresa aislada en líneas celulares (Poole et al., 2006).
- El Virus de la anemia del pollo expresa VP3 induciendo apoptosis en células transformadas; esta inducción se produce tras la interacción en la membrana plasmática con el receptor celular para el virus (Teodoro et al., 2004).

1.1.2. MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE MHC (COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD)

Cuando una célula es infectada por un patógeno intracelular, por ejemplo un virus, éste es degradado a péptidos por el proteasoma celular (Figura 1.1.3), y conducido por medio del TAP (Transportador Asociado al Procesamiento de antígeno) al lumen del RE, donde se ensamblará a las moléculas de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

Estas moléculas están constituidas por una cadena pesada glicosilada (45 kDa) asociada a la β 2-microglobulina (12 kDa), y se sintetizan en el RE.

Existen otras dos proteínas, la calnexina y la calreticulina (caracterizadas por presentar un dominio tipo lectina C), que actúan como chaperonas encargadas del correcto ensamblaje de las moléculas nacientes. Una vez que los péptidos se han asociado a las moléculas de MHC de clase I (HLA-A, -B, -C...), ese complejo es transportado, vía Aparato de Golgi, a la membrana plasmática, donde puede interactuar con receptores de linfocitos T citotóxicos (CTLs) y de células NK. Mientras la interacción con los receptores de los CTLs estimula la actividad citotóxica del linfocito, promoviendo la lisis de la célula infectada, la función lítica de las células NK se ve fuertemente inhibida por la expresión en la membrana plasmática de una molécula no clásica de MHC-I, denominada HLA-E, que interactúa con receptores inhibitorios de células NK que pertenecen a una familia de proteínas tipo lectina C (Figura 1.1.4). Para poder expresarse de una manera estable, HLA-E debe transportar un nonapéptido derivado de la secuencia líder de moléculas clásicas de MHC-I.

Las células NK constituyen una de las primeras líneas de defensa celular frente a virus. Estas células

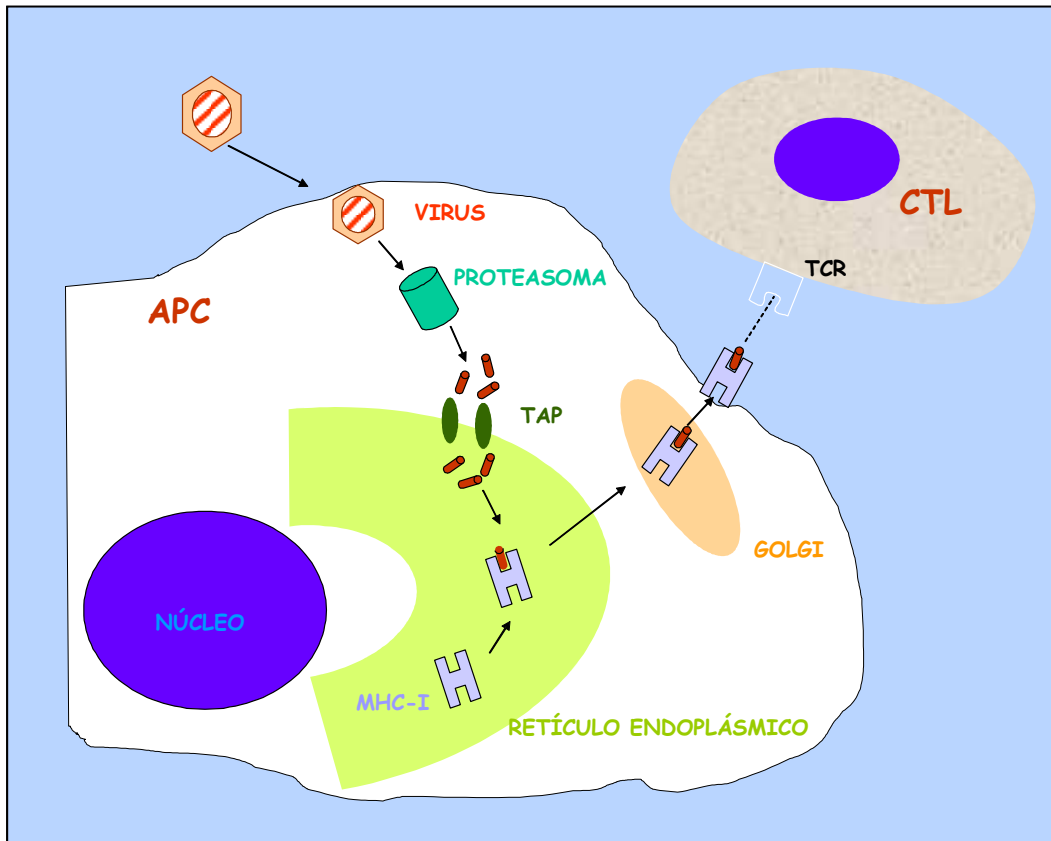


Figura 1.1.3 - Presentación de péptidos virales a linfocitos T citotóxicos (CTLs). Determinados patógenos intracelulares son degradados a péptidos por el Proteasoma y transportados por medio de TAP al Retículo Endoplásmico, donde se unirán, formando un complejo, a las moléculas nascentes de MHC-I, que será conducido, vía Golgi, a la superficie de la membrana plasmática, donde establecerán una interacción con los receptores de CTLs.

poseen receptores activadores, que reconocen carbohidratos en la superficie celular e inducen su función lítica, y receptores inhibidores, que reconocen moléculas MHC de clase I y transducen una señal que bloquea la maquinaria citotóxica. Los receptores de las células NK pertenecen a una de dos superfamilias: la superfamilia de las inmunoglobulinas y la superfamilia tipo lectina C. Los receptores de células NK de la superfamilia de las inmunoglobulinas (KIRs, ILTs, gp49, PIRs, LAIR-1) son glicoproteínas de transmembrana tipo I, que contienen uno o más dominios extracelulares tipo inmunoglobulina, mientras que los miembros de la familia de receptores tipo lectina C (Ly49A, NKR-P1, CD94/NKG2, CD69) son homodímeros o heterodímeros de glicoproteínas transmembrana de tipo II, con dominios extracelulares tipo lectina C en cada cadena. Ambas superfamilias incluyen receptores inhibidores o activadores, de tal manera que las funciones de las células NK son reguladas por un balance dinámico entre las señales positivas (que dan lugar a la lisis de la célula) y señales negativas (que previenen la lisis).

La inhibición de la expresión de MHC-I por un virus puede afectar a la actividad de CTLs y células NK

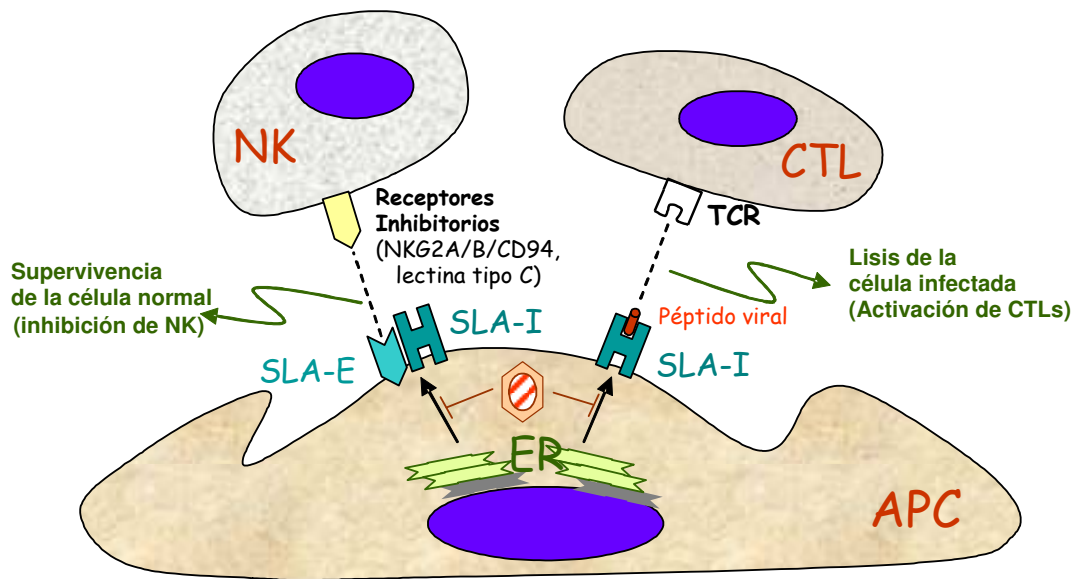


Figura 1.1.4 - Presentación de péptidos virales a linfocitos T citotóxicos (CTLs) y células Natural Killer (NK).

Modelos virales en la modulación de la expresión de antígenos MHC-I

Muchos virus han desarrollado estrategias para evitar el ataque de los CTLs sobre la célula infectada. Principalmente estas estrategias consisten en inhibir la expresión en la superficie de la célula de las moléculas clásicas de MHC-I (reteniéndolas en el RE, bloqueando el transportador TAP...), pero esto conlleva un posible aumento de la citólisis por parte de las células NK, debido a la inhibición de la expresión de HLA-E en la membrana, como consecuencia de la disminución de la expresión de MHC-I, que reduciría la disponibilidad del nonapéptido (derivado de estas moléculas clásicas) que se une a HLA-E para estabilizarlo. Algunas estrategias para evitar este efecto perjudicial en modelos virales que modulen la expresión de MHC-I, se describen a continuación:

- Los herpes virus están particularmente bien dotados de mecanismos que inhiben la presentación de antígeno. El antígeno nuclear EBNA-1 codificado por el virus Epstein-Barr posee una secuencia repetida Gly-Ala que previene la degradación de la proteína por el proteasoma. La proteína ICP47 del virus del herpes simple inhibe la translocación de péptidos del citosol al lumen del RE. Las proteínas K3 y K5 del herpes virus asociado al Sarcoma de Kaposi, dirigen las moléculas de clase I desde el retículo o la superficie celular al citosol o endosomas para su degradación.
- Un ejemplo bien estudiado de la eficiencia de ciertos herpesvirus en la regulación de MHC-I, lo constituye el Citomegalovirus humano (HCMV), que presenta diferentes proteínas implicadas en la evasión del reconocimiento por parte de los CTLs o del ataque lítico de las células NK. La

proteína US6 es una proteína que se une a TAP, inhibiendo el transporte de péptidos del citosol al RE y su ensamblaje con moléculas de HLA-I. La proteína US3 es inmediatamente temprana y su función consiste en retener moléculas de HLA-I en el RE. Las proteínas US2 y US11 se unen a cadenas pesadas (α) de HLA-I en el RE y las translocan al citosol, donde son degradadas por el proteasoma, reduciendo los niveles superficiales de HLA-A y HLA-C, pero preservando la expresión de HLA-E (Gewurz et al., 2001; Machold et al., 1997). La proteína viral gpUL18, homóloga a cadenas pesadas (α) de HLA-I, se asocia a $\beta 2m$ ($\beta 2$ microglobulina, cadena ligera), y al expresarse en membrana podría interactuar con receptores inhibitorios de células NK (Cosman et al., 1997; Leong et al., 1999). Por último, la proteína gpUL40 contiene una secuencia hidrofóbica idéntica a un nonapéptido derivado de la secuencia líder de moléculas HLA-I: MNKFSNTRIGFTCAVMAPRTLILTVGLLGMRIRSLLC. Como se ha indicado anteriormente, péptidos como éste (derivados de HLA-I), procesados y liberados al citosol, se transportan por TAP al lumen del RE, donde se unen a HLA-E, lo que estabiliza la molécula. Este complejo se dirige a la membrana plasmática para interactuar con receptores inhibitorios de células NK (CD94/NKG2A). En el caso del péptido viral, el transporte al lumen del RE es independiente de TAP (ocurre en células TAP-negativas), y parece resistente a la acción del gen viral US6: esto permite que la célula infectada por HCMV mantenga una expresión adecuada de HLA-E, lo que la hace resistente a la lisis por células NK. Por otro lado, la reducción de los niveles de HLA-I (A, B, C, G...) interfiere con su expresión en membrana y la presentación de antígenos a linfocitos T, lo que permite escapar de la acción citotóxica de CTLs. (Tomasec et al., 2000; Ulbrecht et al., 2000).

- En el modelo viral de HIV existe también una reducción de las moléculas de clase I (pero preservando la expresión de HLA-C y HLA-E), manteniendo la resistencia de las células infectadas a lisis por células NK (mediada por receptores CD94/NKG2A y KIR2DL) y el ocultamiento a la acción citolítica de CTLs. Las proteínas implicadas son Nef, Vpu y Gag. Nef se localiza en la membrana plasmática e interactúa con residuos de aminoácidos en la cola citoplasmática de la cadena pesada de HLA-A y B (pero no C ni E), dirigiéndose como complejo Nef-HLA-I a lisosomas para su degradación. Bloquea, por tanto, el reconocimiento por CTLs sin afectar a HLA-E, necesario para el reconocimiento de células NK. La proteína Vpu previene también la expresión superficial de moléculas de clase I, por un mecanismo desconocido. Por último, la proteína Gag produce un aumento de la expresión de HLA-DR (clase II) (Cohen et al., 1999).
- En el modelo de Adenovirus se produce también la inhibición de la expresión superficial de moléculas de clase I, en este caso por la acción de E3/19k (proteína transmembrana tipo I), con un motivo de 2 lisinas en la cola citoplásmica que interactúa con la proteína de cubierta (COP-1) para quedar retenida en el RE. La proteína viral se une a regiones α -1 y α -2 de la cadena pesada de MHC-I, reteniéndolas en el RE e impidiendo su transporte a la superficie celular. Esto conlleva una reducción en el reconocimiento por CTLs. (Farrell et al., 1998; Morris et al., 2004).
- Tanto la proteína K3 del virus de la hepatitis del ratón, como la proteína m06 del citomegalovirus murino, dirigen las moléculas de clase I al lisosoma para su degradación (Stevenson et al., 2002;

Tortorella et al., 2000). La proteína m144 del citomegalovirus induce además señales inhibitoras para células NK que evitan la lisis de la célula infectada (Natarajan et al., 2006).

- Una reducción (50 %) de la expresión de MHC-I también ha sido descrita en la infección por el virus de la fiebre aftosa (Sanz-Parra et al., 1989).

1.2 EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA

El virus de la peste porcina africana (VPPA), uno de los más complejos virus animales existentes, es el único miembro de la familia Asfaviridae (Dixon et al., 2004). Es un virus icosaédrico de gran tamaño (con un diámetro de 200 nm), con envuelta (Figura 1.2.1), que infecta cerdos domésticos (Viñuela, 1985), dando lugar a una enfermedad aguda caracterizada por coagulación intravascular diseminada con múltiples hemorragias en todos los tejidos, que conduce a la muerte del animal por choque hemorrágico en pocos días (Villeda et al., 1993).

El VPPA replica principalmente en macrófagos y monocitos de cerdo, lo que influye considerablemente en el desarrollo de su patogenicidad (Viñuela, 1985), puesto que dichas células juegan un importante papel en el establecimiento de la respuesta inflamatoria e inmune, debido a la secreción de factores inmunomoduladores, quimioatrayentes e inflamatorios, como son IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , óxido nítrico, (mediante la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible, iNOS) y prostaglandina E2 (mediante la expresión de la enzima ciclooxigenasa-2, COX-2) (Stout y Suttles, 2005).

El genoma de VPPA es una molécula de ADN de doble hebra lineal, de gran tamaño (de 170 a 190 Kpb) que codifica más de 150 proteínas, entre las que se han identificado algunas potencialmente implicadas en la modulación de la respuesta antiviral celular (Yañez et al., 1995). Entre ellas, se puede destacar las siguientes: A179L, homólogo de la familia de proteínas antiapoptóticas Bcl-2; A224L, homólogo a la familia de inhibidores de apoptosis IAPs; EP153R homólogo a las lectinas tipo C; y A238L, homólogo a la familia de proteínas I κ B.

Las formas clínicas de la enfermedad producida por el VPPA varían con la virulencia del virus, distinguiéndose cinco tipos: hiperaguda, aguda, subaguda, crónica y subclínica. Las cepas virulentas del VPPA causan una enfermedad aguda que se caracteriza por una linfopenia y un estado de inmunodeficiencia que se observa muy temprano después de la entrada del virus en el animal. Es evidente que la destrucción de linfocitos T y B en etapas tempranas de la infección impide el desarrollo de la respuesta inmune frente al virus, de manera que la muerte se produce entre 3 y 7 días después del primer contacto con el microorganismo.

En el caso de infecciones con cepas virales moderadamente virulentas o atenuadas, la observación más llamativa es que la protección es específica de aislado, es decir, que la infección con un aislado atenuado

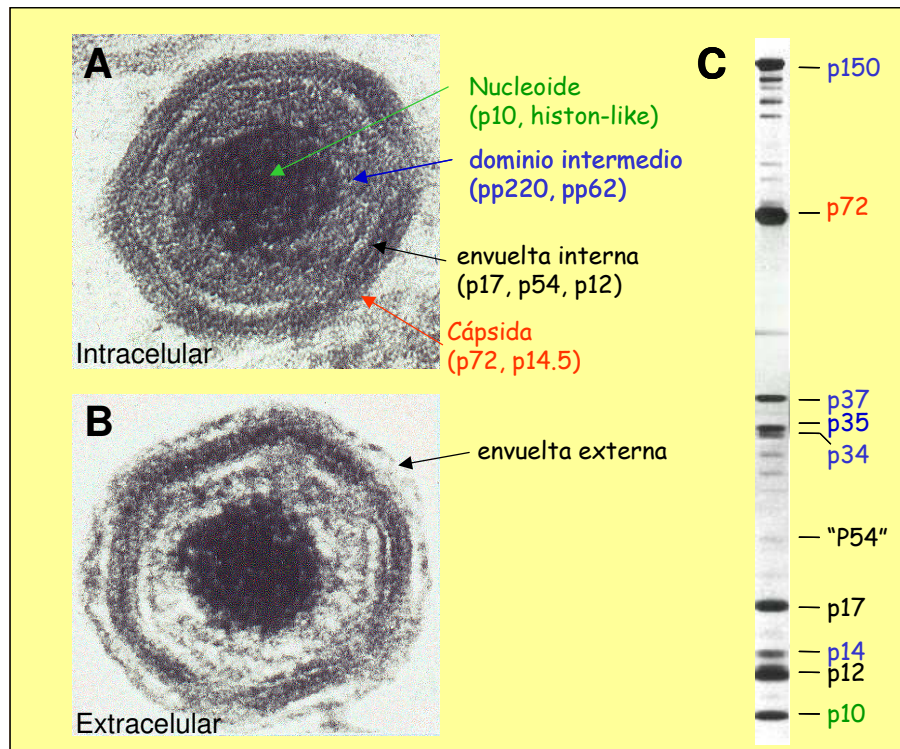


Figura 1.2.1 - Estructura y morfología del VPPA. Es un virus complejo, de morfología icosaédrica, con un diámetro de unos 200 nm (Carrascosa et al., 1984), y que está constituido por una serie de capas concéntricas (Andrés et al., 1997): (1) la región más interna o región central, formada por una zona electrón-densa de aproximadamente 80 nm, el nucleoide, que contiene el genoma viral y que está rodeado por una estructura proteica de 30 nm, (2) el dominio intermedio, donde se localizan las proteínas estructurales derivadas de la poliproteína pp220 (Andrés et al., 1997). Hacia el exterior hay sucesivamente (3) una envuelta lipídica derivada del retículo endoplásmico (Andrés et al., 1998; Cobbold y Wilmart, 1998), una cápsida (4) cuya proteína mayoritaria es la p72 compuesta por unos 200 capsómeros dispuestos de manera hexagonal confiriendo al virión su forma icosaédrica y finalmente (5) una membrana lipídica exterior adquirida por gemación a través de la membrana plasmática (Breese y de Boer., 1966).

induce protección en animales infectados con el mismo aislado virulento, pero no frente a otras cepas del virus, sugiriendo que los antígenos que inducen una respuesta inmune protectora son precisamente los que varían entre las distintas cepas virales. Entre los intentos que se han llevado a cabo para estudiar las diferencias antigénicas que pueden ser responsables de la falta de protección frente a virus heterólogos en cerdos que han sobrevivido una infección o que han sido vacunados con cepas atenuadas, es destacable la generación de anticuerpos monoclonales frente a varias proteínas virales, que efectivamente mostraron la existencia de diferencias antigénicas entre distintas cepas del virus. Sin embargo, no se han podido identificar claramente, por este método, candidatos que varíen siempre entre todos los aislados, ni que generen por sí solos una respuesta inmune protectora en animales inmunizados.

Por otra parte, el estudio de la respuesta inmune generada frente al virus revela la existencia de anticuer-

pos y linfocitos T específicos, tanto cooperadores como citotóxicos, en animales infectados con cepas atenuadas o inoculados experimentalmente con virus inactivados. De hecho, se han identificado proteínas del VPPA, p32 ó p12, que son blanco de la actividad de los CTLs in vitro, así como otras, p72 ó p150, reconocidas fuertemente por anticuerpos obtenidos del suero de cerdos infectados. Sin embargo, y a pesar de ello, es evidente que no hay protección efectiva por estas vías, puesto que los animales mueren si se les enfrenta posteriormente a un aislado virulento.

Todo lo anterior indica que el VPPA posee mecanismos de escape de la respuesta inmune del huésped. La mutación generadora de diferencias de secuencias entre aislados virales es claramente uno de estos mecanismos, pero posiblemente existen, además, otros adicionales que interfieren o modulan rutas celulares implicadas en el control de la infección. Las formas subagudas y crónicas de la infección por VPPA podrían ser explicadas como la consecuencia de la activación de factores, tanto celulares como virales, que contribuyen al establecimiento de la persistencia viral. Una de las estrategias posiblemente utilizada por el VPPA, dada la homología de ciertos genes presentes en su genoma con genes celulares reguladores de la respuesta inmune, es codificar proteínas capaces de modular esta respuesta y así contribuir, por un lado a la modificación de la patogenicidad del virus y por otro, a la evasión de mecanismos inmunológicos efectores. En este sentido, se sabe que el control de la transcripción de ciertas citoquinas inflamatorias, moléculas del MHC y otros factores que median el control de la respuesta inmune, depende en parte de la translocación al núcleo del NF- κ B, un factor de transcripción que se mantiene inactivo en el citoplasma acoplado al inhibidor I κ B- α en situación de reposo celular.

Distintas señales intracelulares (virus, PMA, TNF- α , etc.) inducen la activación de proteínas quinasas que fosforilan el I κ B- α , el cual es posteriormente ubiquitinado y degradado en el proteosoma. La proteína codificada por el gen A238L del VPPA presenta una homología estructural con el I κ B- α celular, y es capaz de interactuar con el NF- κ B en la célula infectada, inhibiendo la interacción del factor de transcripción con el ADN. Este mecanismo capacitaría al virus para controlar la síntesis de citoquinas tales como el TNF- α que, como se ha comentado, está involucrada tanto en la activación de la respuesta inmune como en la apoptosis celular (Powel et al., 1996; Revilla et al., 1998). Así mismo, se ha descrito que la proteína A238L es capaz de regular la actividad del factor de transcripción NFAT, lo que redundaría en la inhibición de moléculas proinflamatorias dependientes de dicho factor de transcripción, tales como la enzima COX-2, responsable de la síntesis de la prostaglandina E2. (Granja et al., 2006). El VPPA contiene al menos tres genes capaces de inhibir la apoptosis en la célula infectada, que son, por tanto, candidatos potenciales a promover la persistencia intracelular al mantener la supervivencia de la célula infectada. Uno de estos genes es homólogo al gen celular Bcl-2 y otro es similar a los miembros de la familia de los IAP (implicados, como el Bcl-2, en el control de la apoptosis), mientras que el tercero muestra homología con lectinas tipo C (Figura 1.2.2).

Se ha descrito que cuando se sobreexpresa en líneas celulares el protooncogén Bcl-2, inhibe la muerte celular inducida por diversos estímulos, y que dicha proteína se localiza en la membrana mitocondrial, donde previene la salida del citocromo C, primer eslabón de la cadena que conduce a la muerte celular cuando se libera al citosol. La proteína viral homóloga a Bcl-2 está codificada por el gen A179L del VPPA

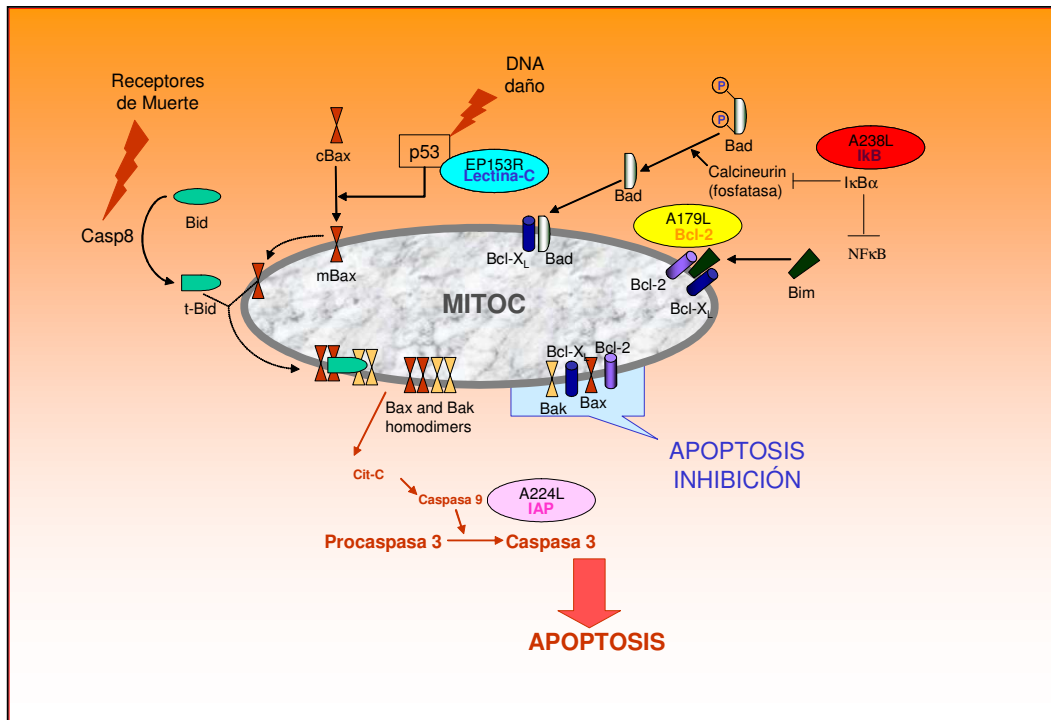


Figura 1.2.2 - Proteínas del VPPA implicadas en la modulación de la apoptosis. La proteína EP153R homóloga a lectina tipo C, la proteína A238L homóloga a I B, la proteína A179L homóloga a Bcl-2 y la proteína A224L homóloga a IAP, pueden afectar las rutas de inducción apoptótica interfiriendo en los pasos indicados en la figura.

y se ha demostrado que previene la apoptosis inducida por inhibidores de la síntesis macromolecular; su localización en la mitocondria a tiempos tempranos de la infección viral sugiere que esta proteína reforzaría la acción del Bcl-2 celular, desempeñando un papel estabilizador de la supervivencia de la célula infectada en los primeros estadios de la infección (Alfonso et al., 1996; Revilla et al., 1997). En relación con el gen viral (A224L), homólogo a la familia de los genes IAP, (Chacon et al., 1995; Nogal et al., 2001) se sabe que inhibe la actividad de las caspasas y por tanto, modula el proceso apoptótico. La lectina viral, codificada por el gen EP153R del VPPA, es objeto de estudio en esta Memoria.

1.2.1. EP153R Y OTRAS LECTINAS TIPO C

Las lectinas tipo C de animales son proteínas que se encuentran en el suero, en la matriz extracelular y en membranas plasmáticas, y que exhiben sitios de unión para carbohidratos dependientes de calcio, actividad muy eficaz para el reconocimiento, tanto endógeno como exógeno, de glicoconjugados específicos en animales (Gabius et al., 1997). Algunas células del sistema inmune (macrófagos, linfocitos B, linfocitos T y células natural killer) muestran receptores con secuencias similares a lectinas tipo C, involucrando a las lectinas tanto en interacciones célula-célula como en el reconocimiento de patógenos, por su habilidad para mediar la discriminación entre lo propio y no propio (Weiss et al., 1998).

Proteínas con dominios tipo lectina C se han descrito en diversos virus animales, la mayoría de ellos en la familia poxviridae [fowlpox (Tomley et al., 1998), vaccinia (Wilcock et al., 1999), myxoma (Cameron et al., 1999) y molluscum contagiosum (Senkevich et al., 1996)]. También han sido descritas en herpesviridae (citomegalovirus) (Voigt et al., 2001) y en asfaviridae (VPPA) (Galindo et al., 2000; Neilan et al., 1999; Yañez et al., 1995). Estas proteínas han demostrado algún papel relevante en la infectividad del virus, en la diseminación del virus célula a célula, en la inhibición de células que median citotoxicidad o en el fenómeno de hemadsorción inducido en células infectadas; sin embargo, la función actual de muchos de los homólogos virales a lectinas, en evasión inmune o en el ciclo infectivo viral, está aún por determinar.

Como se ha indicado, el genoma del VPPA también contiene un gen con homología tipo lectina C (EP153R). El gen EP153R codifica una proteína de 153 aminoácidos (Figura 1.2.3), con un peso molecular teórico de 18 kDa.

El análisis de la secuencia y del perfil de hidropatía de la proteína pEP153R evidencia que la lectina viral es una proteína transmembrana, con un dominio extracelular de 103 aminoácidos, un segmento hidrofóbico de 23 aminoácidos y un dominio citoplásmico formado por 27 residuos. La secuencia contiene tres posibles sitios de fosforilación, y dos de miristoilación. El alto número de posibles sitios de N-glicosilación, ocho en total, indica que posiblemente la forma madura de la proteína se encuentra glicosilada. Este hecho hace que sea improbable que la masa molecular de la proteína madura coincida con la estimada (18 kDa) por su secuencia de aminoácidos. De hecho, cuando se sintetiza la proteína *in vitro* con un lisado de reticulocitos de conejo, en presencia de microsomas pancreáticos caninos, se obtiene una banda de 50 kDa, que debe corresponder a una forma glicosilada de la proteína. En experimentos de accesibilidad a proteinasa K se observa que sólo el extremo N-terminal (27 aminoácidos) de la proteína aparece expuesto a la acción de la proteasa, mientras que el dominio C-terminal se encuentra protegido por los microsomas. Estos hechos permiten concluir que la proteína pEP153R es una glicoproteína integral de membrana tipo II con un extremo C-terminal extracelular (Galindo et al., 2000).

Esta proteína contiene en su secuencia un dominio tipo lectina C animal que caracteriza a todos los miembros de una familia génica, cuya conformación tridimensional se fundamenta en estructuras secun-

```

CGTTATTTATGCTGTATTGTATAAGGATAACTTCGCCACCGCACTAGGAAAAACGGTTGA
AAAATATATAACACAAAATTAATCATGTATTTTAAGAAAAATACATCGGTCTTATTGAT
      M Y F K K K Y I G L I D
AAGAACTGTGAAAAAAAAATATTAGATGATTCTAGTACAATAAAAAATTTGTTACATATTA
K N C E K K I L D D S S T I K I C Y I L
ATTGGAATATTGATTGGAECTAATATGATAACTCTTATTTATAATTTTCATATTCTGGGAT
I G I L I G T N M I T L I Y N F I F W D
AATTATATAAAATGTTACCGAAATAATGATAAAATGTTTTACTGTCCTAATGATTGGGTT
N Y I K C Y R N N D K M F Y C P N D W V
GGATATAATAATATTTGTTACTATTTTAGTAATGGTAGTTTTTCTAAAAATTATACAGCT
G Y N N I C Y Y F S N G S F S K N Y T A
GCTAGTAATTTTTGTAGACAATTAATGGTACACTTGCTAATAATGATACTAATTTATTA
A S N F C R Q L N G T L A N N D T N L L
AATCTAACTAAAATATATAATAATCAATCTATGTATTGGGTTAACAATACGGTAATATTA
N L T K I Y N N Q S M Y W V N N T V I L
CGTGGTGATAATAAATATAGTCAAAAAGTAACTATACAGATTTATTATTTATTTGTGGT
R G D N K Y S Q K V N Y T D L L F I C G
AAATAATGATAAATTAACAATATGTAATTTTTATGAGTAGTAAAAAATATTATTATTA
K *
TAAAACATATATGTGTATAAAAATGATAATAATAGTTATTTTTTAATGTGTTAAAAATA

```

Figura 1.2.3 - Secuencia de la proteína EP153R y secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos. Los residuos correspondientes a la región transmembrana están marcados en azul. Los posibles sitios de N-glicosilación y fosforilación aparecen marcados en rojo y verde respectivamente, y el motivo RGD en negrita.

darias similares y estabilizadas por la presencia de cuatro cisteínas responsables de la formación de dos puentes disulfuro intramoleculares, y que se encuentran perfectamente conservados en la proteína viral.

Además del dominio tipo lectina C, la secuencia EP153R revela un motivo tipo RGD (Arg-Gly-Asp) de adhesión celular, y una homología significativa con la región N-terminal de moléculas CD44 (molécula implicada en la activación de células T y adhesión de leucocitos), lo que justifica el papel observado en el gen EP153R en el proceso de hemadsorción inducido en células infectadas por VPPA: el gen viral homólogo a CD2 celular (EP402R) es el responsable de dicho proceso de adhesión de eritrocitos de cerdo a las células infectadas, y la función de la lectina viral podría estar relacionada (debido a su homología con CD44), con la estabilización de la interacción entre el CD2 inducido por el virus y su correspondiente receptor en el eritrocito del cerdo (Galindo et al., 2000).

Capítulo 2

Objetivos

1. Análisis del efecto de la lectina C del VPPA sobre el proceso apoptótico, tanto en el contexto de la infección viral como en expresión heteróloga.
2. Estudio del mecanismo que opera en la modulación de apoptosis por la lectina C del VPPA: análisis del efecto del gen sobre diferentes componentes involucrados en la cascada apoptótica, y en particular sobre la proteína p53, por su capacidad para inducir apoptosis y su función moduladora del ciclo celular.
3. Modelización de la estructura secundaria del dominio lectina del gen EP153R del VPPA y estudio de su posible interacción con moléculas de MHC-I.
4. Análisis de la modulación de la expresión de moléculas de MHC-I por la lectina viral en diferentes sistemas animales (porcino, murino y humano) y sus posibles consecuencias sobre la citotoxicidad de células NK.

Capítulo 3

Materiales y métodos

3.1 CÉLULAS Y VIRUS

Las líneas celulares establecidas utilizadas en este trabajo fueron obtenidas originariamente de la American Type Culture Collection. Los macrófagos alveolares de cerdo se prepararon a partir de lavados pulmonares, almacenándose como se ha descrito por Carrascosa et al., 1982. Las células fueron cultivadas a 37° C en medio DMEM (Dulbeccot's Modified Eagle Medium) suplementado bien con suero de ternera recién nacida (ST) al 5 %, en el caso de las células Vero, con suero fetal de ternera (SF) al 5 % en el cultivo de células COS ó BHK, o con suero de cerdo homólogo (SC) al 10 % para el cultivo de macrófagos porcinos. También se utilizó el medio RPMI 1640, suplementado con SF al 5 ó 10 %, en el cultivo de células Raw y Jurkat, respectivamente, o suplementado con suero humano (SH) al 20 % e IL-2 (300 u/ml), cuando se cultivaron células NKL (Tabla 4.2.1).

Los virus utilizados fueron el aislado **BA71V del VPPA** (adaptado a células Vero), que fue propagado y titulado por plaqueo en células Vero (Enjuanes et al., 1976), **un mutante de delección ΔEP153R**, generado a partir de BA71V y carente del gen EP153R, construido previamente en nuestro laboratorio (Galindo et al., 2000), y el **virus Vaccinia (VV)**, un virus ADN que pertenece a la familia de los Poxvirus. En este

Cuadro 3.1.1 - Cultivos celulares utilizados en el presente trabajo.

CÉLULA	ESPECIE	TEJIDO	TIPO
Vero	Mono verde africano	Riñón	Línea establecida
COS	Mono verde africano	Riñón	Línea establecida
MAC	Cerdo	Macrófagos alveolares	Cultivo primario
Jurkat	Humano	Linfoblastoma	Línea establecida
NKL	Humano	Células Natural Killer	Línea establecida
Raw	Murino	Macrófagos	Línea establecida

estudio también se utilizó la colección de **aislados de campo del VPPA** disponible en el laboratorio, así como otros dos virus recombinantes de VPPA: **vCD2** y **v72GUS**; el primero de ellos se caracteriza por ser un mutante de delección para el gen viral homólogo del CD2 y el segundo por llevar el gen gus A bajo el control del promotor viral p72.4 que está insertado en el locus de la timidina kinasa.

Los cultivos celulares se infectaron con una mdi (multiplicidad de infección) de 3 ufp/cel y después de 2 h de adsorción se retiró el inóculo y se repuso DMEM 2 % SF (ó DMEM 10 % SC en el caso de los cultivos de macrófagos, ó RPMI 5 % ó 10 % SF cuando se infectaron células Raw ó Jurkat), manteniendo el cultivo a 37° C hasta su recogida a los tiempos indicados.

3.2 TRANSFECCIÓN

El gen viral EP153R fue clonado en los plásmidos pcDNA3.1 Myc/His (Invitrogen) y pEGFP-C2 (Bio-sciences) para su utilización en la transfección de distintas líneas celulares. También se clonaron en el plásmido pcDNA 3.1 Myc/his diferentes contrucciones derivadas del gen EP153R, como el segmento correspondiente al dominio lectina C y el mismo segmento con una delección en los últimos cinco aminoácidos del extremo carboxilo (que incluye una cisteína en la posición 151 implicada en el puente disulfuro intramolecular con la cadena $\alpha 1$).

Las monocapas de células preconfluentes (10^6 células Vero, COS, Raw o Jurkat por placa de 6 cm de diámetro) se transfectaron con 2 μ g de pcDNA 3.1 (ó pEGFP-C2) ó con 2 μ g de pcDNA3.1-EP153R (ó pEGFP-C2-EP153R, pcDNA3.1-lectina C ó pcDNA3.1-lectina C mut), usando 12 μ l de lipofectamina (2 mg/ml) (Invitrogen) por placa. Se incubaron durante 48 h antes de subcultivar en una dilución 1/10 a placas de 10 cm de diámetro, aplicando al día siguiente la selección por antibióticos (500 μ g de Geneticina por ml) (G418, Sigma). Las células se mantuvieron durante quince días, renovando el medio con antibiótico de selección cada tres días, hasta que aparecieron las primeras colonias. Con este proceso se consiguieron líneas transfectadas establemente, aunque también se realizaron transfecciones transitorias, siguiendo el mismo protocolo y omitiendo únicamente el proceso de selección.

La comprobación de la expresión del gen EP153R en las células transfectadas se realizó mediante análisis por RT-PCR.

3.3 AISLAMIENTO DE ARN Y RTPCR

El aislamiento del ARN procedente de los cultivos de células Vero, COS, Raw y Jurkat utilizados en los experimentos de expresión heteróloga del gen EP153R, se realizó con Trizol (Invitrogen) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. El ARN total se transcribió reversamente a una cadena sencilla de ADNc, mediante el uso del sistema Revertaid H Minus First Strand cDNA síntesis kit (Fermentas), según instrucciones del proveedor, utilizando 1 μ g de ARN de cada muestra. El ADN fue amplificado por PCR con la enzima Amplitaq DNA polimerasa (Roche) y los siguientes cebadores:

EP153R 5': 5'-ATG TAT TTT AAG AAA AAA TAC ATC GG- 3'

EP153R 3': 5'-TTA TTT ACC ACA AAT AAA TAA TAA ATC- 3'

siguiendo el protocolo descrito por Innis et al., 1990. Los resultados se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa de concentración 1 %, conteniendo Bromuro de Etidio 0.005 %, siguiendo procedimiento estandar como describen Sambrook et al., 1989.

3.4 WESTERN BLOTTING

Las células fueron lavadas con PBS y lisadas con buffer TNT (Tris HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 200 mM Tritón X-100 1 %), suplementado, inmediatamente antes del uso, con un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche). La concentración de proteínas fue determinada por el método del ácido bicinchonínico (BCA), usando el BCA Protein Assay Reagent de Pierce. Las muestras (30 μ g de proteína) se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 14 % en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS), siendo resuspendidas en tampón de disociación Laemmli (Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, SDS 2 %, DTT 0,1 M y glicerol 10 %), y hervidas durante 3 min antes de ser cargadas en el gel. Una vez separadas electroforéticamente, las proteínas se transfirieron a una membrana de Immobilon (Millipore), utilizando el sistema Mini Protean II de Biorad de acuerdo con las condiciones recomendadas por la casa comercial. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (ver Tabla 2) en TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 y NaCl 150 mM) con 1 % de leche desnatada en polvo (agente bloqueante), durante 12 h a 4° C, para después incubarlas con una dilución 1/1000 del anticuerpo secundario (Pharmacia) anti-especie correspondiente (conejo o ratón) conjugado con peroxidasa, visualizando las bandas positivas por autoradiografía con el reactivo Enhanced Chemiluminiscence (ECL) de Pharmacia ó Amersham.

3.5 ANÁLISIS DE APOPTOSIS

3.5.1. DETECCIÓN DEL FRAGMENTO DE 17 KDA DE CASPASA-3

La transición de la procaspasa-3 (32 kDa) a su forma activa de 17 kDa fue analizada en extractos celulares, obtenidos como hemos indicado anteriormente, detectando específicamente la banda con un anticuerpo policlonal dirigido contra caspasa-3 humana recombinante (anticaspasa-3, Ab4, Neomarkers, dilución 1/400). La cuantificación de las bandas de proteínas fue realizada por densitometría (Image Quant y TINA) en autoradiografías reveladas después de la exposición con ECL (Pharmacia ó Amersham).

3.5.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE CASPASAS

Los extractos celulares (a concentración 1 mg de proteína por ml) fueron diluidos cinco veces con solución tampón (HEPES 25 mM [pH 7,5], 3-[(3-cloramidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato[CHAPS] 0,1 %, sacarosa 10 %, ditiotreitól 10 mM y ovoalbúmina 0,1 mg/ml) y se incubaron a 37° C durante 2 h con una concentración 10 μ M de sustratos fluorescentes específicos para las caspasas 3, 6 y 8. La reacción se detuvo por la adición de buffer HPLC (H₂O-acetonitrilo 75/25, ácido tricloroacético 0,1 %). La fluorescencia del sustrato fue determinada por HPLC (338 nm [excitación] y 455 nm [emisión]).

3.5.3. CITOMETRÍA DE FLUJO

I. La tinción con Anexina V-FITC se utiliza para identificar apoptosis en estadios tempranos, por el reconocimiento de células en donde la fosfatidilserina se ha translocado del interior al exterior de la membrana plasmática. Hemos usado “Annexin V-FICT apoptosis detection kit” (BD Pharmingen) que marca células en conjunción con el colorante vital yoduro de propidio (IP), para distinguir entre fases tempranas de apoptosis (anexina +) y muerte (células marcadas tanto con anexina como con yoduro de propidio). Monocapas de cultivos de células Vero se marcaron con Anexina-V-FICT e yoduro de propidio, siguiendo el protocolo de la casa comercial, después las células se resuspendieron por tripsinización para analizar el porcentaje de células que se marcaron positivamente con Anexina V y negativamente con IP, en un citómetro de flujo BD Biosciences.

II. La medición del contenido de ADN fue realizada en células resuspendidas por tripsinización, permeabilizadas con etanol 70 % e incubadas durante 30 min a temperatura ambiente con IP (Sigma, 50 $\mu\text{g/ml}$ en Nonidet P40 0,3 %, citrato de sodio 0,1 % y 20 $\mu\text{g/ml}$ de RNAsa) antes de ser analizadas por citometría de flujo. El porcentaje de muerte celular total fue determinado en el rango hipodiploide (valor M1) del ciclo celular, que corresponde al conjunto de población celular apoptótica y necrótica.

3.6 EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS EN LA MEMBRANA CELULAR

Para el análisis de la expresión de antígenos de histocompatibilidad en la membrana celular, cultivos de células Raw ó Jurkat se lavaron con PBS-Staining (PBS 1X; BSA 1 %; NaN₃ 0,01 %; SF 1 %; EDTA 5 mM), e incubaron durante 10 min a 4° C con IgG porcina para el bloqueo de los receptores Fc. Las células se volvieron a lavar con PBS-Staining, antes de marcar con el anticuerpo específico de la molécula analizada (MHC-I murino de Serotec, a una dilución 1/100 en PBS-Staining, ó W632, sobrenadante de hibridoma cedido amablemente por el Dr. López de Castro del CBMSO, a una concentración de 50 $\mu\text{l}/10^6$ cel, durante 20 min a 4° C y en oscuridad. Tras una incubación con el anticuerpo secundario (anti-mouse IgG, alexa 488, de Molecular Probes, a dilución 1/500) en las mismas condiciones que el primario, las células se volvieron a lavar y se resuspendieron en PBS-Staining, manteniéndose a 4° C en oscuridad hasta su análisis en el citómetro de flujo, previa adición de IP (1 $\mu\text{g/ml}$).

3.7 ACTIVIDAD TRANSACTIVANTE

El plásmido pGAL4-p53 contiene la secuencia completa de p53, fusionada al dominio de unión a ADN de GAL4; el plásmido reportero pGAL4-luc contiene cinco dominios consenso de ADN específicos para la unión del factor transcripcional GAL4 de levaduras, fusionados con el gen reportero luciferasa, y fue generado como se describe por Minden et al.,1995.

Los cultivos celulares fueron transfectados con el plásmido pGAL4-p53 (100 ng /10⁶ cel) junto con el plásmido pGAL4-luc (250 ng/10⁶ cel), usando Lipofectamina (Invitrogen), como se ha descrito anteriormente. Después de los tratamientos indicados (estaurosporina o infección por VPPA), los extractos celulares se recogieron en el tampón de lisis LCR (Luciferase Assay System, Promega), según el protocolo de la casa comercial. Las muestras obtenidas se analizaron en un luminómetro Monolight-2010 (Analitical Luminiscence Laboratory), expresando los resultados como unidades de luminiscencia después de normalizar la concentración de proteína, determinada por el método de BCA (Pierce).

3.8 ENSAYO DE UNIÓN A ADN

Se generaron oligonucleótidos de doble hebra, marcados con biotina, que corresponden con la secuencia consenso para sitios de unión de p53 al ADN. Los oligonucleótidos utilizados fueron:

p53 BS reverse:

5'-CAGCATGCTTAGACATGTTC-3'-biot

p53 BS forward:

5'-GAACATGTCTAAGCATGCTG-3'

Los oligonucleótidos se resuspendieron a una concentración de $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ en tampón STE pH 8,0 (Tris HCl 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 10 mM), se hibridaron ($100 \mu\text{g}$ de cada uno de ellos) durante 5 min a 94°C , y se dejaron enfriar a temperatura ambiente antes de utilizarlos.

El ensayo de unión se llevó a cabo mezclando $200 \mu\text{g}$ de extracto de proteína total en tampón de lisis (HEPES pH 7,6 20 mM, NaCl 400 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM), $2 \mu\text{g}$ de sonda marcada con biotina, y $20 \mu\text{l}$ de partículas de agarosa recubiertas de estreptavidina. La mezcla fue incubada una hora a temperatura ambiente, con agitación en noria. Posteriormente las partículas de agarosa fueron centrifugadas y lavadas tres veces con PBS frío. Las proteínas unidas a la sonda fueron eluidas añadiendo tampón de carga Laemmli, separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 %, y transferidas por western blotting, antes de revelar con un anticuerpo específico contra p53 (1/500, Santa Cruz Biotecnología) y el sistema ECL de detección de Pharmacia ó Amersham.

3.9 ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL

Analizamos la actividad transcripcional de la proteína p53 y de la proteína Mdm2. El plásmido reportero p53RE-luc contiene catorce motivos de unión consenso para la proteína p53 (Stratagene), sin embargo, el plásmido reportero pMdm2-luc contiene motivos de unión consenso para el promotor de Mdm2. Los cultivos celulares fueron transfectados con el plásmido p53RE-luc o con pMdm2-luc (100 ng por 10^6 cel) usando Lipofectamina (Invitrogen), como se ha descrito anteriormente. Después de los tratamientos indicados (estaurosporina o infección por VPPA), los extractos celulares se recogieron en tampón de lisis LCR (Luciferase Assay System, Promega), según el protocolo de la casa comercial. Las muestras obtenidas se analizaron en un luminómetro Monolight-2010 (Analytical Luminiscence Laboratory), expresando los resultados como unidades de luminiscencia después de normalizar la concentración de

proteína, determinada por el método BCA.

3.10 INMUNOPRECIPITACIÓN Y MARCAJE RADIACTIVO

Los cultivos de macrófagos de cerdo fueron infectados con el virus parental BA71V ó con el mutante de delección Δ EP153R con una mdi de 6 ufp/cel, y marcados a diferentes tiempos post-infección (0, 4, 8, 13, 18, 24 h) con 50 μ Ci/ml de [35 S]-metionina-cisteína (1200 Ci/mmol; Promix Amersham) en medio libre de cisteína-metionina durante 2 h. Los extractos se recogieron en tampón de disociación (NP40 1 %, SDS 0,3 % en PBS) complementado con una mezcla de inhibidores de proteasa (Roche), y se incubaron con un anticuerpo específico de SLA-I (BL6H4, 4B7/8 ó JM1E3, de Biovet-UCO) durante 12 h a 4° C. Posteriormente se añadió una suspensión de proteína A-sefarosa al 16 % en PBS y se incubó 2 h a la misma temperatura. Todas las incubaciones mencionadas se realizaron con agitación en noria. Los inmunocomplejos se recogieron por centrifugación y se lavaron cuatro veces con tampón de lavado (NP40 0,05 % y BSA 0,1 % en PBS), y una vez con el mismo tampón de lavado sin BSA sobre un colchón de sacarosa al 20 %. Las muestras se solubilizaron en tampón de disociación Laemmli a 95° C y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 14 % en presencia de SDS. Las bandas de proteína radiactiva se visualizaron por autoradiografía en los geles fijados con ácido acético 7 % e incubados con el amplificador de señal Amplify de Amersham.

3.11 INMUNOFLUORESCENCIA

Las células Vero cultivadas en cubre-objetos (2×10^5 cel/cm²) e infectadas con el virus parental o con el mutante de delección se incubaron con Mitotracker Red CM-H2 Ros (Molecular Probes) a una concentración 1 μ M, para marcar las mitocondrias celulares. El cultivo fue lavado (3 veces) con PBS y fijado con metanol 99,8 % durante 15 min a -20° C; tras rehidratadar dos veces con PBS se bloqueó con 1 % BSA en PBS (BSA/PBS) durante 10 min a temperatura ambiente antes de incubar durante 2 h con un anticuerpo específico para p53 (Santa Cruz Biotecnología) diluido 1/20 en BSA/PBS. Las muestras se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario (Alexa 488 goat anti-rabbit, Molecular Probes, dil 1/500) durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad.

En el caso de las células tranfectadas con la proteína EP153R fusionada a la proteína fluorescente GFP, se siguió el mismo procedimiento pero se incubó con el anticuerpo α -PDI (Sigma-Aldrich) (marcador del RE), diluido 1/500 en BSA/PBS durante 2 h. Las muestras se lavaron en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario (Alexa 488 goat anti-mouse, Molecular Probes, 1/500). Finalmente las células fueron lavadas con PBS, agua destilada y etanol y se montaron en porta-objetos, utilizando el medio de montaje Mowiol (Dabco). En muchas ocasiones este medio de montaje contenía DAPI (1 μ g/ml, Calbiochem), un marcador específico de ADN. La visualización de las células se realizó en un sistema

Confocal Microradiance (Bio-Rad) acoplado a un microscopio vertical AXioskop2 (Zeiss). Las imágenes obtenidas en el confocal fueron digitalizadas, procesadas y organizadas con los programas Lasershap 2000 v.4, Adobe Photoshop 7.0 y Microsoft Power Point SP-2.

3.12 CLONAJE Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEIDOS

3.12.1. CLONAJE PCDNA 3.1 MYC/ HIS EP153R

El gen que codifica la proteína EP153R se amplificó por PCR utilizando dos oligonucleótidos que incluían los sitios de restricción BamH1 y EcoRI respectivamente, para facilitar el clonaje del producto de la amplificación, que se realizó en el plásmido pcDNA 3.1 Myc/His.

Los oligonucleótidos utilizados fueron:

5'-**CGCGGATCC**ATGTATTTTAAGAAAAAATAC-3'

5'-CGCG**AATTC**ATTATTTACCACAAATAAAT-3'

En negrita se indican las dianas de restricción.

3.12.2. CLONAJE PEGFP-C2 EP153R

El gen que codifica la proteína EP15R se amplificó por PCR utilizando dos oligonucleótidos que incluyen los sitios de restricción Hinde III y EcoRI respectivamente, para facilitar el clonaje del producto de la amplificación, que se realizó en el plásmido pEGFP-C2.

Los oligonucleótidos utilizados fueron:

5'-CGCA**AGCTT**GATGTATTTTAAGAAAAAATACATCGG-3'

5'-CGCG**AATTC**TCTTATTTACCACAAATAGATAATAA-3'

3.12.3. CLONAJE PCDNA B (MYC/HIS)- LECTIN C

Para tratar de adscribir los efectos producidos por el gen EP153R con regiones concretas de la proteína, se generaron dos construcciones derivadas del gen viral. En la primera (W51-K153) se eliminó la parte intracelular y el segmento transmembrana, quedando íntegro el dominio lectina. La segunda (W51-L148) correspondería al mismo fragmento de lectina C pero con una delección en el extremo carboxilo (secuencia **FICGK**), eliminando de esta manera la última cisteína (posición 151) de la secuencia de EP153R,

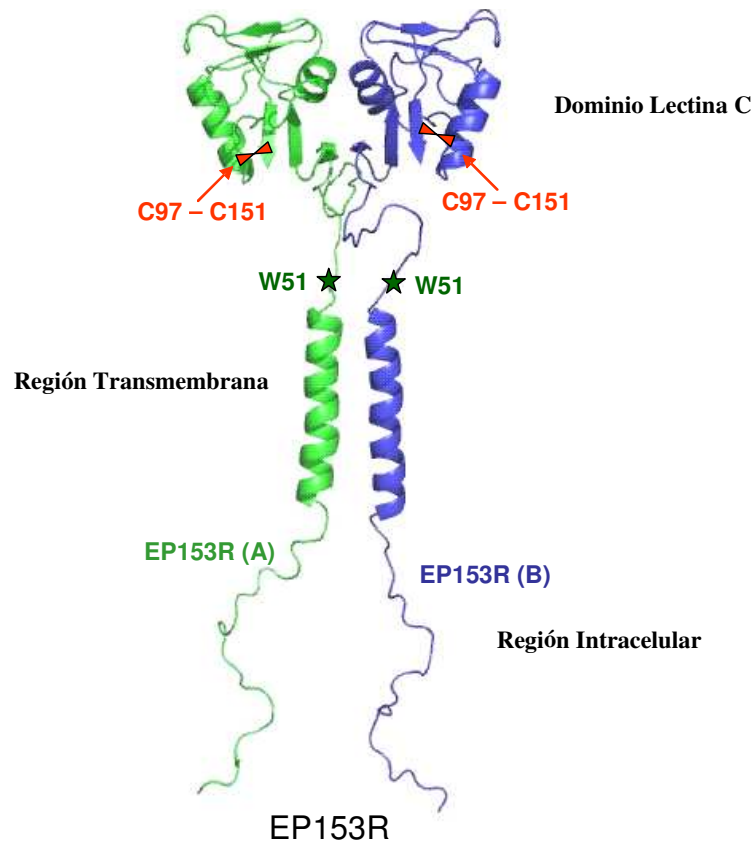


Figura 3.12.1 - Homodímero de EP153R. En esta representación se indican las distintas regiones de EP153R (intracelular, transmembrana y extracelular, que corresponde al dominio lectina C) y las cisteínas implicadas en el puente disulfuro, que se elimina en la construcción W51-L148.

implicada en un puente disulfuro con una cisteína (posición 97) de la primera α -hélice, lo que podría suponer un notable cambio conformacional en el dominio lectina (Figura 3.12.1)

Los fragmentos utilizados para realizar las construcciones, correspondientes tanto a la secuencia íntegra de lectina C como a la mutada, se amplificaron por PCR a partir de la construcción pRSet-Lectin C clon 4.2, utilizando los oligonucleótidos que incluyen los sitios de restricción de las enzimas BamHI y EcoRI.

Los oligonucleótidos utilizados para la construcción pcDNA 3.1 Myc/His-Lectina C fueron:

5'-CGCGGATCCATGTGGGATAATTATATAAAA-3'

5'-CGCGAATTCATTTACCACAAATAAAA-3'.

Los oligonucleótidos utilizados para la construcción pcDNA 3.1 Myc/His-C151 fueron:

5'-CGCGGATCCATGTGGGATAATTATATAAAA-3'

5' -CGCGAATTCCATAATAAATCTGTAT-3'

En negrita se indican las dianas de restricción.

En cada uno de los clonajes, la PCR se llevó a cabo con la Vent polimerasa (Biolabs), enzima capaz de corregir errores, siguiendo el protocolo descrito por Innis et al., 1990: se utilizaron en cada ensayo 0,2 μ g de ADN que se llevaron hasta un volumen de 50 μ l de mezcla de reacción PCR: MgCl₂ 1 mM (Roche), 1X PCR Buffer (Roche), 250 ng de cada oligonucleótido cebador (Isogen), dNTPs (Invitrogen) y 2 unidades de AmpliTaq DNA polymerase (Roche), todo ello diluido en agua miliQ estéril. Las muestras fueron incubadas durante 30 ciclos en un termociclador Robocycler 40 (Stratagene) con un programa de PCR estandar, con la temperatura de hibridación recomendada para cada oligonucleótido. Los resultados se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa de concentración 1 %, conteniendo Bromuro de Etidio 0,005 %, siguiendo el procedimiento estandar descrito por Sambrook et al., 1989. El fragmento correspondiente al producto de amplificación se recortó del gel de agarosa sobre un transiluminador de luz UV y se purificó el ADN mediante el uso del sistema Gel Extraction Kit (Quiagen), siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

La digestión de ADN del fragmento o del vector se llevó a cabo con endonucleasas de restricción en los tampones y condiciones recomendadas por la empresa proveedora (New England Biolabs y Roche).

La relación unidades de enzima/ μ g de ADN a digerir fue generalmente mayor de 2 y el tiempo de incubación entre 2 y 3 h con el fin de asegurar una digestión total. En el caso de digestiones dobles, si los tampones y las condiciones de incubación eran compatibles para las dos enzimas, se realizaron simultáneamente. En caso contrario y/o para asegurarnos una restricción adecuada, tras la primera digestión y antes del tratamiento con la segunda enzima, el ADN se extrajo con el sistema MICROCON (siguiendo protocolo recomendado por la casa comercial, Millipore). Finalizada la digestión y antes de someter la muestra a electroforesis se añadió 0,1 volúmenes de tampón de muestra (EDTA 100 mM, glicerol 50 % y azul de bromofenol 2 %). La electroforesis de ADN se realizó en geles de agarosa de concentración 1 %, conteniendo bromuro de etidio al 0,005 %, siguiendo procedimiento estándar como describen Sambrook et al., 1989.

Para aislar el fragmento de restricción de interés del gel de agarosa, se cortó la banda correspondiente sobre un transiluminador de luz UV y se purificó el ADN mediante el uso del sistema Gel Extraction Kit (Quiagen), siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

La reacción de ligación se realizó con la ADN ligasa del bacteriófago T4 (Boehringer) como describen Sambrook et al., 1989. Previamente a la ligación de fragmentos de ADN se llevó a cabo la eliminación del grupo fosfato 5' terminal del vector plasmídico por tratamiento con fosfatasa alcalina de gamba (SAP de Boehringer). El ADN plasmídico, producto de la ligación se transformó en células competentes E.coli, siguiendo los métodos de Hanahan, 1985 y de Inoue et al., 1990: se descongelaron las células competentes, y se añadió la solución de plásmido ligado, para someterlas a un choque térmico; se man-

tuvo 30 min en hielo, después se dió un pulso de 42° C durante 30 seg, para después mantenerlo a 4° C durante 2 min. Se llevó a un volumen de 0,5 ml de medio LB, y se incubó a 37° C durante 1 h con agitación. Se sembraron en placas de medio LB con el antibiótico cuyo gen de resistencia portaba el plásmido, en esta ocasión ampicilina (Sigma, 150 µg/ml), incubándolas una noche a 37° C; posteriormente se seleccionaron colonias positivas, y se comprobaron por secuenciación. De las colonias seleccionadas se prepararon stocks en glicerol para almacenar, y se utilizaron para purificar ADN plasmídico por el método Wizard Plus SV minipreps de Promega.

3.13 MODELIZACIÓN BIOINFORMÁTICA

Los modelos estructurales para las moléculas de EP153R y SLA-I, fueron construidos usando procedimientos de modelización por homología. Las secuencias similares a EP153R de VPPA y SLA-I porcino fueron obtenidas de una base de datos por medio del programa **Blast** (Altschul et al., 1990), y alineadas con los programas **ClustalW** (Thompson et al., 1994) and **TCOFFEE** (Notredame et al., 2000).

La estructura a partir de la secuencia alineada fue realizada usando el servidor **Phyre**, una versión mejorada de la versión de **3D-PSSM** (Kelley et al., 2000).

Las estructuras cristalográficas del dímero CD69 humano (número de acceso a PDB(Protein Data Bank): 1E8I; Llera et al., 2001), del monómero CD94 humano(1B6E; Boyington et al., 1999) y del receptor murino de células NK, el dímero Ly49A (1QO3 ; Tormo et al., 1999) fueron estructuralmente alineados usando el programa **Dali** (Holm and Park, 2000), antes de ser usados como moldes para la construcción de los modelos tridimensionales de los dominios tipo lectina C del dímero EP153R. La estructura de la molécula porcina SLA-I fue construida usando como modelo la molécula murina MHC-I (PDB entry 1S7U; Velloso et al., 2004). Las estructuras tridimensional tanto de EP153R como SLA-I se construyeron usando el servidor **SWISS-MODEL** (Guex et al., 1999; Peitsch, 1999; Schwede et al., 2003), facilitado en <http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>, su calidad estructural fue comprobada con la aplicación **WHAT-CHECK** (Hooft et al., 1996) obtenido del programa **WHAT IF** (Vriend, 1990).

Tanto el modelo de interacción entre el dímero de EP153R y la molécula SLA-I como la localización y determinación de los aminoácidos de las caras internas de ambas moléculas, que contactarían con cada una de las regiones enfrentadas también fueron construidos usando procedimientos de modelización por homología, utilizando como modelo la interacción entre el receptor de células NK, NKG2D y la molécula de MHC-I, ULBP3 (número de acceso a PDB (Protein Data Bank): 1KGC; Radaev et al., 2001). Y finalmente por medio del programa **Deep VieW** (Guex and Peitsch, 1997), se optimizó la geometría y

los ensamblajes tanto de las estructuras individuales como del complejo de interacción.

3.14 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Las células Jurkat, que actuarán como células diana fueron sembradas a una concentración de $10^6/0,1$ ml de medio RPMI 1640, e incubadas con $100 \mu\text{Ci}$ de ^{51}Cr (Amershan), durante 2h a 37°C , después se lavaron y se resuspendieron en el medio anteriormente usado.

El ensayo lítico se realizó en una placa de 96 pocillos con fondo en forma de “U” (Falcon), donde se sembraron las células efectoras, células de la línea NKL (línea establecida de células Natural Killer), antes de añadir las células diana (10^4 cel/ pocillo), en diferentes proporciones de célula efectora (E)/ célula diana (T) (2:1, 5:1, 10:1, 20:1), en un volumen de reacción final de 0,2 ml. Tras una incubación de 4 h, los cultivos se centrifugaron y se determinó en un contador γ la radioactividad liberada al medio extracelular, como medida de la lisis de células diana marcadas por células NK efectoras.

Como control de lisis espontánea se llevó una muestra de células diana incubadas en ausencia de NKL, y otra muestra similar lisada con detergente (Nonidet P40 0,05 %) permitió la cuantificación de la liberación máxima de ^{51}Cr .

Para calcular el porcentaje de lisis específica se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ LISIS} = \frac{(\text{cpm muestra} - \text{cpm esp.})}{(\text{cpm max.} - \text{cpm esp.})} \cdot 100, \text{ donde}$$

cpm muestra = radiactividad determinada en el sobrenadante de cada muestra

cpm esp. = radiactividad liberada por lisis espontánea

cpm max. = radiactividad liberada por lisis con detergente

3.15 ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS

Cuadro 3.15.1 - Anticuerpos utilizados en el presente trabajo. CF (Citometría de Flujo), IF (Inmunofluorescencia), IP (Inmunoprecipitación), WB (Western Blot).

Especificidad frente	Nombre anticuerpo	Dilución de trabajo	Casa Comercial	Número de catálogo
Akt humano	Anti-Akt	1/100 (WB)	MBL	JM3247100
Bad humano	Bad (H-168)	1/200 (WB)	Santa Cruz Biotechnology	sc-7869
Bax humano	Bax (N-20)	1/200 (WB)	Santa Cruz Biotechnology	sc-493
Bcl-2 humano	Bcl-2 (100)	1/200 (WB)	Santa Cruz Biotechnology	sc-509
Caspasa3 porcino	Caspasa-3 (CPP32) Ab-4	1/400 (WB)	Neomarkers	RB-1197P0
Mdm2 humano	Mdm2 (SMP14)	1/200 (WB)	Santa Cruz Biotechnology	sc-965
MHC-I humano	W632 (SB hibridoma)	50 μ l/10 ⁶ cel	(CF) Cedido por Dr. López de Castro	
MHC-I murino	MHC-I (Monomorphic)	1/100 (CF)	Serotec	MCA2189
p53 humano	p53 (FL-393)	1/500 (WB) 1/20 (IF)	Santa Cruz Biotechnology	sc-6243
p21 murino	Anti-p21-WAF1 (Ab-6)	1/200 (WB)	Calbiochem	OP79
PDI (Proteína del RE) humano	Anti-PDI	1/20 (IF)	Sigma-Aldrich	P7496
SLA-I	BL6H4 (SB hibridoma)	1/2 (IP)	Biovet-UCO	

Capítulo 4

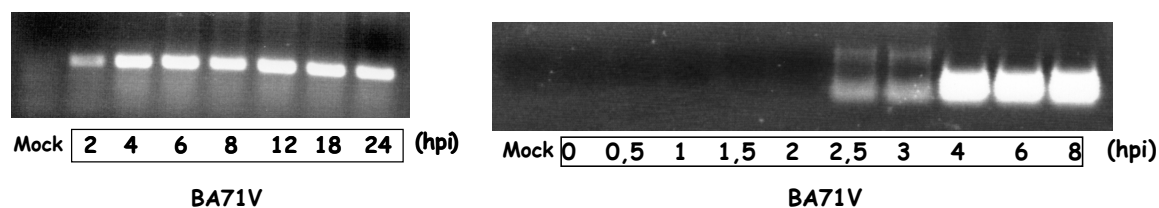
Resultados

El gen EP153R del Virus de la Peste Porcina Africana (VPPA) está localizado en el fragmento EcoRI Et' del genoma viral y codifica una proteína de 153 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 18 kDa y una región homóloga a lectinas tipo C (Yañez et al., 1995). La secuencia completa del gen EP153R se muestra en la Figura 1.2.3, donde se puede observar, entre otras características, la presencia de ocho posibles sitios de N-glicosilación, tres de fosforilación y dos de miristoilación, además de un motivo RGD de adhesión celular.

4.1 EXPRESIÓN DE GEN EP153R

4.1.1. EL GEN EP153R SE EXPRESA A TIEMPOS TEMPRANOS EN EL CICLO DE INFECCIÓN VIRAL

Datos previos indicaban que la proteína pEP153R se podía detectar desde tiempos relativamente tempranos en la infección (6 hpi) aumentando su expresión durante la fase tardía del ciclo viral. Para determinar más concretamente el inicio de la transcripción del gen EP153R, analizamos por RT-PCR la presencia de ARNm específico de la lectina viral, en infecciones convencionales (asincrónicas, Figura 4.1.1A) o sincrónicas (con adsorción del virus a 4° C, Figura 4.1.1B) de células Vero infectadas con el virus parental BA71V (aislado de VPPA adaptado a células Vero). Los resultados encontrados demuestran que el gen EP153R se transcribe desde 2-2,5 hpi, lo que posibilita la acción de la lectina viral desde tiempos muy tempranos en la infección.



(a) *Expresión del gen EP153R en infección asincrónica de VPPA. Las células Vero fueron incubadas con el virus BA71V a una mdi de 3 ufp/cel, en medio DMEM 2% SF durante 2 h a 37°C para la adsorción viral. Tras retirar el inóculo y reponer medio fresco se continuó la incubación a 37°C, recogiendo extractos a los tiempos indicados para analizarlos por RT-PCR.*

(b) *Expresión del gen EP153R en infección sincrónica de VPPA. Las células Vero fueron incubadas con el virus BA71V a una mdi de 3 ufp/cel, en medio DMEM 2% SF tamponado con HEPES 25 mM durante 2 h a 4°C para la adsorción viral. Tras retirar el inóculo y reponer medio fresco se continuó la incubación a 37°C, recogiendo extractos a los tiempos indicados para analizarlos por RT-PCR.*

Figura 4.1.1 - Expresión del gen EP153R en infección sincrónica o asincrónica de VPPA.

4.1.2. EL GEN EP153R SE TRANSCRIBE EN NUMEROSOS AISLADOS DE CAMPO DEL VPPA

Con el fin de obtener información sobre la importancia del gen EP153R en el contexto de la infección por VPPA en la naturaleza, se realizó un estudio de la expresión del gen en diferentes aislados de campo del VPPA. El análisis se llevó a cabo en macrófagos alveolares de cerdo infectados con los diferentes aislados virales, para después determinar por RT-PCR la expresión del gen EP153R en cada una de las infecciones realizadas, llevando como control positivo de infección viral el ensayo por RT-PCR de la expresión de la proteína mayoritaria de la cápsida del VPPA (p72). Como se muestra en la Figura 4.1.2, se confirmó la expresión del gen EP153R en, al menos, dieciséis de los veintidós aislados virales ensayados. Es importante destacar la posibilidad de que algunos de los datos negativos se correspondan con errores de reconocimiento de los cebadores específicos del gen utilizados en el ensayo de RT-PCR, en los casos en los que la secuencia del gen en el aislado considerado difiera de la secuencia modelo.

4.1.3. INACTIVACIÓN DEL GEN EP153R

Una de las estrategias más eficaces para el estudio del papel funcional de un gen consiste en la obtención de virus mutantes en los que el gen que se está analizando ha sido eliminado total o parcialmente. Por eso nos resultó especialmente útil la disponibilidad de un mutante de delección del gen EP153R (generado anteriormente en el laboratorio) en el aislado BA71V. El hecho de haber podido generar un virus como el Δ EP153R viable e infectivo demuestra que el gen EP153R no es esencial para la replicación del virus en cultivo. Estudios preliminares realizados en el laboratorio (Galindo et al., 2000), demostraron que la cinética de producción y el rendimiento viral de BA71V y Δ EP153R eran similares, tanto en células

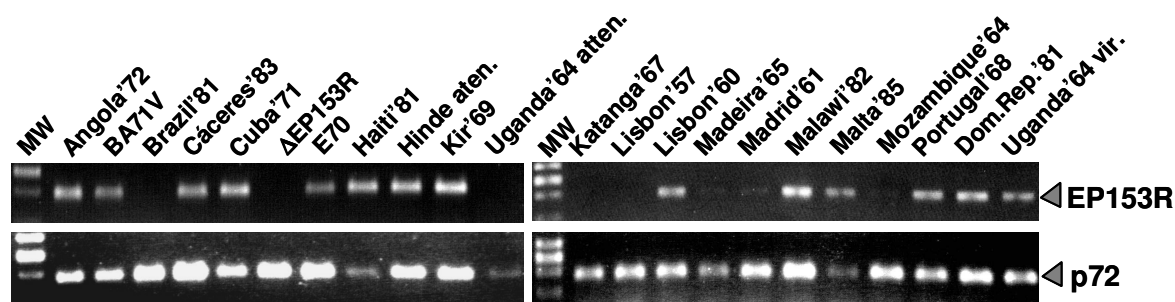


Figura 4.1.2 - Expresión del ARNm de EP153R y p72 en macrófagos de cerdo infectados con diferentes aislados de VPPA. Los cultivos de macrófagos alveolares fueron infectados a *mdi* 2 *ufp/cel* con cada uno de los aislados virales de campo de VPPA indicados, y recogidos a las 18 hpi para analizarlos por RTPCR. El ARN total fue retrotranscrito a ADNc, para después amplificarlo por PCR con los oligonucleótidos específicos para los genes virales EP153R y p72.

Vero como en macrófagos alveolares de cerdo, y sólo se detectaron diferencias cuando se titularon los virus mediante hemadsorción, observándose una deficiente formación de rosetas en el caso del virus recombinante.

4.2 EL GEN EP153R EN EL PROCESO APOPTÓTICO

4.2.1. PAPEL DE EP153R EN EL CICLO DE INFECCIÓN VIRAL

Estudios previos en el laboratorio habían demostrado que la infección de las células Vero por VPPA inducían el proceso de muerte celular programada en la célula infectada, en una etapa posterior a la internalización del virus, en ausencia de replicación viral y antes de la síntesis de proteínas tempranas (Carrascosa et al., 2002). El estudio incluía la determinación de apoptosis mediante análisis de la fragmentación del ADN, de la activación de caspasas, o de la liberación citosólica del citocromo C mitocondrial.

Uno de los ensayos más utilizados para valorar apoptosis se basa precisamente en la detección de la activación de la caspasa-3, por fragmentación de una procaspasa precursora (de 32 kDa) que es la forma inactiva de esta cisteín-proteasa, y que necesita para activarse un procesamiento proteolítico, generando un fragmento de 17 kDa (caspasa activa). Este ensayo fue utilizado en el estudio de la apoptosis inducida en células Vero infectadas con el virus parental BA71V o el mutante de delección para el gen EP153R (Δ EP153R).

El gen EP153R inhibe la activación de caspasa-3 inducida en células Vero por infección con el VPPA

Como se muestra en las Figuras 4.2.1A y 4.2.1B, la activación de caspasa-3 fue detectada a las 12 hpi en células Vero infectadas por VPPA, incrementándose hasta las 20-25 hpi. También se observó que los cultivos infectados con Δ EP153R exhibían mayores cantidades de la banda correspondiente a 17 kDa que los cultivos infectados con el virus parental, indicando que el procesamiento de procaspasa-3 a su forma activa se incrementaba en ausencia de expresión del gen EP153R. El análisis de la actividad de caspasa-3 sobre un sustrato específico, corroboró (Figura 4.2.1C) que, los resultados del procesamiento de caspasa-3 se correlacionan perfectamente con los datos de su actividad enzimática.

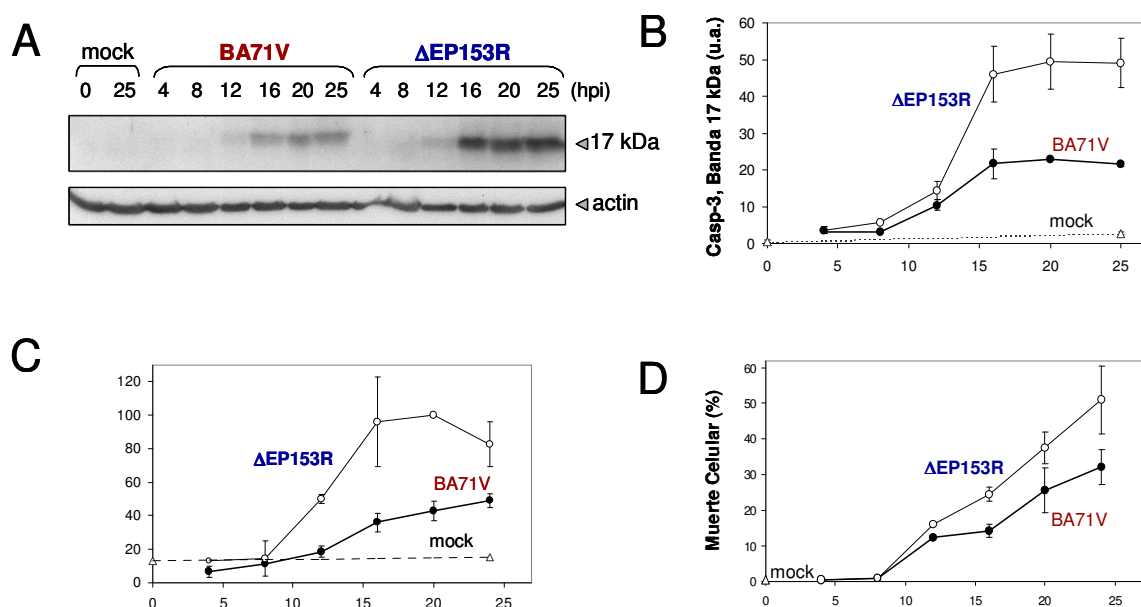


Figura 4.2.1 - Análisis de apoptosis en células Vero infectadas por VPPA. Los cultivos fueron infectados con BA71V o con Δ EP153R a una multiplicidad de infección de 3 ufc/cel y recogidos a los tiempos indicados para determinar la activación de caspasa-3 por detección en Western Blot de su fragmento 17 kDa (A y B) o por actividad biológica (C), y el porcentaje de muerte celular por citometría de flujo después de fijarlos con IP (Ioduro de Propidio). El control de carga de proteína fue realizado con el anticuerpo anti-actina, como se muestra en el panel A. La cuantificación (media +/- DE) del fragmento de 17 kDa proveniente de dos experimentos se muestra en el panel B. Los valores fueron corregidos a igualdad de proteína en cada una de las muestras. Los datos de la actividad biológica de caspasa-3 (panel C) y muerte celular (panel D) fueron también la media +/- DE de duplicados de muestras.

El gen EP153R reduce los porcentajes de muerte celular

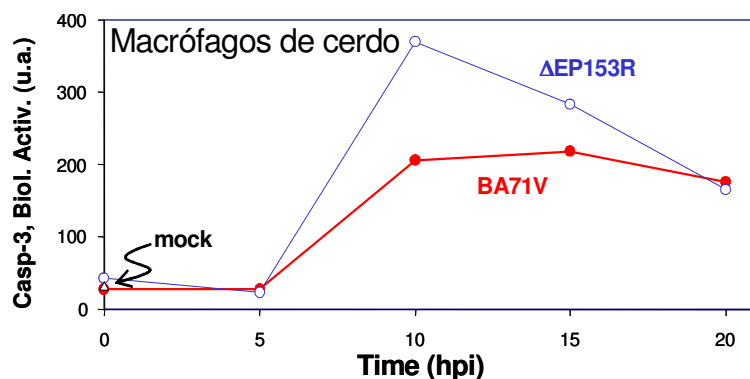
Para confirmar que el incremento en la actividad de caspasa-3 estaba asociado con la muerte celular programada, se analizó por citometría de flujo el ciclo celular en cultivos de células Vero infectados con BA71V o Δ EP153R (Figura 4.2.1D). Como era de esperar, los porcentajes de muerte celular fueron siempre más altos a partir de las 12 hpi en células infectadas con Δ EP153R que en los cultivos infectados con BA71V.

Para mostrar un valor más estadístico, calculamos en 28 determinaciones independientes (incluyendo ensayos de actividad biológica y cuantificación de la proteína de 17 KDa, por varios métodos) la relación entre el nivel de caspasa-3 en células infectadas con Δ EP153R respecto a la infección con BA71V, analizadas a tiempos tardíos de infección (15-30 hpi), obteniendo un valor de 2,11+/- 0,58. De estos resultados se puede concluir que la ausencia del gen EP153R en la infección por VPPA incrementa alrededor de 2 veces la actividad de caspasa-3, o que la presencia del gen es responsable de la reducción a la mitad de la apoptosis inducida por el VPPA.

La inhibición de la apoptosis por EP153R ocurre también en macrófagos de cerdo

Para determinar si el gen EP153R producía un efecto similar en la respuesta apoptótica en macrófagos de cerdo, diana natural del VPPA, se analizó la actividad biológica de caspasa-3 y el porcentaje de muerte celular a lo largo del ciclo infectivo, en cultivos infectados con el virus parental o con el mutante de delección (Figura 4.2.2), llevando en paralelo cultivos de células Vero sometidos a los mismos ensayos, a efectos comparativos.

De los resultados obtenidos se puede establecer que: (i) el proceso apoptótico se induce por la infección viral en ambos tipos celulares, pero se inicia más temprano en macrófagos de cerdos que en células Vero; (ii) en el intervalo de 8-15 hpi, los macrófagos infectados con Δ EP153R presentan una mayor respuesta apoptótica que aquella originada en los cultivos infectados con BA71V; y (iii) a tiempos más tardíos (a partir de 20 hpi) en la infección de macrófagos, los valores obtenidos en ambas infecciones tiende a igualarse, probablemente debido al alto nivel de muerte celular (>70 %) detectado en ambos cultivos a tiempos tardíos.



Macrófagos de cerdo			Vero		
Hpi	BA71V	ΔEP153R	Hpi	BA71V	ΔEP153R
0	15.1(*)		0	0	
4	11.7	20.6	4	0.5	0.5
8	34.0	42.9	8	0.9	0.9
12	27.8	50.2	12	12.3	16.1
16	27.1	54.1	16	14.3	24.6
20	71.8	78.5	20	25.7	37.6

(*) % Muerte celular

Figura 4.2.2 - Actividad de caspasa-3 y muerte celular en células Vero y macrófagos de cerdo. Los cultivos de macrófagos de cerdo y células Vero fueron infectados en paralelo con el virus parental BA71V y el mutante de delección Δ EP153R y procesados en los tiempos indicados para determinar la actividad biológica de caspasa-3 y el porcentaje de muerte celular por citometría de flujo.

Efecto del gen EP153R sobre diferentes caspasas

Para determinar el efecto del gen EP153R en la actividad de otras posibles caspasas implicadas en el proceso de apoptosis, se analizó el efecto de la expresión del gen viral en la actividad enzimática de caspasa 3, 6 y 8 sobre sustratos específicos de cada una de ellas, en células Vero infectadas con el virus parental BA71V o con el mutante Δ EP153R. La Figura 4.2.3 muestra la ausencia de diferencias significativas en la inducción de caspasas-6 y 8 entre ambos virus, lo que confirma el papel predominante de la caspasa-3 en la apoptosis inducida por VPPA, como previamente se había descrito (Nogal et al., 2001).

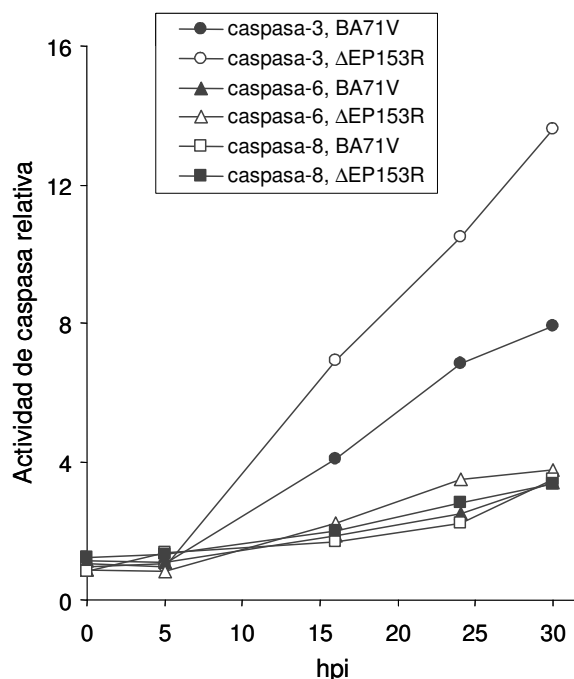


Figura 4.2.3 - Activación de caspasas en células Vero infectadas por VPPA. Los cultivos fueron infectados con BA71V ó Δ EP153R con una mdi de 3 ufp/cel y recogidos a los tiempos indicados, para determinar la actividad proteasa de diversas caspasas sobre substratos específicos (Ac-DVED-AMC, Ac-VEID-AMC, y Ac-IETD-AMC, para caspasa-3, -6 y -8, respectivamente). Los datos corresponden a extractos normalizados para un contenido de proteína de 1 mg/ml y representan actividades de caspasas relativas a los valores de tiempo cero de infección con BA71V para cada proteasa.

Efecto de la inserción de otros genes en la apoptosis inducida por VPPA

La inactivación del gen EP153R en el mutante de delección Δ EP153R se había realizado por inclusión del gen Lac Z (B-galactosidasa), insertado bajo el control del promotor p72 del VPPA en el locus de EP153R (Galindo et al., 2000). Para excluir la posibilidad de que la expresión del gen Lac Z pudiera ser el responsable del incremento en la activación de caspasa-3 observado en las células infectadas con el mutante de delección, se infectaron células Vero con aislados de VPPA o el gen de β -galactosidasa (gen utilizado en la construcción de los mutantes de delección Δ EP153R y vCD2) o el gen de la β -glucuronidasa (insertado en el genoma del aislado BA71V). El análisis de caspasa-3 por inmunoblotting de los extractos obtenidos a tiempo tardío postinfección demostraron que el procesamiento proteolítico del precursor de 32 kDa a la forma activa de 17 KDa era mayor sólo en las células infectadas con Δ EP153R (Figura 4.2.4), confirmando que el incremento en la inducción de caspasa-3 producido por el mutante de delección Δ EP153R no está relacionado con la introducción de un gen extraño en el genoma del VPPA.

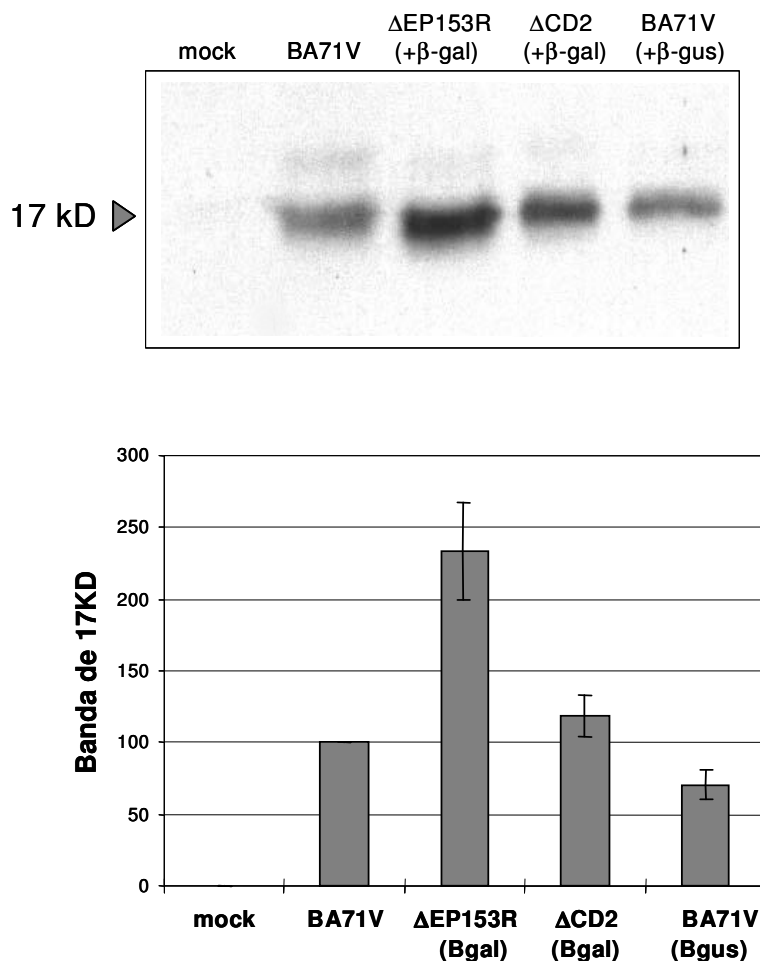


Figura 4.2.4 - Activación de caspasa-3 por distintos aislados del VPPA. Los cultivos de células Vero se infectaron con aislados virales que contenían el gen de la β -galactosidasa (Δ EP153R ó vCD2) o el de la β -glucuronidasa (BA71V β -gus), analizando por inmunoblotting la inducción de caspasa-3 a tiempos tardíos de la infección. La cuantificación de la banda de 17 KDa mostrada en el panel inferior corresponde a los valores medios \pm DE de muestras por triplicado.

EP153R protege de la apoptosis inducida por VPPA en diferentes líneas celulares susceptibles a la infección

Para analizar si el efecto del gen EP153R en la inhibición de apoptosis se producía en otras líneas celulares susceptibles al VPPA, se estudió el efecto de la ausencia del gen en infecciones realizadas sobre cuatro líneas celulares sensibles a la infección viral por VPPA. Los cultivos de células Vero, COS, BHK y macrófagos de cerdo fueron infectados con el virus parental BA71V o con el mutante de delección Δ EP153R, y analizados en su contenido de ADN por citometría de flujo a tiempo tardío en la infección. Como se observa en la Figura 4.2.5, el porcentaje de muerte celular era siempre más alto, en cada una de las líneas celulares infectadas con el mutante de delección para el gen EP153R.

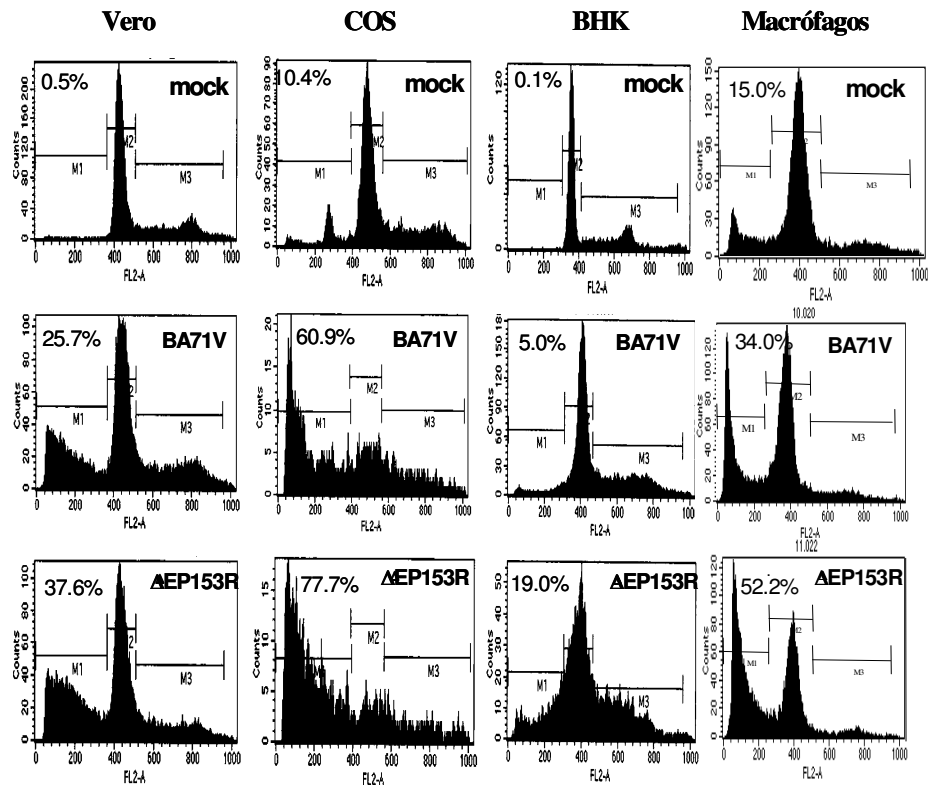


Figura 4.2.5 - Análisis del ciclo celular en células sensibles a la infección por VPPA. Los cultivos de células Vero, COS, BHK y macrófagos de cerdo fueron infectados con BA71V ó Δ EP153R a una mdi de 3 ufp/cel, analizando el ciclo celular a 20 hpi (15 hpi en macrófagos). El porcentaje de muerte celular (región M1) está indicado en la esquina superior izquierda de cada gráfico.

4.2.2. PAPEL DE EP153R EN EXPRESIÓN HETERÓLOGA

La transfección transitoria o estable del gen EP153R protege de la apoptosis inducida tanto por el VPPA como por drogas externas

Para confirmar el papel de EP153R en el control de la apoptosis se realizaron una serie de experimentos que pretendían determinar el efecto de la expresión del gen EP153R en sistemas heterólogos. Después de subclonar el gen viral en el vector de expresión eucariota pcDNA 3.1, los plásmidos (pcDNA 3.1 y pcDNA 3.1-EP153R) se transfectaron para su expresión transitoria o estable en células Vero y COS (como se describe en Materiales y Métodos).

Las líneas celulares transfectadas establemente presentaron una cinética de crecimiento y una densidad de saturación similar a sus líneas originales parentales, indicando que ni el proceso de transfección ni la expresión del gen viral producían ningún deterioro o daño aparente en las líneas. El análisis de la expresión de ARNm específico de EP153R por RT-PCR, reveló la presencia de mensajeros específicos

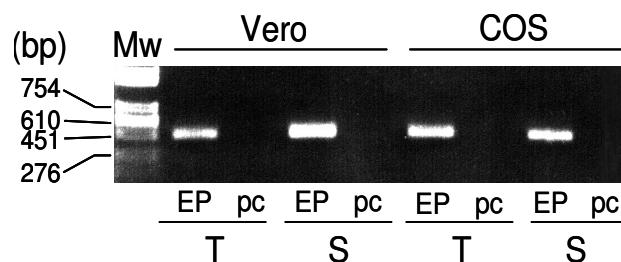


Figura 4.2.6 - Expresión de ARNm en células Vero y COS transfectadas con el gen EP153R. Los cultivos de células Vero y COS transfectados transitoria (T) o establemente (S) con los plásmidos pcDNA 3.1 (pc) ó pcDNA 3.1-EP153R (EP), se analizaron mediante RTPCR, con cebadores específicos para el gen viral EP153R y electroforesis en gel de agarosa.

de EP153R únicamente en cultivos celulares transfectados estable o transitoriamente con el vector que contenía el gen en estudio (Figura 4.2.6).

Una vez confirmada la expresión del gen viral en las líneas transfectadas, procedimos a determinar el efecto de EP153R sobre la apoptosis inducida en tales células tanto por drogas pro-apoptóticas como por infección viral. Para el primer objetivo, se analizó la activación de caspasa-3 provocada por la incubación con drogas inductoras de apoptosis, como actinomicina D ($2 \mu\text{g/ml}$), estaurosporina ($1 \mu\text{M}$) o camptotecina ($4 \mu\text{M}$), en células Vero transfectadas transitoriamente con el plásmido control o con el gen en estudio. Tras 24h de incubación con la droga correspondiente, se prepararon extractos celulares para analizar la actividad biológica de caspasa-3. Como se muestra en la Figura 4.2.7, las células transfectadas con el plásmido control presentaron un aumento de la actividad de caspasa-3 tras el tratamiento con cualquiera de las drogas proapoptóticas, mientras que las células transfectadas con el gen EP153R respondían poco o nada al estímulo, revelando una protección considerable de la apoptosis inducida en células que expresan transitoriamente el gen EP153R.

Como forma alternativa para provocar el proceso apoptótico en las células transfectadas, utilizamos la propia infección con el VPPA (mutante de delección ΔEP153R), que había mostrado una capacidad inductora incluso mayor que la de las drogas proapoptóticas en experimentos preliminares realizados en el laboratorio. El análisis del efecto protector del gen EP153R en células COS transfectadas establemente con el plásmido control y con el gen en estudio, se muestra en la Figura 4.2.8.

Como se esperaba, la infección con VPPA fue capaz de inducir un nivel de actividad de caspasa-3 mucho más alto que el que inducían las drogas proapoptóticas (comparar ordenadas en las figuras 4.2.7 y 4.2.8), y la presencia del gen EP153R en las células COS transfectadas establemente resultó en una protección parcial (aprox 45 %) respecto a la activación de caspasa-3 inducida por la infección viral.

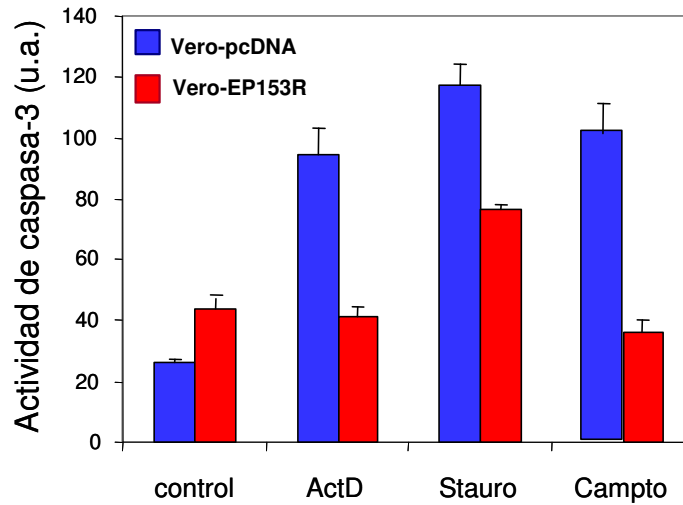


Figura 4.2.7 - Actividad de caspasa-3 en células Vero transfectadas transitoriamente con el gen EP153R. Las células Vero (10^6) fueron transfectadas con *aaa2 g* del plásmido pcDNA 3.1 o pcDNA 3.1-EP153R, 24 h antes de tratar con drogas pro-apoptóticas (Actinomicina D 2 $\mu\text{g/ml}$, Estauosporina 1 μM ó Camptotecina 4 μM). La actividad biológica de caspasa-3 fue determinada en triplicados de muestras recogidas 24 h después del tratamiento.

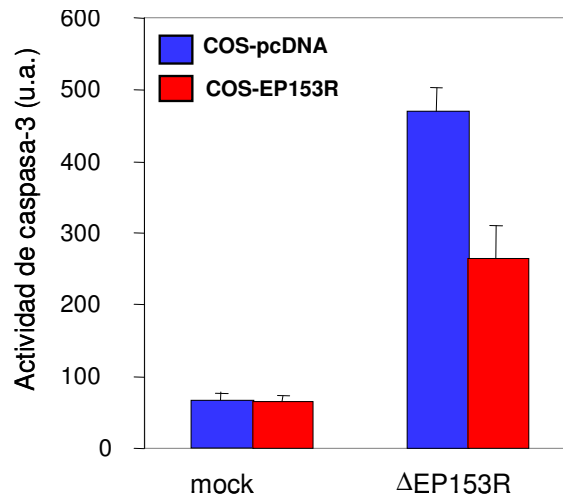


Figura 4.2.8 - Actividad de caspasa-3 en células COS transfectadas establemente con el gen EP153R. Los cultivos de células COS transfectados establemente con el gen EP153R fueron infectados con virus ΔEP153R a una mdi de 3 ufp/cel y recogidos a las 20 hpi, para analizar la actividad biológica de caspasa-3 en muestras triplicadas.

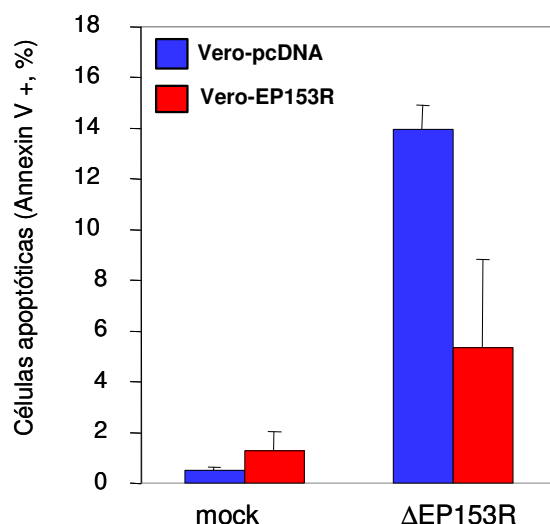


Figura 4.2.9 - Tinción con Anexina V en células Vero transfectadas establemente con el gen EP153R. Los cultivos de células Vero transfectados establemente con el gen EP153R fueron infectados con Δ EP153R a una mdi de 3 ufp/cel y recogidos a las 20 hpi, para analizar el porcentaje de células apoptóticas (Anexina V positivas) en muestras triplicadas.

Estos resultados fueron confirmados en células Vero transfectadas establemente, en un experimento similar al descrito en células COS, donde se determinó el porcentaje de células que se encontraban en procesos apoptóticos tempranos mediante el análisis por citometría de flujo con Anexina V: el ensayo se basa en la translocación, durante el proceso apoptótico, de la fosfatidilserina desde la cara interna a la externa de la membrana celular; la anexina V es una proteína (unida a fluoresceína en el ensayo) que presenta alta afinidad por la fosfatidilserina, de manera que se unirá a las células apoptóticas. La tinción simultánea con el colorante vital yoduro de propidio permite diferenciar las células apoptóticas, que fijan anexina y no se marcan con el colorante, de las células necróticas, que captan tanto la anexina como el yoduro de propidio. Como se ve en la Figura 4.2.9, el indicador apoptótico corroboró que la expresión estable del gen EP153R en células Vero infectadas por Δ EP153R resultó en una reducción mayor del 50 % de la fracción de células positivas a Anexina V, confirmando que la presencia del gen viral confería resistencia a la muerte celular programada inducida por infección con el VPPA.

4.2.3. EFECTO DEL GEN EP153R EN LA ACTIVIDAD DE P53

La proteína p53 presenta una localización nuclear en células infectadas por VPPA

Con el fin de determinar el mecanismo por el que el gen viral EP153R inhibe el proceso apoptótico, investigamos posibles diferencias en la expresión o en la distribución intracelular de la proteína p53, un componente celular involucrado en el control de la apoptosis y del ciclo celular, en células Vero infectadas con BA71V o Δ EP153R. Experimentos previos de nuestro laboratorio demostraban una clara inducción

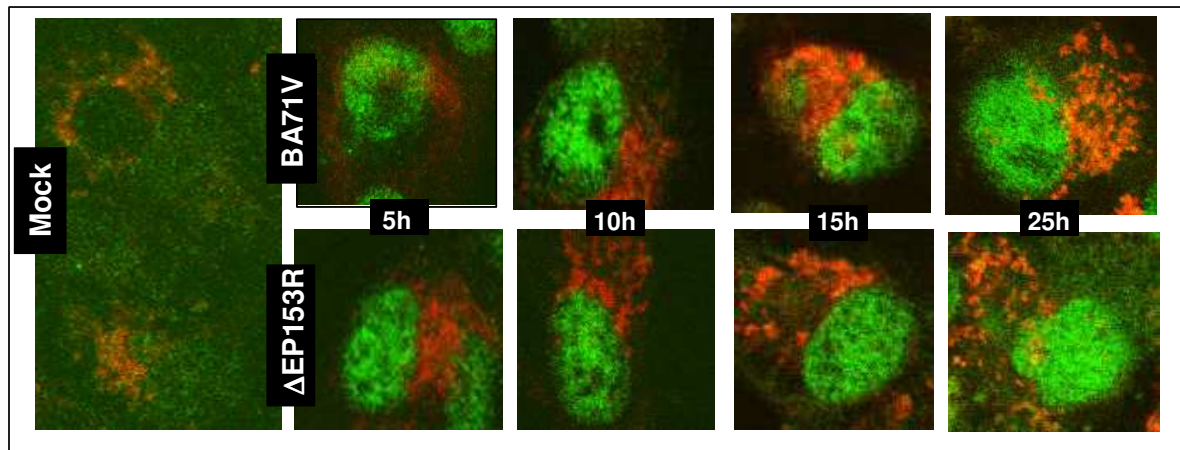


Figura 4.2.10 - La proteína p53 presenta una localización nuclear en células infectadas por VPPA. Las células Vero fueron infectadas con BA71V o Δ EP153R a una mdi de 3 ufp/cel. A los tiempos indicados, los cultivos se incubaron con un marcador de mitocondrias (Mitotracker, rojo) y con anticuerpo anti-p53 (verde), y se examinaron por microscopía confocal.

de p53 en células Vero infectadas por el virus (Granja et al., 2004). El exámen por microscopía confocal de cultivos infectados con BA71V ó Δ EP153R, usando un anticuerpo específico contra p53, mostró una migración temprana de la proteína hacia el núcleo celular (Figura 4.2.10), donde se acumulaba hasta tiempos tardíos en la infección. No se encontraron, sin embargo, diferencias relevantes en la distribución o nivel de expresión de p53 asociada a la presencia (BA71V) o ausencia (Δ EP153R) del gen EP153R, tanto por microscopía confocal (Figura 4.2.10) como por inmunoblotting (Figura 4.2.11).

La proteína EP153R inhibe la actividad transcripcional de p53

Para analizar si la acción de EP153R podría interferir con la actividad biológica de p53, se estudió la actividad transcripcional de p53 inducida en células Vero transfectadas establemente con el gen vi-

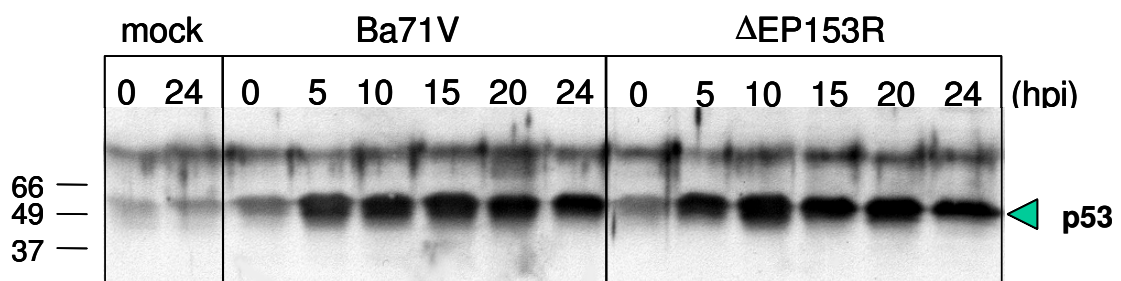


Figura 4.2.11 - Expresión de p53 en células Vero infectadas con Ba71V o Δ EP153R. Los cultivos se infectaron con el virus parental o con el mutante de deleción, con una mdi de 3 ufp/cel, y se recogieron a los tiempos indicados para determinar la expresión de p53 por detección en Western Blot, utilizando un anticuerpo específico contra p53.

ral después de 18 h de infección con BA71V, utilizado como inductor genotóxico. Una reducción de aproximadamente el 70 % en la actividad de p53 fue observada en células transfectadas con el gen viral (Figura 4.2.12), lo que indica un posible papel del gen EP153R en la inhibición de la actividad transcripcional de p53, modulando, por tanto, procesos de tanta relevancia biológica como la apoptosis o el ciclo celular.

Para analizar si el efecto del gen EP153R sobre la actividad de p53 se efectuaba en el contexto de la infección viral, se ensayó la actividad transcripcional de p53 en células Vero infectadas (22 hpi) con los aislados virales BA71V o Δ EP153R. Como se muestra en la Figura 4.2.13, los cultivos infectados con el virus defectivo para el gen EP153R mostraron una mayor de actividad de p53 que los correspondientes infectados con el virus parental.

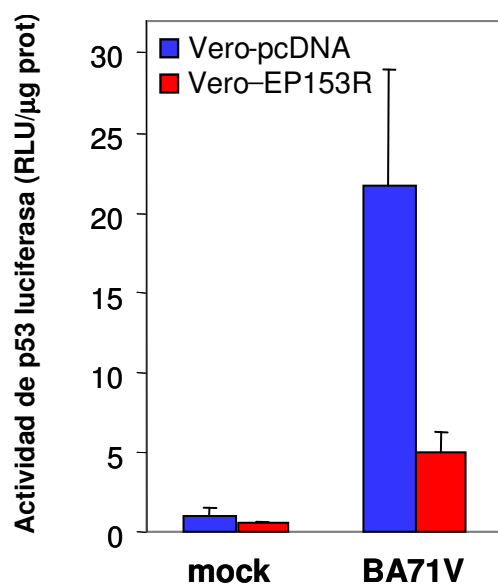


Figura 4.2.12 - Actividad transcripcional de p53 en células Vero transfectadas establemente con pcDNA ó EP153R. Los cultivos de células Vero transfectados establemente con el gen EP153R ó el plásmido control, se transfectaron con el plásmido p53RE-luc (100 ng por 10^6 cels) 24 h antes de la infección con Ba71V a una mdi de 3 ufp/cel. A las 18 hpi se prepararon extractos para analizar la actividad transcripcional de p53. Se muestran los valores de la actividad luciferasa media \pm DE de cinco experimentos independientes con, al menos, triplicados de muestras.

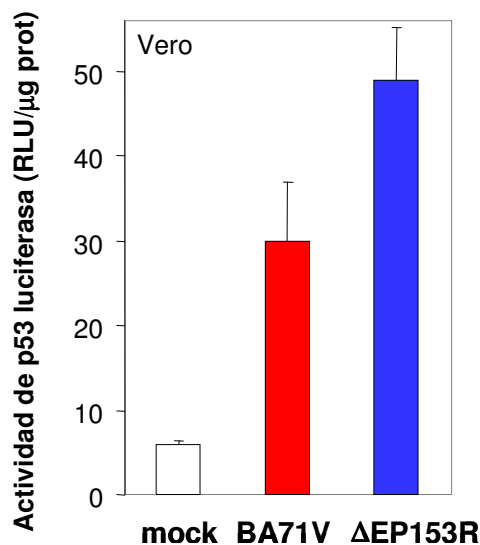


Figura 4.2.13 - Actividad transcripcional de p53 en células infectadas con VPPA. Los cultivos de células Vero se transfectaron con el plásmido p53RE-luc (como en Fig. 21) 24 h antes de infectar con Ba71V ó aaa EP153R, a una mdi de 3 ufp/cel. A las 22 hpi se ensayó la actividad transcripcional de p53 en muestras triplicadas. Los datos mostrados corresponden a los valores medios \pm DE de actividad luciferasa, y proceden de dos experimentos independientes.

Con el fin de determinar las regiones de la lectina viral implicadas en la modulación del proceso apoptótico, se analizó la actividad transactivante de p53 inducida por tratamiento con las drogas proapoptóticas descritas anteriormente (Actinomicina D, Estaurosporina y Camptotecina), en células Vero y Raw transfectadas con distintas construcciones derivadas del gen EP153R, es decir:

- El gen completo (EP153R).
- El dominio correspondiente a lectina C (lectina C).
- El citado dominio, con una deleción de los cinco últimos aminoácidos, que incluye una cisteína implicada en la formación de un puente disulfuro con la primera α -hélice del dominio lectina (lectina C mutada).

El análisis de la actividad transactivante de p53 en células Vero o Raw que expresaban establemente las distintas construcciones derivadas del gen EP153R, se muestra en la Figura 4.2.14, y evidenció que i) cualquiera de las tres drogas inducía actividad p53 en ambas líneas celulares, ii) los cultivos que expresaban el gen completo, tanto en células Vero (Figura 4.2.14A) como en Raw (Figura 4.2.14B), mostraban una menor actividad de p53 que la encontrada en los cultivos transfectados con el plásmido control, y iii) ninguna de las construcciones derivadas de la lectina viral impedían la inducción de p53. Estos resultados indicaban que el efecto inhibitorio de la actividad transcripcional de p53 era debido a la acción del gen EP153R completo.

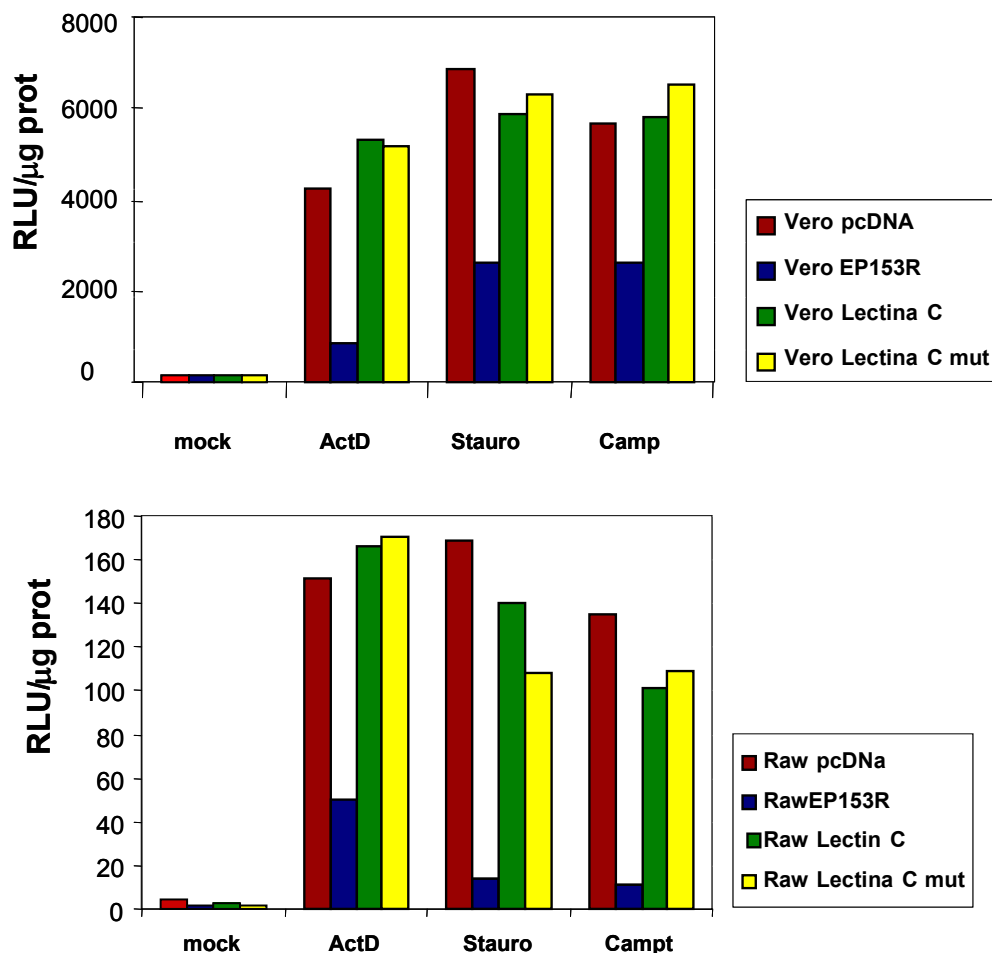


Figura 4.2.14 - Actividad transcripcional de p53 en células Vero y Raw transfectadas establemente con diferentes construcciones derivadas del gen EP153R. Los cultivos de células Vero y Raw, previamente transfectados de una manera estable con las construcciones derivadas del gen EP153R, se transfectaron con el plásmido p53RE-luc 24 h antes de la adición de diferentes inductores de p53 (Actinomicina-D 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Estaurosporina 1 μM ó Camptotecina 4 μM), determinando la actividad transcripcional de p53 a las 15 h de tratamiento.

La inhibición de la actividad transcripcional de p53 causada por la presencia de la lectina de VPPA no parecía relacionada, de acuerdo con los resultados de inmunoblotting, con una disminución de los niveles totales de p53. Consideramos, por tanto, la posibilidad de que la inhibición fuera consecuencia de la alteración de algún proceso necesario para la activación de la citada proteína, como:

- i) la translocación de p53 desde el citoplasma al núcleo
- ii) la unión de p53 al ADN
- ó iii) la transactivación de genes dependientes de p53,

por lo que procedimos al análisis de cada una de estas etapas.

Como hemos descrito anteriormente (Figura 4.2.10), el análisis por microscopía confocal de la distribución de p53 en cultivos de Vero infectados con BA71V ó Δ EP153R, no evidenció diferencias en la translocación al núcleo o nivel de expresión de p53 asociadas a la presencia del gen EP153R, descartando la primera posibilidad.

El estudio de la actividad transactivante de p53, se realizó tanto en cultivos de células Vero transfectadas establemente con el gen en estudio (o con el plásmido control), como en células Vero parentales. En el primer caso, los cultivos se transfectaron ($100 \text{ ng}/10^6 \text{ cel}$) transitoriamente con un plásmido de expresión para una proteína de fusión GAL4-p53: GAL4 es una proteína de levadura que presenta una alta afinidad por ADN, y se ha generado, en este plásmido, fusionada a p53, de tal manera que el paso de unión de la proteína al ADN ocurre independientemente de la capacidad de unión de p53 al ADN. Esto nos permitía el estudio del efecto de la lectina viral en el proceso de transactivación por parte de p53, es decir, la posible alteración de la capacidad de p53 (ya unida al ADN) para realizar el reclutamiento y activación de los factores implicados en el proceso de transcripción de genes dependientes de p53. Para la cuantificación del proceso se transfectaba simultáneamente con un plásmido reportero pGAL4-luc (a una concentración de $250 \text{ ng}/10^6 \text{ cel}$), que facilitaría la determinación de la actividad transactivante de p53 por análisis de actividad luciferasa. A las 24 h de la transfección, los cultivos se infectaron con el virus Δ EP153R (como inductor de p53), recogiendo extractos a distintas horas postinfección para determinar la actividad luciferasa.

Como se puede ver en la Figura 4.2.15, la presencia del gen EP153R en transfección estable no modificó la actividad transactivante de p53 inducida por la infección viral. Este resultado se confirmó en células Vero parentales, transfectadas transitoriamente con GAL4-p53 y pGAL4-luc, e infectadas a las 24 h de la transfección con virus Ba71V o con el mutante de delección Δ EP153R: el análisis de la actividad transactivante de p53 inducida por uno u otro virus (es decir, en presencia o ausencia del gen EP153R en el contexto de la infección viral), evidenció unos niveles similares en ambos casos (Figura 4.2.16).

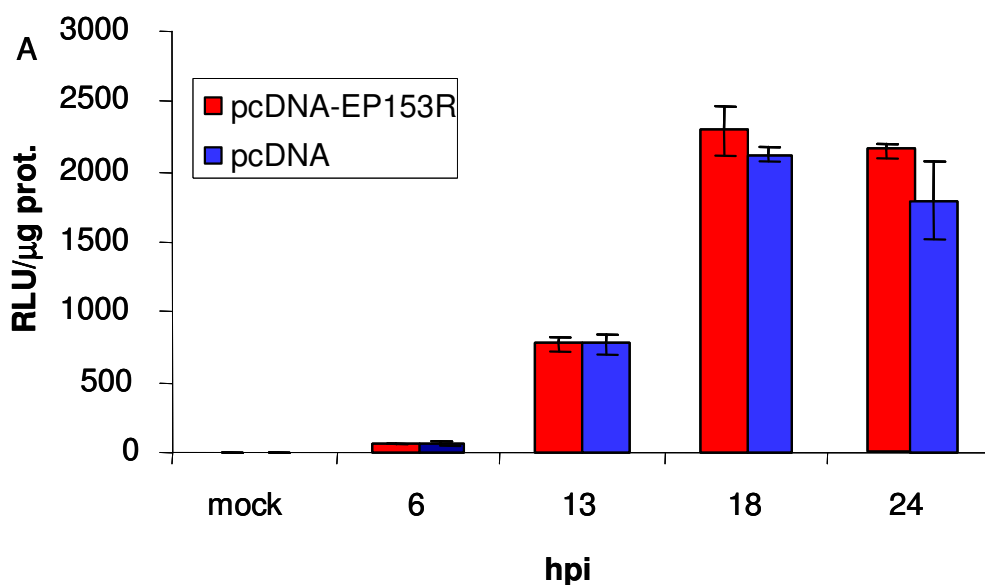


Figura 4.2.15 - Actividad transactivante de p53 en células Vero transfectadas establemente con pcDNA o EP153R. Los cultivos de células Vero transfectados establemente con EP153R se transfectaron transitoriamente con el plásmido pGAL4-p53 junto con el plásmido reportero pGAL4-luc. Tras 24h se infectaron con el virus Δ EP153R a una mdi de 3 ufp/cel y se prepararon extractos celulares a diferentes hpi para analizar la actividad transactivante de p53, por análisis de actividad luciferasa.

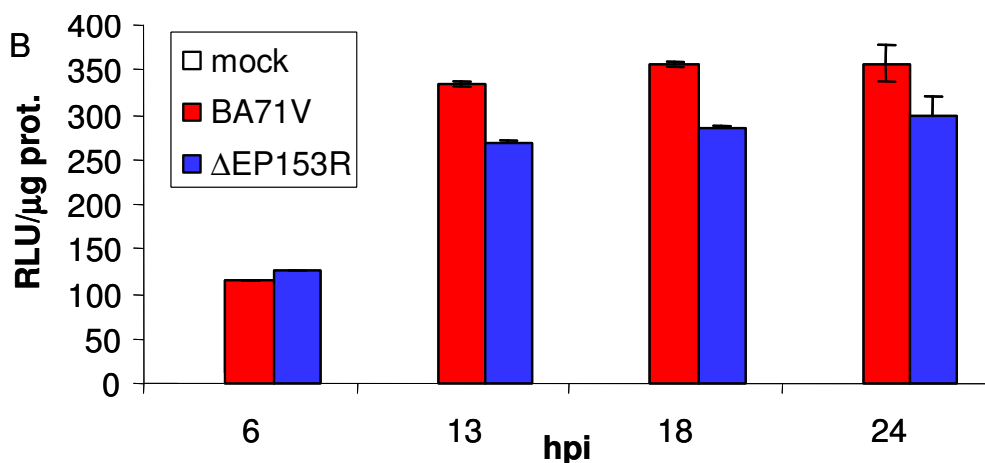


Figura 4.2.16 - Actividad transactivante de p53 en células Vero infectadas con BA71V o EP153R. Los cultivos de células Vero fueron transfectados transitoriamente con el plásmido pGAL4-p53 junto con el plásmido reportero pGAL4-luc. Tras 24h se infectaron con el virus Ba71V o δ EP153R a una mdi de 3 ufp/cel y se prepararon extractos celulares a diferentes hpi para analizar la actividad transactivante de p53, por análisis de actividad luciferasa.

Estos resultados indicaban que el proceso afectado por el gen EP153R en la inhibición de la actividad transcripcional de p53 debería ser la unión de la proteína celular al ADN. Para confirmar esta hipótesis, células Vero transfectadas establemente con el gen EP153R (o con el plásmido control pcDNA) se infectaron con el virus Δ EP153R ó se trataron con estaurosporina $1\mu\text{M}$, para inducir, en ambos casos, una activación de p53. A las 15 h post tratamiento se recogieron extractos totales, se valoró la concentración de proteína, y se reservó una alícuota para la determinación de la p53 inicial.

Para el ensayo de unión al ADN, $200\ \mu\text{g}$ de proteína total de cada extracto se incubaron con una sonda biotinilada de ADN específica de p53, y se sedimentaron con bolas de agarosa cubiertas de estreptavidina. Las proteínas presentes en el complejo unido a la sonda fueron analizadas mediante western blot utilizando un anticuerpo específico contra la proteína p53. Los resultados obtenidos (Figura 4.2.17) indican una disminución de la capacidad de unión de p53 al DNA en los cultivos estimulados (con droga o infección viral) que contenían el gen de la lectina viral (EP), respecto a los transfectados con el plásmido control (pc). Si este resultado se confirmase, la explicación más probable de la inhibición de la actividad transcripcional de p53 por parte del gen EP153R sería el bloqueo de la interacción de p53 con el ADN celular, proceso necesario para que la transcripción de genes dependientes de p53 tenga lugar.

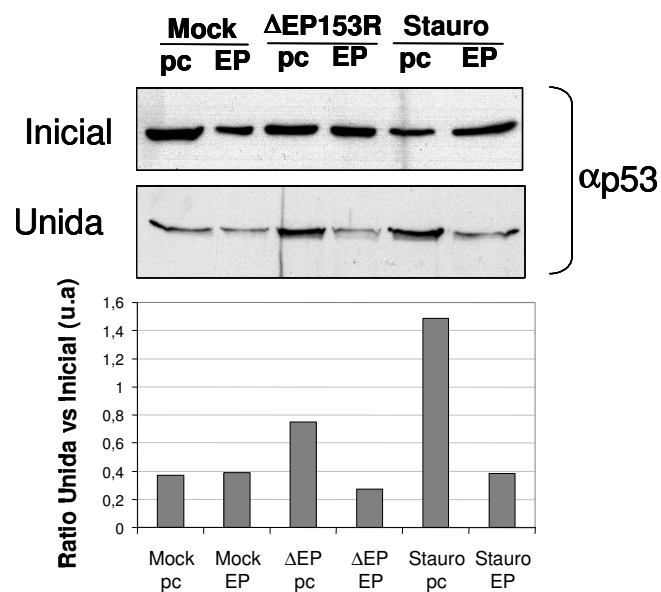


Figura 4.2.17 - Ensayo de unión de p53 a ADN. Los cultivos de células Vero transfectados establemente con el gen EP153R ó con el plásmido vacío control, se trataron con estaurosporina $1\mu\text{M}$ ó se infectaron con Δ EP153R a una mdi de 3 ufp/cel, para inducir p53. A las 15 h se prepararon extractos para analizar por inmunoblotting tanto la expresión de p53 inicial como la p53 unida a la sonda de ADN. La gráfica en el panel inferior representa los valores de la cuantificación de la p53 unida al ADN, normalizada respecto a la expresión total inicial de p53.

4.2.4. EFECTO DE EP153R EN OTROS COMPONENTES IMPLICADOS EN LA CAS-CADA APOPTÓTICA

También se analizaron posibles diferencias en la expresión de otros componentes involucrados en la vía de inducción apoptótica en pasos anteriores a la activación de la caspasa-3, comparando los niveles de expresión obtenidos en células Vero infectadas con BA71V o Δ EP153R.

Como muestra la Figura 4.2.18, no se observaron diferencias relevantes en estudios de inmunoblotting revelados con anticuerpos específicos contra Akt, p21, Bcl-2, Bax ó Bad.

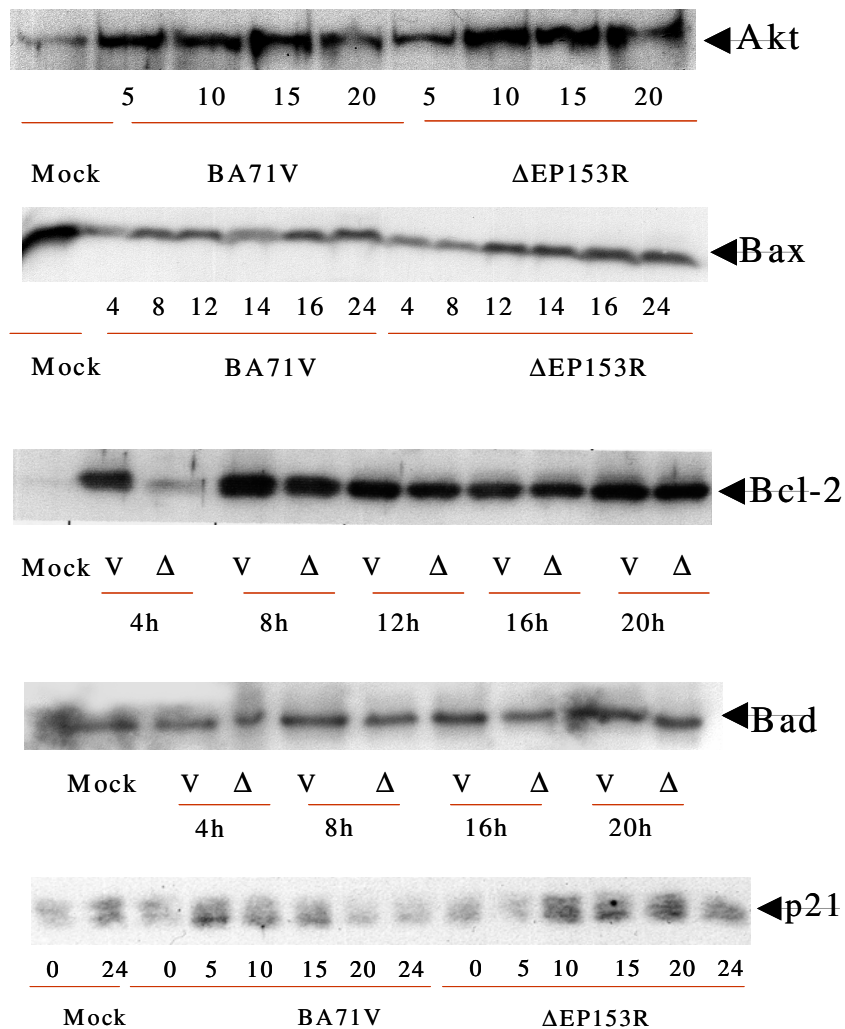


Figura 4.2.18 - Expresión de diferentes componentes involucrados en la cascada apoptótica. Los cultivos de células Vero fueron infectados con BA71V (V) ó Δ EP153R (Δ) a una mdi de 3 ufp/cel y recogidos a los tiempos indicados para determinar por inmunoblotting la expresión de diferentes miembros de la cascada apoptótica.

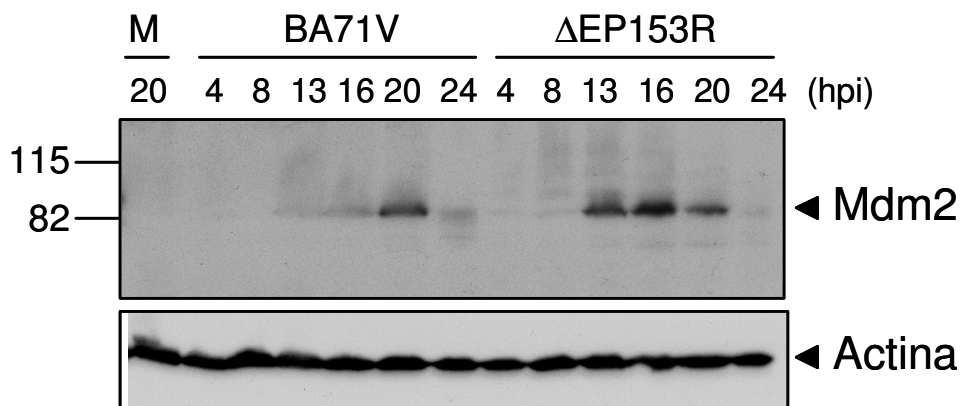


Figura 4.2.19 - Expresión de Mdm2 en células Vero infectadas por VPPA. Los cultivos fueron infectados con BA71V o con Δ EP153R a una mdi de 3 ufp/cel y recogidos a los tiempos indicados para determinar la expresión de Mdm2 (90 kDa) y actina (como control de carga, 45 kDa) por inmunoblotting.

Sin embargo, cuando se analizó por inmunoblotting la expresión de Mdm2, se observó un aumento de su expresión a las 13 hpi en aquellos cultivos infectados con el mutante de delección, respecto a la obtenida en los infectados con el virus parental, que mostraban la inducción de la expresión de Mdm2 a partir de las 20 hpi (Figura 4.2.19).

Para confirmar este resultado se analizó la actividad transcripcional (inducida por la infección de VPPA) del promotor de Mdm2 en dos sistemas, i) en células Vero infectadas con el virus parental (BA71V) o con el virus mutante (Δ EP153R), y ii) en células Vero transfectadas establemente con el gen EP153R (o el plásmido control) e infectadas con el mutante de delección Δ EP153R. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 1 y 2 de la Tabla 4.2.1, donde se indican los valores relativos de la actividad transcripcional del promotor de Mdm2 a distintos tiempos postinfección (4, 8, 13, 16 y 24 hpi) en células infectadas con Δ EP153R frente a células infectadas con BA71V (Tabla 4.2.1, 1), o en células control transfectadas con pcDNA frente a células transfectadas establemente con pcDNA-EP153R infectadas ambas con virus Δ EP153R (Tabla 4.2.1, 2).

El factor obtenido, considerando los datos desde 8 hasta 24 hpi, fue de $2,06 \pm 0,45$ y $2,03 \pm 0,44$ en las tablas 1 y 2, respectivamente. De estos resultados se puede concluir que la ausencia del gen EP153R en la infección por VPPA incrementa alrededor de 2 veces la actividad del promotor de Mdm2.

Cuadro 4.2.1 - Actividad del promotor de Mdm2 en células Vero.**I. Actividad del promotor de Mdm2 en células Vero infectadas con BA71V ó Δ EP153R.**

Experimento realizado en células Vero transfectadas con el plásmido pMdm2 RE-luc (100 ng/10⁶ cel) 24 h antes de la infección con BA71V ó Δ EP153R a una mdi de 3 ufp/cel. A los tiempos postinfección indicados, se prepararon extractos celulares para analizar la actividad del promotor de Mdm2.

Tiempo (hpi)	4	8	13	16	24
Factor (*)	1,00	2,36	2,14	2,34	1,41

(*) Relación del valor en células infectadas con Δ EP153R respecto a células infectadas con BA71V.

II. Actividad del promotor de Mdm2 en células Vero transfectadas establemente con pcDNA ó pcDNA-EP153R, e infectadas con Δ EP153R.

Ensayo realizado en células Vero transfectadas establemente con el gen EP153R o con el plásmido control, que fueron transfectadas con el plásmido pMdm2 RE-luc (100 ng /10⁶ cel) 24h antes de la infección con Δ EP153R a una mdi de 3 ufp/cel. A los tiempos postinfección indicados, se prepararon extractos celulares para analizar la actividad del promotor de Mdm2

Tiempo (hpi)	4	8	13	16	24
Factor (*)	1,32	1,43	2,00	2,40	2,30

(*) Relación del valor en células transfectadas con pcDNA respecto a las transfectadas con pcDNA-EP153R.

4.3 MODELIZACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE EP153R**4.3.1. ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE EP153R CON MOLÉCULAS CD69 DE DIVERSO ORIGEN**

La homología de la secuencia del gen EP153R con proteínas que contienen una región tipo lectina C había sido ya descrita previamente en nuestro laboratorio (Galindo et al., 2000; Yañez et al., 1995). Hemos extendido la comparación de secuencias con diversos CD69 (de origen humano, porcino, bovino o murino, Figura 4.3.1), así como con miembros de la familia de receptores inhibitorios de células NK (Figura 4.3.2).

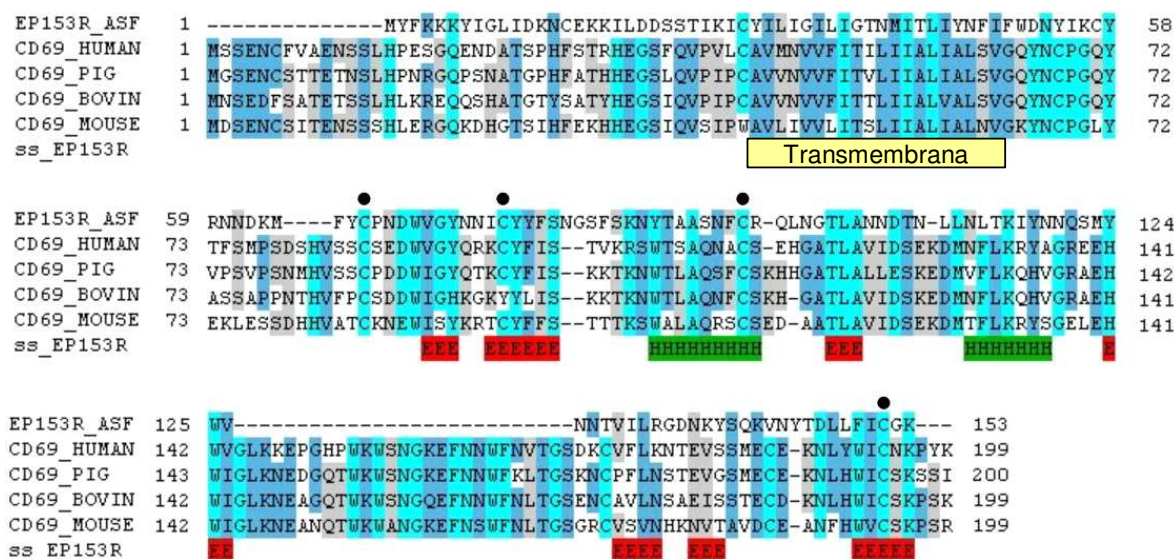


Figura 4.3.1 - Alineamiento de la secuencia de EP153R con moléculas CD69 de diverso origen. Se muestran los residuos de cisteína conservados (●) y las predicciones de hélice α (HHH) y lámina β (EEE) en la estructura secundaria. En el panel inferior se han representado superpuestas las estructuras tridimensionales de la región lectina del CD69 humano (en rojo) y de EP153R (en verde). Los puentes disulfuro aparecen como líneas quebradas conectando los residuos cisteína correspondientes.

Aunque los porcentajes de identidad de aminoácidos entre EP153R y el resto de moléculas comparadas eran bajos (15-18 %), la estructura general de la molécula era muy semejante en todos los casos: un extremo amino intracelular, una región hidrofóbica (transmembrana) de 25-30 residuos, y una región extracelular con 4 residuos de cisteína conservados (responsables de la formación de puentes disulfuro intramoleculares) y con una distribución similar de hélices α y láminas β a lo largo de la secuencia, si bien la lectina del VPPA carecería de una secuencia de 27 residuos (sin estructura secundaria aparente) presentes en las moléculas de CD69 cerca de su extremo carboxilo (representada en el lazo y el puente disulfuro en la línea roja (CD69) que no se superpone con la línea verde (EP153R) en el panel inferior de la Figura 4.3.1).

La existencia de modelos cristalográficos de moléculas con regiones tipo lectina C, tales como CD94, Ly49A (miembros de la familia de receptores inhibitorios de células NK, de origen humano y murino) y CD69 (de receptores activadores, Borrego et al., 1999), nos ha permitido modelar la estructura tridimensional de la lectina del VPPA en paralelo con aquellas descritas para las mencionadas moléculas (Figura 4.3.2).

La comparación de EP153R con estas lectinas evidencia una estructura equivalente en todas ellas, y facilita el modelado de la posible estructura de la lectina viral y de su interacción con candidatos esperables como ligandos, como describimos a continuación.

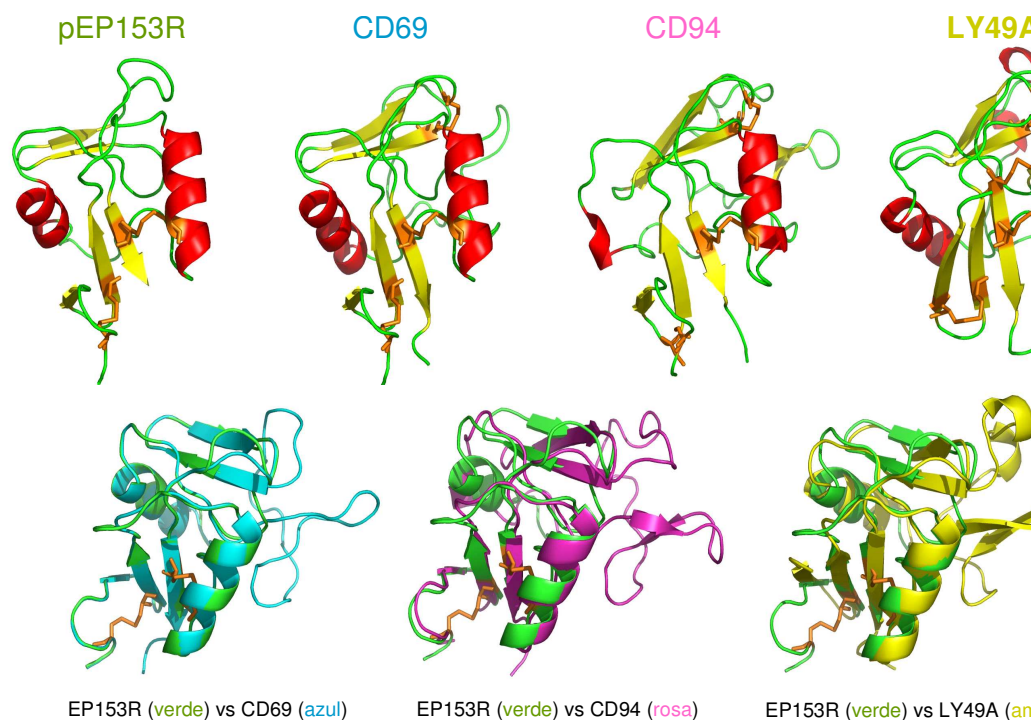


Figura 4.3.2 - Estructura de EP153R modelada sobre la estructura tridimensional de otras moléculas que también presentan dominios tipo lectina C.

4.3.2. MODELO ESTRUCTURAL DE EP153R Y DE SU INTERACCIÓN CON MHC-I

La proteína EP153R probablemente es un homodímero (Figura 4.3.3A), donde las dos moléculas que la constituyen se encuentran enfrentadas parcialmente en el dominio lectina y en el segmento hidrofóbico transmembrana, donde podrían interactuar una serie de aminoácidos polares que se encuentran entre los residuos hidrofóbicos (Figura 4.3.3C). La existencia de diferentes cisteínas cercanas a la zona transmembrana (C15, C29 y C57) podría justificar la formación de enlaces disulfuro intercadena, que también contribuirían a la estabilización del homodímero.

La región intracelular de EP153R no presenta una estructura secundaria evidente, pero la configuración del dominio lectina (extracelular, Figura 4.3.3B) sí se puede definir detalladamente por la presencia de i) residuos conservados de cisteína (que establecen dos puentes disulfuro, uno al inicio del dominio y otro entre la zona cercana al extremo carboxilo y la primera hélice α), ii) cinco láminas β , dos de ellas contrapuestas, y iii) dos hélices α . En comparación con los dominios lectina de los receptores inhibitorios de células NK, la lectina del VPPA mantiene la estructura de dos puentes disulfuro, las hélices α y las láminas β , careciendo, como se indicó más arriba, de un lazo no estructurado y un puente disulfuro situados cerca del carboxilo terminal.

La modelización de EP153R en paralelo con las estructuras tridimensionales descrita para los receptores de células NK también nos permitió estudiar la posible interacción entre la lectina del VPPA y

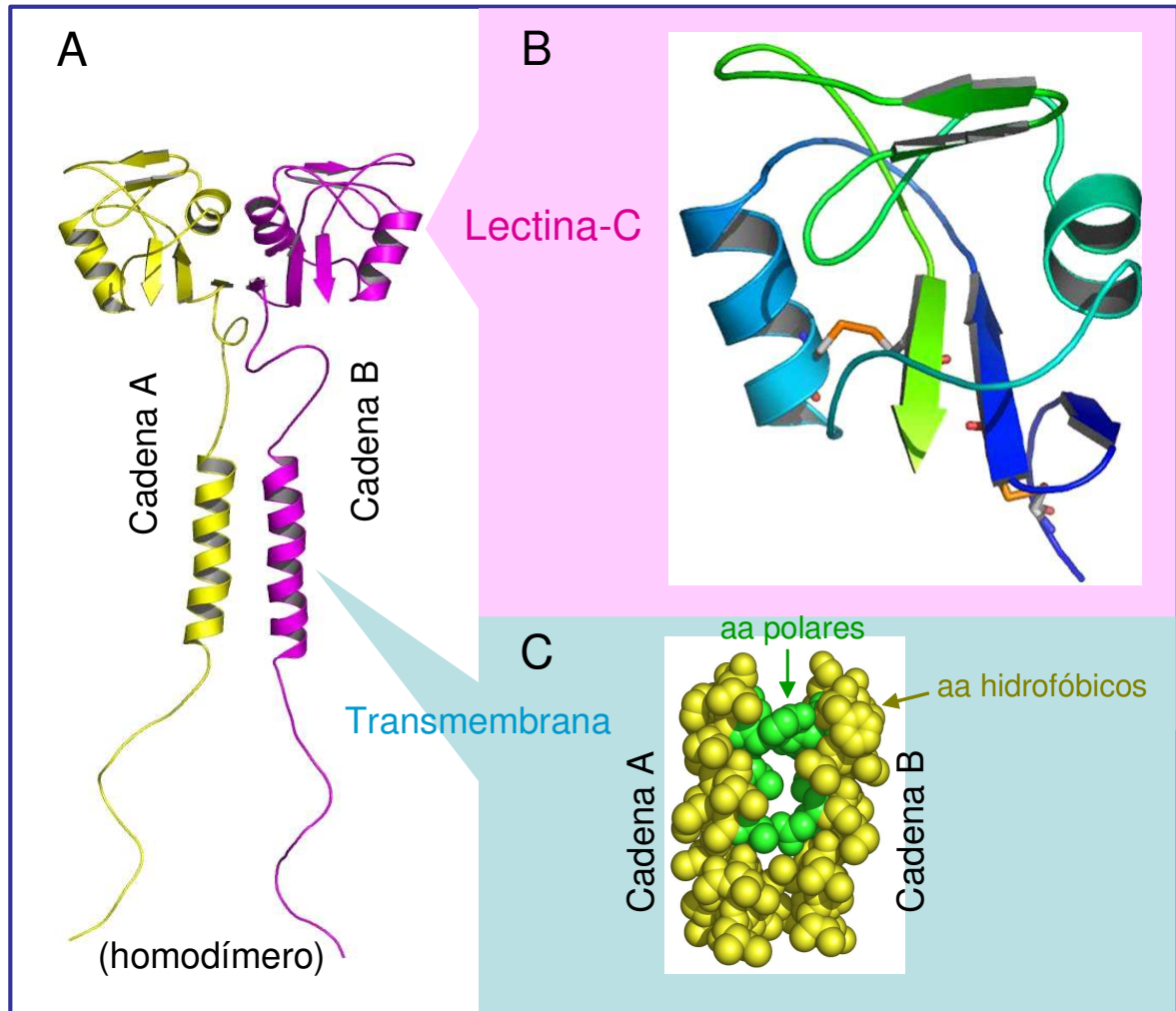


Figura 4.3.3 - Modelo estructural de EP153R. (A) Homodímero formado por dos cadenas. (B) Estructura del dominio lectina C, donde se representan constituyentes propios de su estructura sesecundaria secundaria (lámina β , hélice α , y enlaces disulfuros). (C) Zona transmembrana, donde se representa la posible interacción entre aminoácidos polares de las dos cadenas.

las moléculas de MHC-I, como así se presenta en la Figura 4.3.4. El modelo prevé que existirían dos interacciones distintas, una con cada cadena del homodímero de EP153R, que contactarían con regiones distintas en la molécula de MHC-I. En todo caso, los estudios de modelización nos llevan a considerar que una interacción entre la lectina viral y los antígenos de histocompatibilidad clase I es, al menos, posible, y nos permite aventurar qué regiones de la molécula tendrán mayor relevancia para la posible función de la proteína viral en el contexto de la infección.

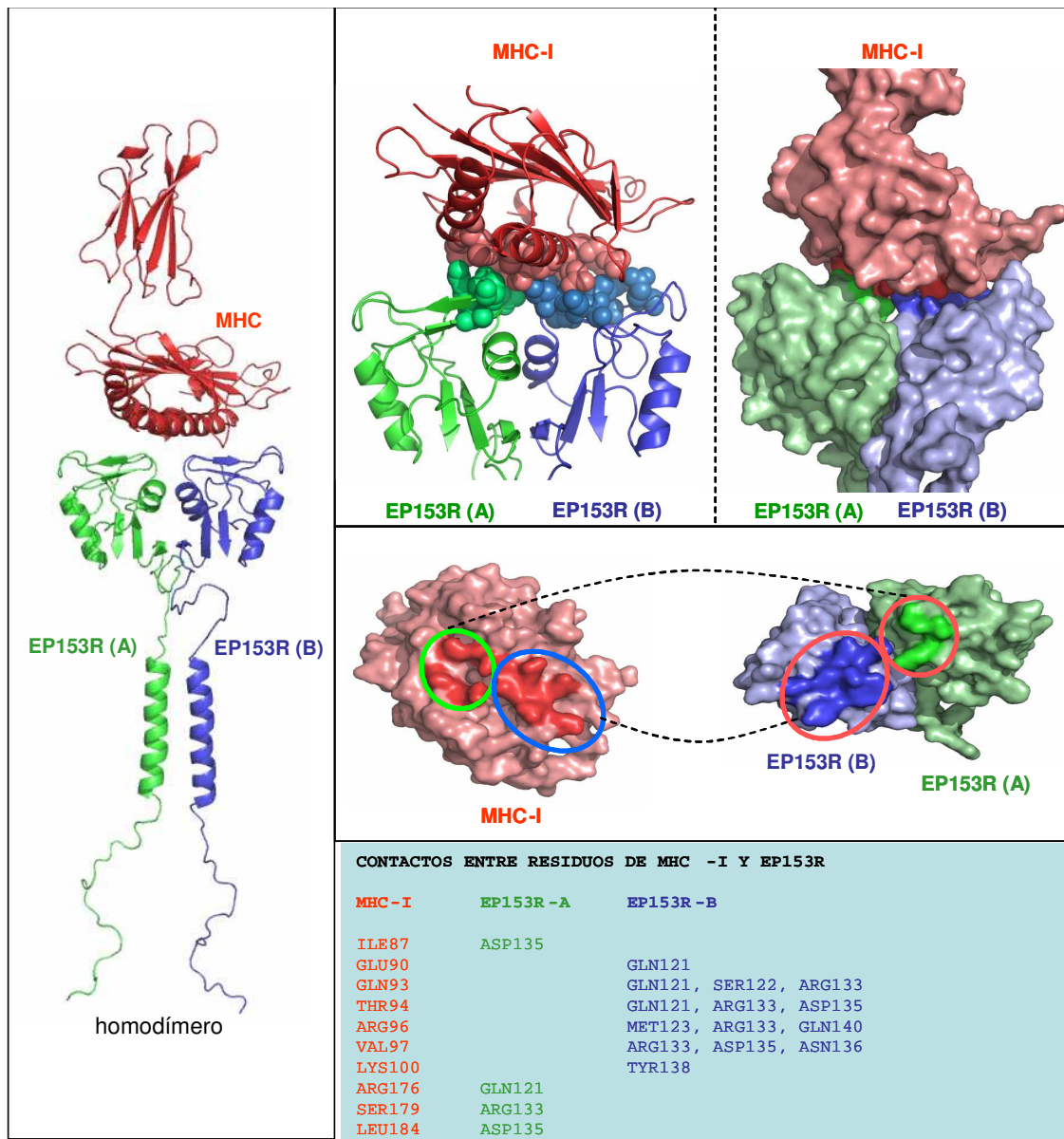


Figura 4.3.4 - Modelo estructural de la interacción de EP153R-MHC-I. Modelo tridimensional de la interacción entre el homodímero de EP153R y una molécula de MHC-I. Se representa en mayor detalle la superficie de interacción y los residuos implicados en esos contactos.

4.3.3. LA PROTEÍNA EP153R SE LOCALIZA EN EL RE

Diferentes proteínas (virales y celulares) que son residentes en el RE presentan residuos conservados de lisinas en la región citoplásmica (extremo carboxilo terminal) de la proteína (Figura 4.3.5).

En el caso de la lectina de VPPA hay un motivo de doble lisina que se encuentra también en la zona citoplásmica, que en este caso corresponde con el extremo amino terminal; el motivo está perfectamente conservado en el gen de la lectina secuenciado en distintos aislados virales (Neilan et al., 1999). En el caso de la proteína E19 de Adenovirus existen dos lisinas en las posiciones tercera, cuarta ó quinta, igualmente en el extremo C-terminal citoplásmico; la presencia de E19 resulta en la reducción de la expresión de moléculas MHC-I en la superficie celular. La presencia de un motivo KKKxx en EP153R se ajusta a la señal consenso (KxKxx) de localización en el RE, compartimento donde podría tener lugar su interacción con moléculas nacientes de MHC-I, que han de estabilizarse para formar los complejos con

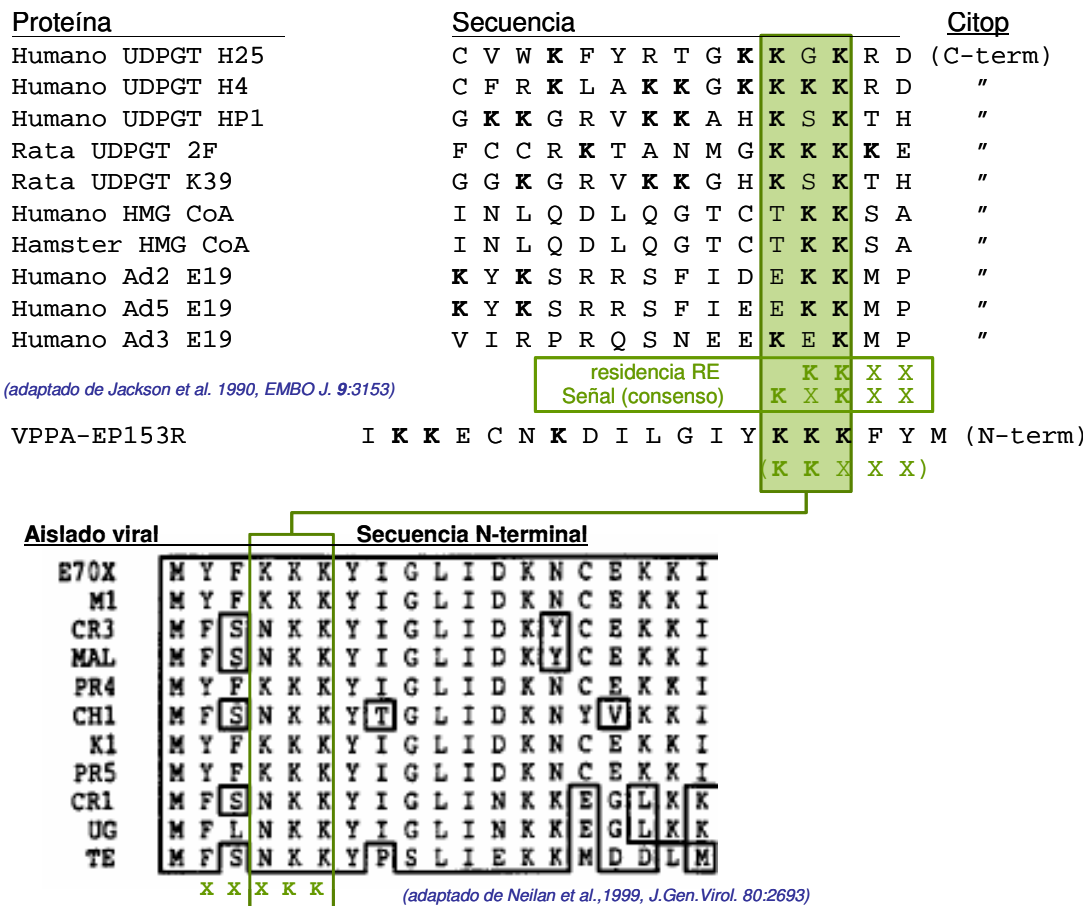


Figura 4.3.5 - Residuos de lisina (K) conservados en secuencias citoplásmicas de proteínas residentes en el Retículo Endoplásmico (RE). Proteínas residentes en el RE, que presentan residuos conservados de lisina, junto con la lectina de VPPA. Panel inferior: residuos de lisina en el extremo N-terminal del gen EP153R secuenciado en diferentes aislados de campo del VPPA.

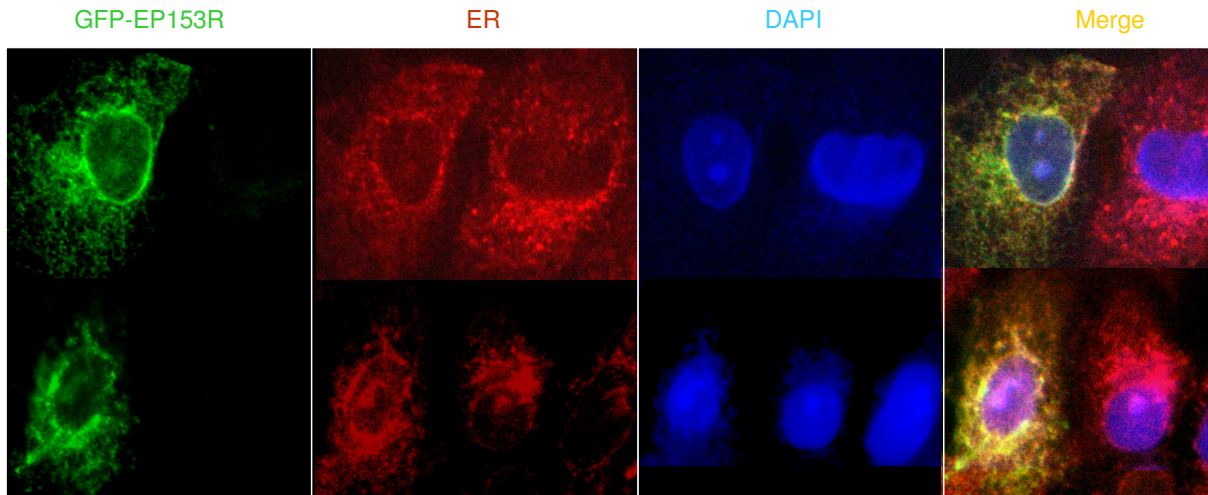


Figura 4.3.6 - Inmunofluorescencia en células Vero. Las células fueron transfectadas transitoriamente con el gen *EP153R* fusionado a *GFP* e incubadas con marcadores de RE (anti-*PDI*) y ADN (*Dapi*).

péptidos derivados de patógenos intracelulares, para ser exportados finalmente a la membrana plasmática celular.

Para determinar si la proteína *EP153R* se localizaba efectivamente en el RE, se clonó el gen viral en el plásmido *pEGFP* (que contiene la proteína verde fluorescente *GFP*) y se transfectó en células Vero. El análisis por microscopía confocal de cultivos transfectados transitoriamente con el plásmido *pEGFP-EP153R* (o su control *pEGFP*) y marcados simultáneamente con un anticuerpo específico contra proteínas propias del retículo y con un marcador nuclear *DAPI* se presenta en la Figura 4.3.6.

Se observó que la imagen de color verde que correspondía con la proteína *EP153R* fusionada a *GFP* era muy similar a la que presentaba el control de retículo (en rojo). La colocalización de ambas marcas (verde y roja) se visualiza como un color amarillo-anaranjado en la imagen de fusión (“merge” en la Figura 4.3.6). En la inmunofluorescencia realizada con las muestras control (células Vero transfectadas con el plásmido vacío) no había marca verde en el RE, como tampoco se observó en experimentos realizados con otras proteínas de *VPPA* clonadas en el laboratorio (datos no mostrados).

4.4 EFECTO DEL GEN EP153R EN LA EXPRESIÓN DE MHC-I

Considerando, como hemos descrito en el apartado anterior, que la proteína EP153R presenta un dominio tipo lectina C similar a los encontrados en receptores de células NK, y la presencia de un motivo de doble lisina que configura un posible sitio de residencia de la proteína viral en el RE que facilitaría su interacción con moléculas nacientes de MHC-I, abordamos el estudio del posible papel de EP153R en la modulación de la expresión de los antígenos de histocompatibilidad clase I en distintos modelos animales.

4.4.1. EL GEN EP153R INHIBE LA SÍNTESIS DE ANTÍGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE I PORCINOS (SLA-I)

El estudio se llevó a cabo inicialmente en un modelo porcino, analizando el efecto del gen EP153R sobre la síntesis de los antígenos de histocompatibilidad específicos (SLA-I). Para ello, se infectaron macrófagos de cerdo con el virus parental BA71V ó con el mutante de delección Δ EP153R, y a distintos tiempos postinfección se marcaron en pulsos de 2 h con 35 S-metionina, y los extractos se inmunoprecipitaron con un anticuerpo específico contra SLA-I.

Como se observa en la Figura 4.4.1, la banda de proteína inmunoprecipitada en tiempos tempranos en la infección (4, 8 y 13 hpi) era comparativamente mayor en los cultivos infectados con Δ EP153R que con el virus parental, indicando que la presencia del gen EP153R provoca una reducción de la

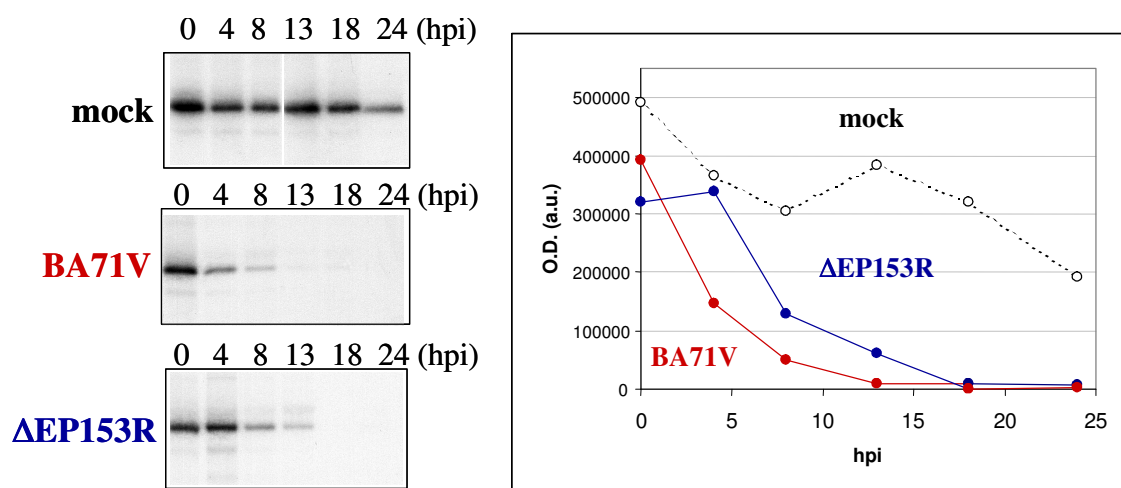


Figura 4.4.1 - Síntesis de SLA-I en macrófagos de cerdo infectados por VPPA. Los cultivos de macrófagos de cerdo fueron infectados con el virus parental BA71V ó con el mutante de delección Δ EP153R con una mdi de 6 ufp/cel y marcados a diferentes tiempos postinección con 35 S-metionina-cisteína durante 2 h. Los extractos se inmunoprecipitaron con un anticuerpo específico frente a SLA-I (BL6H4) y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida. En el panel derecho se representa la cuantificación de la banda de SLA-I inmunoprecipitada.

síntesis/acumulación de moléculas SLA-I, si bien el efecto no es dramático, quizá porque no todos los tipos de antígenos SLA-I reconocidos por el anticuerpo sean afectados por EP153R, sino sólo algunos que vayan a expresarse en la membrana plasmática.

4.4.2. EL GEN EP153R INHIBE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS MURINAS DE MHC-I EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Ante la no disponibilidad de reactivos específicos porcinos que permitieran un análisis adecuado de la expresión de SLA-I en membrana plasmática por citometría de flujo, procedimos a analizar la posible modulación por EP153R de la expresión de antígenos de histocompatibilidad en otros modelos animales, concretamente en el sistema murino, basado en el uso de una línea celular (Raw) immortalizada de macrófagos de ratón y de reactivos comerciales que marcaban la superficie de la membrana celular. Cultivos de células Raw se transfectaron con el plásmido de expresión pcDNA-EP153R ó con el plásmido control, antes de estimular su respuesta con una infección viral (con Vaccinia o con Δ EP153R). La expresión de los antígenos MHC-I en la membrana plasmática se analizó por citometría de flujo a

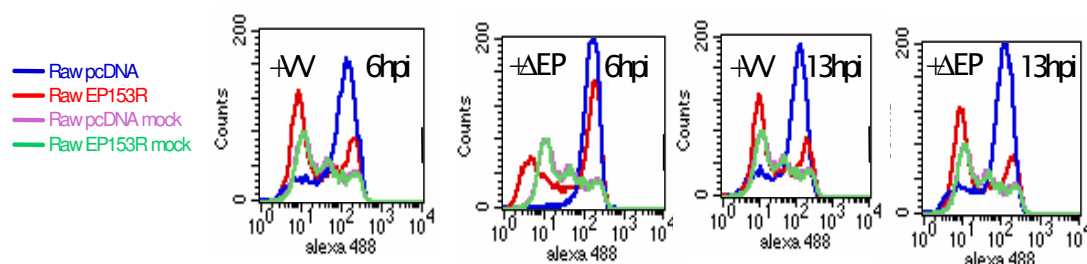
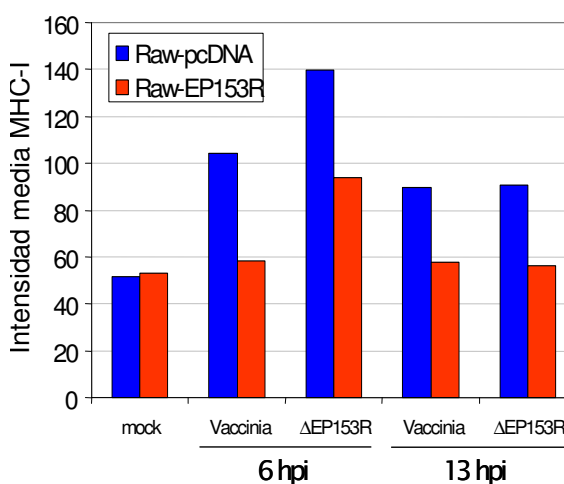


Figura 4.4.2 - Expresión de antígenos de histocompatibilidad de clase I en células Raw transfectadas con EP153R e infectadas con virus. Las células Raw transfectadas transitoriamente con el plásmido pcDNA o con pcDNA-EP153R, fueron infectadas con el mutante de delección Δ EP153R del VPPA, o con el virus Vaccinia, con una mdi de 3 ufp/cel. A los tiempos indicados, y tras la incubación con un anticuerpo anti-MHC-I, se analizó la expresión de estos antígenos en la membrana plasmática mediante citometría de flujo. En el panel superior se muestran los histogramas correspondientes a los datos adquiridos en el citómetro, mostrando la expresión de MHC-I. En el panel derecho se representa la intensidad media de marca de MHC-I en cada muestra.



tiempos tempranos (6 hpi) y tardíos (13 hpi) tras la infección viral (Figura 4.4.2), observando un aumento de 2 a 3 veces de la expresión de MHC-I en las células Raw transfectadas con el plásmido control e infectadas con cualquiera de los dos virus; sin embargo, la presencia del gen EP153R en las células Raw transfectadas con el plásmido pcDNA-EP153R, resultó en una reducción entre un 30 y un 50 % de la intensidad media de marca específica en MHC-I, limitando la expresión de estos antígenos prácticamente a los niveles basales detectados en células no infectadas.

4.4.3. EL DOMINIO DE LECTINA C ES LA REGIÓN DE EP153R IMPLICADA EN LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MHC-I

La generación, a partir de células Raw, de líneas celulares transfectadas expresando establemente diversas construcciones derivadas del gen EP153R, nos permitió el estudio de las regiones de la proteína viral implicadas en el efecto inhibitorio sobre la expresión de antígenos de histocompatibilidad.

Las construcciones utilizadas fueron:

- El gen completo (EP153R).
- El dominio correspondiente a lectina C (lectina C).
- El citado dominio, con una deleción de los cinco últimos aminoácidos, que incluye una cisteína implicada en la formación de un puente disulfuro con la primera α -hélice del dominio lectina (lectina C mut).

Las células transfectadas con las correspondientes construcciones fueron infectadas con el virus vaccinia o con el mutante de deleción Δ EP153R y se analizó la expresión (a 6 y 13 hpi) de los antígenos de histocompatibilidad en la membrana plasmática por citometría de flujo (Figura 4.4.3), observando una disminución de la expresión de MHC-I en aquellas células que expresaban de una manera estable el dominio tipo lectina C, es decir, transfectadas con el gen completo EP153R o con la región correspondiente al dominio de lectina C. Sin embargo, no se observó ningún efecto inhibitorio de la expresión de MHC-I en aquellos cultivos transfectados con el dominio de lectina C mutado. Estos resultados evidencian que la expresión de MHC-I murino se reduce en presencia de la lectina de VPPA y que esta inhibición depende de que la estructura del dominio de lectina C se mantenga intacta.

4.4.4. EL GEN EP153R INHIBE TAMBIÉN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE MHC-I EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN UN MODELO HUMANO

Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos en los anteriores sistemas animales utilizados, se analizó el efecto del gen EP153R en la expresión de moléculas de MHC-I en un modelo humano.

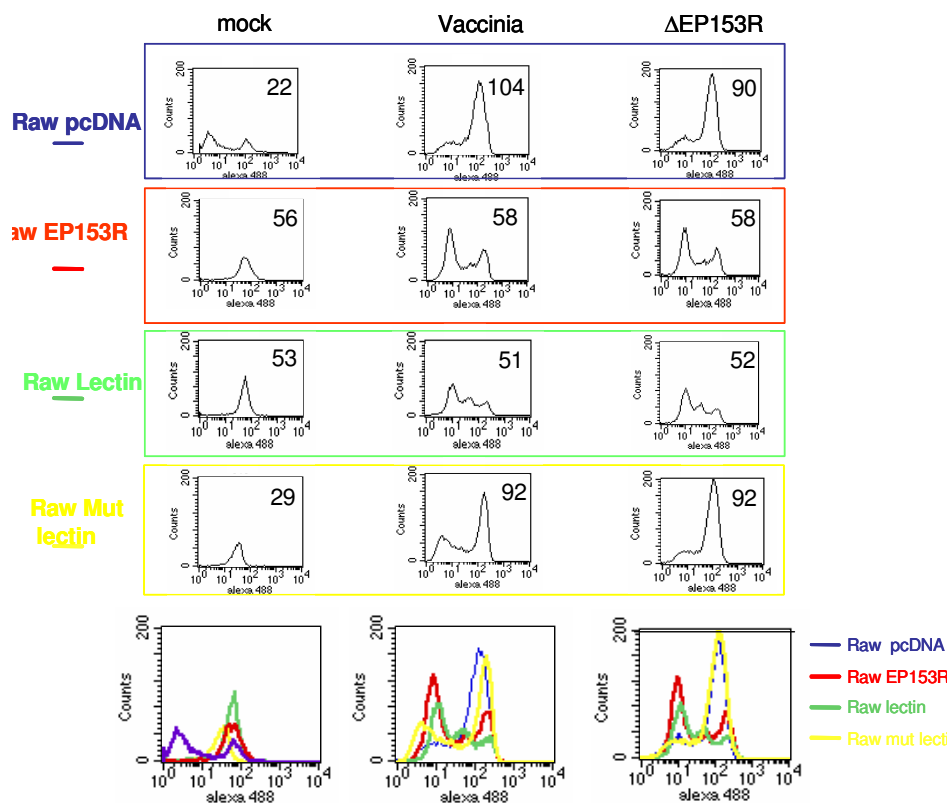


Figura 4.4.3 - Expresión de MHC-I, en células Raw transfectadas con distintas construcciones del gen EP153R e infectadas con virus. Las células Raw transfectadas transitoriamente con diferentes construcciones derivadas del gen EP153R (*gen completo*, *lectina C*, y *lectina C mutada*) se infectaron con el virus Vaccinia o con Δ EP153R a una mdi de 3 ufp/cel. A los tiempos indicados las células se incubaron con un anticuerpo anti-MHC-I y se analizó la expresión de estos antígenos en la membrana plasmática mediante citometría de flujo. En el panel inferior se muestra la superposición de los histogramas de las 4 líneas.

Para ello, células Jurkat (procedentes de un linfoblastoma humano) se transfectaron establemente con el plásmido pcDNA-EP153R, o con el plásmido vacío como control. Los cultivos fueron estimulados con una mezcla de PMA (20 ng/ml) con Ionóforo de calcio (1 μ M) durante 15 min, antes de analizar, por citometría de flujo, la expresión de las moléculas de MHC-I en la membrana plasmática, utilizando el anticuerpo monoclonal W6/32 específico contra moléculas MHC-I humanas. Los resultados obtenidos (Figura 4.4.4) mostraron una disminución de la expresión de los antígenos de histocompatibilidad de clase I en las células transfectadas con el gen de la lectina de VPPA, comparadas con las células parentales sin transfectar o transfectadas con el plásmido control; el porcentaje de inhibición de la expresión de MHC-I (valorado como intensidad media del antígeno en cultivos transfectados con EP153R respecto a los controles) resultó cercano al 50 % ($52,8 \pm 17,6$ %) en tres experimentos independientes.

Estos resultados corroboran los anteriormente aportados en los modelos porcino y murino, y nos permiten concluir que la presencia del gen EP153R del VPPA produce una inhibición de la expresión de las moléculas de MHC-I en la membrana plasmática.

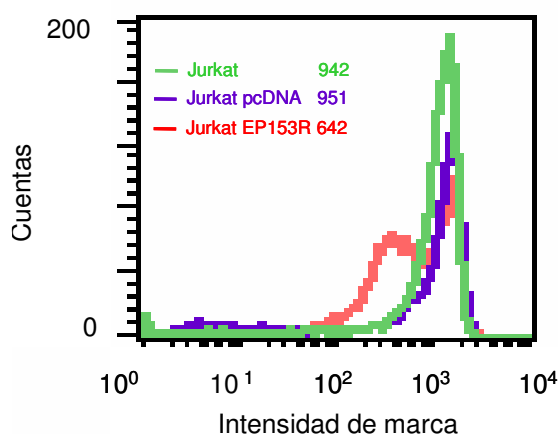


Figura 4.4.4 - Expresión de MHC-I en células Jurkat transfectadas con EP153R. Los cultivos de células Jurkat control o transfectados establemente con los plásmidos pcDNA-EP153R ó pcDNA, se estimularon con PMA (20 ng/ml) más Ionoforo (1 μ M) durante 15 min, y se incubaron con un anticuerpo específico contra moléculas de MHC-I humano (W6/32), para analizar, por citometría de flujo, la expresión de estos antígenos en la membrana plasmática. Se incluyen en la figura los valores de intensidad media obtenidos en el citómetro para cada cultivo.

4.4.5. EFECTO DE EP153R SOBRE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE CÉLULAS NK

Una de las posibles consecuencias de la modulación de la expresión de MHC-I por la lectina viral estaría relacionada con la regulación de la actividad citotóxica de células NK, si los ligandos de la membrana plasmática para los receptores inhibitorios de NK estuvieran efectivamente sub-expresados. Para estudiar el efecto del gen EP153R sobre la citólisis mediada por células NK, utilizamos un modelo humano en que las células efectoras (NKL, línea que expresa el receptor inhibitorio CD94/NKG2A, que interacciona con HLA-E) se enfrentaban a células diana (Jurkat, transfectadas establemente con el gen EP153R ó el plásmido pcDNA control) previamente marcadas durante 2 h con ^{51}Cr . Tras una incubación de 4 h en diferentes proporciones de célula efectora / diana, se determinó en un contador γ la radiactividad liberada al medio extracelular, como medida de la lisis de células diana marcadas por células NK efectoras. Como control de lisis espontánea se llevó una muestra de células diana incubadas en ausencia de NKL, y otra muestra similar lisada con detergente (Nonidet P40 0,05 %) permitió la cuantificación de la liberación máxima de ^{51}Cr .

Para calcular el porcentaje de lisis específica se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ LISIS} = \frac{(\text{cpm muestra} - \text{cpm esp.})}{(\text{cpm max.} - \text{cpm esp.})} \cdot 100, \text{ donde}$$

cpm muestra = radiactividad determinada en el sobrenadante de cada muestra.

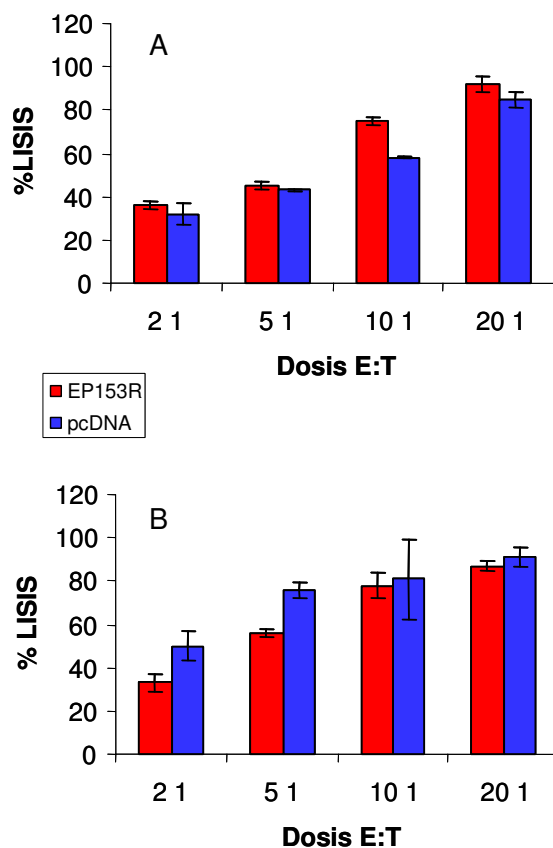


Figura 4.4.5 - Efecto de EP153R en la citolisis de células Jurkat por NKL. Las células Jurkat (células diana, T) transfectadas establemente con el gen EP153R o con el plásmido control pcDNA, se estimularon (A) o no (B) con una mezcla de PMA (20 ng/ml) más Ionóforo (1 μ M), 30 min antes y durante el marcaje (2 h) con Cr51 (aaa100 μ Ci/10⁶ cel), y se incubaron en contacto con células NKL (células efectoras, E) en diferentes proporciones (E:T) 2:1, 5:1, 10:1, 20:1, durante 4h. Los cultivos se centrifugaron para determinar la radiactividad liberada al medio, como se indica en el texto. Cada valor representa la media \pm DE de muestras por quintuplicado.

cpm esp. = radiactividad liberada por lisis espontánea

cpm max. = radiactividad liberada por lisis con detergente

En la Figura 4.4.5 se muestran los resultados de un experimento de este tipo, realizado sobre células diana sin estimular (panel B) o estimuladas (panel A) con PMA (20 ng/ml) más Ionóforo de calcio (1 μ M) 30 min antes y durante el marcaje con ⁵¹Cr. Aunque podría intuirse un ligero aumento de lisis en las células diana transfectadas con EP153R y estimuladas con PMA+Ion, respecto a las transfectadas con el plásmido control, consideramos que las diferencias son poco significativas, si bien correspondería con el tipo de resultado que debería obtenerse si el gen viral redujera, en este sistema heterólogo, la expresión de las moléculas (HLA-E) necesaria para la interacción con los receptores inhibitorios de las células NK, lo que resultaría en un aumento de la actividad citolítica.

Capítulo 5

Discusión

El objetivo final perseguido en esta Tesis ha sido entender el papel que puede jugar en la infección por el VPPA un gen como el EP153R, que codifica una proteína con homología a lectinas C.

5.1 EL GEN EP153R ES UN INHIBIDOR DE APOPTOSIS

Se sabe que el principal papel de las lectinas C de animales viene derivado de su actividad como receptor de membrana que media reconocimiento para la unión y endocitosis de glicoproteínas (Drickamer y Taylor, 1993). Por otro lado, se ha propuesto también una posible implicación de las lectinas en la modulación de apoptosis, como por ejemplo en el caso de la lectina C humana HIP/HAP, que estimula la regeneración en el hígado y protege a los hepatocitos contra la apoptosis inducida por la mezcla de drogas tales como TNF- α y actinomicina D (Simon et al., 2003), o en la expresión de los receptores inhibitorios CD94/NKG2A de células NK en el sistema murino, que parece relacionada con unos niveles bajos de apoptosis (Gunturi et al., 2003). No obstante nunca se había descrito una regulación en el proceso apoptótico por lectinas tipo C codificadas por virus animales. Miembros de familias virales tales como poxviridae, herpesviridae y asfarviridae codifican proteínas tipo lectina C que presentan funciones de modulación en la infectividad viral, en la diseminación del virus célula a célula o en procesos de hemadsorción, pero ninguna función relacionada con modulación apoptótica. La primera descripción (Hurtado et al., 2004), derivada de los datos que se presentan en esta Tesis, corresponde al gen EP153R del VPPA, que además de estar involucrado en el proceso de hemadsorción observado en células infectadas por VPPA y de presentar un dominio tipo lectina C y una homología con la región N-terminal de CD44, revela la presencia de un péptido de reconocimiento celular (RGD), que podría estar involucrado en la modulación de apoptosis por activación directa de caspasa-3 (Buckley et al., 1999). Sin embargo, la ausencia de esta secuencia RGD en la mayoría de los aislados secuenciados (Neilan et al., 1999) sugiere una menor implicación en funciones relevantes en la infección viral. En la primera parte de esta Memoria, describimos el estudio llevado a cabo sobre el efecto del gen EP153R en la apoptosis inducida en células

Vero sensibles a la infección por VPPA (infectadas con el virus parental (BA71V) o con un mutante de delección (Δ EP153R) que carecía del gen en estudio EP153R.

Nuestros resultados muestran un aumento de caspasa-3 cuando se infecta con el mutante de delección Δ EP153R, respecto a los valores obtenidos cuando se infecta con el virus parental. Este incremento se observó tanto en los niveles de proteína activada, determinados por el análisis de la proteólisis de la forma precursora inactiva de 32 kDa a la forma activa de 17 kDa, como por la valoración de la actividad biológica sobre un sustrato específico. Sin embargo, cuando se analizó el efecto de la expresión del gen viral en la actividad enzimática de otras caspasas como 6 y 8, se observó una ausencia de diferencias significativas en la inducción de esas caspasas entre ambos virus, lo que confirma el papel predominante de la caspasa-3 en la apoptosis inducida por VPPA. Es importante señalar que el incremento de apoptosis producido por el mutante de delección Δ EP153R no está relacionado con la introducción de un gen extraño (como el de la β -galactosidasa, incorporado en su construcción) en el genoma viral.

Aunque la activación de caspasa-3 se acepta como indicador preciso del desencadenamiento del proceso apoptótico, hemos querido confirmar los resultados con el análisis del ciclo celular, determinando los porcentajes de células con contenido hipodiploide, que corresponden con las poblaciones en necrosis o apoptosis. Los datos obtenidos en citometría de flujo evidencian un mayor porcentaje de muerte celular en los cultivos de células Vero infectadas con Δ EP153R, respecto a los infectados con BA71V, en línea con los resultados obtenidos en la activación de caspasa-3, y confirmando el efecto antiapoptótico del gen EP153R en la infección de células Vero por el VPPA.

Consideramos de gran relevancia la demostración de que este efecto inhibitorio de apoptosis del gen EP153R se pudiera demostrar, no sólo en otras líneas celulares susceptibles al virus en el laboratorio como COS y BHK, sino también en cultivos primarios de macrófagos de cerdo, que son una diana natural en la infección por VPPA. La ausencia del gen EP153R provocó el aumento de la actividad de caspasa-3 y del porcentaje de células en apoptosis/necrosis, si bien el proceso se inició a tiempos más tempranos en los cultivos de macrófagos que en las células Vero, como reflejo de la duración del ciclo viral en cada célula (menor en los macrófagos porcinos). Esto nos permite concluir que el gen EP153R del VPPA es capaz de modular el proceso apoptótico en las células diana de la infección natural. La importancia del citado gen en el contexto de la infección de VPPA en la naturaleza se fundamenta, además, en su presencia en numerosos aislados de campo, al menos en dieciséis de los veintidós aislados analizados.

Una estrategia para estudiar el efecto de un determinado gen consiste en demostrar que su ausencia en el modelo analizado provoca precisamente el efecto contrario que su presencia en el sistema. En el caso de genes virales, la aplicación de esta estrategia conlleva el análisis del efecto de la ausencia del gen en el ciclo infectivo (con un mutante de delección), y el estudio de la acción del gen aislado de la infección en un sistema heterólogo (transfectado con un plásmido de expresión). En el caso del gen EP153R, una vez analizado el efecto de la ausencia del gen con el mutante de delección Δ EP153R, se procedió al estudio de la expresión del gen en un sistema heterólogo, por transfección estable o transitoria del

gen viral en células Vero y COS. Las células Vero transfectadas con el plásmido control presentaron un aumento de la actividad de caspasa-3 tras el tratamiento con cualquiera de las drogas apoptóticas utilizadas, como actinomicina D, estaurosporina o camptotecina, mientras que las células transfectadas con el gen en estudio prácticamente no respondían al estímulo. Cuando se utilizó como alternativa para provocar el proceso apoptótico en células COS transfectadas establemente, la propia infección por VPPA (que mostró una capacidad inductora de apoptosis mayor que la de las drogas apoptóticas), se confirmó el resultado obtenido en células Vero, ya que la presencia del gen EP153R en dichas células dió lugar a una protección parcial (aprox. 45 %) sobre la activación de caspasa-3 inducida por la infección viral. Estos resultados se confirmaron en otro tipo de experimentos similares a los anteriores, pero utilizando un indicador apoptótico distinto a la activación de caspasa-3; en concreto, analizamos el porcentaje de células que se encontraban en procesos apoptóticos mediante la tinción específica con Anexina V. Este indicador apoptótico corroboró que la expresión estable del gen EP153R en células Vero infectadas por Δ EP153R propició una reducción mayor del 50 % de la fracción de células positivas a Anexina V, confirmando que la presencia del gen viral confería resistencia a la muerte celular programada inducida por infección con el VPPA.

Por tanto, la presencia del gen EP153R protegía contra la apoptosis inducida en cultivos celulares tanto por agentes químicos como por infección con el VPPA.

Considerando los resultados obtenidos tanto en el contexto de la infección viral como en la expresión en sistemas heterólogos, concluimos que el gen EP153R del VPPA tiene un papel relevante en la inhibición de la apoptosis inducida en células infectadas.

5.2 EL GEN EP153R INHIBE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE P53

Para determinar el mecanismo por el que el gen EP153R producía la inhibición de apoptosis, se investigaron las posibles diferencias en la expresión de varios componentes involucrados en la ruta de la inducción apoptótica (en los pasos que anteceden a la activación de la caspasa-3 efectora), en células infectadas con BA71V o con Δ EP153R. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias relevantes en extractos analizados por inmunoblotting con anticuerpos específicos contra Akt, p53, p21, Bcl-2, Bax ó Bad. Ésto indicaba que la cantidad total de cada componente se afectaba poco o nada por la presencia o ausencia del gen EP153R, pero no descartaba otras posibilidades que pueden afectar a la actividad de las proteínas, como su distribución subcelular (la translocación de componentes entre distintos compartimentos celulares permite que ejerzan o no su función), o la activación por modificaciones químicas tipo fosforilación, acetilación, etc. . .

En nuestro laboratorio se había descrito la importancia de la inducción de la proteína p53 en el contexto de la infección por VPPA (Granja et al., 2004), cuya implicación en la modulación del ciclo celular y de la apoptosis es perfectamente conocida. Con el fin de determinar si el gen EP153R afectaba de alguna manera a la actividad de p53, se procedió a analizar la actividad transcripcional de la citada proteína con la ayuda de un plásmido reportero que permitía cuantificar la capacidad transcripcional de p53 en cultivos que habían sido tratados con estaurosporina o infectados con virus, como inductores de p53. Estos experimentos mostraron que la presencia del gen EP153R en células Vero transfectadas establemente producía una reducción de la actividad transcripcional de p53.

Este resultado se pudo corroborar incluso dentro del contexto de la infección viral, ya que se observó que la actividad transcripcional de p53 aparecía aumentada a tiempos tardíos en la infección de células Vero con el mutante de delección Δ EP153R, comparada con la obtenida en los cultivos infectados con BA71V.

Con el objetivo de determinar qué región del gen EP153R estaba implicada en la inhibición de la actividad de p53, se generaron diferentes construcciones derivadas del gen viral (gen completo, dominio lectina C y dominio lectina C mutado, éste último con una modificación crítica para la estructura secundaria de la lectina) y se utilizaron para analizar la actividad transcripcional de p53 con el ensayo de actividad luciferasa, observando que sólo las células transfectadas con el gen completo presentaban un efecto inhibitorio sobre la actividad de p53, en este caso inducida por diferentes drogas como estaurosporina, camptotecina ó actinomicina D. Podemos concluir, por lo tanto, que la inhibición de la actividad transcripcional de p53 requiere no sólo de las regiones intra y extracelulares de la lectina viral, sino además del mantenimiento de la configuración espacial del dominio lectina.

Una vez confirmado que el gen EP153R estaba efectivamente implicado en el control de la actividad de p53, se intentó profundizar sobre el mecanismo que operaba en la inhibición de la actividad transcripcional de dicha proteína por parte del gen viral. El esquema general para abordar este punto se basó en el análisis de los distintos niveles donde la proteína viral podía ejercer su efecto modulador de la actividad de p53,

es decir:

- La inducción de p53 (análisis de expresión de p53 por inmunoblotting).
- La translocación al núcleo de p53 (analizado por inmunofluorescencia).
- La unión de p53 a las secuencias específicas en el ADN (ensayo de unión a ADN).
- La capacidad transactivante del complejo p53-ADN, que requiere el reclutamiento y activación de otros cofactores (ensayo de actividad transactivante con el plásmido GAL4-p53).

El análisis por inmunoblotting de la expresión de p53 no detectó diferencias en relación a la presencia o ausencia del gen EP153R. Además cuando se analizó por microscopía confocal la expresión o distribución de p53 en células Vero infectadas con BA71V o Δ EP153R, se observó que la translocación de p53 al núcleo ocurría a los mismos tiempos (tempranos) en ambas infecciones, sin diferencias aparentes en el nivel de expresión o localización de la proteína p53. Estos datos indicaban que el gen EP153R no afectaba a la síntesis, localización y/o acumulación de p53 en la célula huésped. El siguiente paso fue el análisis de la capacidad transactivante y de unión al DNA de p53.

Cuando se analizó la actividad transactivante de p53 en células Vero transfectadas establemente con el gen EP153R o con el plásmido control, se utilizó un sistema de transfección dual, de una proteína de fusión Gal4-p53 junto con un plásmido reportero pGAL4-luc, que cuantificaría la actividad transactivante de p53 con un ensayo de luciferasa. Los resultados obtenidos evidenciaron que no había diferencia en la actividad transactivante de la proteína p53 por la presencia o ausencia del gen EP153R o, lo que es lo mismo, que el gen EP153R no estaba realizando ningún efecto en el reclutamiento y activación de otros cofactores implicados en la activación de p53, ya que al usar el plásmido pGAL4-p53, el paso de unión de p53 al ADN no dependía de la capacidad de unión de la p53 del extracto, y por lo tanto sólo se analizaba el proceso de transactivación.

En definitiva, el único nivel pendiente de analizar donde la proteína viral podría ejercer su efecto modulador sobre la actividad de p53, era la unión de p53 a las secuencias específicas en el ADN. El ensayo de unión a ADN, en células Vero transfectadas con y sin el gen EP153R, ha permitido definir el nivel donde la proteína viral podría ejercer su efecto modulador de la actividad de p53. Los resultados obtenidos indicaron una disminución de la capacidad de unión de p53 al ADN en los cultivos estimulados, bien con droga o por infección viral, y que contenían el gen de la lectina del VPPA, respecto a los transfectados con el plásmido control, lo que sugiere una posible interferencia de EP153R con la capacidad de unión de p53 al ADN. Este efecto justificaría la inhibición de la actividad transcripcional de p53 detectada en presencia del gen EP153R, ya que el bloqueo de la interacción de p53 con el ADN celular impediría la transcripción de genes dependientes de p53. Una consecuencia esperable de la inhibición de la actividad de p53 sería la modulación de componentes como el Mdm2, cuya síntesis depende de la actividad transcripcional de p53, y que regula retronegativamente a su vez la síntesis de p53 (Honda et al., 2000),

promoviendo la degradación de p53 mediada por ubiquitina, traslocándola del núcleo al citosol para su posterior degradación en el proteasoma (Haupt et al., 1997).

Cuando estudiamos esta posibilidad, observamos un aumento de la expresión de Mdm2 en ausencia del gen EP153R en la infección de células Vero por VPPA. Además, y corroborando este dato, la actividad del promotor de Mdm2, determinada en experimentos de transfección con el plásmido pMdm2RE-luc, se vió inhibida en presencia del gen EP153R tanto en el contexto de la infección viral como en expresión heteróloga. Este resultado es coherente con la interpretación de los datos de actividad de p53, ya que si p53 es un factor de transcripción que regula la expresión de Mdm2, una disminución de su actividad transcripcional debe reflejarse directamente en la actividad del promotor de Mdm2.

Como hemos indicado anteriormente, el análisis de otros componentes relacionados con la ruta de inducción apoptótica previa a la activación de caspasa-3, como Akt, p21, Bcl-2, Bax ó Bad, no reveló diferencias significativas en extractos infectados con Ba71V ó con Δ EP153R, al menos a nivel de cantidad detectable por inmunoblotting con anticuerpos específicos para cada uno de los componentes. Quedaría por determinar si hay diferencias adscribibles a la presencia del gen EP153R en la localización subcelular y en la posible activación de los citados componentes por proteólisis, fosforilación, etc. . . , para poder excluir una conexión directa entre la inhibición de la actividad de p53 y la protección de la apoptosis. Por otro lado, debemos tener en cuenta que la inducción de apoptosis por la vía mitocondrial se puede producir por más de un estímulo. Por ejemplo, esta vía se puede activar tanto por p53 inducida por un estrés extracelular (en este caso una infección viral), como por la vía de los receptores de muerte, capaz de activar también componentes mitocondriales como Bad, Bid y Bcl-2, dando lugar a la liberación del citocromo C al citosol y originando el proceso apoptótico.

Además, en el caso concreto de la infección por VPPA, hemos determinado previamente que puede existir una inducción de apoptosis independiente de p53 (Granja et al., 2004) en presencia de cicloheximida, agente químico que inhibe la síntesis de proteínas, entre ellas la de p53. Por lo tanto, la posible conexión entre la inhibición de la actividad de p53 y la protección de apoptosis no está totalmente establecida, aunque sí se ha podido demostrar, en todo caso, que la presencia del gen EP153R produce tanto una inhibición de la actividad de p53 como una disminución de la activación de la caspasa-3 y de las células positivas a anexina.

En conclusión podemos afirmar que el gen EP153R de VPPA se comporta como un inhibidor de la apoptosis inducida en células bien por el propio VPPA o por agentes externos. Además es interesante señalar que al menos otros dos genes de VPPA están involucrados en la inhibición de la apoptosis: A179L, que codifica un homólogo viral a Bcl-2 ([?] Alfonso et al., 1996; Revilla et al., 1997) y A224L, con similitud a genes IAP (Chacón et al., 1995; Nogal et al., 2001), que inhibe la activación de caspasa y promueve la supervivencia en células de mamíferos. La razón por la que un virus como el VPPA acumula esa batería de genes antiapoptóticos es desconocida, pero podría estar relacionada con el hecho de que la muerte celular programada es un proceso que se dispara a tiempos tempranos y se desarrolla a tiempos intermedios y tardíos en la infección por VPPA (Carrascosa et al., 2002): esto exige un control viral desde

el proceso de desencapsulación y a lo largo de todo el ciclo infectivo, para maximizar la producción de la progenie viral, lo que justificaría la presencia de genes antiapoptóticos transcritos a tiempos tardíos de la infección (A224L) o a tiempos tempranos y tardíos (A179L y EP153R). La existencia de una expresión temprana (2-2,5 hpi) del gen EP153R, descrita en esta Memoria, justificaría la posible acción inhibidora de la lectina del VPPA en las primeras etapas del ciclo de infección viral.

5.3 EL GEN EP153R ES CAPAZ DE MODULAR LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS MHC-I

Hasta el momento no se había descrito ninguna lectina C viral involucrada en la modulación de MHC-I, ya que sólo se conocían casos de lectinas celulares, como aquellas presentes en receptores de células NK (CD94, CD69, NKG2A. . .) o chaperonas como calnexina o calreticulina (Nigam et al., 1994) que regulan el proceso de formación de nuevas moléculas de MHC-I. Sin embargo, algunos estudios revelan que ciertas proteínas virales, como BZLF2 del virus Epstein-Barr, presentan un dominio extracelular con una estructura similar a la de los miembros clásicos de la familia de lectinas tipo C, que se une a la cadena β de la molécula HLA-DR del MHC-II, inhibiendo de esta forma la presentación antigénica (Spriggs et al., 1996).

En el caso de la lectina del VPPA, hemos observado que la presencia del gen EP153R provoca un retraso en la expresión de los antígenos SLA-I porcinos, en el contexto de la infección viral. El efecto no es cuantitativamente muy dramático, quizá debido a que los reactivos específicos para moléculas porcinas no están tan desarrollados como para otras especies animales, lo que conlleva la no disponibilidad de anticuerpos que permitan discernir entre los distintos subtipos de SLA clase I, para determinar más finamente el efecto sobre moléculas concretas. Por otro lado, sería esperable que el efecto del gen EP153R fuera más evidente si se analizara la expresión de SLA-I en la membrana plasmática, más que la cantidad total en la célula. Este tipo de estudio se analizaría por citometría de flujo, técnica para la que ninguno de los anticuerpos disponibles ha resultado eficaz. Por lo tanto, ante la ausencia de reactivos específicos porcinos procedimos a analizar el posible efecto del gen EP153R en otro sistema animal, pero manteniendo el uso de células homólogas a las células diana de la infección de VPPA: así, utilizamos una línea celular (Raw) de macrófagos de ratón, transfectados o no con el gen EP153R, y analizamos la expresión en la membrana plasmática de moléculas murinas MHC-I, para las que existen reactivos comerciales que permiten marcajes razonables para análisis en citometría de flujo.

En este sistema hemos constatado una disminución de la expresión de las moléculas de MHC-I en la membrana plasmática, asociada a la presencia del gen viral, cuando los cultivos se estimulaban por infección (con vaccinia o VPPA).

Este modelo también nos facilitó el estudio de la región del gen EP153R implicada en la inhibición de la expresión de MHC-I, mediante el uso de diversas construcciones derivadas del gen viral. El análisis

de los resultados obtenidos en experimentos de citometría de flujo permitió detectar una inhibición de la expresión de MHC-I, después de la estimulación por infección viral, en las células que expresaban el dominio lectina C, tanto aquéllas que expresaban el gen completo como las que expresaban únicamente el dominio lectina. El cambio conformacional provocado por la eliminación de un puente disulfuro en el dominio lectina dió lugar a la pérdida de la actividad moduladora de MHC-I en la lectina viral, lo que demuestra la importancia del mantenimiento íntegro de la estructura secundaria del dominio lectina para la actividad reguladora de los antígenos de histocompatibilidad. De los resultados obtenidos también podemos deducir que el motivo de anclaje al RE presente en la región intracelular de la lectina viral no parece necesario para su acción moduladora de MHC-I, lo que suscita más interés por conocer dónde tiene lugar la posible interacción entre la proteína viral y MHC-I.

La utilización de un tercer modelo animal permitió corroborar que el gen EP153R es también capaz de modular la expresión de moléculas de MHC-I en un sistema humano, concretamente en células Jurkat transfectadas o no con el gen EP153R y estimuladas con PMA/Ionóforo. De nuevo, aunque la reducción en intensidad media de marca es moderada (alrededor de un 50 %), hay que considerar que el anticuerpo reconoce a todas las moléculas de clase I de MHC; si se pudiera disponer de un reactivo específico de subtipos, por ejemplo de HLA-E, que permitiera un marcaje eficiente para citometría de flujo, cabría esperar un mayor efecto inhibitorio, en el caso de que la lectina viral reconociera sólo a dicho subtipo (E), que es el que interacciona con los receptores inhibitorios de las células NK.

Teóricamente, la modulación de la expresión de MHC-I por el gen EP153R podría tener como consecuencia la regulación de la actividad citotóxica de células NK, si las moléculas de MHC-I que son ligando de los receptores inhibitorios de NK (HLA-E en el modelo humano) hubieran sufrido una disminución de su expresión en la membrana plasmática. Por ello, abordamos el estudio del efecto de la lectina viral en la citólisis mediada por células NK, en un modelo humano en donde células efectoras (línea NKL, que expresaban receptores inhibitorios CD94/NKG2A se enfrentaron con células diana (células Jurkat transfectadas o no con el gen en estudio, y marcadas con ^{51}Cr). La determinación de la actividad citolítica NK evidenció que la presencia del gen EP153R afectaba escasamente el porcentaje de lisis específica en el ensayo, si bien se podía intuir un ligero aumento de lisis en las células diana transfectadas con el gen EP153R y estimuladas con PMA/Ionóforo, respecto a las transfectadas con el plásmido control. Aunque la tendencia observada correspondería con el resultado esperable si el gen viral redujese, en este sistema heterólogo, la expresión de las moléculas de HLA-E necesaria para la interacción con los receptores inhibitorios de las células NK, consideramos que las diferencias no son significativas, y de hecho no se reproducen (incluso muestran cierta tendencia opuesta) en células no estimuladas.

Los resultados obtenidos en el análisis del efecto del gen EP153R sobre las moléculas de MHC-I, confirmaron las previsiones que se establecieron con la modelización de la estructura de la lectina viral en paralelo con otras moléculas con dominios tipo lectina C, y cuya estructura tridimensional había sido previamente establecida. Los datos obtenidos en este estudio permitieron prever algunos detalles estructurales y funcionales en la lectina viral, que resumimos a continuación:

1. El dominio lectina C del gen EP153R se puede superponer con los dominios lectina de los receptores de células NK (CD69, CD94, Ly49A, NKG2A. . .) que interactúan con las moléculas de MHC-I; además presenta una estructura tridimensional que mantiene las características propias de los dominios tipo lectina C clásicos: cuatro cisteínas involucradas en dos puentes disulfuros, dos α -hélices y cinco β -láminas (dos de ellas contrapuestas), careciendo, sin embargo, de un lazo no estructurado y de un puente disulfuro situado cerca del carboxilo terminal. La estructura secundaria de la proteína completa favorece la posibilidad de que se establezca un homodímero estable con dos moléculas de EP153R
2. La proteína EP153R presenta un motivo de doble lisina en la zona citoplasmática, que configura una señal de localización en el RE: los experimentos de expresión en sistemas heterólogos muestran una distribución reticular de la lectina viral, de acuerdo con los resultados obtenidos por inmunofluorescencia de células Vero transfectadas con la proteína EP153R fusionada a una proteína fluorescente verde. La no disponibilidad de un anticuerpo específico frente a la proteína EP153R madura (como se sintetiza en el célula infectada) ha dificultado la localización de la proteína en el contexto de la infección viral. Sin embargo, trabajos previos realizados en nuestro laboratorio para determinar por inmunofluorescencia la localización subcelular de la proteína pEP153R, en células BHK infectadas con un pseudovirus Sindbis recombinante que expresaba la lectina viral, revelaron que la señal específica presentaba un perfil reticular que se extendía por todo el citoplasma de las células infectadas (Inmaculada Galindo, Tesis Doctoral, Madrid 1999). De hecho, ésta fue la primera evidencia de que la lectina viral podía situarse en el RE cuando se expresaba en un sistema heterólogo.
3. La modelización tridimensional del homodímero de EP153R junto con una molécula de MHC-I evidenció una posible interacción estable entre la lectina viral y los antígenos de histocompatibilidad, anticipando la existencia de dos interacciones, una con cada cadena del homodímero de EP153R, que contactarían con regiones distintas en la molécula de MHC-I, y adelantando los contactos esperables entre los residuos de aminoácidos en la zona de interacción. Como consecuencia, si ambas estructuras, lectina viral y moléculas de MHC-I, se encontraran en proximidad física, se podría esperar razonablemente una interacción entre ellas, y esta situación podría presentarse en el RE.

Ante el hecho experimental de que la presencia de la lectina viral provoca la reducción de la expresión de los antígenos de histocompatibilidad de clase I en distintos modelos animales, planteamos la siguiente hipótesis: la proteína EP153R, residente en el RE, podría secuestrar a las moléculas nacientes de MHC-I que se están sintetizando y estabilizando por interacción con diferentes factores en dicho orgánulo, evitando así su posterior transporte vía Golgi a la membrana plasmática, inhibiendo por tanto la presentación antigénica; como consecuencia se evitaría el reconocimiento por parte de los CTLs, y se podría incrementar la citotoxicidad mediada por las células NK. La lectina viral interactuaría con las moléculas de MHC-I de la misma manera que lo hacen otras lectinas tipo C como la calnexina y calreticulina,

moléculas que estabilizan parte de la ruta biosintética de las moléculas de MHC-I, o de la misma manera que los receptores inhibitorios de células NK interaccionan con MHC-I en la membrana plasmática.

Cabe preguntarse qué función podría cumplir la lectina del VPPA en la infección viral. La disminución de la expresión de MHC-I podría interferir con el reconocimiento de las células infectadas por los CTLs, evadiendo en alguna medida la respuesta del sistema inmune. Esto, unido al efecto antiapoptótico temprano descrito para el gen EP153R, sería beneficioso en cuanto a la infección productiva del VPPA en la célula susceptible. Sin embargo, la disminución de la expresión de MHC-I implicaría una reducción en un subtipo de clase I (E) que podría provocar una mayor lisis por parte de las células NK, ya que, como se ha comentado anteriormente, esa molécula es el ligando específico que interaccionaría con los receptores inhibitorios de las células NK, bloqueando el efecto lítico de dichas células sobre las células infectadas.

En nuestro caso, sin embargo, los experimentos realizados en el modelo humano sugieren que no hay aumento de citotoxicidad de células NK en presencia de la lectina del VPPA. Es posible que la lectina viral no pueda interaccionar adecuadamente con su ligando en un sistema heterólogo como el humano, pero también existe la posibilidad de que el VPPA pueda mantener su efecto sobre el MHC-I para evadir la acción citotóxica de los CTLs, y mantener, al mismo tiempo, los niveles del subtipo E, como ocurre en el caso del citomegalovirus humano, que codifica una proteína que contiene una secuencia hidrofóbica idéntica al nonapéptido VMAPRTLIL (que se une a las moléculas de HLA-E para estabilizar la expresión de éstas en la membrana plasmática) derivado de la secuencia líder de las moléculas de HLA-I: esto permite que la célula infectada por HCMV mantenga una expresión adecuada de HLA-E, independiente de la disminución de la expresión de moléculas de MHC-I, lo que le hace resistente a la lisis por células NK. (Tomasec et al., 2000; Ulbrecht et al., 2000).

Otra posible interpretación del efecto del gen EP153R sobre MHC-I, tendría en consideración la evidente semejanza estructural de la lectina viral con el antígeno de diferenciación CD69 sobre el que se ha modelado su estructura tridimensional, si se considera que esta molécula, presente en células T y NK, ha sido considerada por algunos autores como un receptor estimulador (en vez de inhibitorio) de células NK (Borrego et al., 1999). En este caso, el secuestro de los ligandos específicos de CD69 por parte de EP153R provocaría la no-activación de la respuesta lítica de las células NK sobre las células infectadas por el VPPA, por lo que la acción del gen EP153R sería doblemente positiva en cuanto a la producción eficiente de virus infeccioso.

Capítulo 6

Conclusiones

1. La expresión del gen EP153R del VPPA tiene lugar desde tiempos tempranos en la infección viral (2-2,5 h) y se detecta en numerosos aislados de campo.
2. La presencia del gen EP153R disminuye los niveles de apoptosis (caspasa-3, células hipodiploides,..) inducidos en células susceptibles infectadas por el VPPA.
3. La expresión heteróloga del gen de la lectina viral inhibe igualmente la apoptosis inducida por agentes externos.
4. La presencia del gen EP153R provoca una reducción de la actividad transcripcional de p53, probablemente por interferencia con la unión de p53 al ADN celular. Esta inhibición requiere la integridad de la proteína viral.
5. La estructura tridimensional previsible para la lectina del VPPA es similar a la descrita para los dominios tipo lectina C de receptores de células NK, lo que favorece su posible interacción con moléculas de MHC-I.
6. La presencia del gen EP153R provoca una disminución de la expresión de SLA-I en macrófagos de cerdo infectados por el VPPA.
7. La expresión de moléculas de MHC-I, inducida por infección viral en la membrana plasmática de células murinas, se reduce en presencia de la lectina del VPPA. Esta reducción requiere que la estructura del dominio lectina se mantenga intacta.
8. La presencia del gen EP153R reduce la expresión de MHC-I en la membrana plasmática de células humanas. Este efecto no parece tener consecuencias sobre la actividad citotóxica de células NKL.

Bibliografía

Afonso, C. L., J. G. Neilan, G. F. Kutish, y D. L. Rock. 1996. An African swine fever virus Bc1-2 homolog, 5-HL, suppresses apoptotic cell death. *J Virol* **70**:4858-63.

Alcamí, A., y U. H. Koszinowski. 2000. Viral mechanisms of immune evasion. *Trends Microbiol* **8**:410-8.

Altschul, S. F., and D. J. Lipman. 1990. Protein database searches for multiple alignments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:5509-13.

Andrés, G., C. Simón-Mateo, y E. Viñuela. 1997. Assembly of African swine fever virus: role of polyprotein pp220. *J Virol* **71**:2331-41.

Andrés, G., R. García-Escudero, C. Simón-Mateo, and E. Viñuela. 1998. African swine fever virus is enveloped by a two-membraned collapsed cisterna derived from the endoplasmic reticulum. *J Virol* **72**:8988-9001.

Bartz, S. R., y M. Emerman. 1999. Human immunodeficiency virus type 1 Tat induces apoptosis and increases sensitivity to apoptotic signals by up

Benedict, C. A., P. S. Norris, y C. F. Ware. 2002. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nat Immunol* **3**:1013-8.

Borrego, F., M. J. Robertson, J. Ritz, J. Pena, y R. Solana. 1999. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology* **97**:159-65.

Boyington, J. C., A. N. Riaz, A. Patamawenu, J. E. Coligan, A. G. Brooks, and P. D. Sun. 1999. Structure of CD94 reveals a novel C-type lectin fold: implications for the NK cell-associated CD94/NKG2 receptors. *Immunity* **10**:75-82.

Breese, S. S., Jr., y W. R. Hess. 1966. Electron microscopy of African swine fever virus hemadsorption. *J Bacteriol* **92**:272-4.

Brojatsch, J., J. Naughton, M. M. Rolls, K. Zingler, y J. A. Young. 1996. CAR1, a TNFR-related

protein, is a cellular receptor for cytopathic avian leukosis-sarcoma viruses and mediates apoptosis. *Cell* **87**:845-55.

Buckley, C. D., D. Pilling, N. V. Henriquez, G. Parsonage, K. Threlfall, D. Scheel-Toellner, D. L. Simmons, A. N. Akbar, J. M. Lord, y M. Salmon. 1999. RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. *Nature* **397**:534-9.

Budihardjo, I., H. Oliver, M. Lutter, X. Luo, y X. Wang. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**:269-90.

Cameron, C., S. Hota-Mitchell, L. Chen, J. Barrett, J. X. Cao, C. Macaulay, D. Willer, D. Evans, and G. McFadden. 1999. The complete DNA sequence of myxoma virus. *Virology* **264**:298-318.

Carrascosa, A. L., M. J. Bustos, M. L. Nogal, G. González de Buitrago, y Y. Revilla. 2002. Apoptosis induced in an early step of African swine fever virus entry into vero cells does not require virus replication. *Virology* **294**:372-82.

Carrascosa, A. L., J. F. Santarén, y E. Viñuela. 1982. Production and titration of African swine fever virus in porcine alveolar macrophages. *J Virol Methods* **3**:303-10.

Carrascosa, J. L., J. M. Carazo, A. L. Carrascosa, N. Garcia, A. Santisteban, y E. Viñuela. 1984. General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles. *Virology* **132**:160-72.

Cobbold, C., y T. Wileman. 1998. The major structural protein of African swine fever virus, p73, is packaged into large structures, indicative of viral capsid or matrix precursors, on the endoplasmic reticulum. *J Virol* **72**:5215-23.

Cohen, G. B., R. T. Gandhi, D. M. Davis, O. Mandelboim, B. K. Chen, J. L. Strominger, y D. Baltimore. 1999. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* **10**:661-71.

Cosman, D., N. Fanger, L. Borges, M. Kubin, W. Chin, L. Peterson, y M. L. Hsu. 1997. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* **7**:273-82.

Chacón, M. R., F. Almazán, M. L. Nogal, E. Viñuela, y J. F. Rodríguez. 1995. The African swine fever virus IAP homolog is a late structural polypeptide. *Virology* **214**:670-4. **Chehab, N. H., A. Malikzay, E. S. Stavridi, y T. D. Halazonetis.** 1999. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13777-82.

Desagher, S., y J. C. Martinou. 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* **10**:369-77.

-
- Dixon, L. K., C. C. Abrams, G. Bowick, L. C. Goatley, P. C. Kay-Jackson, D. Chapman, E. Liverani, R. Nix, R. Silk, y F. Zhang.** 2004. African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems. *Vet Immunol Immunopathol* **100**:117-34.
- Dobner, T., N. Horikoshi, S. Rubenwolf, y T. Shenk.** 1996. Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science* **272**:1470-3.
- Drickamer, K., y M. E. Taylor.** 1993. Biology of animal lectins. *Annu Rev Cell Biol* **9**:237-64.
- Enjuanes, L., A. L. Carrascosa, y E. Viñuela.** 1976. Isolation and properties of the DNA of African swine fever (ASF) virus. *J Gen Virol* **32**:479-92.
- Everett, H., y G. McFadden.** 1999. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol* **7**:160-5.
- Farrell, H. E., y N. J. Davis-Poynter.** 1998. From sabotage to camouflage: viral evasion of cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell-mediated immunity. *Semin Cell Dev Biol* **9**:369-78.
- Gabius, H. J.** 1997. Animal lectins. *Eur J Biochem* **243**:543-76.
- Galindo, I., F. Almazán, M. J. Bustos, E. Viñuela, y A. L. Carrascosa.** 2000. African Swine Fever Virus EP153R Open Reading Frame Encodes a Glycoprotein Involved in the Hemadsorption of Infected Cells. *Virology* **266**:340-351.
- Garg, H., y R. Blumenthal.** 2006. HIV gp41-induced apoptosis is mediated by caspase-3-dependent mitochondrial depolarization, which is inhibited by HIV protease inhibitor nelfinavir. *J Leukoc Biol* **79**:351-62.
- Guex, N., A. Diemand, and M. C. Peitsch.** 1999. Protein modelling for all. *Trends Biochem Sci* **24**:364-7.
- Guex, N., and M. C. Peitsch.** 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**:2714-23.
- Gewurz, B. E., E. W. Wang, D. Tortorella, D. J. Schust, y H. L. Ploegh.** 2001. Human cytomegalovirus US2 endoplasmic reticulum-lumenal domain dictates association with major histocompatibility complex class I in a locus-specific manner. *J Virol* **75**:5197-204.
- Gliniak, B., y T. Le.** 1999. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand's antitumor activity in vivo is enhanced by the chemotherapeutic agent CPT-11. *Cancer Res* **59**:6153-8.
- Granja, A. G., M. L. Nogal, C. Hurtado, J. Salas, M. L. Salas, A. L. Carrascosa, y Y. Revilla.** 2004. Modulation of p53 cellular function and cell death by African swine fever virus. *J Virol* **78**:7165-74.

- Granja, A. G., M. L. Nogal, C. Hurtado, V. Vila, A. L. Carrascosa, M. L. Salas, M. Fresno, y Y. Revilla.** 2004. The viral protein A238L inhibits cyclooxygenase-2 expression through a nuclear factor of activated T cell-dependent transactivation pathway. *J Biol Chem* **279**:53736-46.
- Gunturi, A., R. E. Berg, y J. Forman.** 2003. Preferential survival of CD8 T and NK cells expressing high levels of CD94. *J Immunol* **170**:1737-45.
- Hanahan, D.** 1985. Techniques for transformation of *E. coli*, p. 109-135. In D. Glover (ed.), DNA cloning: a practical approach, vol. 1. IRL Press, Oxford.
- Haupt, Y., R. Maya, A. Kazaz, y M. Oren.** 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**:296-9.
- Hengel, H., W. Brune, y U. H. Koszinowski.** 1998. Immune evasion by cytomegalovirus—survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol* **6**:190-7.
- Hooft, R. W., C. Sander, M. Scharf, and G. Vriend.** 1996. The PDBFINDER database: a summary of PDB, DSSP and HSSP information with added value. *Comput Appl Biosci* **12**:525-9.
- Holm, L., and J. Park.** 2000. DaliLite workbench for protein structure comparison. *Bioinformatics* **16**:566-7.
- Honda, R., y H. Yasuda.** 2000. Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene* **19**:1473-6.
- Hurtado, C., A. G. Granja, M. J. Bustos, M. L. Nogal, G. González de Buitrago, V. G. de Yébenes, M. L. Salas, Y. Revilla, y A. L. Carrascosa.** 2004. The C-type lectin homologue gene (EP153R) of African swine fever virus inhibits apoptosis both in virus infection and in heterologous expression. *Virology* **326**:160-70.
- Innis, M. A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. y White, T.J.** 1990. PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc, San Diego.
- Inoue, H., H. Nojima, y H. Okayama.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-8.
- Jackson, M. R., T. Nilsson, y P. A. Peterson.** 1990. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Embo J* **9**:3153-62.
- Jault, F. M., J. M. Jault, F. Ruchti, E. A. Fortunato, C. Clark, J. Corbeil, D. D. Richman, y D. H. Spector.** 1995. Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J Virol* **69**:6697-704.

-
- Kelley, L. A., R. M. MacCallum, and M. J. Sternberg.** 2000. Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. *J Mol Biol* **299**:499-520.
- Kroemer, G., N. Zamzami, y S. A. Susin.** 1997. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* **18**:44-51.
- Leong, L. Y., A. F. Le Rolle, E. V. Deverson, S. J. Powis, A. P. Larkins, J. T. Vaage, A. Stokland, D. Lambrecht-Washington, B. Rolstad, E. Joly, y G. W. Butcher.** 1999. RT1-U: identification of a novel, active, class Ib alloantigen of the rat MHC. *J Immunol* **162**:743-52.
- Levine, A. J.** 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**:323-31.
- Llera, A. S., F. Viedma, F. Sanchez-Madrid, and J. Tormo.** 2001. Crystal structure of the C-type lectin-like domain from the human hematopoietic cell receptor CD69. *J Biol Chem* **276**:7312-9.
- Machold, R. P., E. J. Wiertz, T. R. Jones, y H. L. Ploegh.** 1997. The HCMV gene products US11 and US2 differ in their ability to attack allelic forms of murine major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chains. *J Exp Med* **185**:363-6.
- Mahr, J. A., y L. R. Gooding.** 1999. Immune evasion by adenoviruses. *Immunol Rev* **168**:121-30.
- Mausser, A., S. Saito, E. Appella, C. W. Anderson, W. T. Seaman, y S. Kenney.** 2002. The Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 regulates p53 function through multiple mechanisms. *J Virol* **76**:12503-12.
- Mayo, L. D., y D. B. Donner.** 2002. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends Biochem Sci* **27**:462-7.
- Mehmet, H.** 2000. Caspases find a new place to hide. *Nature* **403**:29-30.
- Minden, A., A. Lin, F. X. Claret, A. Abo, y M. Karin.** 1995. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**:1147-57.
- Miyashita, T., M. Harigai, M. Hanada, y J. C. Reed.** 1994. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* **54**:3131-5.
- Morris, C. R., A. J. Reber, J. L. Petersen, S. E. Vargas, y J. C. Solheim.** 2004. Association of intracellular proteins with folded major histocompatibility complex class I molecules. *Immunol Res* **30**:171-9.
- Nakagawa, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. A. Yankner, y J. Yuan.** 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**:98-103.

- Natarajan, K., A. Hicks, J. Mans, H. Robinson, R. Guan, R. A. Mariuzza, y D. H. Margulies.** 2006. Crystal structure of the murine cytomegalovirus MHC-I homolog m144. *J Mol Biol* **358**:157-71.
- Neilan, J. G., M. V. Borca, Z. Lu, G. F. Kutish, S. B. Kleiboeker, C. Carrillo, L. Zsak, y D. L. Rock.** 1999. An African swine fever virus ORF with similarity to C-type lectins is non-essential for growth in swine macrophages in vitro and for virus virulence in domestic swine. *J Gen Virol* **80**:2693-7.
- Nigam, S. K., A. L. Goldberg, S. Ho, M. F. Rohde, K. T. Bush, y M. Sherman.** 1994. A set of endoplasmic reticulum proteins possessing properties of molecular chaperones includes Ca(2+)-binding proteins and members of the thioredoxin superfamily. *J Biol Chem* **269**:1744-9.
- Nogal, M. L., G. González de Buitrago, C. Rodríguez, B. Cubelos, A. L. Carrascosa, M. L. Salas, y Y. Revilla.** 2001. African swine fever virus IAP homologue inhibits caspase activation and promotes cell survival in mammalian cells. *J Virol* **75**:2535-43.
- Notredame, C., D. G. Higgins, and J. Heringa.** 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* **302**:205-17.
- Pan, G., K. O'Rourke, y V. M. Dixit.** 1998. Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* **273**:5841-5.
- Park, J., T. Seo, S. Hwang, D. Lee, Y. Gwack, y J. Choe.** 2000. The K-bZIP protein from Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with p53 and represses its transcriptional activity. *J Virol* **74**:11977-82.
- Peitsch, M. C.** 1996. ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem Soc Trans* **24**:274-9.
- Pogo, B. G., S. M. Melana, y J. Blaho.** 2004. Poxvirus infection and apoptosis. *Int Rev Immunol* **23**:61-74.
- Poole, B. D., J. Zhou, A. Grote, A. Schiffenbauer, y S. J. Naides.** 2006. Apoptosis of liver-derived cells induced by parvovirus B19 nonstructural protein. *J Virol* **80**:4114-21.
- Powell, P. P., L. K. Dixon, y R. M. Parkhouse.** 1996. An IkappaB homolog encoded by African swine fever virus provides a novel mechanism for downregulation of proinflammatory cytokine responses in host macrophages. *J Virol* **70**:8527-33.
- Prives, C., y P. A. Hall.** 1999. The p53 pathway. *J Pathol* **187**:112-26.
- Qian, H., T. Wang, L. Naumovski, C. D. Lopez, y R. K. Brachmann.** 2002. Groups of p53 target genes involved in specific p53 downstream effects cluster into different classes of DNA binding sites.

Oncogene **21**:7901-11.

Radaev, S., B. Rostro, A. G. Brooks, M. Colonna, and P. D. Sun. 2001. Conformational plasticity revealed by the cocrystal structure of NKG2D and its class I MHC-like ligand ULBP3. *Immunity* **15**:1039-49.

Revilla, Y., M. Callejo, J. M. Rodríguez, E. Culebras, M. L. Nogal, M. L. Salas, E. Viñuela, y M. Fresno. 1998. Inhibition of nuclear factor kappaB activation by a virus-encoded IkappaB-like protein. *J Biol Chem* **273**:5405-11.

Revilla, Y., A. Cebrián, E. Baixeras, C. Martínez, E. Viñuela, y M. L. Salas. 1997. Inhibition of apoptosis by the African swine fever virus Bcl-2 homologue: role of the BH1 domain. *Virology* **228**:400-4.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Sanz-Parra, A., M. A. Jiménez-Clavero, M. M. García-Briones, E. Blanco, F. Sobrino, y V. Ley. 1999. Recombinant viruses expressing the foot-and-mouth disease virus capsid precursor polypeptide (P1) induce cellular but not humoral antiviral immunity and partial protection in pigs. *Virology* **259**:129-34.

Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, y P. M. Howley. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**:1129-36.

Schwede, T., J. Kopp, N. Guex, and M. C. Peitsch. 2003. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* **31**:3381-5.

Senkevich, T. G., J. J. Bugert, J. R. Sisler, E. V. Koonin, G. Darai, and B. Moss. 1996. Genome sequence of a human tumorigenic poxvirus: prediction of specific host response-evasion genes. *Science* **273**:813-6.

Shao, R., D. F. Lee, Y. Wen, Y. Ding, W. Xia, B. Ping, H. Yagita, B. Spohn, y M. C. Hung. 2005. E1A sensitizes cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through enhancement of caspase activation. *Mol Cancer Res* **3**:219-26.

Simon, M. T., A. Pauloin, G. Normand, H. T. Lieu, H. Mouly, G. Pivert, F. Carnot, J. G. Tralhao, C. Brechot, y L. Christa. 2003. HIP/PAP stimulates liver regeneration after partial hepatectomy and combines mitogenic and anti-apoptotic functions through the PKA signaling pathway. *Faseb J* **17**:1441-50.

- Spriggs, M. K., R. J. Armitage, M. R. Comeau, L. Strockbine, T. Farrah, B. Macduff, D. Ulrich, M. R. Alderson, J. Mullberg, y J. I. Cohen.** 1996. The extracellular domain of the Epstein-Barr virus BZLF2 protein binds the HLA-DR beta chain and inhibits antigen presentation. *J Virol* **70**:5557-63.
- Stevenson, P. G., S. Efstathiou, P. C. Doherty, y P. J. Lehner.** 2000. Inhibition of MHC class I-restricted antigen presentation by gamma 2-herpesviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:8455-60.
- Stout, R. D., y J. Suttles.** 2005. Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. *Immunol Rev* **205**:60-71.
- Takada, S., N. Kaneniwa, N. Tsuchida, y K. Koike.** 1997. Cytoplasmic retention of the p53 tumor suppressor gene product is observed in the hepatitis B virus X gene-transfected cells. *Oncogene* **15**:1895-901.
- Teodoro, J. G., D. W. Heilman, A. E. Parker, y M. R. Green.** 2004. The viral protein Apoptin associates with the anaphase-promoting complex to induce G2/M arrest and apoptosis in the absence of p53. *Genes Dev* **18**:1952-7.
- Thompson, D. A., C. N. Cronin, and F. Martin.** 1994. Genomic cloning and sequence analyses of the bovine alpha-, beta A- and beta B-inhibin/activin genes. Identification of transcription factor AP-2-binding sites in the 5'-flanking regions by DNase I footprinting. *Eur J Biochem* **226**:751-64.
- Tomasec, P., V. M. Braud, C. Rickards, M. B. Powell, B. P. McSharry, S. Gadola, V. Cerundolo, L. K. Borysiewicz, A. J. McMichael, y G. W. Wilkinson.** 2000. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* **287**:1031.
- Tormo, J., K. Natarajan, D. H. Margulies, and R. A. Mariuzza.** 1999. Crystal structure of a lectin-like natural killer cell receptor bound to its MHC class I ligand. *Nature* **402**:623-31.
- Tomley, F., M. Binns, J. Campbell, and M. Boursnell.** 1988. Sequence analysis of an 11.2 kilobase, near-terminal, BamHI fragment of fowlpox virus. *J Gen Virol* **69** (Pt 5):1025-40.
- Tortorella, D., B. E. Gewurz, M. H. Furman, D. J. Schust, y H. L. Ploegh.** 2000. Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol* **18**:861-926.
- Turner, N. A., F. Xia, G. Azhar, X. Zhang, L. Liu, y J. Y. Wei.** 1998. Oxidative stress induces DNA fragmentation and caspase activation via the c-Jun NH2-terminal kinase pathway in H9c2 cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* **30**:1789-801.
- Ulbrecht, M., S. Martinozzi, M. Grzeschik, H. Hengel, J. W. Ellwart, M. Pla, y E. H. Weiss.** 2000. Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *J Immunol* **164**:5019-22.

- Vaux, D. L., y S. J. Korsmeyer. 1999. Cell death in development. *Cell* **96**:245-54.
- Velloso, L. M., J. Michaelsson, H. G. Ljunggren, G. Schneider, and A. Achour. 2004. Determination of structural principles underlying three different modes of lymphocytic choriomeningitis virus escape from CTL recognition. *J Immunol* **172**:5504-11.
- Villeda, C. J., S. M. Williams, P. J. Wilkinson, y E. Viñuela. 1993. Consumption coagulopathy associated with shock in acute African swine fever. *Arch Virol* **133**:467-75.
- Viñuela, E. 1985. African swine fever virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **116**:151-70.
- Voigt, S., G. R. Sandford, L. Ding, y W. H. Burns. 2001. Identification and characterization of a spliced C-type lectin-like gene encoded by rat cytomegalovirus. *J Virol* **75**:603-11.
- Vriend, G. 1990. Parameter relation rows: a query system for protein structure function relationships. *Protein Eng* **4**:221-3.
- Wang, H. G., T. Miyashita, S. Takayama, T. Sato, T. Torigoe, S. Krajewski, S. Tanaka, L. Hovey, 3rd, J. Troppmair, U. R. Rapp, et al. 1994. Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. *Oncogene* **9**:2751-6.
- Weiss, D. J., O. A. Evanson, D. J. McClenahan, M. S. Abrahamsen, y B. K. Walcheck. 2001. Regulation of expression of major histocompatibility antigens by bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* or *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infect Immun* **69**:1002-8.
- Westendorp, M. O., R. Frank, C. Ochsenbauer, K. Stricker, J. Dhein, H. Walczak, K. M. Debatin, y P. H. Krammer. 1995. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* **375**:497-500.
- Wilcock, D., S. A. Duncan, P. Traktman, W. H. Zhang, and G. L. Smith. 1999. The vaccinia virus A4OR gene product is a nonstructural, type II membrane glycoprotein that is expressed at the cell surface. *J Gen Virol* **80** (Pt 8):2137-48.
- Yang, Y., T. Ikezoe, T. Takeuchi, Y. Adachi, Y. Ohtsuki, S. Takeuchi, H. P. Koeffler, y H. Taguchi. 2005. HIV-1 protease inhibitor induces growth arrest and apoptosis of human prostate cancer LNCaP cells in vitro and in vivo in conjunction with blockade of androgen receptor STAT3 and AKT signaling. *Cancer Sci* **96**:425-33.
- Yáñez, R. J., J. M. Rodríguez, M. L. Nogal, L. Yuste, C. Enríquez, J. F. Rodríguez, y E. Viñuela. 1995. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. *Virology* **208**:249 - 278.

The C-type lectin homologue gene (EP153R) of African swine fever virus inhibits apoptosis both in virus infection and in heterologous expression

Carolina Hurtado,^a Aitor G. Granja,^a María J. Bustos,^a María L. Nogal,^a
Gonzalo González de Buitrago,^b Virginia G. de Yébenes,^a María L. Salas,^a
Yolanda Revilla,^a and Angel L. Carrascosa^{a,*}

^aCentro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (C.S.I.C.-U.A.M.), Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^bCentro Nacional de Biotecnología (C.S.I.C.), Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

Received 29 March 2004; accepted 24 May 2004

Abstract

The open reading frame EP153R of African swine fever virus (ASFV) encodes a nonessential protein that has been involved in the hemadsorption process induced in virus-infected cells. By the use of a virus deletion mutant lacking the EP153R gene, we have detected, in several virus-sensitive cells, increased levels of caspase-3 and cell death as compared with those obtained after infection with the parental BA71V strain. Both transient and stable expression of the EP153R gene in Vero or COS cells resulted in a partial protection of the transfected lines from the apoptosis induced in response to virus infection or external stimuli. The presence of gene EP153R resulted in a reduction of the transactivating activity of the cellular protein p53 in Vero cell cultures in which apoptosis was induced by virus infection or staurosporine treatment. This is to our knowledge the first description of a viral C-type lectin with anti-apoptotic properties.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: ASFV; C-type lectin; EP153R gene; Caspase-3; p53; Apoptosis

Introduction

C-type animal lectins are proteins found in serum, extracellular matrix, and cellular membranes, which exhibit a Ca^{2+} -dependent carbohydrate-binding activity enabling the recognition of both endogenous and exogenous specific glycoconjugates in animals. Lectins are generally considered as non-enzymatic proteins acting as receptors for carbohydrate ligands (Gabiús, 1997). It is known, on the other hand, that several cells of the immune system (macrophages, B, T, and natural killer cells) display receptors with sequence similarity to C-type lectins, thus involving the mammalian lectins both in cell-to-cell interactions and in pathogen recognition by their ability to mediate discrimination between self and nonself (Weis et al., 1998). Several proteins with C-type lectin-like domains have been reported

in animal viruses, most of them in the poxviridae family (fowlpox (Afonso et al., 2000; Tomley et al., 1988), vaccinia (Blasco et al., 1993; Goebel et al., 1990; Wilcock et al., 1999), cowpox (Shchelkunov et al., 1998), myxoma (Cameron et al., 1999), and molluscum contagiosum (Senkevich et al., 1996)), although a lectin homologue has also been found in herpesviridae (cytomegalovirus (Voigt et al., 2001)) and in asfarviridae (African swine fever virus (ASFV) (Galindo et al., 2000; Neilan et al., 1999; Yáñez et al., 1995)). These proteins have proven or putative roles in virus infectivity, cell to cell spreading, inhibition of cell-mediated cytotoxicity, or hemadsorption. However, the actual function of many of the viral lectin homologues in immune evasion or in the virus infective cycle remains to be determined.

In addition to the immune response developed by the host to combat virus infections, the infected cell itself can activate a suicide program (O'Brien, 1998), which may have an adverse effect on virus replication. In turn, viruses have evolved different strategies to regulate this process,

* Corresponding author. Fax: +34-914974799.

E-mail address: acarrascosa@cbm.uam.es (A.L. Carrascosa).

either by preventing premature cell death to allow infectious virus production or by promoting apoptosis for rapid cell-to-cell virus dissemination (Everett and McFadden, 1999).

African swine fever virus (ASFV), a large enveloped deoxyvirus, is the causative agent of a highly contagious disease of domestic pigs and infects a variety of cells of the mononuclear phagocytic system (reviewed in (Costa, 1990; Hess, 1981; Vinuela, 1985). ASFV replication can elicit the apoptotic response both in acute in vivo (Gomez-Villamandos et al., 1995; Oura et al., 1998; Ramiro-Ibanez et al., 1996) and in vitro infections (Nogal et al., 2001), in a process triggered in the absence of virus replication, after virus internalization, and before early virus protein synthesis, most probably during the virus uncoating (Carrascosa et al., 2002). Several ASFV genes have been reported to modulate the programmed cell death or to interfere with the host cell response; among them, A179L, which encodes a viral Bcl-2 homologue (Afonso et al., 1996; Revilla et al., 1997), and A224L, with similarity to IAP genes (Chacon et al., 1995; Nogal et al., 2001), have been shown to inhibit caspase activation and promote cell survival in mammalian cells. A224L is also able to activate the transcription factor NF- κ B (Rodriguez et al., 2002), while another ASFV gene, A238L, which encodes an IkappaB-like protein (Powell et al., 1996; Revilla et al., 1998), behaves as an effective inhibitor of NF- κ B activity (Revilla et al., 1998). As mentioned above, the ASFV genome also contains a gene (EP153R) with a C-type animal lectin-like domain (Yáñez et al., 1995), which has been involved in the hemadsorption process observed in ASFV-infected cells (Galindo et al., 2000). The EP153R gene is transcribed both during the early and late phases of the infectious cycle, the expression of the protein pEP153R being detected from early times (6 hpi) after infection. Besides the C-type lectin domain, the EP153R sequence reveals a cell attachment (RGD) sequence and significant homology with the N-terminal region of CD44 molecules involved in cellular adhesion and T-cell activation, respectively. We show in this report that the ASFV protein pEP153R has an inhibitory effect on the caspase-3 activation and the apoptosis induced both in ASFV-infected cells and in cell lines transfected, either stably or transiently, with the EP153R gene and treated with different pro-apoptotic stimuli. To our knowledge, this is the first description of a viral C-type lectin with anti-apoptotic properties.

Results

EP153R inhibits caspase-3 activity and cell death during ASFV infection

We have previously shown that permissive Vero cells develop apoptosis, as characterized by DNA fragmenta-

tion, caspase activation, cytosolic release of mitochondrial cytochrome *c*, and flow cytometric analysis of DNA content, upon infection with ASFV (Carrascosa et al., 2002). Proteolysis of caspase-3 from its 32-kDa precursor to the active form (17 kDa) was used in this study to quantify the apoptosis induced in Vero cells infected with either the parental strain BA71V or the EP153R deletion mutant (Δ EP153R). As shown in Figs. 1A and B and as previously reported, caspase-3 activation was first detected in virus-infected cells at 12 hpi, increasing until 20–25 hpi. It can also be noticed that cultures infected with Δ EP153R exhibited higher amounts of the 17-kDa band, indicating that the processing of procaspase-3 to its active form was enhanced in the absence of EP153R gene expression. As can be seen in Fig. 1C, the results of caspase-3 cleavage correlated perfectly well with the analysis of enzymatic activity. To confirm that the increase in caspase-3 activity was associated with programmed cell death, the cell cycle of virus-infected cultures was analyzed by flow cytometry after PI staining (Fig. 1D). As expected, the percentages of cell death were always higher from 12 hpi in cells infected with Δ EP153R than in BA71V-infected cultures. To provide a more statistical value of the increase in caspase-3 associated to the absence of EP153R, we have calculated in 28 independent determinations (including assays of biological activity and quantification of the 17-kDa protein by several methods) the ratio between the level of caspase-3 in Δ EP153R-infected and BA71V-infected cultures, analyzed at late times of infection (15–30 hpi), resulting in a factor of 2.11 ± 0.58 . From these results, we conclude that the absence of gene EP153R in the ASFV infection increases about 2-fold the activity of caspase-3.

Because other caspases have been shown to play a key role in apoptosis, we have studied the effect of EP153R expression on the enzymatic activity of caspases 6 and 8 in Vero cells infected with either BA71V or Δ EP153R virus isolates (Fig. 2A). The activity of caspases 6 and 8 was only slightly increased in BA71V-infected Vero cells, and this increase was not affected by the absence of the EP153R gene in cells infected with the mutant Δ EP153R virus. These findings also indicate the predominant role for caspase-3 (increased up to 7-fold) in the apoptosis induced by ASFV, as previously described (Nogal et al., 2001).

To rule out the possibility that the expression of the *LacZ* gene, inserted under the control of ASFV promoter p72 into the EP153R locus for the construction of Δ EP153R deletion mutant (Galindo et al., 2000), could be responsible for the enhanced caspase-3 activation observed in Δ EP153R-infected cells, we performed the analysis presented in Fig. 2B: Vero cells were infected with ASFV isolates containing either a β -galactosidase (Δ EP153R and v Δ CD2) or a β -glucuronidase (v72GUS)

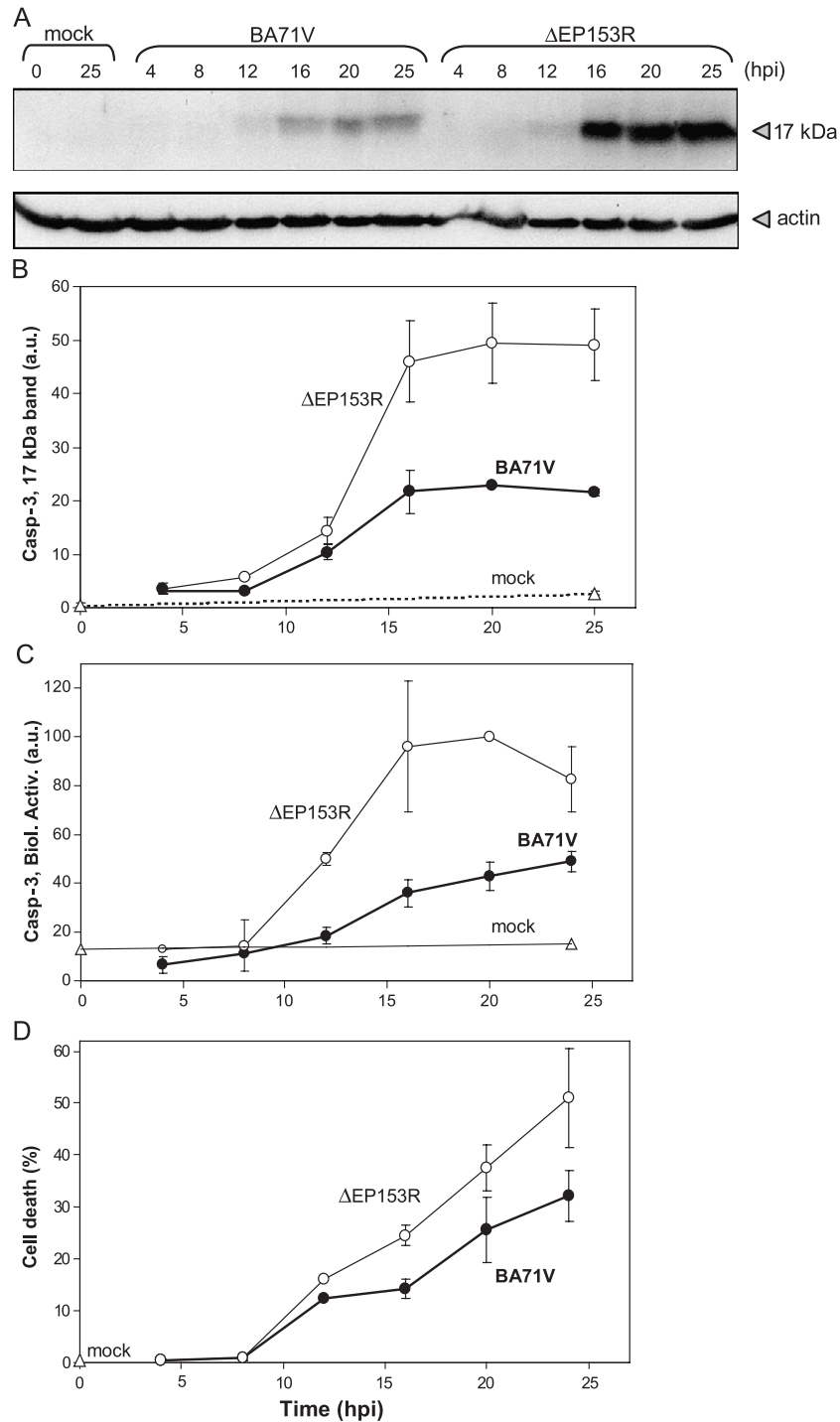


Fig. 1. Analysis of apoptosis in ASFV-infected Vero cells. Cultures were mock-infected or infected with BA71V or Δ EP153R at a moi of 3 pfu/cell and collected at the times indicated to determine the activation of caspase-3 by detection of the 17-kDa fragment in Western blots (A and B) or biological activity (C), and the percentage of cell death by flow cytometry after PI staining (D). The control of protein loading was performed with anti-actin antibodies and is shown in panel A. The quantification (mean \pm SD) of the 17-kDa fragment from two separate experiments is shown in panel B. The values were corrected taking into account the actin content in each sample. Data on caspase-3 biological activity (panel C) and cell death (panel D) are also the average (\pm SD) of duplicate samples.

gene, and analyzed for caspase-3 cleavage by immunoblotting, as described above. Proteolytic cleavage was only enhanced in cells infected with Δ EP153R, indicat-

ing that the observed effect is due to the absence of gene EP153R, and not to the insertion of a foreign gene (*lacZ* or *gusA*) into the ASFV genome.

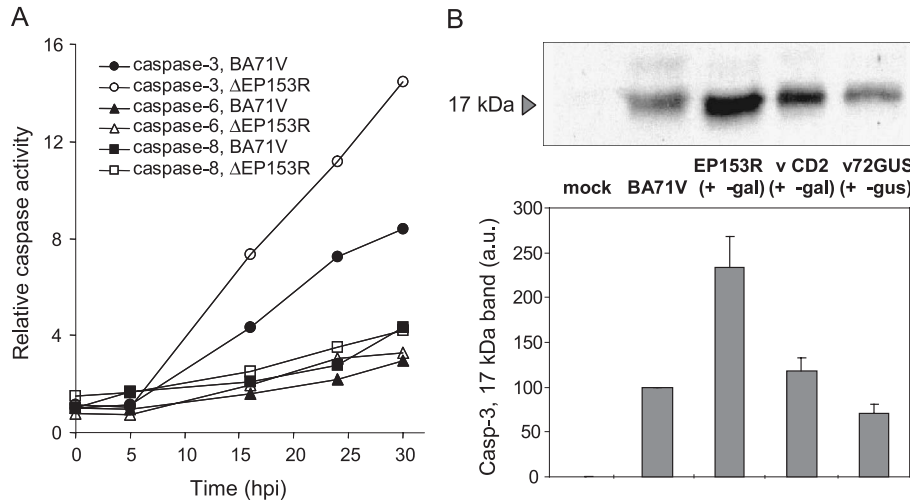


Fig. 2. Caspase activation in ASFV-infected Vero cells. (A) Cultures were infected with BA71V or Δ EP153R at a moi of 3 pfu/cell and collected at the indicated times to determine the protease activity of caspases on specific substrates (Ac-DVED-AMC, Ac-VEID-AMC, and Ac-IETD-AMC for caspase -3, -6, and -8, respectively) after normalizing the cell extracts for total protein content (1 mg/ml). Data represent caspase activities relative to the values at zero time of infection with BA71V for each protease. (B) Vero cells were mock-infected or infected with ASFV isolates containing or not either a β -galactosidase (Δ EP153R and v Δ CD2) or a β -glucuronidase (v72GUS) gene, and analyzed for caspase-3 cleavage by immunoblotting, as indicated in the legend to Fig. 1. The quantification (mean \pm SD) of the 17-kDa fragment from triplicate samples is shown below.

EP153R protects different virus-sensitive cells from ASFV-induced apoptosis

To further analyze the role of gene EP153R, we studied the effect of its absence in infections performed in three ASFV-sensitive cell lines. Cultures of Vero, COS, and BHK cells were infected with either the parental strain BA71V or Δ EP153R and analyzed for their DNA content by flow cytometry at 20 hpi. As shown in Fig. 3A, the percentage of cell death was always higher in each particular cell line when infected with the EP153R deletion mutant. To determine more precisely the apoptotic response in swine macrophages, the natural target cell for ASFV, we analyzed the biological activity of caspase-3 and the percentage of cell death along the infective cycle in cultures infected either with BA71V or Δ EP153R (Figs. 3B and C). From these results, we could establish that (i) the onset of apoptosis occurred earlier in infected swine macrophages than in infected Vero cells, (ii) in the interval of 8–15 hpi, macrophages infected with Δ EP153R displayed higher levels of apoptotic response than those of BA71V-infected cultures, and (iii) at later times of infection (from 20 hpi), the values obtained from both infections tend to equalize.

Taken together, these results supported the conclusion that the absence of EP153R expression resulted in an enhancement of the apoptotic response developed in virus-sensitive infected cells.

Transient or stable transfection of EP153R gene results in protection from drug or virus-induced apoptosis

To confirm the role of EP153R in the control of apoptosis, we performed a series of experiments to analyze the

effect of EP153R expression in heterologous systems. After subcloning the ASFV EP153R gene into the pcDNA3.1 mammalian expression vector, the plasmids were transfected for transient or stable expression into Vero and COS cells as described under Materials and methods. Stably transfected cell lines displayed growing kinetics and saturation densities similar to their original cell types, indicating that the transfection process had no deleterious effect on them. The analysis of EP153R mRNA expression by RT-PCR (Fig. 4A) revealed the presence of EP153R-specific transcripts in cell cultures transfected for transient or stable expression with the EP153R-containing vector and their absence in the corresponding controls transfected with the plasmid alone. To analyze the effect of EP153R gene in heterologous expression, transiently transfected Vero cell cultures were treated, 24 h after transfection, with different apoptotic drugs (2 μ g/ml actinomycin D, 1 μ M staurosporine, or 4 μ M camptothecin) and further incubated for 24 h. Cell extracts were prepared and assayed for biological activity of caspase-3. As shown in Fig. 4B, all of the drugs were able to induce an approximately 5-fold activation of caspase-3 in control pcDNA-transfected Vero cell cultures, while little or no induction was detected in EP153R-transfected cells, revealing a considerable protection from apoptosis in Vero cells transiently expressing the EP153R gene. As we had previously determined that one of the best apoptosis inducers in virus-sensitive cells was precisely the ASFV infection, we used the deletion mutant Δ EP153R EP153R virus to provoke the apoptotic process and then analyzed the possible protective effect of EP153R expression in COS cells stably transfected with control or EP153R-containing pcDNA (Fig. 4C), as described above. As expected, ASFV infection was able to induce a level of

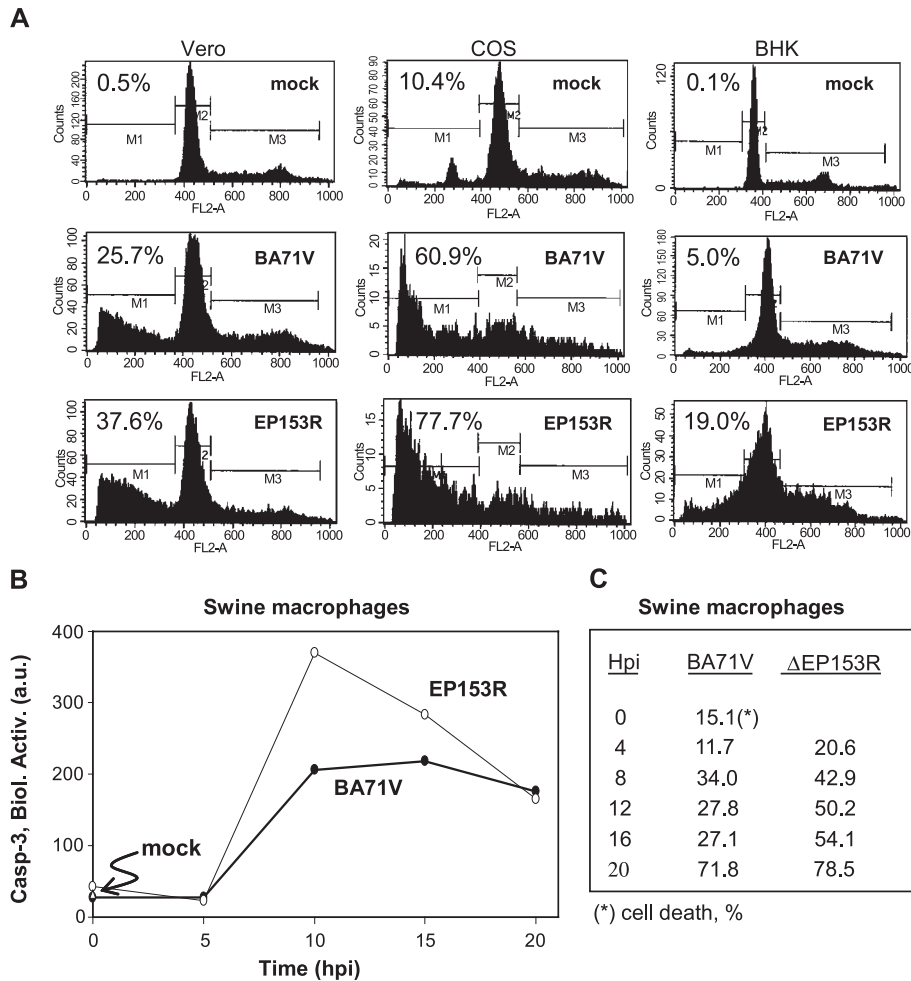


Fig. 3. Analysis of cell cycle and caspase-3 activity in ASFV-sensitive cell lines infected with BA71V or Δ EP153R isolates. Cultures of Vero, COS, and BHK cells were mock-infected or infected with BA71V or Δ EP153R at a moi of 3 pfu/cell and subjected at 20 hpi to cell cycle analysis by flow cytometry after PI staining (panel A). The percentage of total cell death (M1 value) is indicated at the left side of each graph. Cultures of swine macrophages were infected in parallel and processed at the indicated times to determine the biological activity of caspase-3 (panel B) or the percentage of cell death by flow cytometry (panel C).

caspase-3 activity much higher than pro-apoptotic drugs (compare ordinates in panels B and C of Fig. 4), and a partial protection (up to approximately 45%) from virus-induced caspase-3 activation was observed in EP153R-transfected COS cells at 24 hpi, indicating again a protective role for EP153R gene in ASFV-induced apoptosis. These results were confirmed in stably transfected Vero cells, which were analyzed by determination of the percentage of cells undergoing early apoptosis (stained by Annexin V) (Fig. 4D), after mock-infection or infection with Δ EP153R virus. The Annexin V apoptotic indicator corroborated that the expression of gene EP153R in Vero cells conferred resistance to the ASFV-induced programmed cell death.

Effect of EP153R gene on p53 activity

In an effort to elucidate the mechanism by which the viral EP153R gene inhibits the apoptotic process, we searched for possible differences in the expression or intracellular distri-

bution of protein p53, a cellular component involved both in the apoptotic cascade and in cell cycle control, in Vero cells infected with BA71V or Δ EP153R. Previous experiments from our laboratory had shown a clear induction of p53 in ASFV-infected cultures (Granja et al., in press). The examination of Vero cell cultures infected with BA71V or Δ EP153R by confocal microscopy, using a specific anti-p53 antibody (Fig. 5A), showed a nuclear localization for the ASFV-induced p53, which accumulated in this compartment throughout the virus cycle until 20 hpi. However, no relevant differences could be detected in the distribution or level of expression of p53 associated to the presence (BA71V) or absence (Δ EP153R) of gene EP153R. To analyze whether the action of EP153R could interfere with the biological activity of p53, we studied the p53-transactivating activity induced in pcDNA- or EP153R-stably transfected Vero cells at 15 h after staurosporine treatment. A slight (about 20%), but consistent, reduction of p53-transactivating activity was obtained in cells transfected

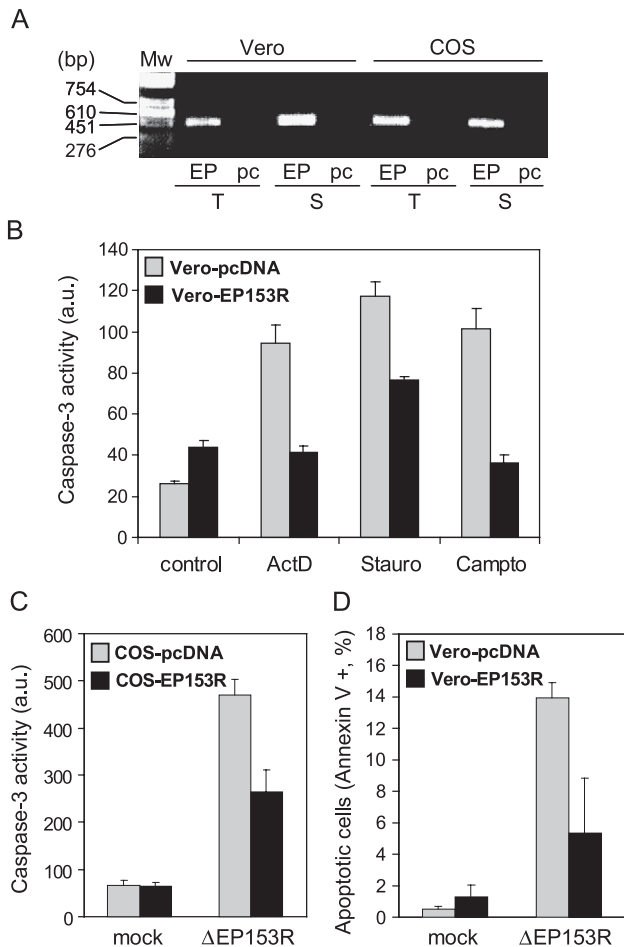


Fig. 4. EP153R mRNA expression, caspase-3 activity, and Annexin V staining in transiently or stably EP153R-transfected Vero and COS cells. (A) Cultures of Vero or COS cells, transiently (T) or stably (S) transfected with pcDNA3.1 (pc) or pcDNA3.1-EP153R (EP) plasmids, were collected for RT-PCR analysis. Total RNA was reverse-transcribed to cDNA and PCR-amplified with primers specific for EP153R viral gene before being analyzed by agarose gel electrophoresis. (B) Vero cell cultures were transfected with 2 μ g of pcDNA3.1 or pcDNA3.1-EP153R plasmids and, 24 h later, the cultures were treated with pro-apoptotic drugs (2 μ g/ml actinomycin D, 1 μ M staurosporine, or 4 μ M camptothecin). The biological activity of caspase-3 was determined in triplicate samples collected 24 h after drug treatment. (C) Cultures of stably transfected COS cells were infected with Δ EP153R at a moi of 3 pfu/cell and collected at 20 hpi to analyze the biological activity of caspase-3 in triplicate samples. (D) Cultures of stably transfected Vero cells were mock-infected or infected with Δ EP153R at a moi of 3 pfu/cell and collected at 20 hpi to analyze the percentage of apoptotic cells (Annexin V positives) in triplicate samples.

with EP153R (Fig. 5B), suggesting that the presence of EP153R might reduce to some extent the response of cells to external injuries. To confirm this effect, we made the same analysis in stably transfected Vero cells after 18 h of infection with BA71V as genotoxic inducer: a reduction of approximately 75% in p53 activity was observed in cells transfected with the viral gene (Fig. 5C). From these results, it should be inferred that a possible role of EP153R would be the inhibition of p53 function in ASFV-infected cells; accordingly, when p53 activity was assayed in Vero cells

infected either with BA71V or Δ EP153R virus isolates, a higher activity was observed in cultures infected with the EP153R-defective virus (Fig. 5D). The fact that EP153R was less efficient in inhibiting the p53 activity induced by staurosporine (Fig. 5B) than that induced by ASFV infection (Figs. 5C and D) indicates that the mode of triggering the p53 response is important to determine its chances to be inhibited.

Discussion

The recognition of a broad repertoire of carbohydrate specificities in cell surfaces by lectins has important implications in many biological processes. The binding of mitogenic lectins to glycoproteins expressed on the plasma membrane of T-cells results in the stimulation of lymphocytes as well as other cells (Ashraf and Khan, 2003), although the induction of apoptosis by Concanavalin A in cultured murine macrophages has also been reported (Suen et al., 2000). In the case of C-type animal lectins, their main roles are derived from its activity as membrane-bound receptors that mediate recognition or endocytosis of glycoproteins (Drickamer and Taylor, 1993). The involvement of C-type lectins in the modulation of apoptosis has been recently proposed in the case of human HIP/PAP C-type lectin encoding gene, which stimulates liver regeneration and protects hepatocytes against TNF- α plus actinomycin-D-induced apoptosis (Simon et al., 2003), and for CD94/NKG2 murine NK cell receptors, whose expression is also correlated with a lower level of apoptosis (Gunturi et al., 2003), but has never been described in C-type lectin genes encoded by animal viruses. Members of the poxviridae (Afonso et al., 2000; Blasco et al., 1993; Cameron et al., 1999; Goebel et al., 1990; Senkevich et al., 1996; Shchelkunov et al., 1998; Tomley et al., 1988; Wilcock et al., 1999), herpesviridae (Voigt et al., 2001), and asfarviridae (Galindo et al., 2000; Neilan et al., 1999; Yáñez et al., 1995) families have been reported to encode proteins with C-type lectin-like domains, with activities modulating virus infectivity, cell to cell spreading, or hemadsorption.

In the case of the ASFV gene EP153R, which has been involved in the hemadsorption process observed in ASFV-infected cells (Galindo et al., 2000), the sequence of the BA71V strain revealed, besides the C-type lectin domain and the homology with the N-terminal region of CD44 molecules, the presence of a cell attachment (RGD) sequence (Yáñez et al., 1995) that could be involved in the modulation of apoptosis by direct caspase-3 activation, as reported for RGD peptides (Buckley et al., 1999). Consequently, we have analyzed in this work the effect of gene EP153R on the apoptosis induced in ASFV-sensitive Vero cells infected either with the parental virus BA71V or with the deletion mutant virus Δ EP153R that lacks the EP153R gene. Our results clearly show an enhanced activation of caspase-3 (determined either by processing of procaspase-3

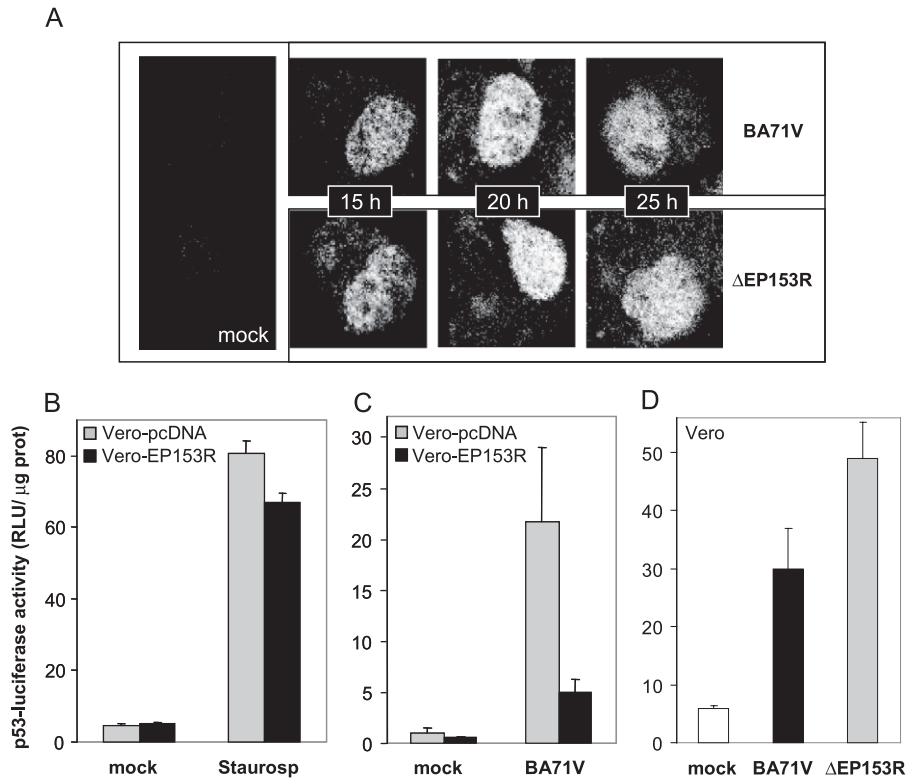


Fig. 5. (A) Subcellular localization of ASFV-induced p53. Vero cell cultures were mock-infected or infected with BA71V or Δ EP153R isolates at a moi of 3 pfu/cell. At the times indicated, cultures were labeled with anti-p53 antibody and then examined by confocal microscopy. (B and C) p53 transactivating activity in pcDNA or EP153R stably transfected Vero cells. Cultures of stably transfected Vero cells were transfected with p53RE-luc plasmid (100 ng per 10^6 cells) and incubated for 24 h before the addition of 1 μ M staurosporine (panel B) or infection with BA71V at a moi of 3 pfu/cell (panel C). Cell extracts prepared after 15 h of staurosporine treatment or after 18 h of virus infection were analyzed for p53-transactivating activity. Data in panel B are the mean \pm SD of duplicate samples and correspond to one of three independent experiments. Panel C shows the average values of luciferase activity and standard deviations from five independent experiments (with, at least, triplicate samples). (D) p53 transactivating activity in ASFV-infected Vero cells. Cultures were transfected with p53RE-luc plasmid (as in B and C) 24 h before infection with BA71V or Δ EP153R virus isolates at a moi of 3 pfu/cell. At 22 hpi, p53 activity was assayed in triplicate samples. Data correspond to the average values of luciferase activity and standard deviations from two independent experiments.

to its active form of 17 kDa or by biological activity), which resulted in an increase in the percentage of cell death, in Vero cell cultures infected with Δ EP153R as compared to those infected with the parental BA71V isolate. This was the opposite effect to that expected if the RGD sequence present into gene EP153R would activate caspase-3 (as reported for soluble RGD peptides), which should inhibit the apoptosis in cells infected with the deletion mutant Δ EP153R. Thus, the anti-apoptotic action of gene EP153R must not be related to the RGD sequence, but to another part of the molecule. Interestingly, the analysis of caspase-3 activation in swine macrophages at different times after infection with BA71V or Δ EP153R revealed that ASFV gene EP153R was also able to modulate the apoptotic process in the natural target cell for ASFV in a similar manner to that observed in other ASFV-sensitive cell lines (Vero, COS, and BHK).

To further confirm the modulation of apoptosis assigned to the viral protein, we have tested the effect of the expression of EP153R in a heterologous system by stable or transient transfection of the ASFV gene into Vero or COS cells. Using this protocol, we were also able to associate the presence of

EP153R with a protective effect from the apoptosis triggered in cell cultures by chemical inducers (actinomycin D, staurosporine, or camptothecin) or by ASFV infection. Taken together, these results demonstrate a role in the control of apoptosis for ASFV gene EP153R.

Regarding the mechanism by which EP153R accomplishes the inhibition of apoptosis, we investigated for possible differences in the expression of several components involved in the apoptotic induction pathway, upstream the activation of effector caspase-3, in cells infected with BA71V or Δ EP153R. No relevant differences were observed by immunoblotting studies revealed with antibodies specific against p53, p21, Mdm2, Bcl-2, and Bax (data not shown). However, we could determine that the presence of gene EP153R in stably transfected Vero cells resulted in a reduced ability to induce p53 transactivating activity after staurosporine treatment or ASFV infection. The analysis by confocal microscopy of the expression and distribution of p53 in Vero cells infected with BA71V or Δ EP153R revealed that p53 was equally induced and accumulated into the nucleus in both infections. However, the trans-

activating activity of p53 was enhanced at late times in cells infected with the deletion mutant virus Δ EP153R, suggesting that EP153R might be involved in the control of p53 activity rather than in its expression or distribution. It must be noted that the activation of p53 can be modulated at three levels: increase of p53 expression, transformation of the protein from a latent to an active conformation through phosphorylation or acetylation, and translocation of p53 to the nucleus, where it acts as a transcriptional factor (Prives and Hall, 1999; Qian et al., 2002). In the case of ASFV infection, it seems that translocation of p53 to the nucleus occurs at early times of infection (Granja et al., in press) and that activation of p53 as a transcriptional factor is partially inhibited by the presence of EP153R. The possible connection between the inhibition of p53 activity and the protection from apoptosis by EP153R in ASFV-infected cells is still speculative. Further experiments are needed to determine the effect of gene EP153R in p53 posttranslational modifications and in successive steps downstream of p53 activation to elucidate the involvement of the viral gene in the control of cell cycle and death. The presence of a double lysine motif (preserved in many ASFV isolates, Neilan et al., 1999) within the cytoplasmic (C-terminal) tail of pEP153R, a characteristic shared with several proteins from human, rat, hamster, and viral (human adenovirus) origin that reside in the endoplasmic reticulum (Jackson et al., 1990), may target pEP153R to this subcellular compartment, which might exclude the viral protein from direct interaction with caspase-3, but should allow it to produce some disturbance in interactions between resident elements or in the Ca^{2+} metabolism in the reticulum, resulting in the alteration by inhibition of the apoptotic process.

In conclusion, we report here that the ASFV gene EP153R behaves as an inhibitor of the apoptosis induced by the virus in infected cells. It is interesting to note that there are at least two other ASFV genes involved in the inhibition of apoptosis: A179L, which encodes a viral Bcl-2 homologue (Afonso et al., 1996; Revilla et al., 1997) and A224L, with similarity to IAP genes (Chacon et al., 1995; Nogal et al., 2001), which inhibit caspase activation and promote cell survival in mammalian cells. The reason why ASFV carries such an anti-apoptotic battery of genes is unknown, but it is tempting to speculate that, because the programmed cell death is a process triggered at early times and developed at intermediate and late times after ASFV infection (Carrascosa et al., 2002), it must be controlled from the virus uncoating process and throughout the infective cycle to prolong cell survival and maximize the production of viral progeny. This could account for the presence of anti-apoptotic genes transcribed either late (A224L) after virus infection or at both early and late (A179L and EP153R) times of infection and for the presence of anti-apoptotic proteins in the viral particle (A224L), which might confer protection from apoptosis induced during virus internalization, transcription, replication, or in any other step in the infectious cycle. Besides the different

times of expression, the existence of several anti-apoptotic genes should confer other advantages to the virus, such as the increase of the response against cell suicide by the sum of activities, the development of resistance to the apoptosis induced by the cytolytic action of natural killer cells and cytolytic T lymphocytes, or the interference with different routes of apoptosis induction: in the case of ASFV, genes A179L (Bcl-2), A224L (IAP), and EP153R (C-type lectin) might interfere with the induction of the mitochondrial pathway, the efficiency of effector caspase-3, and the activation of p53, respectively. In any case, it becomes evident that ASFV is especially concerned about the control of apoptosis in the infected host cell. Additionally, it must be considered that ASFV encodes proteins with the capacity to regulate the transcription machinery of the host cell, like A224L, reported to activate the NF- κ B activity (Rodriguez et al., 2002), and A238L (Powell et al., 1996; Revilla et al., 1998), which encodes an IkappaB-like molecule that prevents the activation of both NF- κ B and NFAT transcription factors (Miskin et al., 1998; Miskin et al., 2000; Revilla et al., 1998; Tait et al., 2000), extending even more the capacity of ASFV to interfere with the expression of cellular genes involved in the activation of immune response, inflammation, and lastly in the control of cell viability.

Materials and methods

Cells and viruses

The established cell lines used in this report were seeded from working stocks kept in store in our laboratory and can be obtained from the American Type Culture Collection. Swine alveolar macrophages were prepared by bronchoalveolar lavage as previously described (Carrascosa et al., 1982). Cells were cultured at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle (DME) medium supplemented with either 5% newborn calf serum (Vero), 5% heat-inactivated fetal calf serum (COS and BHK), or 10% homologous swine serum (swine macrophages).

The Vero-adapted ASFV strain BA71V was propagated and titrated by plaque assay on Vero cells as described (Carrascosa et al., 1982; Enjuanes et al., 1976). The construction and evaluation of the ASFV deletion mutant lacking gene EP153R (Δ EP153R) have been previously reported (Galindo et al., 2000). The ASFV recombinants v Δ CD2, lacking the virus CD2 homologue, and v72GUS, with the gusA gene under the control of the viral p72.4 promoter inserted into the thymidine kinase locus, have been described before (Garcia et al., 1995; Rodriguez et al., 1993).

Transfections

The viral EP153R gene was subcloned into the pcDNA3.1 mammalian expression vector (Invitrogen). For transient expression, Vero or COS cells were plated at 1×10^6 per 6 cm dish 24 h before being transfected with 2 μ g of

pcDNA3.1 or pcDNA3.1-EP153R using 12 μ l of Lipofectamine (2 mg/ml, Invitrogen) per dish. To generate stably expressing lines, cells were transfected as described above and incubated for 2 days before being trypsinized, and plated at 1:10 dilution in 10-cm dishes. Next day, antibiotic selection was applied (2 mg/ml G418, Sigma) and cells were re-fed with medium with fresh antibiotic every 3 days until colonies were apparent (2–3 weeks).

Western blot analysis

Cells were washed twice with PBS and lysed in TNT buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 M NaCl, 1% Triton \times 100) supplemented immediately before use with protease inhibitor cocktail tablets (Roche). Protein concentration was determined by the bicinchoninic acid (BCA) method using the BCA Protein Assay Reagent from Pierce. Proteins (30 μ g) were subjected to sodium dodecyl sulfate (SDS)-12% polyacrylamide gel electrophoresis, and then electroblotted onto a nitrocellulose (Protran, Schleicher and Schuell) membrane. After reacting with specific primary antibodies (anti-caspase-3 or anti-actin), membranes were exposed to horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-species (rabbit or mouse) antibody (Amersham), followed by chemiluminescence (ECL, Amersham) detection by autoradiography.

Analysis of apoptosis

- (1) Detection of the 17-kDa fragment of caspase-3. The cleavage of procaspase-3 (32 kDa) to the activated form of 17-kDa was detected in cell extracts, obtained as indicated above, by Western blot analysis revealed by incubation with a 1/400th dilution of polyclonal antibody specific for recombinant human caspase-3 (anti-caspase-3, Ab-4, NeoMarkers). Quantification of protein bands was performed by densitometry (Image Quant and TINA) in films developed after ECL exposure.
- (2) Biological activity of caspases. Cell extracts (aliquots containing about 1 mg of protein per ml) were diluted five times with assay buffer (25 mM HEPES, pH 7.5, 0.1% 3-((3-cholamidopropyl)-dimethylammonio)-1-propanesulfonate (CHAPS), 10% sucrose, 10 mM dithiothreitol, and 0.1 mg/ml ovalbumin) and incubated at 37 °C for 2 h with a 10 mM concentration of fluorescent substrate for specific (3, 6, or 8) caspases. The reaction was stopped by addition of HPLC buffer (H₂O-acetonitrile 75/25, 0.1% trifluoroacetic acid). The cleaved fluorescent substrate was determined by C₁₈ reverse-phase high performance liquid chromatography using fluorescent detection.
- (3) Flow cytometry: (I) Annexin V-FITC staining can identify apoptosis at earlier stages than assays based on DNA fragmentation by recognition of cells undergoing translocation of phosphatidylserine from the inner to

the outer side of the plasma membrane. We used the Annexin V-FITC apoptosis detection kit I (BD Pharmingen), which labels cells in conjunction with the vital dye propidium iodide (PI), to distinguish between early apoptosis (annexin+) and total death (double-labeled cells). Cultures were stained according to the manufacturer's staining protocol, except that cells were labeled in monolayer, then detached by trypsinization and examined using a BD Biosciences FACSCalibur flow cytometer. (II) DNA content measurement was performed in cells suspended by trypsinization, permeabilized with 70% ethanol, and stained for 30 min at room temperature with PI (50 μ g/ml in 0.3% Nonidet P40, 0.1% sodium citrate, and 20 μ g/ml RNase) before being analyzed by flow cytometry. The percentage of total cell death was assigned from the data observed in the hypodiploid range (M1 value) of the cell cycle, which corresponded to apoptotic + necrotic cell population.

RT-PCR analysis of EP153R mRNA expression

Total RNA from transfected Vero or COS cell cultures was isolated by using the Trizol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. RNA was reverse transcribed to single-stranded cDNA with the avian myeloblastosis virus reverse transcriptase and oligo(dT) primers from Promega. DNA was PCR-amplified with Amplitaq DNA polymerase (Roche) and the following primers: 5'-ATGTATTTTAAAGAAAAATACATCGG and 5'-TTATTTACCACAAATAATAATAAATC and then analyzed by electrophoresis on 0.7% agarose gels containing ethidium bromide.

p53 transactivating activity

The p53RE-luc reporter plasmid contains 14 tandem repeats of the p53 consensus binding motif (Stratagene). Cell cultures (300 000 cells) were transfected with p53RE-luc plasmid (100 ng per 10⁶ cells) and Lipofectamine (Invitrogen) as described above, and incubated for 24 h. After the indicated treatments, cell extracts in CCLR lysis buffer (Luciferase Assay System, Promega) were obtained and processed according to the manufacturer's recommendations. Light produced was measured and recorded in a Monolight 2010 luminometer (Analytical Luminescence Laboratory). Results were expressed as luminescence units after normalization of protein concentration determined by the BCA method.

Confocal microscopy

Vero cells were grown on coverslips to about 2 \times 10⁵ cells/cm². Cultures were extensively rinsed (three times) with PBS and fixed with cold 99.8% methanol for 15 min at -20 °C before rehydrating twice with PBS and blocking

with 1% BSA in PBS (BSA/PBS) for 10 min at room temperature. Cells were then incubated with specific primary antibodies against p53 (sc-6243, Santa Cruz Biotechnologies), diluted 1/20 in BSA/PBS for 2 h, and rinsed extensively with PBS before the secondary antibody (Alexa 488 goat anti-rabbit, Molecular Probes) was added (diluted 1/500) for 1 h at room temperature in the dark. Finally, the cells were rinsed successively with PBS, distilled water and ethanol, and mounted with a drop of Mowiol on a pre-cleaned microslide. Visualization of stained cultures was performed in a Confocal Microradiance (BioRad) coupled to a vertical Axioskop2 (Zeiss) microscope. Confocal images were digitized, processed, and organized with LaserSharp2000 v.4, Adobe Photoshop 7.0 and Microsoft PowerPoint SP-2 software.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Ministerio de Ciencia y Tecnología (BMC2000-1485 and AGL2002-10220-E), the European Commission (QLRT-2000-02216), and by an institutional grant from the Fundación Ramón Areces. C. Hurtado was a fellow from Fundación Ramón Areces.

References

- Afonso, C.L., Neilan, J.G., Kutish, G.F., Rock, D.L., 1996. An African swine fever virus Bcl-2 homolog, 5-HL, suppresses apoptotic cell death. *J. Virol.* 70 (7), 4858–4863.
- Afonso, C.L., Tulman, E.R., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G.F., Rock, D.L., 2000. The genome of fowlpox virus. *J. Virol.* 74 (8), 3815–3831.
- Ashraf, M.T., Khan, R.H., 2003. Mitogenic lectins. *Med. Sci. Monit.* 9 (11), RA265–RA269.
- Blasco, R., Sisler, J.R., Moss, B., 1993. Dissociation of progeny vaccinia virus from the cell membrane is regulated by a viral envelope glycoprotein: effect of a point mutation in the lectin homology domain of the A34R gene. *J. Virol.* 67 (6), 3319–3325.
- Buckley, C.D., Pilling, D., Henriquez, N.V., Parsonage, G., Threlfall, K., Scheel-Toellner, D., Simmons, D.L., Akbar, A.N., Lord, J.M., Salmon, M., 1999. RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation [see comments]. *Nature* 397 (6719), 534–539.
- Cameron, C., Hota-Mitchell, S., Chen, L., Barrett, J., Cao, J.X., Macaulay, C., Willer, D., Evans, D., McFadden, G., 1999. The complete DNA sequence of myxoma virus. *Virology* 264 (2), 298–318.
- Carrascosa, A.L., Santaren, J.F., Vinuela, E., 1982. Production and titration of African swine fever virus in porcine alveolar macrophages. *J. Virol. Methods* 3 (6), 303–310.
- Carrascosa, A.L., Bustos, M.J., Nogal, M.L., Gonzalez de Buitrago, G., Revilla, Y., 2002. Apoptosis induced in an early step of African swine fever virus entry into vero cells does not require virus replication. *Virology* 294 (2), 372–382.
- Costa, J., 1990. Molecular biology of Iridoviruses. In: Darai, G. (Ed.), Kluwer Academic Publisher, Boston, pp. 247–270.
- Chacon, M.R., Almazan, F., Nogal, M.L., Vinuela, E., Rodriguez, J.F., 1995. The African swine fever virus IAP homolog is a late structural polypeptide. *Virology* 214 (2), 670–674.
- Drickamer, K., Taylor, M.E., 1993. Biology of animal lectins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 237–264.
- Enjuanes, L., Carrascosa, A.L., Moreno, M.A., Vinuela, E., 1976. Titration of African swine fever (ASF) virus. *J. Gen. Virol.* 32 (3), 471–477.
- Everett, H., McFadden, G., 1999. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol.* 7 (4), 160–165.
- Gabius, H.J., 1997. Animal lectins. *Eur. J. Biochem.* 243 (3), 543–576.
- Galindo, I., Almazán, F., Bustos, M.J., Viñuela, E., Carrascosa, A.L., 2000. African swine fever virus EP153R open reading frame encodes a glycoprotein involved in the hemadsorption of infected cells. *Virology* 266 (2), 340–351.
- Garcia, R., Almazan, F., Rodriguez, J.M., Alonso, M., Vinuela, E., Rodriguez, J.F., 1995. Vectors for the genetic manipulation of African swine fever virus. *J. Biotechnol.* 40 (2), 121–131.
- Goebel, S.J., Johnson, G.P., Perkus, M.E., Davis, S.W., Winslow, J.P., Paoletti, E., 1990. The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* 179 (1), 247–266, 517–563.
- Gomez-Villamandos, J.C., Hervas, J., Mendez, A., Carrasco, L., Martin de las Mulas, J., Villeda, C.J., Wilkinson, P.J., Sierra, M.A., 1995. Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 9), 2399–2405.
- Granja, A.G., Nogal, M.L., Hurtado, C., Salas, J., Salas, M.L., Carrascosa, A.L., Revilla, Y. Modulation of p53 cellular function and cell death by African swine fever virus. *J. Virol.* (in press).
- Gunturi, A., Berg, R.E., Forman, J., 2003. Preferential survival of CD8 T and NK cells expressing high levels of CD94. *J. Immunol.* 170 (4), 1737–1745.
- Hess, W.R., 1981. African swine fever: a reassessment. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 25, 39–69.
- Jackson, M.R., Nilsson, T., Peterson, P.A., 1990. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 9 (10), 3153–3162.
- Miskin, J.E., Abrams, C.C., Goatley, L.C., Dixon, L.K., 1998. A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin. *Science* 281 (5376), 562–565.
- Miskin, J.E., Abrams, C.C., Dixon, L.K., 2000. African swine fever virus protein A238L interacts with the cellular phosphatase calcineurin via a binding domain similar to that of NFAT. *J. Virol.* 74 (20), 9412–9420.
- Neilan, J.G., Borca, M.V., Lu, Z., Kutish, G.F., Kleiboecker, S.B., Carrillo, C., Zsak, L., Rock, D.L., 1999. An African swine fever virus ORF with similarity to C-type lectins is non-essential for growth in swine macrophages in vitro and for virus virulence in domestic swine. *J. Gen. Virol.* 80 (Pt 10), 2693–2697.
- Nogal, M.L., Gonzalez de Buitrago, G., Rodriguez, C., Cubelos, B., Carrascosa, A.L., Salas, M.L., Revilla, Y., 2001. African swine fever virus IAP homologue inhibits caspase activation and promotes cell survival in mammalian cells. *J. Virol.* 75 (6), 2535–2543.
- O'Brien, V., 1998. Viruses and apoptosis. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 8), 1833–1845.
- Oura, C.A., Powell, P.P., Parkhouse, R.M., 1998. African swine fever: a disease characterized by apoptosis. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 6), 1427–1438.
- Powell, P.P., Dixon, L.K., Parkhouse, R.M., 1996. An IkappaB homolog encoded by African swine fever virus provides a novel mechanism for downregulation of proinflammatory cytokine responses in host macrophages. *J. Virol.* 70 (12), 8527–8533.
- Prives, C., Hall, P.A., 1999. The p53 pathway. *J. Pathol.* 187 (1), 112–126.
- Qian, H., Wang, T., Naumovski, L., Lopez, C.D., Brachmann, R.K., 2002. Groups of p53 target genes involved in specific p53 downstream effects cluster into different classes of DNA binding sites. *Oncogene* 21 (51), 7901–7911.
- Ramiro-Ibanez, F., Ortega, A., Brun, A., Escribano, J.M., Alonso, C., 1996. Apoptosis: a mechanism of cell killing and lymphoid organ impairment during acute African swine fever virus infection. *J. Gen. Virol.* 77 (Pt 9), 2209–2219.
- Revilla, Y., Cebrian, A., Baixeras, E., Martinez, C., Vinuela, E., Salas, M.L., 1997. Inhibition of apoptosis by the African swine fever virus Bcl-2 homologue: role of the BH1 domain. *Virology* 228 (2), 400–404.
- Revilla, Y., Callejo, M., Rodriguez, J.M., Culebras, E., Nogal, M.L., Salas, M.L., Vinuela, E., Fresno, M., 1998. Inhibition of nuclear factor kappaB

- activation by a virus-encoded IkappaB-like protein. *J. Biol. Chem.* 273 (9), 5405–5411.
- Rodríguez, J.M., Yanez, R.J., Almazan, F., Vinuela, E., Rodríguez, J.F., 1993. African swine fever virus encodes a CD2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected cells. *J. Virol.* 67 (9), 5312–5320.
- Rodríguez, C.I., Nogal, M.L., Carrascosa, A.L., Salas, M.L., Fresno, M., Revilla, Y., 2002. African swine fever virus IAP-like protein induces the activation of nuclear factor kappa B. *J. Virol.* 76 (8), 3936–3942.
- Senkevich, T.G., Bugert, J.J., Sisler, J.R., Koonin, E.V., Darai, G., Moss, B., 1996. Genome sequence of a human tumorigenic poxvirus: prediction of specific host response-evasion genes. *Science* 273 (5276), 813–816.
- Shchelkunov, S.N., Safronov, P.F., Totmenin, A.V., Petrov, N.A., Ryazankina, O.I., Gutorov, V.V., Kotwal, G.J., 1998. The genomic sequence analysis of the left and right species-specific terminal region of a cowpox virus strain reveals unique sequences and a cluster of intact ORFs for immunomodulatory and host range proteins. *Virology* 243 (2), 432–460.
- Simon, M.T., Pauloin, A., Normand, G., Lieu, H.T., Mouly, H., Pivert, G., Carnot, F., Tralhao, J.G., Brechot, C., Christa, L., 2003. HIP/PAP stimulates liver regeneration after partial hepatectomy and combines mitogenic and anti-apoptotic functions through the PKA signaling pathway. *FASEB J.* 17 (11), 1441–1450.
- Suen, Y.K., Fung, K.P., Choy, Y.M., Lee, C.Y., Chan, C.W., Kong, S.K., 2000. Concanavalin A induced apoptosis in murine macrophage PU5-1.8 cells through clustering of mitochondria and release of cytochrome *c*. *Apoptosis* 5 (4), 369–377.
- Tait, S.W., Reid, E.B., Greaves, D.R., Wileman, T.E., Powell, P.P., 2000. Mechanism of inactivation of NF-kappa B by a viral homologue of I kappa b alpha. Signal-induced release of i kappa b alpha results in binding of the viral homologue to NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* 275 (44), 34656–34664.
- Tomley, F., Binns, M., Campbell, J., Boursnell, M., 1988. Sequence analysis of an 11.2 kilobase, near-terminal, *Bam*HI fragment of fowlpox virus. *J. Gen. Virol.* 69 (Pt 5), 1025–1040.
- Vinuela, E., 1985. African swine fever virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 116, 151–170.
- Voigt, S., Sandford, G.R., Ding, L., Burns, W.H., 2001. Identification and characterization of a spliced C-type lectin-like gene encoded by rat cytomegalovirus. *J. Virol.* 75 (2), 603–611.
- Weis, W.I., Taylor, M.E., Drickamer, K., 1998. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol. Rev.* 163, 19–34.
- Wilcock, D., Duncan, S.A., Traktman, P., Zhang, W.H., Smith, G.L., 1999. The vaccinia virus A4OR gene product is a nonstructural, type II membrane glycoprotein that is expressed at the cell surface. *J. Gen. Virol.* 80 (Pt 8), 2137–2148.
- Yáñez, R.J., Rodríguez, J.M., Nogal, M.L., Yuste, L., Enríquez, C., Rodríguez, J.F., Viñuela, E., 1995. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. *Virology* 208, 249–278.