

UNIVERSIDAD DE OVIEDO



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN
BIOLOGÍA FUNCIONAL Y MOLECULAR**

**Identificación y estudio de las interacciones virus-célula del
*vesivirus de conejo (RaV)***

**José Arrojo Fernández
2015**

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: Identificación y estudio de las interacciones virus-célula del vesivirus de conejo (RaV)	Inglés: Identifying and functionally characterizing viral-host interactions for rabbit vesivirus (RaV)
2.- Autor	
Nombre: JOSE ARROJO FERNANDEZ	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Biología funcional y molecular (interdepartamental)	
Órgano responsable: BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR	

RESUMEN (en español)

Los calicivirus son virus RNA de cadena sencilla y polaridad positiva que actúan como agentes patógenos en animales y humanos. El rango de huésped y el tropismo celular, así como el desarrollo de la infección, dependen en gran medida de la interacción con proteínas del huésped.

En la presente memoria de tesis doctoral se describen las estrategias desarrolladas para la identificación de proteínas celulares que interactúan con secuencias próximas a los extremos 5' y 3' del genoma del RaV y con las proteínas virales NS5, NS6/7 y VP1 del mismo virus.

Para el estudio de las interacciones RNA viral-proteína celular se desarrolló una cromatografía de afinidad a RNA biotinilado utilizando extractos citoplasmáticos de células susceptibles y permisivas a la infección por RaV, que fueron incubados con RNAs sintéticos que presentaban secuencias de los extremos del genoma del virus. Las proteínas purificadas se analizaron e identificaron por espectrometría de masas. En total se consiguieron identificar 28 proteínas que presentaban diferente afinidad por secuencias del extremo 3' o 5'.

Para la identificación de las interacciones proteína viral-proteína celular se generaron líneas celulares modificadas establemente que expresaran, de manera independiente, las proteínas virales NS5, NS6/7 y VP1 de forma inducible y fusionadas a una etiqueta peptídica (C-TAP) para la purificación por afinidad en tándem (TAP). Se purificaron proteínas celulares unidas a NS5 y VP1, que fueron analizadas e identificadas por espectrometría de masas. En conjunto se identificaron 5 proteínas celulares capaces de interactuar con VP1 y 3 con NS5.

Al ser el RaV uno de los pocos modelos de calicivirus que puede ser propagado en cultivos celulares, se pudo estudiar la función de las proteínas PABP y hnRNPK en la infección. La proteína PABP, identificada por su interacción con secuencias próximas al extremo 3' del genoma del RaV, fue silenciada en cultivos celulares y la posterior infección dio lugar a un descenso en el título viral, lo que indica un papel relevante de esta proteína celular en la propagación del virus. La proteína hnRNPK se identificó por su interacción con secuencias de la región 5' del genoma del RaV, y el silenciamiento de su expresión causó un aumento del título viral, sugiriendo que esta proteína juega un papel negativo en la propagación del RaV.

Con los resultados obtenidos en esta tesis doctoral se abren nuevas vías para el estudio de los procesos moleculares de replicación de RNA, traducción y formación de nuevas partículas virales en la infección por calicivirus, así como para el desarrollo de estrategias antivirales basadas en la acción de proteínas celulares durante la infección.

RESUMEN (en Inglés)

Caliciviruses are single-stranded, positive sense RNA viruses pathogenic to humans and other animals. Their host range and cellular tropism, as well as their infection process, depend to a great extent on the interaction of viral components with host proteins.

This doctoral dissertation describes the strategies followed to identify cellular proteins able to interact with sequences near the 5' and 3' ends of the RaV genome, as well as with the RaV proteins NS5, NS6/7 and VP1.

In order to study the viral RNA–host cell protein interactions, affinity chromatography with biotinylated RNA, using cytoplasmic extracts of cultured cells susceptible and permissive to RaV infection, were used. These extracts were incubated with synthetic RNAs sequences corresponding the terminal ends of the viral genome. Proteins which co-purified with the RNA were analyzed and identified by mass spectrometry. In total 28 proteins, with different affinities for sequences of the 5' or 3' ends of the viral genome, were identified.

For the identification of viral protein–host protein interactions, stable cell lines were developed for an inducible, and independent, expression of NS5, NS6/7 and VP1 viral proteins labeled with a peptide tag (C-TAP) for tandem affinity purification (TAP). Cellular proteins bound to NS5 and VP1 were purified and identified by mass spectrometry. Five cellular proteins were identified due to their interaction with VP1 and 3 with NS5.

Furthermore, since RaV is one of the few calicivirus models that can be propagated in cultured cells, the role that the cellular proteins PABP and hnRNPk play during the infection process were studied. PABP, which interacts with sequences close to the 3' end of the viral genome, was silenced in cultured cells, resulting in a decrease of the viral titer after infection, which suggests a relevant role of this protein in viral propagation. hnRNPk interacted with sequences in the 5' region of the RaV genome. Cultured cells in which this protein had been silenced displayed an increase in the viral titer, suggesting that hnRNPk has a negative effect on RaV propagation.

These results open new possibilities for the study of the molecular processes involved in RaV RNA replication and translation, as well as in the formation of new viral particles during calicivirus infection. They could also provide a basis for the development of antiviral strategies based on the action of cellular proteins during the infection process.

ABREVIATURAS

BSA	Seroalbúmina bovina
BVDV	<i>Virus de la diarrea viral bovina</i>
CBP	Péptido de unión a calmodulina
CCAR2	Proteína reguladora de la apoptosis y ciclo celular 2
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CMV	<i>Citomegalovirus</i>
CTP	Citosín-trifosfato
DARS	Sintetasa de aspartil-ARNt
DDX3X	Helicasa de ARN DDX3
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	1,4-Ditiotreitol
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i> (Colección Europea de Cultivos celulares)
EDTA	Ácido etilén-diaminotetraacético
EGTA	Ácido etilén-glicoltetraacético
eIF	Factor de iniciación de la traducción en eucariotas
EIF2AK2	Quinasa 2 del factor de inicio de la traducción EIF2A
ELAV1	Proteína similar a ELAV
FCV	<i>Calicivirus felino</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Flp	Recombinasa flipasa
FRT	Diana de recombinación para la flipasa
G3BP	Proteína de unión a la proteína activadora de Ras-GTPasa
gRNA	RNA genómico
HCV	<i>Virus de la hepatitis C</i>
HDLBP	Proteína de unión a HDL
HEK 293T	<i>Human Embryonic Kidney cells</i> (Línea celular de riñón de embrión humano)
HeLa S3	Línea celular derivada de un adenocarcinoma humano
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIV	<i>Virus de la inmunodeficiencia humana</i>
hnRNPA/B	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear A/B
hnRNPA0	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear A0
hnRNPA1	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1
hnRNPA2/B1	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear A2/B1
hnRNPK	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear K
hnRNPL	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear L
hnRNPAQ	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear Q
hnRNPU	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear U
Hpi	Horas post-infección
Hpt	Horas post-transfección
HPV	<i>Virus del papiloma humano</i>
HSC70	Proteína del choque térmico semejante a 71kDa
HSP90	Proteína del choque térmico de 90kDa

HSPA1A	Proteína del choque térmico de 70kDa 1A
HSPA1B	Proteína del choque térmico de 70kDa 1B
HuNoV	<i>Norovirus humano</i>
HuR	Antígeno humano R
IBV	<i>Virus de la bronquitis infecciosa aviar</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (Comité internacional de taxonomía de virus)
IGF2BP3	Proteína de unión al ARNm del factor de crecimiento similar a insulina 3
IgG	Inmunoglobulina G
ILF	Factor de unión al enhancer de interleukina
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i> (sitio de entrada interna al ribosoma)
JEV	<i>Virus de la encefalitis japonesa</i>
LARS	Sintetasa de leucil-ARnt
LB	Medio de cultivo de Luria-Bertani
LC	Péptido líder de la cápsida
MARS	Sintetasa de metionil-ARnt
MHV	<i>Virus de la hepatitis murina</i>
MNV	<i>Norovirus murino</i>
Moi	Multiplicidad de infección
MOPS	Ácido 3-(<i>N</i> -morfolino)-proponasulfónico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MTT	3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)
NF	Factor nuclear
NDV	<i>Virus de la enfermedad de Newcastle</i>
NS	Proteína no estructural
NTPs	Nucleósidos trifosfato
NV	<i>Virus Norwalk</i>
ORF	<i>Open reading frame</i> (fase abierta de lectura)
PABP	Proteína de unión a poli-A
PBS	Tampón fosfato salino
PCBP	Proteína de unión a poli-C
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PEC	<i>Calicivirus entérico porcino</i>
PKR	Proteína quinasa activada por RNA
Pol	Polimerasa
Pro	Proteasa
pro-pol	Proteasa-polimerasa
PTBP1	Proteína de unión a secuencias de poli-pirimidinas-1
Q-PCR	PCR cuantitativa
RaV	<i>Vesivirus de conejo</i>
RHDV	<i>Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo</i>
RLR	<i>Rig-like receptor</i> (Receptores tipo-RIG-I)
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal

RT	Transcripción reversa/Transcriptasa reversa
SBF	Suero fetal bovino
SCM	Sitio de clonación múltiple
SDS	Dodecilsulfato sódico
sgRNA	Ácido ribonucleico subgenómico
siRNA	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia
SFPQ	<i>Splicing factor, Proline/glutamine rich</i> (Factor de splicing rico en prolina y glutamine)
SMSV	<i>Virus del león marino de San Miguel</i>
snRNA	Ácido ribonucleico nuclear pequeño
snRNPA	Ribonucleoproteína pequeña nuclear A
SSC	Cloruro sódico y citrato sódico
SV	<i>Virus de Sapporo</i>
SV-40	<i>Virus del simio-40</i>
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
TAP	Tandem affinity purification (Purificación en tándem por afinidad)
TCID50	<i>50% tissue culture infective dose</i> (Dosis infecciosa que causa un 50% de efecto citopático en el cultivo celular)
TEV	<i>Virus del mosaico del tabaco</i>
TGEV	<i>Virus de la gastroenteritis porcina transmisible</i>
TIV	Transcripción <i>in vitro</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (Receptores tipo-Toll)
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
tRNA	Ácido ribonucleico transferente
TUBB	Tubulina beta
TURBS	<i>Termination Upstream Ribosomal Binding Site</i> (Sitio de unión al ribosoma que precede a la terminación)
TuV	<i>Virus Tulane</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i> (Región no traducida)
Vero	Línea celular derivada de riñón del mono verde africano
VESV	<i>Virus del exantema vesicular de cerdo</i>
VF1	Factor de virulencia-1
VLPs	<i>Virus-like particles</i> (Partículas similares a virus)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. La familia Caliciviridae.....	1
1.1 La cápsida viral.....	4
1.2 El genoma viral.....	6
1.3 Traducción y procesamiento de las proteínas virales.....	9
1.4 Replicación del RNA viral y variación genética.....	14
1.5 Ciclo replicativo.....	17
2. Interacciones virus-célula huésped.....	21
2.1 Interacciones virus-célula huésped en virus RNA de polaridad positiva.....	23
2.2 Interacciones virus-célula huésped en los calicivirus.....	29
3. Vesivirus de conejo (RaV).....	32
OBJETIVOS.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
1. Materiales.....	37
1.1 Virus.....	37
1.2 Bacterias.....	37
1.3 Líneas celulares.....	37
1.4 Medios de Cultivo.....	38
1.5 Vectores plasmídicos.....	39
1.6 Enzimas.....	40
1.7 Anticuerpos.....	41
1.8 Oligonucleótidos.....	42
1.9 Programas informáticos.....	43
1.10 Otros reactivos.....	43
2. Métodos.....	45
2.1 Técnicas generales en biología molecular.....	45
2.2 PCR.....	45
2.3 Transcripción <i>in vitro</i>	46
2.4 Electroforesis en geles de agarosa.....	46
2.5 Cuantificación de moléculas.....	47
2.6 Análisis de la expresión de genes celulares mediante RT-Q-PCR.....	47
2.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	48
2.8 Western-blot.....	49
2.9 Análisis North-western y dot-blot.....	50
2.10 Técnicas generales de cultivo de células eucariotas.....	51
2.11 Obtención de extractos citoplasmáticos de células Hela S3.....	52

2.12 Cromatografía de afinidad de RNA.....	52
2.13 Transfección de DNA en Flp-In tm T-Rex tm -293.....	53
2.14 Obtención de extractos citoplasmáticos de Flp-In tm T-Rex tm - 293 modificadas.....	54
2.15 Localización de proteínas en cultivos celulares por inmunofluorescencia.	54
2.16 Purificación en tándem por afinidad de las proteínas recombinantes.....	55
2.17 Identificación de proteínas por espectrometría de masas	56
2.18 Infección de cultivos celulares con RaV	57
2.19 Titulación de RaV.....	58
2.20 Transfección de siRNAs en cultivos celulares	58
2.21 Valoración de la viabilidad de cultivos celulares	59
RESULTADOS	61
1. Identificación de proteínas celulares que interaccionan con los extremos del genoma del RaV	61
1.1 Síntesis de RNAs biotinilados de los extremos del genoma viral	62
1.2 Cromatografía de afinidad a RNAs virales.....	65
1.3 Identificación de proteínas que interaccionan con los extremos del genoma viral.....	70
2. Identificación de proteínas celulares que interaccionan con las proteínas NS5, NS6/7 y VP1 del RaV.....	77
2.1 Obtención de las líneas celulares que expresen de forma inducible productos del RaV.....	77
2.2 Cromatografía de afinidad en tándem de las fusiones NS5-C-TAP y VP1-C- TAP e identificación de las interacciones con proteínas celulares.....	84
3. Estudio funcional de proteínas que interaccionan con elementos del RaV.....	93
3.1 Selección de proteínas que interaccionan con los extremos del genoma del RaV para estudios funcionales.....	93
3.2 Estudio funcional de la proteína PABP	97
3.3 Estudio funcional de la proteína hnRNPK	102
DISCUSIÓN.....	109
1. Identificación de proteínas celulares que interaccionan con los extremos del genoma viral	109
2. Identificación de proteínas celulares que interaccionan con las proteínas NS5, NS6/7 y VP1 del RaV.....	123
3. Estudio funcional de proteínas que interaccionan con elementos del RaV.....	137
CONCLUSIONES.....	147
BIBLIOGRAFÍA	149

INTRODUCCIÓN

Los virus son parásitos intracelulares obligados constituidos por una estructura proteica o cápsida y un genoma de DNA o RNA de cadena sencilla o doble, que necesitan de la maquinaria de traducción de la célula huésped para sintetizar sus componentes proteicos. Por tanto, pueden ser clasificados por los mecanismos de producción de mRNA a partir de su genoma (Baltimore 1971).

1. La familia *Caliciviridae*

Los calicivirus son virus de pequeño tamaño y el virión está formado por una cápsida de simetría icosaédrica con un diámetro entre 27 y 40 nm sin envoltura lipídica. Su genoma es un RNA monocatenario no segmentado y de polaridad positiva, esto es, que puede funcionar como RNA mensajero (mRNA). Son virus con un amplio rango de hospedadores causando patologías de diversa gravedad en humanos y otros animales. El patógeno más importante de la familia *Caliciviridae* en humanos es el *virus Norwalk* (NV) que causa gastroenteritis aguda (Kapikian, 2000), siendo frecuente la aparición de brotes localizados. En países industrializados los norovirus humanos son la mayor causa de gastroenteritis aguda de origen no bacteriano (Lopman *et al.*, 2002; Hall *et al.*, 2013). En animales encontramos enfermedades que presentan una alta mortalidad como la causada por el *virus de la enfermedad hemorrágica del conejo* (RHDV), que provoca hemorragias en diversos órganos pudiendo causar la muerte de cerca del 90% de los animales afectados (Ohlinger *et al.*, 1993). Otro ejemplo es la enfermedad causada por el *Calicivirus felino* (FCV) (Radford *et al.*, 2007) que afecta a las vías respiratorias superiores en gatos.

Los primeros calicivirus caracterizados fueron incluidos dentro de la familia *Picornaviridae*, formada por virus de animales con cápsida de simetría icosaédrica de similar tamaño y también con un genoma de RNA monocatenario de polaridad positiva, hasta que en 1979 se propuso la creación de un taxón independiente al ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Ambas familias presentan similitudes estructurales y moleculares

como la unión covalente de una proteína viral al extremo 5' del genoma, la traducción del genoma independiente de *cap* y poseer proteínas estructural y funcionalmente similares como la proteasa (NS6; 3C), la RNA polimerasa-dependiente de RNA (NS7; 3D) o la VPg (NS5; 3B). Cabe destacar que la nomenclatura aplicada a los productos génicos de la familia *Caliciviridae* se ha establecido tradicionalmente en función del peso molecular o de su similitud con los productos de la familia *Picornaviridae*. No obstante, en este trabajo utilizaremos el sistema propuesto por Sosnotsev y colaboradores en 2006 o nomenclatura que haga referencia a la función de la proteína.

La existencia de características diferenciales permitió la creación de una familia independiente aceptada por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) inicialmente compuesta por cuatro géneros (Green *et al.*, 2000). La cápsida de los miembros de la familia *Caliciviridae* está formada por una proteína mayoritaria de aproximadamente 60kDa que se autoensambla formando 32 depresiones características en forma de cáliz que dan nombre a la familia, y una proteína minoritaria de aproximadamente 10kDa. En cuanto a la organización de genoma, con la excepción de los *Norovirus*, presentan dos o tres pautas de lectura (ORFs) que codifican para las proteínas no estructurales en la región más cercana al extremo 5' y para las proteínas estructurales en la región 3' del genoma. Los *Norovirus* poseen una cuarta ORF. Presentan dos regiones no traducidas (UTRs), una de corta extensión en el extremo 5', que no permite la presencia de elementos regulatorios de la traducción definidos como los IRES, y otra de mayor longitud en el extremo 3'.

Actualmente son aceptados cinco géneros dentro de la familia *Caliciviridae* (Clarke *et al.*, 2011) en base a las diferencias de secuencia y organización genómica y que corresponden a los géneros ***Norovirus***, como especie tipo el NV; ***Lagovirus***, especie tipo el RHDV; ***Sapovirus***, como especie tipo el *virus Sapporo* (SV); ***Vesivirus***, como especie tipo el *virus del exantema vesicular del cerdo* (VESV) y el género ***Nebovirus***, cuyo virus tipo es el *virus Newbury-1* (Smiley *et al.*, 2002; Oliver *et al.*, 2006).

También han sido propuestos al ICTV los géneros *Recovirus*, que incluiría al *virus de Tulane* (TuV) (Farkas *et al.*, 2008), y *Valovirus*, a partir del aislamiento y caracterización del genoma del *virus de St-Valérien* (L'Homme *et*

al., 2009). El descubrimiento de nuevos virus con características de la familia *Caliciviridae* ha permitido sugerir la formación de cuatro nuevos géneros: *Bavovirus* (Wolf *et al.*, 2011) y *Nacovirus* (Day *et al.*, 2010; Wolf *et al.*, 2012; Liao *et al.*, 2014) a partir de virus aislados en aves de corral, el género *Secalivirus* (Ng *et al.*, 2012) a partir de la secuenciación parcial de genomas en muestras tomadas en aguas residuales y el género *Salovirus* (Mikalsen *et al.*, 2014), aislado de salmones. Aunque inicialmente el *virus de la hepatitis E* había sido incluido dentro de la familia *Caliciviridae*, se aceptó su retirada debido a las diferencias funcionales y filogenéticas de las proteínas no estructurales (Koonin *et al.*, 1992; Berke *et al.*, 2000).

Género	Especie	Hospedador	Patología
<i>Norovirus</i>	<u><i>Virus Norwalk</i> (NV)</u>	Humano	Gastroenteritis
	<i>Norovirus murino</i> (MNV)	Ratón	Patología sistémica
	<i>Norovirus bovino</i> (Virus Jena)	Bovino	Gastroenteritis
<i>Lagovirus</i>	<u><i>Virus de la enfermedad hemorrágica de los conejos</i> (RHDV)</u>	Conejo	Enfermedad hemorrágica
	<i>Virus del síndrome de la liebre parda europea</i> (EBHV)	Liebre	Enfermedad hepática
<i>Sapovirus</i>	<u><i>Virus Sapporo</i> (SV)</u>	Humano	Gastroenteritis
	<i>Calicivirus entérico porcino</i> (PEC)	Cerdo	Gastroenteritis
<i>Vesivirus</i>	<u><i>Virus del exantema vesicular del cerdo</i> (VESV)</u>	Cerdo y mamíferos marinos	Lesiones vesiculares
	<i>Calicivirus felino</i> (FCV)	Gato	Enfermedad respiratoria y lesiones vesiculares
	<i>Vesivirus de conejo</i> (RaV)	Conejo	Gastroenteritis ¿?
<i>Nebovirus</i>	<u><i>Virus Newbury-1</i></u>	Bovino	Gastroenteritis

Tabla 1: Resumen de los géneros aceptados por el ICTV dentro de la familia *Caliciviridae* hasta la fecha, donde se incluyen algunas de las especies más importantes e información sobre los hospedadores y patologías que provocan. Se subrayan las especies tipo de cada género.

Como se puede observar en la Tabla 1, los calicivirus infectan a varias especies animales, pero solamente se han encontrado patógenos para humanos en los géneros *Norovirus* y *Sapovirus*. No obstante, otros virus descritos, particularmente los *Vesivirus*, pueden saltar la barrera de especie y es posible la aparición de zoonosis (Smith *et al.*, 1998).

Si bien nos referimos a especies virales, la nomenclatura y taxonomía está bajo discusión por la falta de unos criterios objetivos que permitan delimitar claramente esta unidad taxonómica, adquiriéndose acuerdos por consenso (Adams *et al.*, 2013).

1.1 La cápsida viral

La cápsida presenta varias funciones relacionadas con sus propiedades moleculares y las de sus componentes, como la capacidad para autoensamblarse incorporando el genoma viral, interaccionar con los receptores y componentes de membrana necesarios para la entrada del virión y su capacidad para desensamblarse y liberar el genoma en condiciones adecuadas para su replicación y traducción, protegiendo el material genético en el medio extracelular. Al ser el componente externo del virión, está también implicada en los mecanismos de transporte intra y extracelular, así como en la interacción con elementos del sistema inmune del huésped.

Los viriones de la familia *Caliciviridae* presentan una cápsida de simetría icosaédrica con un diámetro de entre de 27 y 40 nm y carecen de envuelta lipídica. Entre las características morfológicas que la definen al microscopio electrónico están la presencia de 32 depresiones en forma de copa y el estar compuesta por una proteína mayoritaria de aproximadamente 60 kDa denominada VP1 (también como VP60) y por una proteína minoritaria, VP2, de aproximadamente 10 kDa, denominada también VP10.

La estructura de la cápsida recombinante del NV, formando VLPs (Prasad *et al.*, 1999) y las de los viriones del *virus del león marino de San Miguel* (SMSV) (Chen *et al.*, 2006) del género *Vesivirus*, así como del *virus de Tulane* (Yu *et al.*, 2013) se han podido resolver mediante el análisis por difracción de rayos X. Es una cápsida icosaédrica de simetría T=3 formada por 180 moléculas de la proteína mayoritaria VP1 organizada en 90 homodímeros y distribuidas en 12 pentámeros en los vértices y 20 hexámeros en las caras del icosaedro. La VP2 se encuentra en un número muy bajo de copias (Wirblich *et al.*, 1996; Sosnovtsev y Green, 2000) y se desconoce su localización exacta y su posible función en la formación de la cápsida.

El examen de la estructura de la VP1 nos permite diferenciar un dominio próximo al extremo amino terminal que se dispondrá hacia el interior de la cápsida, dominio S (del inglés *shell*), y un dominio protuberante que se dispone hacia el exterior, dominio P (del inglés *protruding*), que es el responsable de la interacción entre los monómeros de VP1 y se subdivide a su vez en los subdominios P1 y P2. Estos dominios se diferencian a su vez en la variación génica y estructural, siendo el dominio S el más conservado y el subdominio P2 una región hipervariable (Chakravarty *et al.*, 2005) con capacidad antigénica (Tohya *et al.*, 1997; Matsuura *et al.*, 2001) y responsable de la adsorción y entrada del virus en la célula huésped (Lochridge *et al.*, 2005). La evolución de la secuencia del dominio P en cultivo y durante el proceso patológico presenta características de cuasiespecie (Radford *et al.*, 1998; Carlsson *et al.*, 2009) debido a la alta variabilidad de secuencias y la presión selectiva sobre la región.

Las unidades de la proteína estructural VP1 tienen la capacidad de, expresadas en condiciones adecuadas, autoensamblarse de manera espontánea formando VLPs y conservando sus características antigénicas (Jiang *et al.*, 1992; Boga *et al.*, 1997; Di Martino *et al.*, 2007).

La presencia de la VP2 no es necesaria para la formación de VLPs, pero su expresión analizada en el sistema de genética reversa del *calicivirus felino* es un requisito necesario para la formación de partículas infecciosas funcionales (Sosnovtsev *et al.*, 2005). Se ha descrito experimentalmente la interacción de VP2 del NV con el dominio S de la VP1 (Vongpunsawad *et al.*, 2013) localizado en la región interna de la cápsida. El alto contenido en aminoácidos de carácter básico de la VP2, que permitiría la unión a ácidos nucleicos, junto con su interacción con la VP1, indican que es una buena candidata para actuar como factor de encapsidación del genoma viral.

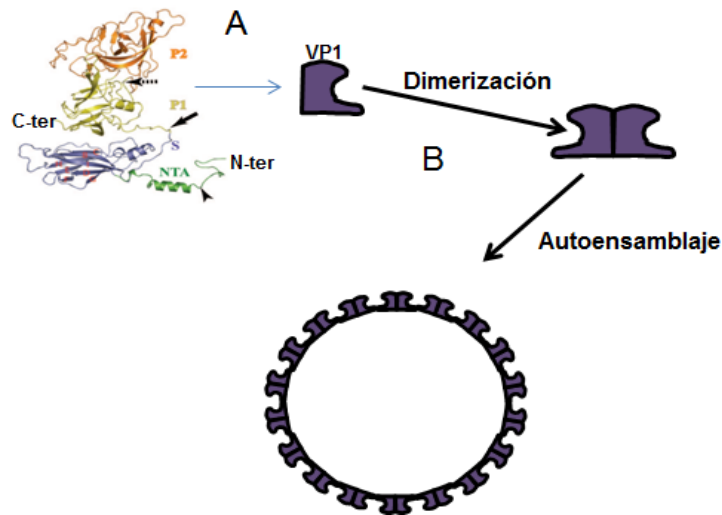


Figura 1: Estructura de la VP1 (Chen *et al.*, 2006), donde se indican los dominios S, P1 y P2 y los extremos de la proteína (A). Representación del proceso de formación de la cápsida (B), primero por dimerización de las unidades de VP1 y posteriormente por el autoensamblaje de los protómeros.

1.2 El genoma viral

El genoma contiene la información necesaria para la expresión de las proteínas virales en el interior de la célula huésped y las secuencias y estructuras necesarias para la regulación de la transcripción, procesamiento, replicación y traducción del mismo en presencia de elementos celulares y virales.

En los miembros de la familia *Caliciviridae* el genoma está formado por una molécula lineal de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva con un tamaño de 6,3 a 8,3 kb. Este RNA genómico (gRNA) presenta en el extremo 5' una proteína covalentemente unida (VPg) y una región no traducida (NTR) de corta extensión (4 nucleótidos en *Norovirus* y 75 en *Nebovirus*). Seguidamente se localizan los genes de las proteínas no estructurales y, a continuación, los genes de las proteínas estructurales VP1 y VP2. En el extremo 3' existe una NTR de mayor tamaño y una cola de poli-A.

Se ha descrito también la presencia de un RNA subgenómico (sgRNA) coterminado con el extremo 3' del gRNA, incluyendo la región 3'-NTR y la cola de poli-A, y que aparece empaquetado dentro de los viriones (Meyers *et al.*, 1991). Si bien no se ha podido demostrar la presencia simultánea de ambas especies de RNA en el mismo virión, el sgRNA puede ser encapsidado en viriones de menor densidad (Neill, 2002). Al igual que el gRNA, presenta unida la VPg a su

extremo 5' (Meyers *et al.*, 1991; Herbert *et al.*, 1997). Las secuencias del extremo 5' en los RNAs genómico y subgenómico son similares, lo que sugiere que pueden contener elementos comunes que regulen la traducción y replicación de los mismos. La secuencia del sgRNA contiene los genes de las proteínas estructurales VP1 y VP2, sirviendo como molde principal para la traducción de las proteínas estructurales.

El genoma de los miembros de la familia *Caliciviridae* tiene en común ser policistrónico, tener una ORF independiente para la expresión de la VP2 en la región del extremo 3' que se solapa con los nucleótidos finales de la ORF anterior, y que la producción de las proteínas no estructurales (NS1-7) se realiza siempre a partir de la ORF1. Podemos encontrar, sin embargo, diferencias características en la organización genómica, expresión y posterior procesamiento de los productos virales de cada género.

De esta manera, en los géneros *Sapovirus*, *Lagovirus* y *Nebovirus* el genoma se divide en dos pautas abiertas de lectura (ORFs 1 y 2), la primera (ORF 1) codifica las proteínas no estructurales y la proteína mayoritaria de la cápsida, mientras la proteína minoritaria se expresa a partir de una segunda (ORF 2). Una tercera ORF incluida dentro la región 5' del gen de la VP1 ha sido propuesta en el género *Sapovirus* a partir de predicciones bioinformáticas (Clarke y Lambden, 2000), pero no se ha detectado la expresión de la proteína correspondiente.

En *Vesivirus* y *Norovirus*, encontramos tres ORFs (ORF 1, ORF 2 y ORF 3). La primera codifica las proteínas no estructurales. La proteína mayoritaria de la cápsida se sintetiza a partir de la ORF 2, mientras que la proteína minoritaria se encuentra en una tercera pauta de lectura (ORF 3). En el caso de los *Norovirus* se ha caracterizado una ORF adicional, denominada ORF 4, que en el MNV se solapa con una región en 5' de la ORF 2 y que expresa una proteína no esencial para la replicación del MNV denominada VF1 (Factor de Virulencia-1) (McFadden *et al.*, 2011).

Los sgRNAs contienen en todo caso dos pautas de lectura abierta, siendo la más cercana al extremo 5' la que codifica para la VP1 y la segunda para la VP2. La secuencia del gen que expresa la proteína minoritaria de la cápsida se solapa con el extremo 3' de la ORF 1 en *Lagovirus*, *Sapovirus* y *Nebovirus*, y con el de la ORF 2 en *Norovirus* y *Vesivirus*.

Además de las características anteriormente citadas, encontramos particularidades en la forma madura de los productos virales de algunos géneros. En *Norovirus* los péptidos codificados por las secuencias más cercanas al extremo 5', NS1 y NS2, aparecen como una sola proteína denominada NS1-NS2 al no tener una región de corte para la proteasa viral (Sosnovtsev *et al.*, 2006). En *Sapovirus* y *Vesivirus* la proteasa y la RNA polimerasa no son procesadas y dan lugar a la proteína bifuncional NS6/7 (Oka *et al.*, 2005; Sosnovtseva *et al.*, 1999). La proteína mayoritaria de la cápsida en el género *Vesivirus* se sintetiza como un precursor que es procesado por la proteasa viral liberando la secuencia peptídica que ocupa la posición N-terminal denominada *leader* o LC y la forma madura de la proteína mayoritaria de la cápsida, VP1 (Sosnovtsev *et al.*, 1998; Matsuura *et al.*, 2000).

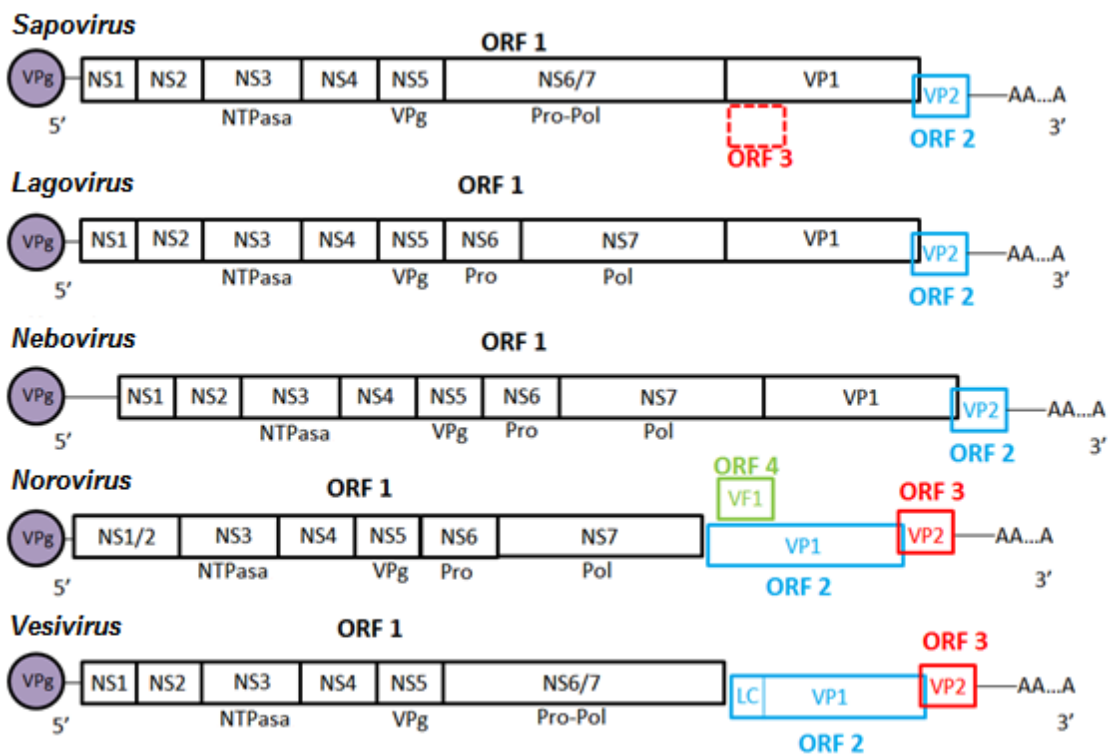


Figura 2: Representación esquemática de la organización genómica de los distintos géneros de la familia *Caliciviridae* y las proteínas para las que codifican. Se indican los extremos 5' (con la VPg unida) y 3' (con la cola de poli-A), los productos génicos y las distintas pautas abiertas de lectura (ORF) delimitadas en diferente color. Se indican las funciones conocidas bajo la región de la proteína no estructural correspondiente (NTPasa; Pro: Proteasa; Pol: RNA polimerasa dependiente de RNA (Rp-Rd); VPg: Proteína viral unida al genoma). La VP1 y VP2 corresponden a las proteínas estructurales. VF1 corresponde al factor de virulencia-1 y LC al péptido líder de la cápsida.

1.3 Traducción y procesamiento de las proteínas virales

La traducción del genoma de los calicivirus ocurre por un mecanismo independiente de *cap* (característico de los mRNAs celulares y de otros virus como las familias *Coronaviridae* y *Flaviviridae*) y no regulado por un Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (IRES) (como sucede, por ejemplo, con los picornavirus) ya que el genoma de los calicivirus carece de *cap* y no se han descrito estructuras tipo IRES. En su lugar, parece probable que el inicio de la traducción se produzca mediante la interacción de la VPg con los factores de inicio de la traducción eIF3, eIF4E y eIF4G, (Chaudry *et al.*, 2006; Daughenbaugh *et al.*, 2003, 2006; Goodfellow *et al.*, 2005; Hosmillo *et al.*, 2014; Chung *et al.*, 2014) que actuando con otros factores de inicio, elementos regulatorios de la traducción y la proteína ribosomal S6 (Daughenbaugh *et al.*, 2006), permita la formación del complejo de inicio de la traducción (Subunidad ribosomal 40S asociado al complejo tRNA iniciador-eIF2-GTP). Este modelo explicaría la traducción de las proteínas estructurales a partir del sgRNA que también mantiene la proteína VPg unida covalentemente a su extremo 5' (Meyers *et al.*, 1991; Herbert *et al.*, 1997).

Con la expresión de la ORF1 se obtiene una poliproteína que se autoprocresa debido a la actividad proteasa (Martín Alonso *et al.*, 1996; Sosnovtsev *et al.*, 2002, 2006; Blakeney *et al.*, 2003; Oka *et al.*, 2005) dando lugar a distintos productos intermedios que se procesarán hasta obtener las proteínas maduras no estructurales (NS). Tradicionalmente se ha denominado a estas proteínas por similitud de secuencia y función con su contraparte en la familia *Picornaviridae* de manera que también pueden nombrarse con distintas nomenclaturas: 2A (NS1), 2B (NS2), 2C (NS3), 3A (NS4), 3B (NS5), 3C (NS6) y 3D (NS7).

NS1-NS2

El producto del proceso proteolítico en el extremo amino de la poliproteína de la ORF1 será la proteína NS1-NS2 en *Norovirus* y los productos maduros NS1 y NS2 en el resto de géneros. Estudios con la proteína NS1-NS2 del virus Norwalk muestran su capacidad de asociarse a las membranas biológicas e interactuar con la proteína asociada a vesículas VAP-A (Ettayebi

y Hardy, 2003) y de promover la desestructuración del aparato de Golgi, afectando al tráfico celular (Fernández-Vega *et al.*, 2004). Estos datos sugieren que la proteína puede jugar un papel en la formación de los complejos de replicación durante la infección viral. En *Vesivirus* la forma NS2 se ha encontrado asociada a los complejos de replicación (Green *et al.*, 2002; Casais *et al.*, 2008) y se ha descrito la interacción, mediante ensayo de doble híbrido, de la región NS2 del FCV con las proteínas NS3, NS4 y NS6/7 (Kaiser *et al.*, 2006), datos que apoyan ese posible rol como copartícipe de la formación de estructuras membranosas.

NS3

La proteína NS3 posee capacidad de unión a RNA. Se ha caracterizado su capacidad de unión a NTPs y su actividad NTPasa (Marin *et al.*, 2000; Pfister y Wimmer, 2001) y aunque el análisis de su secuencia sugiere que puede actuar como una helicasa (Neill, 1990), no ha podido ser demostrado experimentalmente. Se ha encontrado en complejos de replicación asociada a la membrana y se ha descrito su interacción con la proteína NS2 (Kaiser *et al.*, 2006). Podría, por tanto, formar parte de los complejos de replicación favoreciendo la síntesis de RNA y, de confirmarse la actividad helicasa, la separación posterior de las hebras de polaridad positiva y negativa tras la actividad de la polimerasa viral.

NS4

La proteína NS4 posee secuencias características de dominios hidrófobos y ha sido encontrada en forma NS4 y como precursor NS4-NS5 en células infectadas con el FCV y el MNV (Sosnovtsev *et al.*, 2002, 2006) y formando parte de complejos de replicación (Green *et al.*, 2002). Su interacción con NS2 (Kaiser *et al.*, 2006) permite suponer que participa conjuntamente con ésta en la formación de los complejos de replicación y el intermediario NS4-NS5 podría funcionar como anclaje para la interacción de la NS5 con el genoma y factores celulares.

NS5 (VPg)

El producto NS5 corresponde a la proteína unida covalentemente al extremo 5' del genoma (VPg) cuya presencia es esencial para traducción y la replicación efectiva del genoma viral (Herbert *et al.*, 1997; Dunham *et al.*, 1998). Al carecer de IRES y cap el mecanismo de traducción del gRNA y sgRNA en calicivirus puede iniciarse por la presencia de la VPg y su interacción con proteínas celulares implicadas en la formación de complejos de inicio de la traducción (Chaudry *et al.*, 2006; Daughenbaugh *et al.*, 2003, 2006; Goodfellow *et al.*, 2005). La VPg jugaría también un importante papel en la síntesis de los distintos RNAs producidos durante la replicación viral al poder ser nucleotidilada *in vitro* por la polimerasa NS7 o su precursor N6-NS7 (Belliot *et al.*, 2008; Machín *et al.*, 2001; Rohayem *et al.*, 2006) utilizando un residuo de tirosina próximo al extremo amino como cebador para iniciar la síntesis (Machín *et al.*, 2001) y cuya supresión resulta letal para el virus (Mitra *et al.*, 2004). También consistente con esto es la observación de la interacción entre la NS5 y la NS6/7 del FCV (Kaiser *et al.*, 2006). Otra función que se le ha atribuido por su interacción con la proteína estructural de la ORF2 (Kaiser *et al.*, 2006) es la de servir como señal de empaquetamiento del RNA viral.

NS6 (Pro)

La proteína NS6 presenta actividad cisteín-proteasa (Wirblich *et al.*, 1995; Blakeney *et al.*, 2003; Someya *et al.*, 2005) y es la encargada de procesar la poliproteína expresada por la ORF 1 (Martín-Alonso *et al.*, 1996; Belliot *et al.*, 2003; Oka *et al.*, 2005; Sosnovtsev *et al.* 2002), así como la proteína de la cápsida en los *Vesivirus* (Sosnovtsev *et al.*, 1998). En los *Norovirus*, *Lagovirus* y *Nebovirus* se produce de forma totalmente procesada como NS6, mientras en los *Vesivirus* y *Sapovirus* la forma madura definitiva es la proteína bifuncional NS6/7 (Sosnotseva *et al.*, 1999; Martín-Alonso *et al.*, 2005; Sosnovtsev *et al.*, 2002; Oka *et al.*, 2005). Estudios de interacción por el método de doble híbrido han permitido detectar la interacción del producto NS6/7 con las proteínas NS2, NS5, pre-VP1 y VP2 en FCV (Kaiser *et al.*, 2006) lo que sugiere que participa en la maduración de proteínas estructurales y no estructurales dentro de los complejos de replicación.

NS7 (Pol)

La polimerasa viral es la proteína NS7, un enzima con actividad RNA polimerasa dependiente de RNA encargada de la síntesis de las hebras positiva y negativa del genoma y del sgRNA (Vázquez *et al.*, 1998). Al igual que hemos visto con la proteasa, en los *Vesivirus* y *Sapovirus* la forma NS6/7 no se procesa y aparece como un enzima bifuncional que posee ambas actividades. Aunque en los *Norovirus* y *Lagovirus* es mayoritaria la forma procesada NS7, encontramos también la forma NS6/7 (Konig *et al.*, 1998; Sosnovtsev *et al.*, 2006). La forma no procesada y la NS7 del RHDV presentan diferencias funcionales *in vitro* siendo la forma no procesada más efectiva en la unión de residuos poli-U a la proteína VPg y la forma procesada más efectiva en la extensión de la nueva hebra (Machín *et al.*, 2009).

La polimerasa de los calicivirus puede iniciar la síntesis *de novo* o extender un oligonucleótido cebador (Belliot *et al.*, 2005; Vázquez *et al.*, 1998; Rohayem *et al.*, 2006; Fullerton *et al.*, 2007). También posee la capacidad de iniciar la síntesis utilizando como cebador un grupo hidroxilo de un residuo de tirosina de la VPg (Machín *et al.*, 2001, 2009; Belliot *et al.*, 2008; Subba-Reddy *et al.*, 2011). La resolución de la estructura de la polimerasa ha permitido identificar los dominios característicos de las RNA polimerasas dependientes de RNA (Ng *et al.*, 2002; Hogbom *et al.*, 2009) y al igual que la polimerasa de picornavirus, funciona como un homodímero con actividad cooperativa (Hogbom *et al.*, 2009). También se han podido identificar en el centro activo del enzima los característicos motivos ricos en aspartato de las RNA polimerasas dependientes de RNA que permiten la interacción con cationes divalentes (Mg^{2+} o Mn^{2+}) y que se han demostrado esenciales para la actividad catalítica (Vázquez *et al.*, 2000; Fullerton *et al.*, 2007).

Las proteínas estructurales

Además de las proteínas no estructurales, en el extremo 3' de la ORF1 en *Nebovirus*, *Sapovirus* y *Lagovirus* se encuentra codificada la secuencia de la VP1 que en estos géneros, además de traducirse a partir del sgRNA, puede

producirse por procesamiento de la poliproteína mediante la acción de proteasa viral y manteniendo la capacidad de autoensamblarse (Sibilia *et al.*, 1995; Hansman *et al.*, 2008). También se ha detectado la expresión de la proteína mayoritaria de la cápsida a partir del gRNA en *Norovirus* y *Vesivirus* (McCormick *et al.*, 2008; Sosnovtsev *et al.*, 1998) si bien el gen que las codifica está en diferente pauta de lectura y en *Norovirus* se supone que ocurre por un mecanismo de reinicio de la traducción dependiente de la terminación de la ORF anterior (McCormick *et al.*, 2008).

La traducción del sgRNA da lugar a las proteínas estructurales VP1 y VP2. La síntesis de la VP1 seguiría el mismo modelo que se ha propuesto para la traducción del gRNA en el que la presencia de la VPg y su interacción con factores celulares permiten la formación del complejo de inicio de la traducción.

La región 5' de la ORF que codifica la VP2 se solapa con la región 3' de la ORF anterior (Meyers, 2003) que codifica la VP1. Para la traducción de esta segunda ORF se ha descrito un mecanismo de reinicio de la traducción dependiente de la terminación de la ORF anterior (Naphtine *et al.*, 2009; Luttermann y Meyers, 2007, 2009; Meyers 2003, 2007) facilitado por la presencia de una secuencia de unos 70 nucleótidos (TURBS) al final del gen de la VP1 que forma una estructura secundaria con 2 motivos definidos, que interacciona por su motivo 1 con el rRNA 18S (Naphtine *et al.*, 2009; Luttermann y Meyers, 2007, 2009; Meyers, 2007) y lo mantiene unido al RNA viral. La descripción de la interacción de elementos TURBSs con factores de inicio de la traducción como el eIF3 por la región del motivo 1 (Pöyri *et al.*, 2007) explicaría la formación de nuevos complejos de traducción. Por otro lado, el motivo 2 se propone como implicado en la relocalización del ribosoma sobre el codón de inicio de la traducción (Luttermann y Meyers, 2007; Meyers, 2007).

Una vez expresada la VP1 a partir del sgRNA no necesita procesamiento por parte de la proteasa viral a excepción del género *Vesivirus*, donde se sintetiza en forma de precursor (Pre-VP1) que es procesado dando lugar a la VP1 y al péptido LC (Sosnovtsev *et al.*, 1998; Matsuura *et al.*, 2000). Además de la función estructural previamente descrita, se ha observado la interacción de la proteína codificada por la ORF2 (Pre-VP1) con los productos NS5, NS6/7 y VP2 del FCV (Kaiser *et al.*, 2006) y se ha descrito la interacción

del dominio S de la VP1 con la polimerasa del MNV, actuando como un regulador positivo de la replicación del RNA (Subba-Reddy *et al.*, 2012).

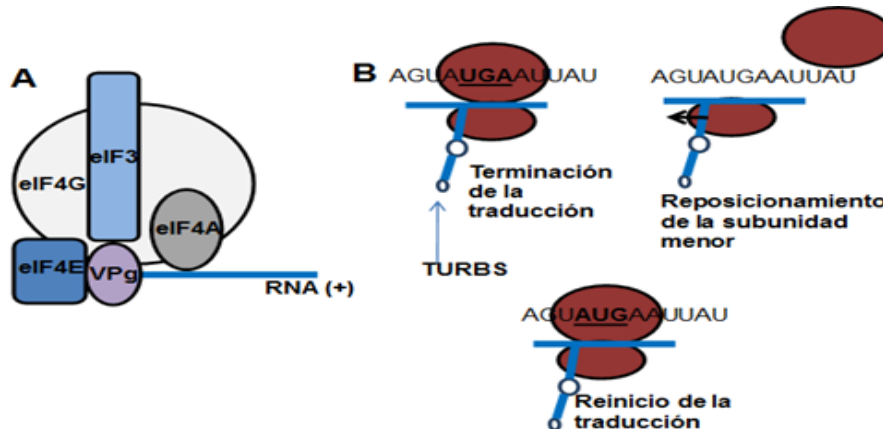


Figura 3: Esquema de la formación del complejo de inicio de la traducción del gRNA y del sgRNA con los factores celulares reclutados por la VPg (A), adaptado de Thorne y Goodfellow, 2014. Representación del proceso propuesto de traducción de la ORF de la VP2 mediante un mecanismo de reinicio de la traducción dependiente de la terminación de la ORF anterior (B), siendo TURBS la secuencia del RNA (Lutterman y Meyers, 2007; 2009) necesaria para el reinicio de la traducción.

Adicionalmente se ha encontrado en el MNV, del género *Norovirus*, la expresión de una ORF alternativa (ORF 4) solapada con la ORF 2 (McFadden *et al.*, 2011). El estudio de su secuencia ha permitido encontrar una región de inicio (AUG) en un entorno favorable de Kozak que permite proponer el mecanismo de "leaky scanning" para su traducción (McFadden *et al.*, 2011).

La función de la VP2 continúa sin determinarse aunque se propone que pueda servir para la encapsidación del genoma viral debido a que es una proteína de carácter básico que podría interactuar con los gRNA y sgRNA y por su capacidad de interactuar con la proteína mayoritaria de la cápsida (Glass *et al.*, 2003; Kaiser *et al.*, 2006; Vongpunsawad *et al.*, 2013). La interacción de la VP2 con la VP1 aporta estabilidad durante el proceso de ensamblaje y frente a la acción de proteasas (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2003) lo que puede explicar la importancia funcional de la VP2 para la formación de partículas infecciosas (Sosnovtsev *et al.*, 2005).

1.4 Replicación del RNA viral y variación genética

La replicación del gRNA requiere la síntesis de una hebra complementaria de polaridad negativa que servirá como molde para la

transcripción y replicación, generando nuevos sgRNAs y gRNAs. Durante este proceso, llevado a cabo por la RNA polimerasa dependiente de RNA viral, se forma una molécula de RNA de doble cadena. Al no haberse detectado VPg ligada a la hebra negativa, se ha propuesto que la cadena antisentido se sintetiza *de novo* (Rohayem *et al.*, 2006) en un proceso regulado por la interacción de la polimerasa con el dominio S de la proteína estructural, interacción que no afecta a la polimerización dependiente de VPg (Subba-Reddy *et al.*, 2011, 2012). De esta forma, en las etapas iniciales la interacción de la polimerasa con la VP1 favorecería la síntesis de moldes de polaridad negativa, mientras que en fases más tardías de la infección el autoensamblaje de cápsida restaría esos recursos y reduciría la formación de genomas antisentido. Una vez se ha sintetizado la hebra negativa, y utilizando ésta como molde, tiene lugar la síntesis de la cadena positiva empleando la proteína VPg como cebador (Rohayem *et al.*, 2006).

Se han encontrado hebras de polaridad positiva y negativa tanto de los RNAs genómico como subgenómico en células infectadas, lo cual parece indicar la posibilidad de que se forme sgRNA a partir de una cadena complementaria de polaridad negativa (Green *et al.*, 2002). Inicialmente se propusieron dos modelos, uno que sugería una terminación temprana de la síntesis de la hebra de polaridad negativa por separación del complejo RNA-Polimerasa debido a una señal de terminación en la secuencia del gRNA que diera lugar a un subgenómico antisentido. Usando éste como molde y utilizando la VPg como cebador se sintetizarían los sgRNAs (Revisado en Thorne y Goodfellow, 2014). El segundo modelo, apoyado por datos obtenidos *in vitro* (Morales *et al.*, 2004) y predicciones bioinformáticas (Simmonds *et al.*, 2008) establece que el subgenómico se formaría usando como molde la hebra genómica antisentido por la presencia de una estructura secundaria en la hebra de polaridad negativa que actúa como promotor permitiendo la unión de la RNA polimerasa viral y el inicio de la síntesis del sgRNA empleando como cebador la VPg. La secuencia que actuaría como promotor mediante la formación de estructuras secundarias y su interacción con la RNA polimerasa ha sido confirmada experimentalmente en *Norovirus* (Yunus *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015). A partir del RNA subgenómico la polimerasa viral podría sintetizar *de*

de novo las hebras complementarias explicando así la presencia de subgenómicos de polaridad negativa.

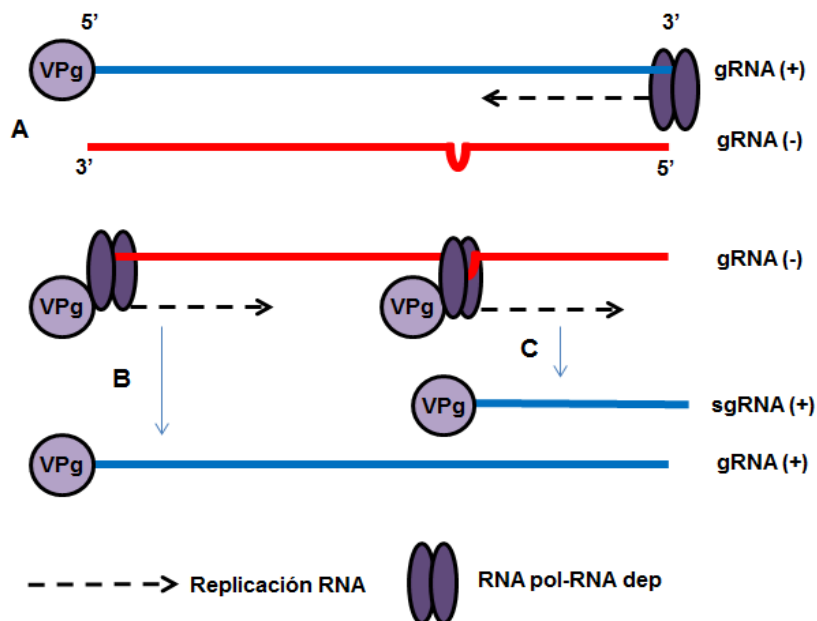


Figura 4: Esquema de la replicación de RNA en calicivirus. (A) La síntesis de la hebra de polaridad negativa se realiza *de novo* por la RNA polimerasa-RNA dependiente. (B) La síntesis del gRNA y (C) del sgRNA se realiza utilizando la VPg como cebador. La protuberancia que se indica en la hebra de polaridad negativa representa la región que actúa como promotor para la síntesis del sgRNA.

La replicación del RNA en los calicivirus es, como en otros virus de RNA, la principal fuente de variación génica debido a la actividad de las RNA polimerasas dependientes de RNA que, por su deficiencia en actividad correctora de errores, introduce mutaciones en, aproximadamente, 1 de cada 10^4 bases sintetizadas. Esta alta tasa de mutación y el alto número de copias generadas en el proceso infeccioso, generan una dinámica de cuasiespecies dando lugar a multitud de genomas funcional y estructuralmente relacionados pero con una alta variabilidad de secuencias y, en consecuencia, de fenotipos (Lauring y Andino, 2010; Domingo *et al.*, 2012).

La tasa de error de las RNA polimerasas dependientes de RNA es un mecanismo evolutivo necesario para mantener la elevada diversidad genética de estos virus, de manera que la disminución de la tasa de error de estas enzimas provoca una disminución en la propagación y virulencia (Pfeiffer y Kirkegaard, 2005), y un aumento de la tasa de mutación también tiene consecuencias negativas que pueden llevar incluso a la extinción de la

progenie viral por la acumulación de mutaciones, lo que podría ser utilizado para el tratamiento farmacológico de infecciones virales (Revisado en Perales y Domingo, 2014). Compuestos como la rivabirina y favipiravir, que aumentan la tasa de mutación de las RNA polimerasas virales, han demostrado ser eficaces en la inhibición de la propagación del MNV (Arias *et al.*, 2014).

Otra fuente de variación génica que encontramos en los calicivirus es la recombinación cuando se replican dos o más genomas diferentes en un mismo huésped. Ha sido estudiada en mayor detalle entre virus de distintos genotipos dentro del género *Norovirus* donde ocurre con mayor frecuencia en la región solapante de la ORF1 y la ORF2 (Bull *et al.*, 2005; Rohayem *et al.*, 2005). Se ha propuesto que este fenómeno se deba a la presencia de secuencias que favorezcan el cambio de molde de la polimerasa durante la replicación del genoma y que estarían situadas en la región 3' de las hebras subgenómicas de polaridad negativa (Bull *et al.*, 2005). En *Lagovirus* también encontramos recombinación homóloga en la región *upstream* del gen de la VP1 (Abrantes *et al.*, 2008), dando lugar a la aparición de variantes, por la recombinación de la región donde se encuentran los genes de las proteínas no estructurales con la región que contiene los genes de las proteínas estructurales, entre diferentes aislados de RHDV (Lopes *et al.*, 2015).

1.5 Ciclo replicativo

Para que en una célula puedan producirse nuevas partículas virales, ésta debe ser permisiva (que permita la entrada del genoma) y susceptible (que contenga las condiciones y factores necesarios para la formación de nuevos virus) a la infección. Estas características condicionan el rango de huésped y el tropismo.

Unión, entrada y liberación del genoma

Para introducir el genoma dentro de la célula huésped, se debe producir la adsorción del virión a la célula mediante interacción con moléculas específicas dispuestas en la superficie celular. Estas moléculas son proteínas o glúcidos asociados a lípidos y proteínas de membrana que permiten el anclaje del virión y, generalmente en combinación con otras moléculas, facilitan el

acercamiento a la superficie celular y, dado el caso, la formación de vesículas para el transporte de la partícula viral.

En la familia *Caliciviridae* las interacciones con moléculas de la superficie celular más caracterizadas son las que tienen lugar entre los norovirus humanos y los antígenos que determinan los grupos sanguíneos (Marionneau *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003). También se ha detectado la interacción de antígenos de grupos sanguíneos con la cápsida del RHDV (Ruvoen-Clouet *et al.*, 2000; Leuthold *et al.*, 2014), siendo candidatos para actuar como receptores en la unión a la célula huésped. Otro componente glucídico que puede funcionar como receptor de calicivirus son los residuos de ácido α -2,6-sialico, cuya interacción y unión se ha descrito para el MNV (Taube *et al.*, 2009) y el FCV (Stuart y Brown, 2007). En el género *Vesivirus* se ha observado la unión a dos tipos de receptores proteicos. En el *vesivirus de conejo* (RaV) se ha encontrado la interacción de la cápsida con la anexina A2 y que su presencia es necesaria para la propagación viral (González-Reyes *et al.*, 2009). El papel de la anexina A2 en el transporte celular permite sugerir que juega un papel en el proceso de entrada de la partícula viral. En el *calicivirus felino* ha sido caracterizada la unión al receptor JAM-1 (Makino *et al.*, 2006; Ossiboff y Parker, 2007) y se sugiere la necesidad de más receptores para permitir la entrada del virión. El tropismo del FCV por el tracto respiratorio superior se explica mejor por la presencia conjunta, en células de dicha región, del receptor JAM-1 y residuos de ácido α -2,6-sialico (Stuart y Brown, 2007).

La unión del virión con uno o varios de los receptores de superficie facilita la entrada del virus mediante la formación de vesículas. En el caso del FCV la entrada se produce por endocitosis mediada por clatrina (Stuart y Brown, 2006) y el desensamblaje de la cápsida ocurre por acidificación posterior de los endosomas (Kreutz y Seal, 1995; Stuart y Brown, 2006) dejando el gRNA libre en el citoplasma. Sin embargo, el mecanismo de entrada del MNV es independiente de clatrina y de caveolina. Si bien no se conoce el mecanismo exacto de entrada, parece dependiente de la presencia de colesterol y dinamina (Perry y Wobus, 2010; Gerondopoulos *et al.*, 2010).

Síntesis de proteínas y RNAs virales

Una vez el gRNA con la VPg unida en el extremo 5' queda libre en el citoplasma, tiene lugar la traducción por la formación del complejo de inicio de la traducción tras la interacción de la VPg con factores celulares. La expresión de la ORF1 dará lugar a una poliproteína que se autoprocresa debido a la actividad proteasa, NS6, dando lugar a los diferentes precursores y productos virales maduros.

La producción de proteínas de la ORF1 favorece la formación de complejos de replicación en el citoplasma, que son estructuras membranosas formadas a partir de las membranas internas de la célula y que delimitan un entorno adecuado para los procesos de traducción y replicación de RNA del virus, incrementando la concentración de los elementos virales y celulares necesarios para que ocurran dichos procesos de manera eficiente. Estos complejos han sido observados en FCV (Bailey *et al.*, 2010; Green *et al.*, 2002), MNV (Hyde *et al.*, 2009; Hyde y MacKenzie, 2010) y RaV (Casais *et al.*, 2008). En el FCV se forman a partir de la membrana del retículo endoplasmático por la asociación con las proteínas NS2, NS3 y NS4 (Bailey *et al.*, 2010) y en el MNV están implicadas las proteínas NS1-NS2, NS4 y estructuras de membrana del retículo endoplasmático, aparato de Golgi y endosomas (Hyde *et al.*, 2009; Hyde y MacKenzie, 2010). Los complejos en el MNV se localizan en regiones próximas al centro organizador de microtúbulos lo que, junto con la posible mediación de la VP1 en la reestructuración de los microtúbulos (Hyde *et al.*, 2012), aporta los primeros datos sobre los mecanismos de transporte durante la infección por calicivirus.

Dentro de los complejos de replicación tendrá lugar la replicación del genoma viral por la RNA polimerasa dependiente de RNA. Según los modelos propuestos para la replicación y la traducción, se sintetiza la hebra complementaria a la genómica *de novo* formándose un intermediario de doble cadena. Las hebras de polaridad negativa servirán, a su vez, como molde para la síntesis del gRNA y del sgRNA empleando como cebador la proteína NS5 (VPg). En el entorno de los complejos se produce la traducción dependiente de VPg de los RNAs genómico y subgenómico de polaridad positiva, dando lugar a las proteínas no estructurales y estructurales, respectivamente.

Durante la replicación viral, existe competición de recursos con la célula huésped e interacción con los mecanismos de defensa. La actividad proteasa NS6 es capaz de procesar la proteína celular PABP (Kuyumcu-Martínez et al., 2004) necesaria para la traducción de los mRNA celulares y la expresión de la ORF4 en MNV interfiere en la respuesta innata mediada por interferón (McFadden *et al.*, 2011) aumentando la virulencia de la infección.

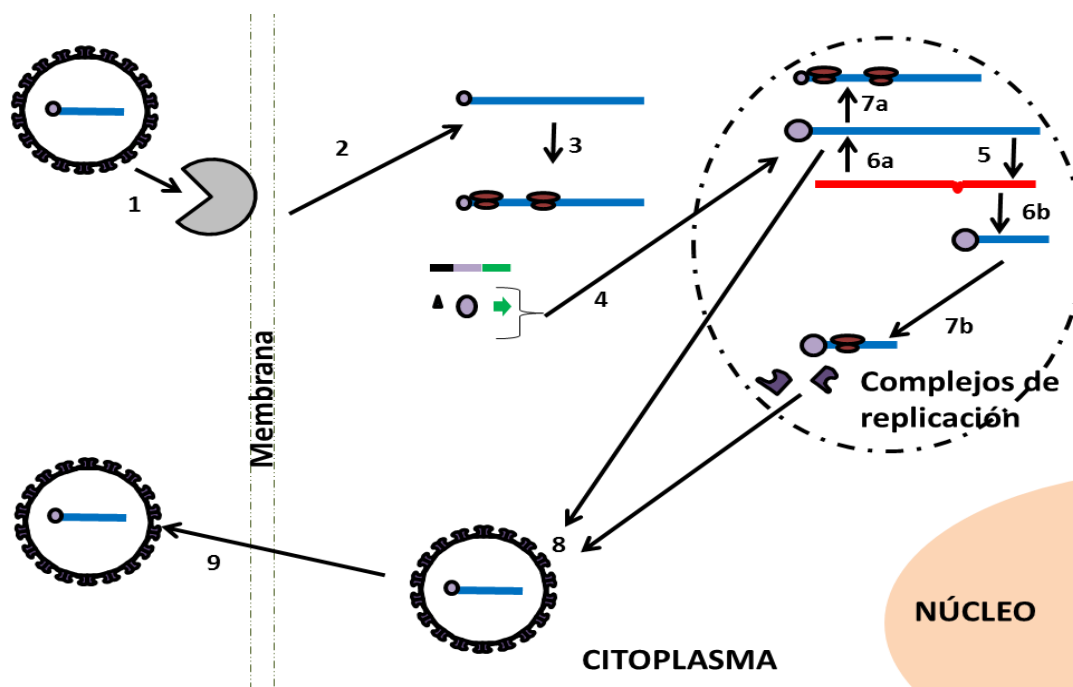


Figura 5: Esquema del ciclo replicativo de calicivirus. Tras la adsorción a una o varias moléculas (figura gris) de la superficie celular (1) se produce la internalización del virión y liberación del genoma con la proteína VPg en el extremo 5' (2), que es traducido (3) dando lugar a las proteínas no estructurales tras el procesamiento de la poliproteína. Las proteínas no estructurales participan en la formación de los complejos de replicación (4) y en la replicación de RNA (5) que dará lugar a la hebra de polaridad negativa en rojo. Utilizando la hebra negativa como molde se sintetizan más gRNAs (6a) y sgRNAs (6b). La traducción de los gRNAs dará lugar a más proteínas no estructurales (7a), mientras que la traducción de los sgRNAs da lugar a las proteínas estructurales (7b). Las proteínas estructurales se autoensamblan incorporando RNAs (+) con VPg unida, dando lugar a las nuevas partículas virales (8). El daño celular y desestructuración de membranas internas permite la liberación de los viriones (9).

Empaquetamiento y salida

Cuando el número de copias de la proteína estructural VP1 es suficientemente elevado, se autoensambla formando la cápsida e incorporando el genoma unido a la VPg. Para el desarrollo de este proceso sería necesario estabilizar la VP1 y evitar su degradación, papel llevado a cabo en MNV por la chaperona HSP90 (Vashist *et al.*, 2015). Se desconoce qué señal o señales

permiten empaquetar selectivamente los gRNA y sgRNA virales, pero se ha sugerido que puedan ser la VPg, unida covalentemente a ambos, o la VP2, proteína de carácter básico que interacciona con la VP1.

La salida del virus se produce por lisis de la célula huésped, probablemente debido a la acumulación masiva de partículas virales y la destrucción de estructuras celulares. Este proceso estaría favorecido por la apoptosis de la célula huésped (Alonso *et al.*, 1998; Bok *et al.*, 2009; Sosnovtsev *et al.*, 2003; Álvarez-Sánchez *et al.*, 2015) y la interacción entre proteínas virales y celulares, como la que tiene lugar en el FCV entre la proteína LC, procesada a partir del producto de la ORF2, y la anexina A2 (Abente *et al.*, 2013). Dicha interacción puede jugar un papel en la desestructuración de las membranas celulares que permita la liberación del virus (Abente *et al.*, 2013).

La profundización en el estudio integral del proceso infectivo en calicivirus necesita modelos capaces de replicarse de manera efectiva en cultivos celulares. Esta característica, dentro de la *familia Caliciviridae*, sólo ha sido descrita en miembros del género *Vesivirus*, en el MNV del género *Norovirus* y en el *virus de Tulane* del género propuesto *Recovirus* (Farkas *et al.*, 2008). El cultivo de otros calicivirus presenta dificultades y puede requerir de factores añadidos. Así, se ha encontrado un modelo para el cultivo del *calicivirus entérico porcino* (PEC) del género *Sapovirus* en líneas celulares procedente de cerdo y con el aporte de sales biliares (Chang *et al.*, 2004) y se ha descrito la posibilidad de cultivar norovirus humano en cultivos de linfocitos B con presencia de bacterias entéricas productoras de antígenos de grupos sanguíneos (Jones *et al.*, 2014).

2. Interacciones virus-célula huésped

El genoma viral tiene capacidad para un número limitado de genes lo que implica la participación de proteínas celulares en varios procesos del ciclo replicativo. La coevolución entre los distintos virus y sus hospedadores ha dado lugar a que proteínas celulares realicen funciones de regulación dentro de un contexto de infección viral.

A modo de resumen y desde un punto de vista genérico, podemos establecer una serie de diferencias en función de la estrategia de los distintos virus para obtener sus RNAs mensajeros que, de entrada, marcarán algunas diferencias ineludibles en los requerimientos de factores celulares. Así, en la mayoría de los virus de DNA la replicación del material genético tiene lugar en el núcleo y la replicación de DNA y transcripción de mRNAs dependen de la DNA polimerasa y de la RNA polimerasa dependientes de DNA celulares, respectivamente. Se encuentran algunas excepciones como los miembros de la familia *Poxviridae*, de replicación citoplasmática y con capacidad génica para sintetizar sus propias DNA y RNA polimerasas. Mención aparte merece el grupo que forman las familias *Caulimoviridae* y *Hepadnaviridae*, virus de DNA bicatenario cuyos RNAs los sintetiza la RNA polimerasa dependiente de DNA celular. A partir de estos RNAs se sintetiza el genoma mediante la acción de la transcriptasa inversa codificada en el genoma viral.

En los virus de RNA su replicación suele ocurrir en el citoplasma (hay excepciones como la familia *Orthomyxoviridae*) mediante la acción de una RNA polimerasa dependiente de RNA, exclusiva de estos virus. Una excepción la constituye la familia *Retroviridae*, cuyo genoma es un RNA monocatenario que se produce por acción de la RNA polimerasa DNA dependiente celular a partir del DNA bicatenario sintetizado por la transcriptasa inversa e integrado en el genoma celular. Con actividad RNA polimerasa-RNA dependiente se encuentran los virus de RNA bicatenario (como por ejemplo la familia *Reoviridae*) y los que presentan un RNA de cadena sencilla, dentro de los cuales se distingue aquellos cuyo RNA genómico puede ser traducido directamente (polaridad positiva) y aquellos cuyo RNA genómico (polaridad negativa) debe ser transcrito para formar RNA mensajero. A pesar de que estos virus sintetizan su propia polimerasa, su limitado número de genes les obliga a necesitar de la interacción con proteínas celulares para llevar a cabo una replicación efectiva (Ortín y Parra, 2006).

La familia *Caliciviridae* se encuentra dentro de los virus RNA de polaridad positiva, con los que comparte algunas estrategias y procesos que permiten una aproximación experimental semejante al estudio de los factores celulares implicados en la replicación viral.

2.1 Interacciones virus-célula huésped en virus RNA de polaridad positiva

Dentro de los virus RNA de polaridad positiva encontramos, entre otras, las familias *Picornaviridae*, *Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Arteriviridae* y *Caliciviridae* que incluyen patógenos humanos y animales. Otras familias bien estudiadas son *Potyviridae* y *Bromoviridae*, causantes de patologías en plantas y que comparten características y estrategias con las anteriores.

Las aproximaciones experimentales que han permitido la identificación y estudio de las interacciones entre proteínas celulares y proteínas y RNAs virales en virus RNA de polaridad positiva se basan en técnicas de estudio de la permisividad y susceptibilidad de cultivos celulares a las infecciones virales, análisis de los complejos proteicos que co-purifican con proteínas virales o la interacción directa y específica entre proteínas virales y celulares, estudio de la interacción y precipitación de proteínas celulares con regiones de los distintos RNAs virales, en especial con las regiones de los extremos 5' y 3' u otras regiones con posible función reguladora, y técnicas de silenciamiento génico que permitan estudiar funcionalmente genes concretos (Lai, 1998; Wang y Li, 2012; Ahlquist *et al.*, 2003).

El grupo de proteínas identificadas mediante estos ensayos incluye proteínas de membrana, proteínas del metabolismo de lípidos, chaperonas, proteínas del citoesqueleto, proteínas de regulación del ciclo celular, factores de transcripción, proteínas de procesamiento del RNA, factores de traducción y elementos del sistema inmune innato (Lai, 1998; Wang y Li, 2012; Ahlquist *et al.*, 2003).

Interacciones en la unión, entrada y liberación del genoma

Los receptores y co-receptores utilizados para la adsorción del virión son proteínas, glucoproteínas o glucolípidos de membrana con funciones fisiológicas o de relación en la célula huésped y presentan una gran variedad incluso dentro de miembros de la misma familia. Sin embargo, existen algunas coincidencias entre miembros de las distintas familias, ya que encontramos unión a residuos de ácido siálico en miembros de la familia *Picornaviridae* (Uncapher *et al.*, 1991; Reza *et al.*, 2005) y *Coronaviridae* (Winter *et al.*, 2006;

Schwegmann-Webels *et al.*, 2011). En flavivirus no se han descrito uniones con ácido siálico, pero si se han encontrado interacciones con residuos glucídicos de heparán sulfato como receptores para el *virus Denge* y el *virus de la fiebre amarilla* (Chen *et al.*, 1997; Germi *et al.*, 2002; Hilgard y Stocker, 2000; Lee *et al.*, 2006). Una vez se une a los receptores adecuados se produce la entrada del virion. En los coronavirus, la entrada se produce por endocitosis mediada por clatrina, pero la fusión de la membrana del virus con la membrana de los endosomas ocurre tras el procesamiento de la proteína S de la superficie del virus por parte de proteasas celulares presentes en los lisosomas (Burkard *et al.*, 2014). En flavivirus se ha descrito que la entrada se produce por endocitosis mediada por clatrina y la liberación del genoma por fusión de membranas dependiente de pH ácido (Mathapati *et al.*, 2010). En el caso de los picornavirus, al ser un virus sin envuelta a diferencia de coronavirus y flavivirus, la entrada se produce por endocitosis y la unión al receptor produce un cambio conformacional de las proteínas estructurales que permite el anclaje y la posterior formación de un poro en la membrana del lisosoma, liberando el genoma en el citoplasma de la célula huésped (Fricks y Hogle, 1990; Panjwani *et al.*, 2014; Seitsonen *et al.*, 2012).

Traducción del RNA y factores celulares

Una vez se ha liberado el genoma de los virus RNA de polaridad positiva, se traduce parasitando la maquinaria celular de síntesis de proteínas. Los coronavirus y flavivirus, cuyos genomas presentan un *cap* en el extremo 5' y una cola de poli-adenina en el extremo 3', pueden reclutar los factores de inicio de la traducción de la célula eucariota y estabilizar el complejo de traducción mediante la circularización del genoma por la interacción del *cap* con eIF4E y la formación de un complejo con eIF4G y la proteína de unión a poli-adenina, PABP (Wells *et al.*, 1998). Además de la cola de poli-adenina en el extremo 3', podemos encontrar otras secuencias y estructuras que regulan *in cis* la traducción de estos genomas. En coronavirus se han encontrado estructuras secundarias que permiten el desplazamiento del marco de lectura por parte del ribosoma para la traducción de genes solapados (Herold y Siddell, 1993; Dos Ramos *et al.*, 2004) y en algunos flavivirus, como el HCV, se ha

descrito la presencia de IRES en la NTR del extremo 5' del genoma que, con la regulación en *trans* por parte del antígeno La celular, permitirían un mecanismo de traducción alternativa, no dependiente de *cap* (Ali *et al.*, 2000).

Los picornavirus carecen de *cap* y el inicio de la traducción es regulado en *cis* por la presencia de IRES en la región no traducida del extremo 5'. Las estructuras secundarias que se forman en esta región permiten la interacción con factores de inicio de la traducción como el eIF4G y la subunidad ribosómica 40S. La formación de estos complejos que permiten el inicio de la traducción está regulada en *trans* por proteínas celulares. La primera descripción de un factor celular asociado a la traducción en picornavirus fue la del autoantígeno La, necesario para el correcto desarrollo de la traducción (Meerovitch *et al.*, 1993). Las proteínas celulares PTBP1 (Kafasla *et al.*, 2010) y PCBP (Gamarnik y Andino, 1997) interactúan con el IRES de poliovirus y regulan positivamente el proceso. La proteína PCBP se une a regiones ricas en residuos de poli-citosina e interactúa con la proteína PABP aportando estabilidad a los mensajeros (Wang *et al.*, 1999) y pudiendo formar un puente RNA-proteína-proteína-RNA que favorezca la aproximación de los extremos y circularización del genoma (Herold y Andino, 2001).

Otro factor asociado a la regulación de la traducción en picornavirus es la hnRNPA1, que se asocia a regiones no traducidas en el extremo 5' tanto en enterovirus como en el virus *Sindbis* (Familia *Togaviridae*) regulando positivamente y en *trans* una traducción dependiente de IRES y otra dependiente de *cap* (Lin *et al.*, 2009).

Durante la infección se produce competencia entre los recursos de la traducción de mensajeros virales y celulares. La proteasa 2A de picornavirus procesa el factor de inicio de la traducción eIF4G, eliminando su dominio de unión a eIF4E (Lamphear *et al.*, 1993) e inhibiendo la traducción dependiente de *cap*. Otras estrategias consistirían en el procesamiento por la proteasa 2A de la PABP (Kerekatte *et al.*, 1999) que, como hemos visto, está implicada en la circularización de los mensajeros celulares para la traducción. Durante el proceso infeccioso también se producen interacciones con elementos del sistema inmune innato de la célula huésped, que pueden ser inactivados mediante procesamiento por parte de las proteasas virales (Barral *et al.*, 2007, 2009;

Debaraj *et al.*, 2007) o mediante la inhibición de su producción (Arnaud *et al.*, 2010).

Formación de complejos de replicación

Con la participación de las proteínas formadas durante la traducción del RNA viral se forman los complejos de replicación, estructuras de membrana formadas por la interacción de proteínas virales y membranas del retículo endoplasmático y endosomas (Welsch *et al.*, 2009; Knoops *et al.*, 2008), que crean un entorno favorable para la replicación, traducción y transcripción de los RNAs virales y que debe incluir todos los factores necesarios para el desarrollo de esos procesos a la vez que protege y estabiliza los productos de síntesis, impidiendo la interacción de las formas replicativas (RNA de doble cadena) con los receptores TLR, RLR y PKR del sistema inmune innato.

Proteínas celulares y síntesis de RNA viral

La replicación del RNA en virus de polaridad positiva necesita la síntesis de una hebra negativa con la que formará transitoriamente un intermediario de doble cadena y que servirá a su vez como molde para la formación de nuevos gRNAs y sgRNAs. Uno de los pasos que necesitan regulación es la transición entre los procesos de traducción y replicación dado que la lectura de los ribosomas en dirección 5'-3' bloquea la lectura en sentido inverso de la cadena molde por parte de la polimerasa (Andino *et al.*, 1999).

El mecanismo propuesto para controlar estos procesos en picornavirus necesita la interacción de la PCBP con regiones no traducidas del extremo 5' y con la PABP que permanece unida a la cola de poli-A, y que permiten el correcto desarrollo de la traducción. Tras la síntesis de las proteínas virales, se produce la interacción de la 3CD viral, con actividad proteasa y polimerasa, y la PCBP, dificultando la traducción y facilitando el acercamiento de la polimerasa 3D al extremo 3', mediante interacción con la PABP, para iniciar la síntesis de RNA (Gamarnik y Andino, 1998; Herold y Andino, 2001) *de novo* y dependiente de la presencia de la proteína VPg, y su interacción con la polimerasa 3D (Hope *et al.*, 1997), que actúa como cebador (Paul *et al.*, 1998) siendo

uridilada como paso necesario para la elongación de la hebra negativa. La PABP se muestra como una proteína celular necesaria para el inicio de la traducción, para la producción de una replicación efectiva y para la regulación en *trans* de la transición entre ambos procesos.

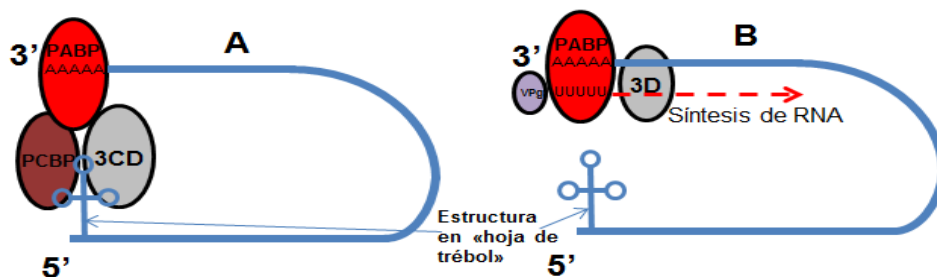


Figura 6: Representación del modelo de circularización del genoma de poliovirus (A) mediado por estructuras del RNA viral (en "hoja de trébol") y los factores celulares PABP y PCBP, que favorece (B) la síntesis de la hebra negativa por parte de la polimerasa viral (3D) utilizando el VPG como cebador. Adaptación del esquema propuesto por Herold y Andino en 2001.

También se ha descrito la interacción y relocalización de las proteínas nucleares hnRNPK y nucleolina con los extremos 5' y 3', respectivamente, del genoma, jugando un papel importante en la replicación de virus de la familia *Picornaviridae* (Lin *et al.*, 2008; Waggoner y Sarnow, 1998). La proteína hnRNPK contiene tres dominios KH que permiten su unión a residuos ricos en poli-citosinas al igual que las PCBPs, si bien se diferencian en la presencia de varios dominios adicionales de unión a RNA y DNA en la hnRNPK (Leffers *et al.*, 1995) que permiten suponer afinidades similares en cuanto a regiones de unión, pero diferencias funcionales.

En coronavirus encontramos, además de la replicación del gRNA, la formación de mensajeros subgenómicos, denominada transcripción, que son traducidos para expresar proteínas virales. La replicación está regulada en *cis* por secuencias de las regiones no traducidas de los extremos 5' y 3', incluida la cola de poli-adenina (Spagnolo y Hogue, 2000), y proteínas virales como la proteína de la nucleocápsida (Almazán *et al.*, 2004) y celulares como la PABP (Spagnolo y Hogue, 2000), necesarias para la replicación efectiva del genoma. La transcripción de los sgRNAs está regulada en *cis* por la secuencia líder en el extremo 5' del genoma y las secuencias intergénicas de regulación de la transcripción situadas en la región 5' de distintos genes virales. Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el que tiene lugar la transcripción, se ha

propuesto que se produce mediante un proceso de síntesis discontinua y cambio de molde (Zúñiga *et al.*, 2004) que necesitaría la actuación en *trans* de proteínas virales y celulares como la PTBP1, que mediante su interacción con la nucleoproteína y la secuencia líder, ha sido descrita como un regulador positivo del proceso (Li *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2002).

En el coronavirus MHV se ha observado la interacción de la hnRNPA1 con la nucleocápsida y con la secuencia líder y las secuencias intergénicas de la hebra negativa (Wang y Zhang, 1999; Li *et al.*, 1997) pero se discute si juega realmente un papel esencial durante la infección viral (Shen y Masters, 2001). Ensayos de precipitación de RNAs sintéticos de los extremos 5' y 3' del genoma del TGEV han permitido identificar su interacción con varias proteínas celulares, y los estudios funcionales han señalado a las proteínas hnRNPA1, PABP y EPR como proteínas necesarias para la correcta replicación del virus (Galán *et al.*, 2009), en el caso de la hnRNPA1 posiblemente jugando un papel en la síntesis de RNA (Choi *et al.*, 2004).

Algunas de las proteínas celulares citadas presentan funciones circunstanciales en varias familias de virus RNA de polaridad positiva, así en el *virus Sindbis* de la familia *Togaviridae*, la hnRNPA1 interacciona con la región 5' del genoma y juega un papel importante en la regulación de la replicación y la traducción (Gui *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2009), mientras otras interacciones como la que tiene lugar entre la hnRNPK y proteínas no estructurales y sgRNA del *virus Sindbis* (Burnham *et al.*, 2007) han sido probadas *in vitro* pero no estudiadas funcionalmente.

Factores celulares en la encapsidación y liberación del virus

Una vez se han producido las proteínas y genomas virales, se producirá la encapsidación del genoma y el ensamblaje de la cápsida, dando lugar a nuevas partículas virales. Este proceso puede necesitar de la acción de chaperonas celulares para el correcto pliegue de las proteínas y ensamblaje de la cápsida (Tsou *et al.*, 2013) y estar regulado por interacciones entre proteínas estructurales del virus y proteínas celulares. De esta forma, la proteína hnRNPK podría tener un papel en el ensamblaje del virus Dengue mediante la

interacción con la proteína de la nucleocápsida (Chang *et al.*, 2001) y en la regulación de la encapsidación del gRNA en el HCV (Poenisch *et al.*, 2015), también de la familia *Flaviviridae*.

Finalmente tiene lugar la liberación de las partículas virales. En los virus que presentan envuelta lipídica, la salida se produce tras la unión de proteínas virales con la membrana plasmática o membranas internas (Klumperman *et al.*, 1994), mientras en virus sin envuelta puede producirse directamente por lisis celular. En el caso de los picornavirus la acción de la proteína viral 2B, que forma poros en las membranas plasmáticas e internas, permite la desregulación de los niveles de Ca^{2+} , favoreciendo la permeabilización de la membrana plasmática y la salida del virus (Van Kuppeveld *et al.*, 1997).

2.2 Interacciones virus-célula huésped en los calicivirus

La profundización en el estudio funcional de las interacciones virus-célula huésped en la familia *Caliciviridae* ha presentado dificultades experimentales por la escasez de virus con capacidad de multiplicarse en cultivos celulares, siendo el FCV y el MNV los más empleados. Gracias a estos modelos se han podido identificar varios posibles receptores en calicivirus, como la proteína JAM-1 en FCV (Makino *et al.*, 2006; Ossiboff y Parker, 2007), la anexina A2 en RaV (González-Reyes *et al.*, 2009) y residuos de ácido α -2,6-sialico en FCV y MNV (Taube *et al.*, 2009; Stuart y Brown, 2007).

El proceso donde más se ha estudiado la dependencia de factores celulares es la traducción. Al no presentar IRES ni *cap* en el extremo 5', ésta se produciría por un mecanismo dependiente de la VPg y su interacción con los factores celulares eIF4E, eIF3 y eIF4G (Chaudry *et al.*, 2006; Daughenbaugh *et al.*, 2003, 2006; Goodfellow *et al.*, 2005; Hosmillo *et al.*, 2014; Chung *et al.*, 2014) que reclutan los elementos necesarios para la formación del complejo de inicio de la traducción.

La expresión de las proteínas virales permite la formación de los complejos de replicación, estructuras membranosas formadas probablemente por la interacción de proteínas virales entre sí (Kaiser *et al.*, 2006) y con

estructuras membranosas celulares (Fernández-Vega *et al.*, 2004; Bailey *et al.*, 2010) y proteínas del huésped como la VAP-A (Ettayebi y Hardy, 2003).

La replicación y transcripción de los RNAs virales tiene lugar dentro de los complejos de replicación y es regulada mediante la interacción entre la proteína estructural VP1 y la polimerasa NS7 en *Norovirus* (Subba-Reddy *et al.*, 2012). La síntesis de las hebras de polaridad positiva se realiza utilizando la proteína viral VPg como cebador (Belliot *et al.*, 2008; Machín *et al.*, 2001; Rohayem *et al.*, 2006), con la probable interacción entre dicha proteína y la polimerasa viral (Kaiser *et al.*, 2006).

La armonización de estos procesos y de la transición entre traducción y replicación necesita de elementos reguladores. Los extremos 5' y 3' del genoma presentan secuencias complementarias que regulan *in cis* facilitando el acercamiento de los mismos, pero son necesarias proteínas celulares para estabilizar la interacción (Sandoval-Jaime y Gutiérrez-Escolano, 2009). Se ha observado que la circularización del genoma puede estar mediada por la interacción de las proteínas PCBP2 y hnRNPA1 y de éstas con los extremos 5' y 3' del genoma (López-Manrique *et al.*, 2013). El silenciamiento de estas proteínas afecta a la replicación viral seguramente por la disrupción del complejo ribonucleoproteico.

Otras interacciones con los extremos del genoma han sido estudiadas *in vitro* pero no funcionalmente como las proteínas PTBP, PCBP2, La y hnRNPL que interaccionan con el extremo 5' del *virus Norwalk* (Gutiérrez-Escolano *et al.*, 2000) y las proteínas La, PTBP y PABP con el extremo 3' del mismo virus (Gutiérrez-Escolano *et al.*, 2003). Si bien no han podido estudiarse por la falta de un modelo cultivable para el *virus Norwalk*, han servido como referencia para profundizar en el estudio de las interacciones utilizando otros modelos.



Figura 7: Representación del modelo de circularización del genoma del MNV propuesto por López-Manrique y colaboradores (2013), con la participación de las proteínas celulares PCBP2 y hnRNPA1.

El estudio funcional de la interacción con el extremo 5' del gRNA y del sgRNA de la PTBP en la replicación del FCV, ha permitido comprobar su importancia en la replicación viral y sugerir su rol como una chaperona de RNA que estabiliza los complejos ribonucleoproteicos (Karakasiolitis *et al.*, 2006) y cuya transición del núcleo al citoplasma durante la infección puede regular negativamente la traducción de los RNAs virales y favorecer la replicación y transcripción de los mismos (Karakasiolitis *et al.*, 2010).

Otras interacciones han sido observadas y se ha estudiado su papel relativo en la replicación viral a través del silenciamiento de los respectivos mRNAs celulares, pero aún se desconoce su función exacta. La nucleolina interacciona *in vitro* con regiones no traducidas del extremo 3' del NV y FCV además de con las proteínas NS6-NS7 recombinante del NV y NS6/7 del FCV. El silenciamiento de la nucleolina en células infectadas con FCV dio lugar a una reducción del título viral (Cancio-Lonches *et al.*, 2011) sugiriendo un papel importante en la replicación eficaz del FCV. El estudio de la precipitación de proteínas celulares con los extremos 5' y 3' del MNV ha permitido identificar varias proteínas celulares capaces de unirse a dichas regiones (Vashist *et al.*, 2012). El silenciamiento de la expresión de las proteínas La, DDX3 y PTBP permitió observar un descenso en la producción de virus que sugiere que estas proteínas juegan un papel en la correcta replicación del MNV (Vashist *et al.*, 2012).

Una vez se han producido las proteínas estructurales y gRNAs virales se produce el ensamblaje de la partícula viral y encapsidación del genoma. En estos procesos participan factores celulares como la chaperona HSP90, necesaria para la estabilización de la VP1 (Vashist *et al.*, 2015) y posiblemente otras chaperonas moleculares y proteínas de transporte intracelular. También se desconoce cómo ocurre la encapsidación del genoma, siendo las principales candidatas las proteínas virales VPg, unida covalentemente a los RNAs genómico y subgenómico, que es capaz de interactuar con la VP1 (Kaiser *et al.*, 2006), y VP2 por su interacción con el dominio interno de la VP1 (Vongpunsawad *et al.*, 2013) y por su carácter básico que le permitiría la unión a ácidos nucleicos.

Otras interacciones entre proteínas virales y elementos celulares descritas en calicivirus pueden jugar un papel relevante sobre el resultado final de la infección. La PABP puede ser procesada por la proteasa viral (Kuyumcu-Martínez *et al.*, 2004) lo que podría inhibir la traducción dependiente de *cap*. En el caso del MNV, se expresa VF1 que interfiere con los mecanismos de defensa innatos de la célula huésped (McFadden *et al.*, 2011). La desestructuración de las membranas que favorecería la liberación de las nuevas partículas virales en el FCV, podría estar causada por la interacción del péptido LC, procesado a partir de la ORF2, con la anexina 2 (Abente *et al.*, 2013), dando lugar al efecto citopático característico de este virus.

3. Vesivirus de conejo (RaV)

El virus con el que se ha realizado el presente trabajo es el **Vesivirus de conejo (RaV)**, aislado por el Prof. Alvin W. Smith (Facultad de medicina veterinaria, Oregon State University, Corvallis, USA) a partir de muestras extraídas de las heces de conejos que sufrían gastroenteritis. Posteriormente fue caracterizado en nuestro laboratorio donde se observaron características propias del género *Vesivirus* (Martin Alonso *et al.*, 2005) como la presencia de 3 ORFs, presentar la proteína bifuncional NS6/7 con actividad proteasa y RNA polimerasa dependiente de RNA y expresar la proteína mayoritaria de la cápsida como un precursor que es procesado dando lugar a los productos LC y VP1 (Martin Alonso *et al.*, 2005; González Molleda, 2008).

El RaV es capaz de infectar tanto células Vero (procedente de mono verde), como HeLa, HeLa S3 y HEK293T (líneas celulares humanas) causando un efecto citopático característico (González Molleda, 2008). Se ha descrito la interacción de la cápsida con la proteína anexina A2 (González-Reyes *et al.*, 2009) pero es probable que además de estructuras proteicas necesite la presencia de glúcidos para la entrada tras los estudios en cultivos tratados con lectinas (González Molleda, 2008). Ensayos en nuestro laboratorio dan indicios que sugieren un mecanismo de entrada por endocitosis mediada por clatrina y liberación del gRNA por acidificación de los endosomas (González Molleda, 2008). Durante la replicación del RaV se forman complejos de replicación en el citoplasma de las células infectadas, donde encontramos las proteínas y RNAs

virales (Casais *et al.*, 2008). Estos complejos de replicación deben incorporar los factores celulares necesarios para el correcto desarrollo de la infección.

Utilizando el RaV como modelo, se pretende identificar aquellas interacciones de factores celulares con proteínas y RNA virales que afectan funcionalmente a la eficiencia de multiplicación del RaV y que pueden arrojar nueva información sobre los procesos moleculares en calicivirus y servir como modelo para la búsqueda de dianas terapéuticas.

OBJETIVOS

Las interacciones entre elementos virales y celulares son claves en la regulación de los distintos procesos que tienen lugar durante la infección viral y su estudio puede ayudar a comprender mejor la biología molecular del proceso infeccioso, permitiendo diseñar estrategias terapéuticas. Dentro de la familia *Caliciviridae* se han caracterizado funcionalmente pocas interacciones debido a la falta de modelos reproducibles en cultivos celulares. Se pretende estudiar qué proteínas celulares pueden ser importantes para la regulación de los procesos moleculares en calicivirus y analizar el papel que desempeñan.

Para llevar a cabo estos estudios, se utilizará como modelo el *vesivirus de conejo* (RaV).

Teniendo esto en cuenta, los objetivos que se han planteado en el trabajo de investigación desarrollado en esta tesis doctoral son:

1. Identificación de proteínas celulares que interaccionan con los extremos 5' y 3' del genoma del RaV.

Para llevar a cabo este objetivo se pondrá a punto una cromatografía de afinidad a RNA, utilizando secuencias de los extremos 5' y 3' del genoma del RaV y extractos citoplasmáticos de líneas celulares permisivas y susceptibles a la infección por RaV. Las proteínas purificadas junto con los RNAs sintéticos se analizarán electroforéticamente e identificarán por espectrometría de masas.

2. Identificación de proteínas celulares que interaccionan con las proteínas NS5, NS6/7 y VP1 del RaV.

Se crearán líneas celulares estables que expresen de forma inducible las proteínas virales junto a una etiqueta peptídica fusionada en el extremo carboxilo que permitirá el rescate de los complejos mediante cromatografía en tándem por afinidad. Aquellas proteínas purificadas se analizarán electroforéticamente y se identificarán mediante espectrometría de masas.

3. Estudio funcional de las proteínas celulares identificadas.

Mediante silenciamiento génico, empleando siRNAs específicos, se suprimirá la expresión de las proteínas celulares identificadas y se analizará cómo afecta su inhibición a la producción de nuevas partículas virales con capacidad infectiva en cultivos celulares infectados con RaV.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1 Virus

El RaV, caracterizado en nuestro laboratorio (Martín-Alonso *et al.*, 2005), fue cedido por el Dr. Alvin W. Smith de la Oregon State University.

El RaV fue aislado a partir de las muestras obtenidas de cinco conejos de la especie *Oryctolagus cuniculus* que presentaban diarrea y posteriormente adaptado a cultivos de células Vero. Los stocks de RaV empleados en este trabajo se obtuvieron a partir de sobrenadantes recogidos tras la infección de monocapas confluentes de células Vero con RaV. Dichos sobrenadantes se titularon y fueron almacenados a -80°C.

1.2 Bacterias

Para la clonación y producción de preparaciones de plásmidos recombinantes se empleó la cepa de *Escherichiacoli* XL1-Blue {*endA1*, *hsdR17* (*rk⁻*,*mk⁺*), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, [F' *proAB*, *lac^PZΔM15*, Tn10 (*tet^r*)]}, previamente tratadas según el método propuesto por Inoue *et al.*, 1990, para la preparación de células competentes. Las bacterias XL1-Blue competentes se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

1.3 Líneas celulares

Las células HeLa S3 (células epiteliales derivadas de un adenocarcinoma de útero humano, producido por HPV-18) y las células HEK 293T (células de riñón de embrión humano transformadas con el Adenovirus HAd-5 y el gen que expresa el antígeno T del SV-40) fueron cedidas por el laboratorio del Dr. Ortín (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid).

Las células Vero (células de riñón del mono verde africano) fueron adquiridas del European Collection of Cell Cultures (ECACC).

Las células Flp-InTm T-RexTm-293 derivadas de la línea HEK 293T y que contiene dos plásmidos integrados, pFRT/*lacZeo* y pcDNA6/TR, (Figura 8)

fueron cedidas por el Dr. Thierry Fischer (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid).

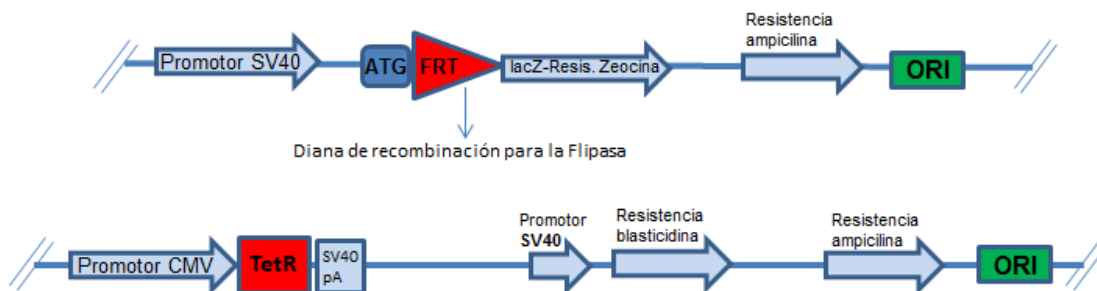


Figura 8: Esquema de las regiones integradas en la línea celular Flp-In™ T-Rex™-293. (Arriba) Pert/lacZeo que expresa el gen de fusión lacZ y de resistencia a la zeocina, susceptible de ser interrumpida por la recombinación en la región FRT. (Abajo) plásmido pcDNA6/TR que expresa el gen TetR y el gen de resistencia a blasticidina.

La línea celular derivada de las células Flp-In™ T-Rex™-293 y modificada para expresar de forma inducible la proteína recombinante C-TAP, fue cedida por el laboratorio de la Dra. Amelia Nieto del Centro Nacional de Biotecnología.

1.4 Medios de Cultivo

Las bacterias *E. coli* fueron cultivadas en medio LB modificado según lo descrito en Sambrook y col. (1989). La preparación de medios de cultivo sólidos para el crecimiento y selección de bacterias transformadas se realizó empleando una concentración de agar de 15g/L en medio LB y se añadió ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml para la selección de aquellos clones que hubieran incorporado plásmidos.

Las líneas de células eucariotas HeLa S3, HEK 293T y Vero fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SBF) al 10%, glutamina 4mM y gentamicina 50 µg/ml. El medio DMEM, la gentamicina y la glutamina fueron suministrados por la casa comercial Invitrogen y el SBF fue encargado a Biochrom AG. En el caso de la línea HEK 293T se aportaron, además, aminoácidos no esenciales (Invitrogen) al 1%.

Cuando se realizan las infecciones con el RaV, se emplea como medio de cultivo DMEM no suplementado con SBF y en ausencia de antibiótico.

Para la línea celular Flp-In[™] T-Rex[™]-293 el medio de cultivo empleado fue DMEM suplementado con SBF al 10%, glutamina 4mM, aminoácidos no esenciales, 100 µg/ml de zeocina y 15 µg/ml de blasticidina (Invitrogen). Una vez se ha realizado la transfección de los plásmidos recombinantes, se emplea un medio con 100 µg/ml de higromicina (Invitrogen) en ausencia de zeocina. Para inducir la expresión de las proteínas recombinantes, se añade al medio las líneas establecidas que expresan las proteínas recombinantes 1 µg/ml de tetraciclina o doxiciclina (Invitrogen).

Las transfecciones de DNA plasmídico y siRNAs en células HeLa S3 o HEK 293T, se realizaron empleando como medio de cultivo el medio modificado y reducido en suero OPTI-MEM (Invitrogen).

Los cultivos de las distintas líneas celulares eucariotas se realizaron en frascos de plástico de 25 (T-25), 75 (T-75) y 150 (T-150) cm² de superficie y placas de 6, 24 o 96 pocillos (Becton Dickinson), ocupando cada pocillo una superficie de 9,6; 2 y 0,38 cm² respectivamente.

1.5 Vectores plasmídicos

Los moldes de transcripción para sintetizar los RNAs *in vitro* fueron obtenidos mediante PCR a partir del plásmido pFRaVeA (García Manso, 2014), que contiene el cDNA completo del genoma del RaV.

Para la construcción de líneas celulares establecidas que expresen proteínas recombinantes de forma inducible, la región codificadora de la etiqueta peptídica C-TAP se extrajo del plásmido pZome-1-C (CellZome) (Figura 9A) derivado de la técnica descrita por Rigaut *et al.*, (1999), y se insertó entre los sitios de restricción BamHI y XhoI de la región de clonación del plásmido pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen) (Figura 9B).

Las regiones codificadoras de las distintas las proteínas virales (NS5, NS6/7 y VP1) se amplificaron por PCR y se ligaron en un plásmido pGEM-T (Promega). Tras la digestión con enzimas de restricción compatibles de los productos virales y la construcción pcDNA5/FRT/TO-C-TAP, se ligaron los genes por su extremo 3' a la secuencia de la etiqueta peptídica C-TAP y por su

extremo 5' al promotor, de manera que al expresarse la proteína de fusión el extremo amino correspondiera al de las proteínas virales.

El plásmido pOG-44 (Invitrogen) que expresa la recombinasa FIp (flipasa), se cotransfectó con las construcciones anteriores para la inserción estable de los plásmidos en la región FRT de la línea celular FIp-InTm T-RexTm-293.

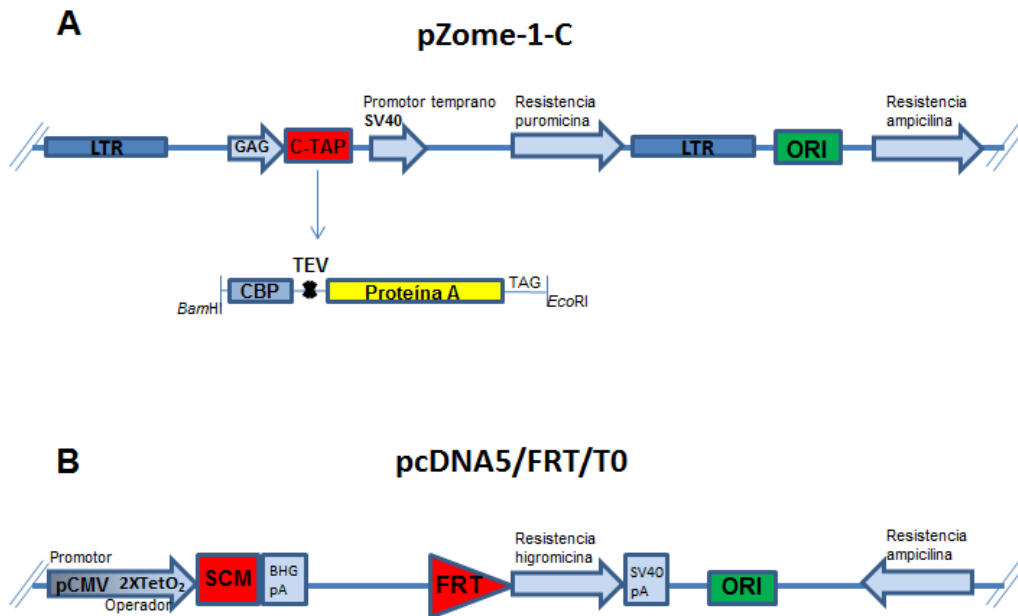


Figura 9: Esquema del plásmido pZOME-1-C (A) con la región codificadora de la etiqueta C-TAP. (B) Plásmido pcDNA5/FRT/TO, (FRT) el lugar de inserción en el genoma, (SCM) sitio de clonación múltiple.

1.6 Enzimas

La DNA polimerasa empleada para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue la LA TaqTM adquirida a la casa comercial TAKARA. Las diferentes endonucleasas de restricción fueron suministradas por Fermentas o TAKARA, y la ribonucleasa A (RNasa A), así como la DNA ligasa del fago T4, se encargaron a Roche.

La RNA polimerasa del fago T7 y la DNasa empleadas en la transcripción *in vitro* de RNAs sintéticos formaban parte del kit RiboMAXTM de Promega.

En la síntesis de cDNAs a partir de RNAs, se utilizó la transcriptasa reversa del High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

Para procesar las proteínas recombinantes durante la realización de la purificación en tándem, se utilizó la proteasa del virus TEV (Tobacco Etch Virus) de Invitrogen. Para el subcultivo y tratamiento de las distintas líneas celulares empleadas en este trabajo se empleó tripsina/EDTA suministrada por Biochrom AG.

1.7 Anticuerpos

En este trabajo se han empleado varios sueros de conejo generados en nuestro laboratorio frente a las proteínas NS5, NS6/7 y VP1 recombinantes (Casais *et al.*, 2008) y suero de cobaya anti-RaV.

Para la detección de la proteína hnRNPK, se han empleado anticuerpos policlonales de conejo (Abcam) (Van Domselaar *et al.*, 2013).

El suero de conejo empleado frente a la proteína PABP, fue cedido por el laboratorio de la Dra. Amelia Nieto del Centro Nacional de Biotecnología (Burgui *et al.*, 2003).

Los anticuerpos frente a las proteínas PTBP1, hnRNPU, hnRNPQ, hnRNPA1 y hnRNPA2/B1 (Galán *et al.*, 2009), fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Luis Enjuanes del Centro Nacional de Biotecnología.

Como controles de carga se han utilizado la α -tubulina y la β -actina. Para la detección de α -tubulina se usa un anticuerpo monoclonal procedente de ratón (Calbiochem) y para la de β -actina un anticuerpo monoclonal, también de ratón, de la casa comercial Sigma-Aldrich.

Las inmunoglobulinas G de cabra, anti-IgG de conejo, conjugadas con isotiocianato de fluoresceína utilizadas en inmunofluorescencia, se obtuvieron de Sigma-Aldrich. También se usaron como anticuerpos secundarios en esta misma técnica anticuerpos policlonales de pollo anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 555 (Invitrogen) y anti-IgG de cobaya conjugado con Alexa Fluor 488 (Cedidos, respectivamente, por los laboratorios de la Dr. Pilar

Fernández y el Dr. Carlos López Otín de la Universidad de Oviedo) emitiendo fluorescencia en rojo y verde respectivamente.

Para la detección de proteínas por fluorescencia en ensayos *Western-blot* empleando el dispositivo Odyssey (Li-Cor), se emplearon sueros de cabra policlonales conjugados con IRDye 680 (fluorescencia roja) o IRDye 800CW (fluorescencia verde) como anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo y anti-IgG de ratón suministrados por la misma compañía.

1.8 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos de DNA utilizados para la clonación de genes virales y amplificación de los moldes de transcripción fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Tab.M.1).

Para sintetizar cDNA a partir del RNA extraído mediante RT-PCR se utilizaron como cebadores hexámeros aleatorios suministrados dentro del High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

En la cuantificación de los niveles de expresión del gen de la PABP mediante Q-PCR, se utilizaron las sondas Taqman específicas catalogadas como Hs00743792_s1 suministradas por Applied Biosystems.

Para suprimir la expresión de genes celulares se emplearon distintos siRNAs que fueron adquiridos de Ambion. Como control negativo se empleó un siRNA irrelevante y validado por la casa comercial, que no produce el silenciamiento inespecífico de genes celulares y de referencia #4390843 (Lo denominaremos **Neg**). Para el silenciamiento de la PABP se utilizaron los siRNAs s25665 y s25664 (denominados **PA-1** y **PA-2**, respectivamente, en este trabajo). Los siRNAs que tuvieron como diana la expresión del gen hnRNPK fueron s6737 y s6738 (denominados **#A** y **#B**, respectivamente, en este trabajo).

Nombre	Secuencia (5'-3')	Long.	Pol.	Uso
RaV1	ttttttttttttcctaataatgcaacctacc	31	-	T
T7RaV14	ctcgag <u>taatac</u> gactcactata gtaaatagagaattgagctatggc	47	+	T
RaV16	gacaatcgctttgcaagggcg	21	-	T
RaV18	attcgggttcgttccgggtg	21	-	T
T7RaVsg	ctcgag <u>taatac</u> gactcactata gtgttgagaattagccactatggc	48	+	T
TAP-5'NS6/7	aagcttgctatgggagtcattgatggtgttg	31	+	C
TAP-3'NS6/7	agatctattctcaaacacctcaccac	26	-	C
TAP-5'VP1	ggtaccatggatgggtcccagtaacccc	27	+	C
TAP-3'VP1	agatctactgtgttctgtcaataa	26	-	C
TAP-5'-NS5	ggtaccatggccaagggcaagaataagaac	30	+	C
TAP-3'NS5	ggtaccctcagagtaccagtcac	24	-	C

Tabla 2: Oligonucleótidos empleados para la obtención de transcritos sintéticos (T) o en la clonación (C) de regiones codificadoras de proteínas del RaV. Se indica la denominación y secuencia de los cebadores así como su longitud (Long.) y polaridad (Pol.). El texto subrayado corresponde a la secuencia del promotor de la RNA polimerasa del fago T7.

1.9 Programas informáticos

En la realización de este trabajo se han empleado diferentes programas informáticos para visualizar y analizar los resultados experimentales. Así, tras la detección de proteínas empleando el sistema de imagen para infrarrojos Odyssey, fue necesaria la utilización de la versión 3.0 del software de la aplicación, provisto por Li-Cor, para la visualización, análisis y cuantificación de la señal.

Para la lectura de resultados de la secuenciación de los diferentes DNAs se empleó el programa Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium).

Los datos obtenidos en la realización de la Q-PCR, se obtuvieron y analizaron utilizando el software ABI PRISM 7000 SDS versión 1.0.

1.10 Otros reactivos

Los reactivos utilizados para la transfección de DNA plasmídico (lipofectamina 2000™) y siRNAs (lipofectamina RNA iMAX™) fueron adquiridos a Invitrogen. Para el marcaje del RNA sintético con biotina, se utilizó 14-CTP-Biotina, también de Invitrogen.

Para el análisis electroforético de macromoléculas se emplearon agarosa y acrilamida. La agarosa tipo II empleada para el análisis de DNA y RNA fue suministrada por Sigma-Aldrich. Para el análisis de proteínas se utilizó acrilamida y bis-acrilamida de Serva para la preparación de disoluciones y disoluciones comerciales de acrilamida/bis-acrilamida (19:1) al 30% de Bio-Rad.

Como marcadores de tamaño molecular para el análisis de ácidos nucleicos se emplearon los marcadores lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* de Promega y 100 bp DNA *ladder* de Invitrogen para DNA y los marcadores de Roche RNA *marker* II para analizar RNA. Para el análisis comparativo de la masa molecular de proteínas se emplearon diferentes marcadores suministrados por GE Healthcare, Bio-Rad, Fermentas y Promega (estos tres últimos, preteñidos) cuyos masas moleculares relativas se indicarán en las figuras correspondientes.

Para el análisis de proteínas y RNAs biotinilados mediante ensayos *Western* y *North-western*, respectivamente, se emplearon membranas de nitrocelulosa suministradas por Millipore. Para la detección de proteínas en geles SDS-PAGE, se utilizó la tinción SYPRO[™] Ruby de Invitrogen. Cuando el revelado de los ensayos *Western-blot* se hizo utilizando proteína A conjugada con peroxidasa, se utilizó el kit Pierce[™] ECL Western-blotting substrate (Thermoscientific).

Para la preparación de extractos citoplasmáticos se utilizaron los inhibidores de proteasas suministrados por Roche y se prepararon siguiendo las indicaciones del proveedor. La polilisina empleada en el tratamiento de las superficies de cultivo fue adquirida a Sigma.

Las resinas de Estreptavidina-Sefarosa e IgG-Sefarosa, empleadas en cromatografías de afinidad, han sido compradas a la casa comercial GE Healthcare. La resina de afinidad al péptido de unión a calmodulina (CBP) fue suministrada por Stratagene.

2. Métodos

2.1 Técnicas generales en biología molecular

Las reacciones de manipulación y generación de DNAs recombinantes se realizaron mediante digestión con endonucleasas de restricción y ligación siguiendo las indicaciones de las casas comerciales.

La transformación de bacterias competentes con plásmidos recombinantes se hizo mediante choque térmico según el método descrito por Hanahan en 1985. Las bacterias transformadas se incubaron durante 16 horas a 37°C en medio LB y posteriormente se cultivaron en medios sólidos conteniendo 100 µg/ml de ampicilina.

Los plásmidos recombinantes se purificaron a partir de células *E. coli* transformadas mediante lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) o empleando el sistema WizardTM Plus SV Minipreps de Promega según las indicaciones del fabricante. Los plásmidos purificados se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

La purificación de RNA sintetizado mediante transcripción *in vitro*, se realizó empleando fenol y cloroformo según la técnica descrita por Sambrook y col. (1989). Cuando se extrajo el RNA de cultivos celulares o se requirió de una muestra de mayor pureza, se empleó el kit RNeasy de QIAGEN, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

2.2 PCR

En la amplificación de DNA complementario a secuencias del RaV, se utilizaron los reactivos y la DNA-polimerasa del sistema LA TaqTM de TAKARA y se siguieron las recomendaciones del fabricante. Se decidieron las condiciones de temperatura, tiempo y repeticiones de cada ciclo en función de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos (T_m) y de la longitud del fragmento a amplificar (Tabla 3). En todos los casos se utilizó el termociclador Robocycler (Stratagene).

Oligonucleótidos	(1 ciclo)	(25 ciclo)	(1 ciclo)
T7RaV14	94°C:5'	94°C:30''/55°C:45''/72°C:45''	94°C:30''/55°C:45''/ 72°C:20'
RaV18			
T7RaV14	94°C:5'	94°C:30''/60°C:45''/72°C:2'	94°C:30''/60°C:45''/ 72°C:20'
RaV16			
T7RaVsg	94°C:5'	94°C:30''/58°C:45''/72°C:3'	94°C:30''/58°C:45''/ 72°C:20'
RaV1			

Tabla 3: Condiciones de amplificación mediante PCR empleadas para los distintos fragmentos amplificados.

2.3 Transcripción *in vitro*

La transcripción de RNA, a partir de moldes de DNA (5 µg) amplificados mediante PCR a partir del plásmido pFRaVeA e incluyendo en los cebadores (Tabla 2) la secuencia del promotor para la RNA polimerasa-DNA dependiente del fago T7, se llevo a cabo empleando los reactivos del sistema RiboMAX™ Large Scale (Promega), siguiendo las indicaciones de la casa comercial y utilizando los NTPs y reactivos suministrados en el kit.

Para el marcaje del RNA producto en la transcripción se utilizó Biotina-14-CTP 5mM (Invitrogen) para obtener una relación 1:5 respecto al CTP no marcado. La síntesis de RNA tuvo lugar durante 3 horas a 37°C, tras lo cual se añade DNasa y se purifican los RNAs transcritos antes de ser almacenados a -20°C.

2.4 Electroforesis en geles de agarosa

El tamaño molecular de los distintos fragmentos de DNA se analizó electroforéticamente en geles de agarosa. Estos geles se prepararon, tal y como se describe en Sambrook *et al.*, (1989), en disoluciones en tampón TAE (Tris-acetato 0,04 M y EDTA 0,002 M), con una concentración de agarosa de entre 0,7 y 1% y 0,5 µg/ml de bromuro de etidio para la detección del DNA cuando es iluminado con luz ultravioleta.

El análisis electroforético de los tamaños moleculares de los RNAs utilizados en este estudio, se hizo en geles de agarosa-formaldehído en tampón

MOPS (MOPS 0,2 M; acetato de sodio 50 mM y EDTA 10 mM) con una concentración de 1,2% de agarosa y 6,3% de formaldehído. El RNA analizado se preparó en tampón de muestra conteniendo 50% de formamida, 6,1% de formaldehído, 10% de glicerol y 0,5% de azul de bromofenol en tampón MOPS y calentado durante 15 minutos a 65°C. Las muestras se cargaron añadiendo bromuro de etidio al 0,05% y se observaron los fragmentos de RNA por fluorescencia tras iluminación con luz ultravioleta.

2.5 Cuantificación de moléculas

Las muestras de DNA y RNA purificadas se cuantificaron espectrofotométricamente a 260nm de longitud de onda empleando el BioPhotometer de Eppendorf. Las cuantificaciones de RNA que requirieron de una mayor precisión se llevaron a cabo empleando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies).

La cuantificación de proteínas en una disolución se llevó a cabo según el método Bradford (1976) empleando un patrón de concentraciones conocidas de BSA.

2.6 Análisis de la expresión de genes celulares mediante RT-Q-PCR

Para analizar cuantitativamente los niveles de expresión de la PABP en cultivos celulares tratados con siRNAs, se parte del RNA total extraído de cultivos celulares silenciados y control empleando el kit RNeasy de QIAGEN. El RNA purificado se cuantificó empleando un espectrofotómetro NanoDrop y se igualaron las concentraciones de RNA total en todas las muestras.

El cDNA total se sintetizó empleando 100ng de RNA total, utilizando como cebadores hexámeros aleatorios y la transcriptasa reversa del High Capacity cDNA Transcription Kit (Applied Biosystems) según las indicaciones del fabricante.

La cuantificación de la expresión de la PABP se hizo empleando las sondas TaqMan específicas descritas en el apartado 1.8 de materiales. Los datos de la reacción se obtuvieron en un ABI PRISM7000 sequence detection

system (Applied Biosystems) y analizados con el programa ABI PRISM 7000 SDS 1.0. En la representación de los datos aparecen los porcentajes de expresión respecto a los valores medios obtenidos de la cuantificación de la expresión del gen PABP en cultivos celulares tratados con el siRNA irrelevante.

2.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida

El análisis de la masa molecular relativa de proteínas se realizó mediante separación electroforética en geles SDS-PAGE según lo descrito por Laemli en 1970, con un gel de empaquetamiento al 3,5% de acrilamida y un gel de separación de concentraciones variables de acrilamida (Entre 8 y 15%).

La preparación de las proteínas para el análisis se hizo en un tampón de muestra compuesto por Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS al 2%, EDTA 2mM, glicerol al 8,75%, β -mercaptoetanol al 0,625% y azul de bromofenol al 0,005%. Se calentaron las muestras durante 5 minutos a 100°C antes de cargar en el gel para favorecer la desnaturalización de las proteínas y la separación electroforética se realizó en un aparato mini-protean II de BioRad durante 1 h a 150 V.

Cuando se necesitó una mayor resolución en el análisis de proteínas se emplearon geles comerciales en gradiente Tris-HCl 8-16% (BioRad) y NuPAGE 4-12% (Invitrogen) utilizando el tampón NuPAGE MOPS-SDS Running Buffer de la misma casa comercial. También se utilizaron soportes realizados en nuestro laboratorio que permitían una mayor longitud y capacidad de los geles SDS-PAGE, aumentando la cantidad de proteína cargada y distancia entre bandas.

Tras la electroforesis las proteínas se visualizaron inicialmente por tinción con azul de Coomassie. Cuando se hizo necesaria una mayor sensibilidad de los métodos de tinción, se emplearon también tinciones de plata compatible con espectrometría de masas y tinción fluorescente con SYPRO Ruby de Invitrogen, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. La observación y obtención de imágenes de geles SDS-PAGE teñidos con SYPRO se hizo empleando un scanner TYPHOON.

2.8 Western-blot

Para la detección de proteínas empleando anticuerpos específicos mediante ensayo *Western-blot*, las muestras fueron previamente separadas mediante electroforesis SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa según describe Burnette (1981). La transferencia se realizó en semi-seco durante 45 minutos a 100 mA en el aparato comercializado por BioRad y utilizando un tampón compuesto por Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 192 mM y metanol al 20%.

La transferencia se comprobó mediante tinción con la disolución rojo Ponceau (0,01% Ponceau S y 0,1% ácido acético) y fue lavada con agua destilada para eliminar el colorante. A continuación se bloquea la membrana con la disolución de bloqueo (5% de leche en polvo en PBS con Polioxietileno-sorbitanmonolaurato (Tween 20) al 0,1% o 5% de leche en polvo en PBS cuando la membrana se va a analizar con Odyssey) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, se lavó tres veces la membrana con un volumen abundante de disolución de lavado (PBS con Tween 20 al 0,1%).

La incubación del anticuerpo o suero correspondiente en disolución de bloqueo se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente salvo que se indique lo contrario. Las diluciones empleadas para cada anticuerpo o suero fueron las indicadas en la Tabla 4.

Anticuerpo	Dilución
Suero de conejo anti-PABP	1/200
Suero de conejo anti-NS6/7	1/200
Suero de conejo anti-NS5	1/200
Suero de conejo anti-VP1	1/400
Suero de conejo anti-hnRNPK	1/500
Anticuerpo monoclonal de ratón anti- α -tubulina	1/1000
Anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -actina	1/10000

Tabla 4: Anticuerpos utilizados en este trabajo en ensayos Western-blot y diluciones en que se emplearon.

Tras la incubación con el anticuerpo primario se lava con PBS y se incuba la membrana 45 minutos a temperatura ambiente con proteína A

conjugada con peroxidasa (1:2000) o durante 45 minutos en oscuridad a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios suministrados (a una dilución 1:10000) por Li-Cor.

Cuando la membrana fue incubada con proteína A conjugada con peroxidasa se reveló por quimioluminiscencia utilizando los reactivos suministrados con el kit Pierce[™] ECL Western-blotting substrate (Thermoscientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los anticuerpos anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo de Li-Cor que emiten fluorescencia infrarroja, permitieron la detección de proteínas utilizando el dispositivo Odyssey, cuyo software nos permite, además, cuantificar la intensidad total de las bandas seleccionadas, lo que se utiliza como indicador de la cantidad de señal para comparar la cantidad relativa de proteína en las distintas muestras. La cuantificación se hizo utilizando un control de carga (α -tubulina) como factor corrector que nos permite comparar las diferencias de intensidad en relación a la de una proteína que se expresa de forma constitutiva y homogénea.

2.9 Análisis North-western y dot-blot

Los RNAs biotinilados resultado de transcripción *in vitro*, se separan electroforéticamente y son transferidos a una membrana de nitrocelulosa por capilaridad según el método descrito en Sambrook *et al.*, (1989). De esta forma, el gel de agarosa-formaldehído se incuba en tampón SSC (NaCl 0,15 M y citrato sódico 0,015 M) concentrado 2 veces y la membrana en tampón SSC 10X. Se pone el gen en contacto con la membrana y se deja durante 16 horas a temperatura ambiente la transferencia.

Una vez se ha transferido el RNA a la membrana, es fijado utilizando el UV Stratalinker 1800 de Stratagene. Para el ensayo *dot-blot* se colocaron distintos volúmenes del resultado de la transcripción en el filtro y se fijaron y revelaron de igual modo.

Una vez fijado el RNA al filtro, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con 5% de leche en polvo en PBS –Tween 0,1%. A continuación se añadió el conjugado estreptavidina-peroxidasa 1:1000 en solución de bloqueo.

Se lava abundantemente la membrana con solución de lavado (PBS con Tween 20 al 0,1%) y, posteriormente, con PBS.

El revelado se realizó en algunos casos con tampón PBS conteniendo 4-cloro-1-naftol al 0,5%, metanol al 15% y H₂O₂ al 0,015%. En otros casos se utilizó para el revelado el kit de detección por quimioluminiscencia mencionado en el apartado 1.10 de materiales.

2.10 Técnicas generales de cultivo de células eucariotas

En el cultivo de las líneas celulares eucariotas descritas en el apartado 1.3, se utilizaron técnicas comunes para el subcultivo, propagación y almacenamiento de las mismas. Los medios de cultivo y superficies empleadas se describen en el apartado 1.4 de materiales. En los cultivos de células HEK 293T y derivadas, fue necesario tratar las superficies de cultivo con polilisina cuando se iban a realizar manipulaciones que requerían varios lavados y cambios de medio. Para ello, se cubrieron las superficies con un volumen adecuado en cada caso de polilisina 100µg/ml en PBS. Se dejó incubar la disolución durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el medio con polilisina y se dejó secar en condiciones de esterilidad.

Las células cultivadas se incuban a 37°C y con una concentración de CO₂ del 5%. En estas condiciones proliferan hasta alcanzar la confluencia, siendo necesario subdividir el cultivo para permitir la propagación en una nueva superficie. Este proceso se realiza retirando el medio de cultivo, lavando con el mismo volumen de PBS y disgregando la monocapa con tripsina/EDTA a un volumen y concentración que varían en función de la superficie y de la línea celular. Tras este proceso, se añade un volumen de medio DMEM suplementado con SBF al 10%, que inactiva la acción de la tripsina, y se siembra una fracción del total de células en una nueva superficie.

Cuando fue necesario conocer el número de células que se iban a sembrar o el número de células presentes en una superficie, se realiza un conteo de una dilución de la suspensión de células disgregadas en un hemocitómetro o cámara de Neubauer.

Para almacenar las líneas celulares, una vez disgregada la monocapa e inactivada la tripsina con DMEM y SBF al 10%, se centrifuga la suspensión durante 5 minutos a 250g, se elimina el sobrenadante y se recogen las células sedimentadas en alícuotas conteniendo medio DMEM con SBF al 20% y un 10% de DMSO (Invitrogen). Se enfrían gradualmente en isopropanol a -80°C y a las 12 horas se almacenan a -150°C. Para descongelar las alícuotas, se someten los recipientes a 37°C hasta observar descongelación, se elimina el sobrenadante con DMSO por centrifugación durante 5 minutos a 300g y se resuspenden y siembran las células en DMEM con SBF al 10%.

2.11 Obtención de extractos citoplasmáticos de células HeLa S3

Los extractos citoplasmáticos se prepararon a partir de monocapas confluentes de HeLa S3. Se retiró el medio y se lavaron con 10 ml de PBS, a continuación se almacenaron a -80°C. Posteriormente se descongelaron y se levantaron las células con una espátula en 1ml de tampón de extracción (10mM HEPES pH 7,9, 10mM KCl, 0,1mM EDTA, 1mM DTT e inhibidores de proteasas (Roche) siguiendo las instrucciones de la casa para 75 cm² de monocapa (6x10⁶ células). Se incubaron las células durante 15 min a 4°C en dicho medio hipotónico, y se favoreció la lisis mediante aspiración y expulsión utilizando una jeringuilla de insulina. Las células no lisadas, los núcleos y los restos de membranas se eliminaron mediante centrifugación a 5000 x g durante 15 min a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes, se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford (1976) y, cuando no se utilizaron en fresco, se almacenaron a -80°C en presencia de glicerol al 10%.

2.12 Cromatografía de afinidad de RNA

El estudio de las proteínas que interaccionan con el RNA se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad de RNA biotinilado y su incubación con extractos citoplasmáticos. Las incubaciones se realizaron en tubos de centrifuga. La resina de estreptavidina-sefarosa (GE Healthcare) se sedimentó en todos los casos por centrifugación a 500 x g durante 2 min.

En primer lugar se inmovilizó el RNA biotinilado a 50µl de resina a 37°C durante 1h 30min, en presencia de tampón de alta concentración en sal (5mM HEPES pH 7,9, 0,5mM EDTA, 1M KCl), tras lo cual se lavó tres veces, para eliminar el exceso de sal. Los pasos de lavado se realizaron en todos los casos durante 15 min a 4°C con un 1 ml del tampón de unión y lavado (50 mM HEPES pH 7,9, 150 mM KCl, 5% glicerol y 0,01% NP-40).

A continuación la resina se incubó durante la noche a 4°C en una noria con 100µl de extracto previamente tratado con incubaciones sucesivas con resinas de estreptavidina libre de RNA y 100µl de tampón de unión y lavado por cada 25µl de resina. Posteriormente se recuperó la resina por centrifugación, se lavó tres veces con 1ml del tampón de unión y lavado, y las proteínas unidas al RNA se disociaron en tampón de muestra 1X (Apartado 2.7) a 90°C durante 5min. Se recupera el sobrenadante y se almacena a -80°C hasta su análisis.

2.13 Transfección de DNA en Flp-Intm T-Rextm-293

Se utilizaron placas de 6 pocillos y recubiertas con células Flp-Intm T-Rextm-293 a una confluencia aproximada del 100%. Como reactivo se utilizó Lipofectaminetm 2000 (Invitrogen) y como medio de cultivo OPTI-MEM (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para generar líneas modificadas estables, se llevó a cabo la cotransfección de los plásmidos recombinantes derivados del pcDNA5/FRT/TO, incluyendo las regiones codificadoras de las distintas proteínas virales, junto con el vector pOG44, usando de este último 2,7µg/0,3µg de pcDNA5/FRT/TO, y siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Tras la cotransfección cultivamos las células sin Zeocina, para evitar la pérdida de células que incorporaran el plásmido recombinante, que ahora son sensibles a este antibiótico, y en medio de selección con higromicina (Invitrogen). Se cultivaron a diferentes diluciones y cuando se observaron colonias aisladas se subcultivaron en nuevas superficies de cultivo.

2.14 Obtención de extractos citoplasmáticos de Flp-Intm T-Rextm-293 modificadas

Para ello se retira el medio de cultivo y se trata la monocapa con tripsina. Una vez dissociada la monocapa se bloquea la reacción con medio suplementado con 10% SBF y se centrifuga a 300 x g a 4°C durante 5 min. El sedimento celular se lava con dos veces su volumen en PBS. Tras una nueva centrifugación, el sedimento se resuspende en 5 volúmenes del Buffer A (10mM HEPES pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,5 mM EDTA e inhibidor de proteasas). Después de incubar 15 minutos en hielo, se homogenizan las células con una jeringuilla de insulina y el extracto se centrifuga a 700 x g a 4°C, durante 20 min. Recogemos el sobrenadante, que será la fracción citoplasmática.

2.15 Localización de proteínas en cultivos celulares por inmunofluorescencia

Se realizó el ensayo en portaobjetos de 8 compartimentos, previamente recubiertos con polilisina, donde se sembraron las células a analizar y se indujeron cuando se analizaba la expresión de proteínas recombinantes. Tras el tiempo de inducción, se retira el medio.

Se fijan las células con PBS-paraformaldehído 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente y luego se lavan con PBS. A continuación, se permeabilizan las células en PBS-Tritón 0,1% 15 min a temperatura ambiente, y se lavan con PBS. Seguidamente se bloquean y rehidratan con PBS-BSA 1%, durante 60 min a temperatura ambiente y se incuban 1 h con 100µl de anticuerpo primario diluido 1:100 en PBS-BSA 1%. Seguidamente se lavan 3 veces con PBS y se incuban con el conjugado, en este caso anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con FICT, durante 45 min a temperatura ambiente, diluido 1:100 en PBS-BSA 1%. A continuación se lavan 3 veces durante 5 minutos en PBS-BSA 1% y se dejan secar.

Cuando el ensayo se realizó para estudiar la localización de proteínas celulares y virales durante la infección, se parte de cultivos celulares de HeLa S3 y se infectan con el RaV a una m.o.i. conocida aquellos cultivos que no vayamos a utilizar como control sin infección. Posteriormente se retira el medio y se lavan con PBS los cultivos no infectados y los infectados a las 4 y 8 horas

post-infección para proceder a su fijación. En la primera incubación con anticuerpos, se incuba durante 1h con 100µl conteniendo simultáneamente los anticuerpos primarios contra la proteína correspondiente y de cobaya anti-RaV diluidos 1:100 en PBS-BSA 1%. Tras 3 lavados con PBS se incuban con los conjugados de manera independiente y sucesiva. En primer lugar se incuba con anticuerpo anti-IgG de cobaya conjugado con Alexa Fluor 488, durante 45 min a temperatura ambiente, diluido 1:100 en PBS-BSA 1%. A continuación se lava con PBS e se incuba con anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 555 durante el mismo tiempo y diluido 1:100 en PBS-BSA 1%.

En todos los casos, las muestras se montaron y se dejaron secar 24h en oscuridad, tras lo cual se pueden almacenar a 4°C hasta su análisis. Las imágenes se visualizaron en un microscopio automatizado Olympus-BX61.

2.16 Purificación en tándem por afinidad de las proteínas recombinantes

Las líneas celulares establecidas cultivadas en superficies de 175 cm² se inducen con tetraciclina o doxiciclina a una concentración de 1µg/ml para conseguir la expresión las proteínas recombinantes VP1-C-TAP y NS5-C-TAP. A las 48 horas post-inducción se recoge el medio de cultivo y se lava con PBS. Se recoge la monocapa en 750 µl de buffer de lisis (5mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,5% NP-40, 1mM DTT e inhibidores de proteasas (Roche)) y se incuba 30 minutos en hielo. Una vez lisadas, se centrifuga el extracto a 500 x g durante 3 minutos a 4°C para eliminar los núcleos. Se recoge el sobrenadante y se centrifuga a 5000 x g durante 10 minutos a 4°C para eliminar restos de membranas. Se recogen 750µl del extracto obtenido se incuba con 50µl de resina IgG-Sefarosa equilibrada y resuspendida en 750µl del buffer IPP150 (Tris-HCl pH 7,8, 150 mM NaCl y NP-40 al 0,5%) durante 14 horas a 4°C.

Tras la incubación, se recoge la resina por sedimentación que se hará, en todos los casos, a 500 x g durante 2 minutos y se lava la resina 3 veces con 10 volúmenes (Respecto al volumen de la resina) de IPP150 a 4°C. Posteriormente se equilibra la resina con el buffer de corte 1X y se incuban 0,5µl de la proteasa TEV con 200µl de buffer de corte 1X (Ambos

suministrados por Invitrogen) durante 3 horas a temperatura ambiental. A continuación, se recoge el sobrenadante por centrifugación y se hace pasar por una minicolumna (Promega), para eliminar los restos de resina.

Para proceder con el siguiente paso de la purificación es necesario añadir al extracto CaCl_2 hasta alcanzar una concentración de 2mM. Se incuba el extracto con 50 μl resina de afinidad al CBP, previamente equilibrada con el buffer CBB (10mM Tris-HCl pH8, 10mM β -mercaptoetanol, 150 mM NaCl, 1mM Acetato de magnesio, 1mM Imidazol, 2mM CaCl_2 , 0,1% NP-40) durante 14 horas a 4°C. Tras la incubación, se recoge la resina por centrifugación y se lava 3 veces con 200 μl de buffer CBB. Finalmente, añadimos a la resina 200 μl del buffer de Elución (10mM Tris-HCl pH8, 10mM β -mercaptoetanol, 150 mM NaCl, 1mM Acetato de magnesio, 1mM Imidazol, 3mM EGTA, 0,1% NP-40) y recogemos por centrifugación el sobrenadante para su análisis.

2.17 Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Las bandas de proteínas analizadas en geles SDS-PAGE que fueron seleccionadas para su identificación por espectrometría de masas se recortaron manualmente y se enviaron para su análisis en 1 ml de agua destilada en tubos de centrifugas a los servicios de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) o del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

Las bandas que fueron identificados por el servicio de proteómica en el CNB se procesaron y analizaron según el protocolo descrito en Choi *et al.*, 2013. Las muestras analizadas en el servicio de proteómica del CNIC fueron digeridas de forma automática en un robot Proteineer DP (BrukerDaltonik) bajo el control del programa dpControl 1.2. El análisis de masas de las muestras se realizó de forma automática en un espectrómetro de masas Ultraflex MALDI-TOF/TOF (BrukerDaltonik) empleando calibración interna bajo el control del programa flexControl 2.2 (BrukerDaltonik) y seleccionando para el segundo tiempo de vuelo el péptido de mayor intensidad. En aquellas muestras analizadas en el servicio de proteómica del CNB, se analizaron en el segundo tiempo de vuelo los 8 péptidos de mayor intensidad. Las huellas peptídicas y los péptidos analizados en el segundo tiempo de vuelo se combinaron con el

programa BioTools 3.0 (BrukerDaltonik) y se compararon en la base de datos no redundante del NCBIInr empleando como motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science).

El motor de búsqueda MASCOT, empleado en todos los casos, está basado en el algoritmo *Molecular Weight Search* (MOWSE) descrito por Pappin y colaboradores en 1993 y que asigna a las identificaciones un valor estadístico que depende del número de péptidos analizados y del tamaño de la base de datos analizada. En este trabajo utilizaremos el valor estadístico denominado *score*, cuya fórmula es:

$$\text{score} = -10 \times \text{Log}(P)$$

Donde P es la probabilidad de que el mismo resultado pudiera ser obtenido por azar dentro de la base de datos a partir de los péptidos analizados. El *score* total de la proteína deriva del análisis de los valores de *score* individuales de los diferentes iones. Se toma como p-valor 0,05 y se consideran identificaciones significativas aquellas proteínas con un valor de *score* superior a 66.

2.18 Infección de cultivos celulares con RaV

La infección de cultivos celulares de las líneas HeLa S3 y Vero se realizó a partir de diluciones de concentraciones conocidas de RaV (medidas en unidades formadoras de placas (ufp) /ml) en medio DMEM sin SBF. La cantidad de ufp empleadas se calculó en función de la multiplicidad de infección (m.d.i o m.o.i en inglés y que se define como la ratio entre unidades formadoras de placas en la disolución y células totales en la superficie de cultivo) deseada. Para ello se calculó el número de células totales en un cultivo utilizando un hemocitómetro.

Se retira el medio del cultivo celular, se lava con PBS y a continuación se añade la disolución con el RaV sobre la superficie asegurándose que quede homogéneamente distribuida. Se deja incubar durante una hora a 37°C para favorecer la adsorción y entrada del RaV, agitando levemente el soporte para favorecer la correcta difusión de las partículas virales. Tras la incubación se desecha el medio con RaV y se añade medio DMEM con SBF al 2% y se deja

en incubación a 37°C y en 5% de CO₂ hasta la recogida o análisis de la muestra (En cada experimento se indicarán las horas post-infección (h.p.i) del análisis).

2.19 Titulación de RaV

La cuantificación de la producción viral con capacidad infectiva se determinó mediante cuantificación de la dosis infectiva necesaria para causar un 50% de efecto citopático (TCID₅₀). Estos ensayos se hicieron en células Vero, que presentan deficiencia en la producción de interferón (Desmyter *et al.*, 1968).

Para calcular la dosis infectiva necesaria para causar un 50% de efecto citopático (TCID₅₀) se infectaron monocapas confluentes de células Vero en placas de 96 pocillos con 100µl de las diluciones seriadas (Desde 10⁻² hasta 10⁻⁹) de la disolución a valorar en medio DMEM sin suero utilizando 6 pocillos por dilución. Las células Vero con el inóculo se incubaron a 37°C y a una concentración de CO₂ del 5% durante tres días. Se analizaron los pocillos y se anotó como positivo la presencia de efecto citopático característico del RaV y como negativo su ausencia, a fin de calcular el título por el método de Reed y Muench (Payment *et al.*, 1993). En las representaciones gráficas de este trabajo se expresan los valores como log₁₀TCID₅₀/ml.

2.20 Transfección de siRNAs en cultivos celulares

Para los ensayos en que se silenció la expresión de genes celulares mediante siRNAs se utilizaron cultivos de células HEK 293T y HeLa S3 en placas de 6 pocillos a una confluencia del 50%. Se preparó separadamente una mezcla de transfección con los siRNAs correspondientes a concentraciones entre 25-50 nM en 200µl de disolución por pocillo y 2-4µl del reactivo de transfección (RNAiMAXtm) en igual volumen, ambas disoluciones en medio de cultivo OPTI-MEM. Se mezclaron y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 25 minutos para permitir la formación de los complejos lipofectamina-RNA.

Transcurrido ese tiempo, se retira el medio de cultivo, se lava con PBS y se deposita la mezcla de transfección sobre el cultivo celular. Se incuba durante 4 horas a 37°C y a una presión de CO₂ del 5%. Finalmente, se sustituye el medio por medio DMEM con SBF y se mantienen las células en las mismas condiciones de temperatura y CO₂.

2.21 Valoración de la viabilidad de cultivos celulares

Aquellos cultivos en los que se silenció la expresión de genes celulares fueron analizados para comprobar que dicho proceso no afectaba a la viabilidad de las células. Dicha valoración se llevó a cabo mediante ensayo con MTT, compuesto que puede ser reducido por oxidorreductasas presentes en el citosol en células metabólicamente activas, generando cristales de formazán que dejan un precipitado púrpura en el interior de las células.

El ensayo se llevó a cabo subcultivando cultivos celulares tratados con siRNAs irrelevantes y siRNAs frente a los correspondientes mensajeros celulares a las 24 horas post-transfección (h.p.t) y no tratados en placas de 96 pocillos. Una vez adheridos a la superficie se sustituyó el medio por medio con MTT a 0,5 mg/ml y se incubaron a 37°C en oscuridad durante cuatro horas. Tras la incubación se retira el medio de cultivo con MTT y se disuelven los cristales de formazán en una disolución de HCl al 0,17% en isopropanol. Las placas se leyeron por espectrometría en un lector de placas a 570 nm de longitud de onda y se compararon los resultados de las células tratadas respecto a aquellas que no habían sido transfectadas.

RESULTADOS

1. Identificación de proteínas celulares que interaccionan con los extremos del genoma del RaV

La regulación de la replicación, la transcripción y la traducción de los RNAs virales en calicivirus puede ser llevada a cabo en *cis*, mediante elementos contenidos en el RNA, como secuencias específicas y estructuras secundarias, y en *trans*, por la interacción de proteínas virales o celulares con los RNAs virales.

En los extremos 5' y 3' del RNA genómico y subgenómico se encuentran, probablemente, secuencias reguladoras de los procesos de replicación de los RNAs virales y de la traducción de la ORF1 y las proteínas estructurales VP1 y VP2. Debido al reducido tamaño de las UTRs, la ausencia de IRES y de otros elementos reguladores conocidos, y a la carencia de un clon infectivo que permita estudiar por mutagénesis las regiones de los extremos, las secuencias que actúan en *cis* permanecen desconocidas.

Dadas esas circunstancias, en esta tesis se estudiarán los factores proteicos que podrían regular en *trans* dichos procesos mediante la interacción con transcritos que incluyan los extremos del genoma del RaV.

El primer objetivo de este trabajo ha sido identificar qué proteínas presentes en una línea celular susceptible y permisiva a la infección por RaV interaccionan *in vitro* con fragmentos de RNA sintético que contienen las secuencias de los extremos 3' y 5' del genoma del RaV.

La estrategia utilizada (Figura 1) consiste en la síntesis por transcripción *in vitro* de fragmentos correspondientes al RNA subgenómico (RNAsg), coterminales con RNA genómico en su extremo 3', y secuencias de diversa longitud del extremo 5' del RNA genómico. Estas transcripciones se hacen a partir del cDNA del genoma completo del RaV en presencia de CTP marcado con biotina.

Paralelamente se pone a punto una cromatografía de afinidad a RNA con el objetivo de aislar los complejos formados por proteínas celulares y RNAs sintéticos. Se ensayan las condiciones de temperatura, tiempo de incubación y

cantidades de RNA y proteínas para que, tras la adsorción de los RNAs sintéticos a una matriz de estreptavidina-sefarosa y la incubación de las resinas con extractos citoplasmáticos de las líneas celulares HeLa S3 o HEK 293T, se puedan recoger las proteínas unidas a la matriz en tampón de muestra para ser analizadas electroforéticamente en un gel SDS-PAGE. Aquellas bandas que muestren una distribución diferencial son recortadas y tratadas para su posterior análisis e identificación por espectrometría de masas.

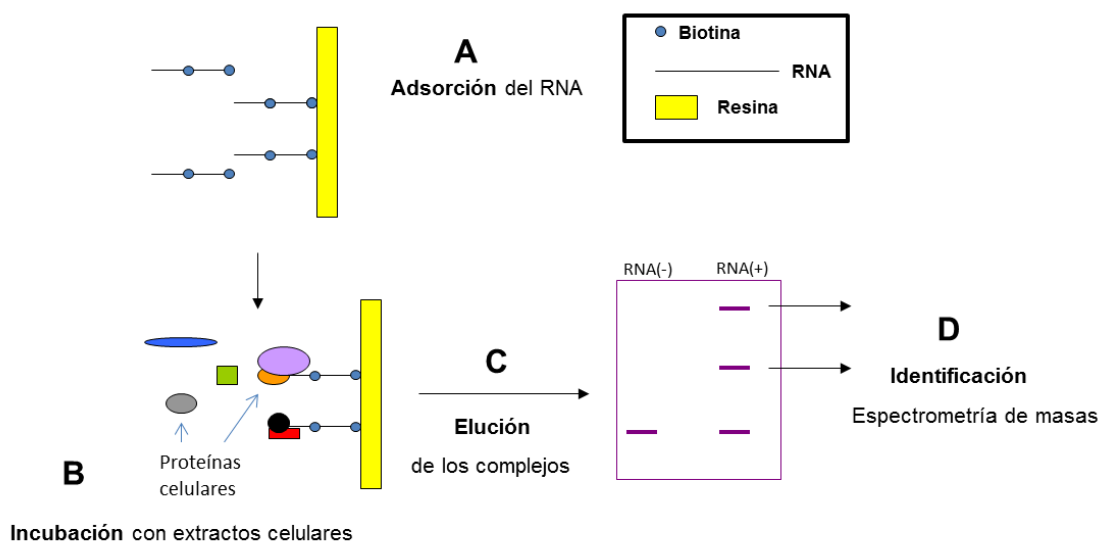


Figura 10: Esquema del procedimiento empleado para la identificación de proteínas celulares que interactúan con el RNA viral. (A) los RNAs virales, previamente biotinilados se inmovilizan en una resina de agarosa-estreptavidina. (B) Incubación de extractos citoplasmáticos de HeLa S3 o HEK 293T con la resina que previamente ha adsorbido los RNAs biotinilados (las formas coloreadas representan proteínas celulares). Tras los lavados se eluye el material adsorbido en la resina (C) y se analiza electroforéticamente. Las bandas diferenciales entre las resinas incubadas en presencia o ausencia de RNAs virales son seleccionadas e identificadas por espectrometría de masas (D).

1.1 Síntesis de RNAs biotinilados de los extremos del genoma viral

Para abordar la identificación de las interacciones proteína-RNA, siguiendo la estrategia antes mencionada, el primer paso es la amplificación del cDNA y su transcripción en presencia de CTP marcado con biotina para obtener fragmentos de RNA marcados y correspondientes a los extremos del genoma viral.

Se sintetizaron dos RNAs del extremo 5' del genoma (de 0,45 y 1,83kb), que incluyen la UTR presente en el extremo 5' y el inicio de la traducción de la ORF 1 en el nucleótido 20. También se sintetiza el sgRNA (2,6 kb) que incluye el extremo 3' del genoma viral, incluida una secuencia de poli-A con 15 residuos de adenina, la UTR del extremo 3' y las ORFs 2 y 3.

Para ello se construyeron moldes para la transcripción *in vitro* a partir del cDNA del genoma viral, clonado en el plásmido pFRaVeA (Figura 11). Los moldes se sintetizaron mediante PCR con el promotor para la RNA polimerasa-DNA dependiente del fago T7 en un extremo, usando los oligonucleótidos T7RaV14, T7RaVsg, RaV16, RaV18 y RaV1, descritos en el apartado de materiales y métodos.

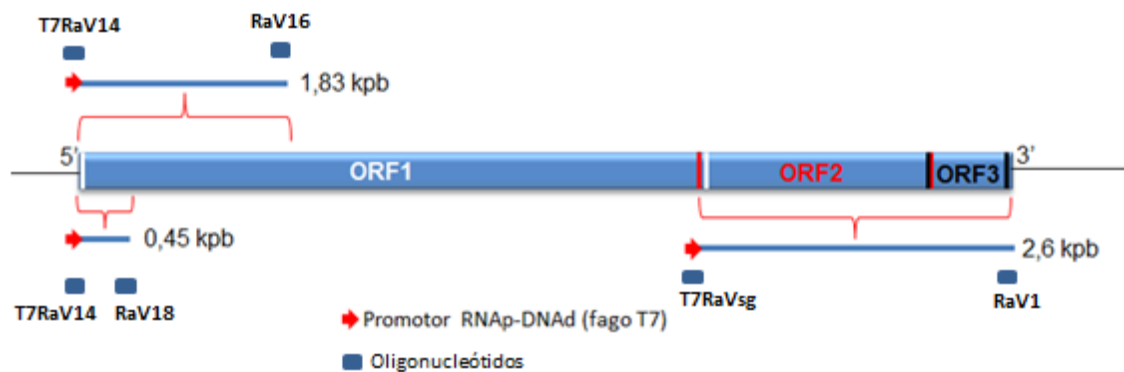


Figura 11: Representación esquemática del plásmido pFRaVeA, indicando la región que contiene el cDNA completo del RaV (rectángulo azul claro), incluyendo las ORFs y las longitudes y localización de los moldes de transcripción, así como los oligonucleótidos empleados.

Para la amplificación del molde correspondiente a 0,45 kb del extremo 5' se usaron los oligonucleótidos T7RaV14 y RaV18 que delimitan una secuencia del cDNA del genoma del RaV comprendida entre los nucleótidos 1 y 451. Para el fragmento de 1,83 kb del mismo extremo se utilizaron los cebadores T7RaV14 y RaV16, que permiten amplificar el DNA complementario correspondiente entre los nucleótidos 1-1831 del genoma de RaV. Finalmente para el RNAsg se usaron los cebadores T7RaVsg y RaV1, y se amplificó un fragmento de 2668 pb comprendido entre los nucleótidos 5648 y 8310 del cDNA del genoma del RaV. Los tamaños de los amplicones resultantes se comprobaron en geles de agarosa (Figura 12.A) y se cuantificó la cantidad de ADN por espectrofotometría.

Los moldes se transcribieron *in vitro* en presencia de biotina-14-CTP en una proporción 1:5 y 1:2 respecto a CTP no marcado. La integridad y el tamaño de los RNAs transcritos se evaluó en geles desnaturizantes de agarosa y se estudió la movilidad de los RNAs biotinilados (1:5 y 1:2 biotina-14-CTP:CTP) respecto a los no biotinilados, debido a que el marcaje del RNA con biotina podría dar lugar a modificaciones en la conformación del mismo y, por tanto, afectar a la interacción con proteínas, no encontrándose diferencias de movilidad entre los diferentes marcajes (Figura 12.B).

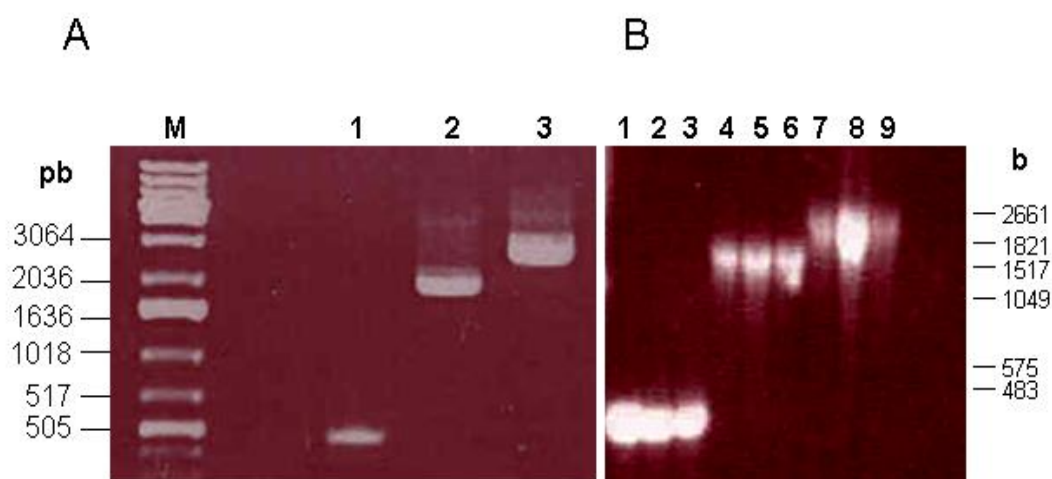


Figura 12: Análisis electroforético de los DNAs molde obtenidos mediante PCR (A) utilizados para la transcripción *in vitro* de los RNAs sintéticos de 0,45 (1), 1,8 kb (2) y del RNA subgenómico (3). (B) Análisis electroforético en geles de agarosa/formaldehído de los transcritos sintéticos de 0,45Kb (1-3); 1,83Kb (4-6) y RNAsg (7-9) en ausencia de biotina-14-CTP (1,4 y 7) o en presencia de una relación 1:5 (2, 5 y 8) o 1:2 (3, 6 y 9) de biotina-14-CTP:CTP

Como control de la transcripción en presencia de biotina se utilizó el RNA el gen de la luciferasa. Se comprueba la cantidad de RNA mediante espectrofotometría y la incorporación del marcaje en los distintos RNA sintéticos mediante un ensayo *dot-blot* (Figura 13) utilizando 1µg de los mismos y se almacena en alícuotas a -20°C.

Se decide emplear en adelante la proporción 1:5 (Biotina-14-CTP:CTP) que permite un marcaje más laxo que pudiera afectar en menor medida a la estructura de los RNAs y, por tanto, más cercano a la conformación nativa de los mismos. Esta proporción es similar a la empleada en el estudio de interacción de proteínas con RNAs de los extremos 5' y 3' en *flavivirus* y *coronavirus* (Isken *et al.*, 2003; Galán *et al.*, 2009).

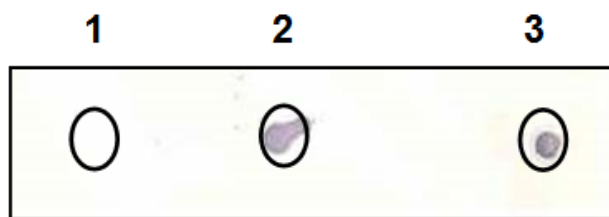


Figura 13: Ensayo *dot-blot* del RNA de 0,45Kb sintetizado en ausencia de biotina-14-CTP (1) o en presencia de una relación 1:5 (2) o 1:2 (3) de biotina-14-CTP:CTP.

Para confirmar el marcaje de los transcritos del RaV así como el control de luciferasa, se realiza un análisis *North-Western*, transfiriendo los RNAs a una membrana de nitrocelulosa que se reveló, utilizando estreptavidina con peroxidasa conjugada, mediante quimioluminiscencia. El revelado indica que tanto los tamaños, como el marcaje y la integridad de los RNAs era el esperado (Figura 14).

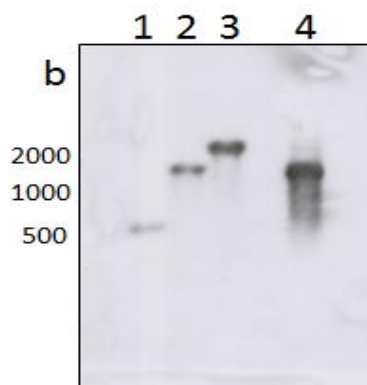


Figura 14: Análisis *North-Western* de los transcritos: 1- RNA de 0,45kb; 2- RNA de 1,83 kb; 3- RNAsg (2,65 kb); 4-RNA luciferasa (1,82 kb). El tamaño de los marcadores de RNA en bases (b) se indica a la izquierda.

1.2 Cromatografía de afinidad a RNAs virales

Los factores proteicos necesarios para la replicación del RaV se han de encontrar en una línea celular que sea permisiva y susceptible a la replicación del virus. Basándonos en los datos de curvas de crecimiento del RaV en distintas líneas celulares obtenidos en nuestro laboratorio (datos publicados en la tesis “Caracterización molecular de un nuevo calicivirus de conejo” del Dr. Lorenzo González Molleda, 2008), se elige utilizar la línea celular HeLa S3 para

estudiar las interacciones de factores proteicos celulares con los extremos 5' y 3' del genoma del RaV.

La replicación de los calicivirus, y por tanto la del RaV, tiene lugar en el citoplasma de las células infectadas (Casais *et al.*, 2008), por esta razón se parte de extractos citoplasmáticos de HeLa S3 que contienen aquellos elementos requeridos para la replicación eficiente del RaV. Estos extractos se obtienen a partir de la lisis y separación por centrifugación de las fracciones nuclear y citoplasmática de cultivos de HeLa S3 confluentes, lavados con PBS y congelados a -80°C. Se recoge la fracción citoplasmática y se cuantifica por el método de Bradford como se indica en materiales y métodos, obteniendo unos rendimientos de aproximadamente 3µg/µl.

Se realizan ensayos previos para detectar posibles uniones inespecíficas a la matriz de estreptavidina-sefarosa cuando se incuba la resina en ausencia de RNA con los extractos citoplasmáticos de HeLa S3. Inicialmente no se detectaron bandas en los eluidos de la matriz en un análisis electroforético SDS-PAGE cuando se utilizó como tinción azul de Coomassie (datos no mostrados). Ensayos posteriores utilizando una tinción de mayor sensibilidad (SYPRO) permitieron observar la presencia de proteínas que se unían a una resina sin RNA.

Con el objetivo de reducir las posibles uniones inespecíficas se incuban extractos citoplasmáticos, con 600µg de proteína total, con 25µl de resina a 4°C durante 4 horas, tras las cuales se centrifuga, se recoge el sobrenadante y se incuba en las mismas condiciones con una nueva resina. Se recogen las proteínas adsorbidas a la resina precipitada con tampón de muestra en cada paso y se analizan electroforéticamente en un gel SDS-PAGE al 10% (Figura 15).

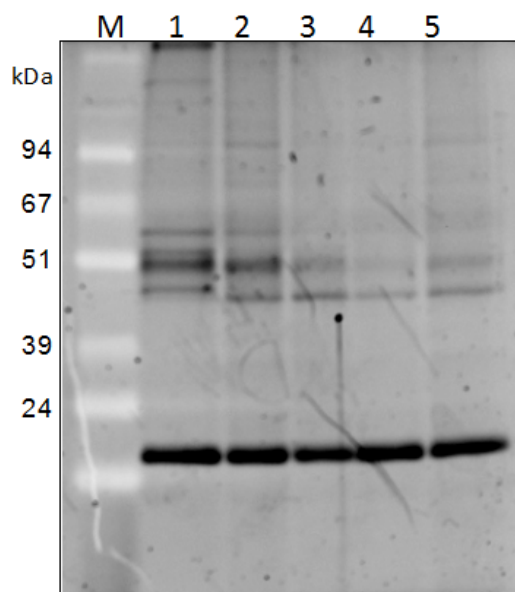


Figura 15: Análisis electroforético SDS-PAGE y tinción con SYPRO de las muestras eluídas de las resinas tras sucesivas incubaciones (indicadas con números del 1 al 5) de un extracto citoplasmático de HeLa S3 con resinas de estreptavidina-sefarosa en ausencia de RNA.

No se apreciaron diferencias en los patrones de unión inespecífica de proteínas a la resina cuando el extracto había sido incubado en más de tres ocasiones. Los extractos celulares que van a ser empleados en la cromatografía de afinidad a RNA biotinilado, se pre-incubarán en tres pasos consecutivos con resinas libres de RNA para reducir en lo posible las reacciones inespecíficas. La unión de los RNAs sintéticos y biotinilados a la matriz se hizo empleando los productos obtenidos por transcripción *in vitro*, una vez cuantificados y analizada su integridad y marcaje.

Se utilizaron cantidades de RNA de 8 y 15 μ g, por similitud a las empleadas en otros estudios (Galán et al., 2009), incubándose durante 1 hora y 30 minutos con 25 μ l de resina, previamente equilibrada, en presencia de un tampón de alto contenido en sal (1M de KCl). Posteriormente se incubaron las resinas conteniendo el RNA inmovilizado con los extractos celulares. Tras varios pasos de lavado, se recuperaron las proteínas unidas a la matriz en tampón de muestra y se analizaron electroforéticamente (Figura 16).

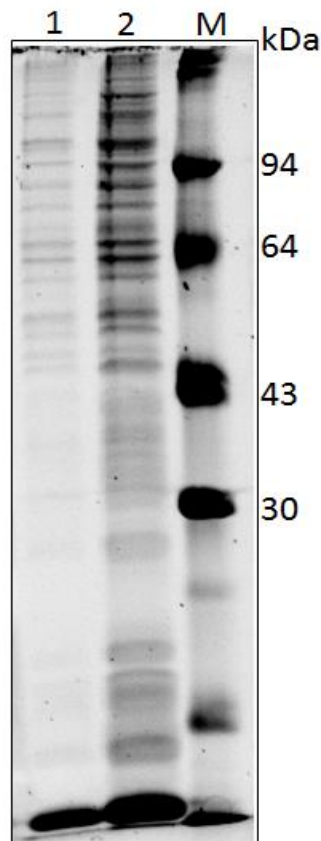


Figura 16: Análisis electroforético SDS-PAGE y tinción con SYPRO de las proteínas recogidas tras incubar un extracto de HeLa S3 con matrices que habían adsorbido 8 μ g (1) y 15 μ g (2) del RNA de 0,45kb.

En todas las muestras obtenidas a partir de la incubación de extractos de HeLa S3 con resina conteniendo las distintas especies de RNA biotinilado, se observó que la cantidad de proteína capturada era superior cuando se utilizaban extractos con 600 μ g de proteína y matrices incubadas con 15 μ g del RNA.

Para comprobar el efecto de la temperatura se incubaron 15 μ g de los distintos transcritos durante 90 minutos a 4 $^{\circ}$ C, a temperatura ambiente (22 $^{\circ}$ C) y a 37 $^{\circ}$ C. Tras ese período se retira el sobrenadante para su análisis, se lava la resina abundantemente con el tampón de unión de proteínas para eliminar el exceso de sal, que puede interferir posteriormente en las interacciones RNA-Proteína, y se incuban las resinas con extractos celulares durante 16 horas a 4 $^{\circ}$ C. Se recogen las resinas por centrifugación y tras los lavados se eluyen en tampón de muestra las proteínas que interaccionan con los RNAs biotinilados para su análisis.

En los sobrenadantes recogidos tras la incubación de las resinas con los diferentes RNAs no se observaron indicios de degradación cuando se analizaron en un gel de agarosa en condiciones desnaturizantes (datos no mostrados). En el análisis electroforético SDS-PAGE de las proteínas unidas a las resinas que habían adsorbido los RNAs sintéticos en distintas condiciones de incubación (Figura 17) se observaron diferencias en la cantidad de proteína recuperada de cada resina.

Cuando la incubación del RNA se llevó a cabo a 4°C la cantidad y el patrón de las proteínas recuperadas de la matriz es similar al observado cuando se incuba el extracto celular con resina libre de RNA (Figura 15 y calle 1 de la figura 17). A temperaturas superiores observamos un patrón diferente y un aumento significativo en la cantidad de proteína recuperada, siendo la mayor observada cuando se incuban los RNAs biotinilados a 37°C. En adelante las incubaciones del RNA con la resina se harán a 37°C durante 90 minutos.

Una vez establecidas las condiciones para realizar la cromatografía de afinidad a RNA, se procede al análisis de las interacciones en cada uno de los transcritos y a la identificación de las bandas de proteínas que muestren un comportamiento diferencial en su unión.

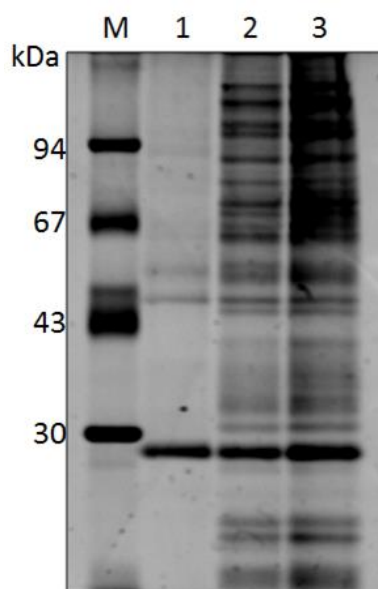


Figura 17: Análisis electroforético SDS-PAGE y tinción con SYPRO de las proteínas recogidas tras incubar un extracto celular con matrices que habían adsorbido 15µg el RNA de 0,45kb en incubaciones de una hora y media a 4°C (1), temperatura ambiente (2) y a 37°C (3).

1.3 Identificación de proteínas que interaccionan con los extremos del genoma viral

Para identificar las proteínas que interaccionan con los extremos del genoma viral se utilizarán los RNAs anteriormente sintetizados marcados con biotina. Para el estudio de las interacciones con el extremo 5' del genoma del RaV se emplean dos fragmentos, uno que contiene los 451 primeros residuos nucleotídicos del mismo y otro fragmento que contiene los primeros 1831. Ambos contienen la UTR de 19 nucleótidos del extremo 5' y el inicio de la traducción de la ORF1 por lo que deben presentar las regiones que regulan *in cis* la replicación del gRNA y la traducción de la ORF1. Para el estudio de las interacciones con el extremo 3' se utiliza el RNA subgenómico completo, coterminado con el extremo 3' del genoma del RaV y que presenta la UTR del sgRNA, la UTR del extremo 3' y 15 residuos de cola de poli-A. Además, contiene en el extremo 5' el origen de la traducción de la ORF2. También encontramos en el RNAsg la región TURBS que permite el inicio de la traducción de la ORF3 dependiente de la terminación de la ORF2.

Para la identificación de las proteínas que interaccionan con estos RNAs se emplearon en este ensayo extractos citoplasmáticos de HeLa S3 y HEK 293T, ambas líneas celulares son de origen humano y permisivas y susceptibles a la infección del RaV. Los extractos fueron pre-incubados con resinas de estreptavidina antes de ser añadidos e incubados con resinas que habían unido los distintos RNAs biotinilados y a una resina control sin RNA. Tras la incubación se centrifuga, se recoge la resina y se eluyen las proteínas en tampón de muestra. Para el análisis electroforético se empleó un gel comercial con gradiente de acrilamida 4-12% y tampón SDS-MOPS para una mejor resolución de las bandas (Figura 18), permitiendo su mejor manipulación.

La imagen obtenida se analiza buscando aquellas diferencias en el patrón de bandas que resulten interesantes para su posterior estudio. De esta forma se siguieron principalmente dos criterios:

-Aquellas proteínas que mostraban afinidad preferencial por una de las diferentes especies de RNA biotinilado, especialmente cuando había una unión diferencial por uno de los extremos y no estaban presentes en el control sin RNA.

-Las diferencias en el patrón electroforético obtenido cuando se utilizaban extractos citoplasmáticos de HeLa S3 frente a HEK 293T y que no estuvieran presentes en el control sin RNA.

En el gel se observaron numerosas proteínas que mostraban un comportamiento diferencial al incubarse en presencia de un RNA perteneciente al extremo 5' o al 3'. También se pudieron apreciar diferencias entre las cromatografías en las que se utiliza un extracto de HeLa S3 y aquellas en las que se emplea HEK 293T. Esas bandas se recortaron del gel y se realiza el análisis por espectrometría de masas usando la técnica MALDI-TOF/TOF, seleccionando para el segundo período de vuelo los péptidos de mayor intensidad. El análisis de las huellas peptídicas asignó valores estadísticos a las identificaciones utilizando el programa de búsqueda MASCOT.

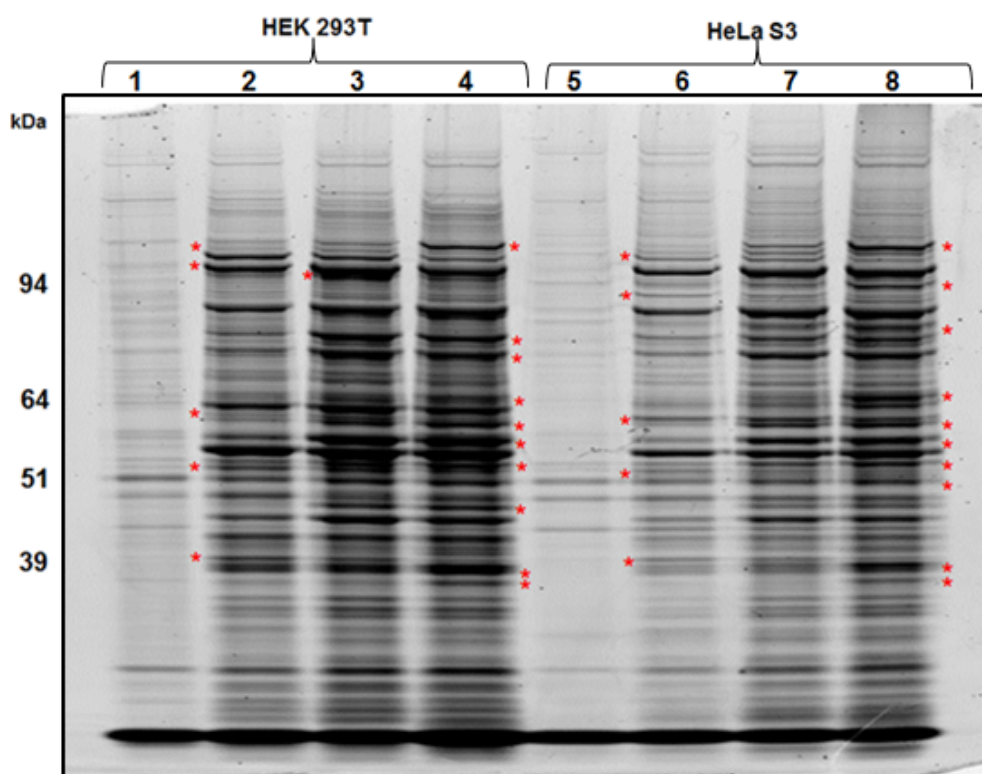


Figura 18: Análisis electroforético SDS-MOPS-PAGE (4-12%) y tinción con SYPRO de las proteínas recuperadas tras incubación de extractos celulares de HEK 293T (1-4) y HeLa S3 (5-8) con matrices sin RNA adsorbido (1 y 5), con RNA del extremo 5' de 0,45kb (2 y 6), con RNA del extremo 5' de 1,83kb (3 y 7) y con el RNA subgenómico, incluyendo el extremo 3' (4 y 8).

Se consideraron identificaciones válidas aquellas proteínas de las que se analizaron un mínimo de tres péptidos en el segundo período de vuelo y presentaban un valor de “score” superior a 100.

Atendiendo a estos criterios, se recortaron 33 bandas entre las que se identificaron un total de 28 proteínas diferentes. Algunas de ellas se identificaron en la misma banda, pero correspondían los tamaños moleculares al mostrado por la banda y el resultado estadístico de la identificación se consideró significativo. Otras fueron identificadas tanto en bandas recortadas tras realizar la cromatografía con extractos de HEK 293T como en el caso de utilizar extractos provenientes de HeLa S3.

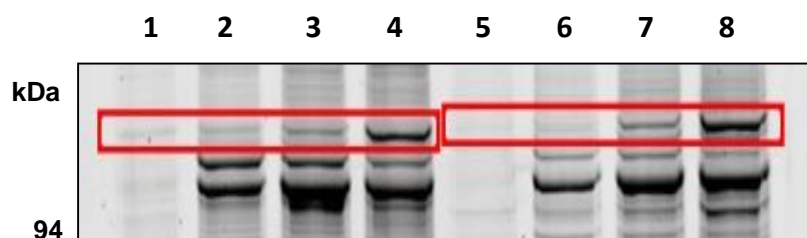


Figura 19: Detalle del análisis electroforético de la Figura 18. Se indica en rojo una región del gel donde se observan diferencias de intensidad en función de los extractos citoplasmáticos y los diferentes RNAs biotinilados empleados.

Se presentan en tablas los resultados de dichas identificaciones. En primer lugar las identificaciones de aquellas proteínas que mostraron mayor afinidad por el extremo 5' del genoma viral (Tabla 5) y a continuación aquellas que se recortaron por su interacción con el sgRNA (Tabla 6), indicando las líneas celulares en las que se encontraron y los valores estadísticos de la identificación.

Las proteínas identificadas, excepto la proteína reguladora del ciclo celular y apoptosis 2 (CCAR2), han sido descritas previamente en la bibliografía como proteínas de unión a RNA o tienen algún papel regulador en los procesos metabólicos relacionados con el RNA, ya sea durante la transcripción, procesamiento, degradación o traducción.

La EIF2AK2 (o PKR) y la proteína de unión a lipoproteínas de alta densidad (HDLBP o Vigilina) se identificaron tanto en HeLa S3 como en HEK 293T y presentan dominios de unión a RNA. La proteína EIF2AK2, es una

proteína de defensa frente a infecciones virales que reconoce RNAs de doble cadena y fosforila al factor EIF2A, inhibiendo la traducción.

La RNA Helicasa A dependiente de ATP, participa en la separación de los híbridos DNA-RNA que se generan durante la transcripción en la célula eucariota. Las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares K y A/B (hnRNPK y hnRNPA/B) están asociadas al procesamiento, transporte y metabolismo del RNA.

Las proteínas PCBP2, hnRNPK, HDLBP e IGF2BP3, presentan dominios KH, secuencias conservadas de unión a RNA y a DNA de cadena sencilla. Destaca la diferencia encontrada entre líneas celulares en la unión al extremo 5' de las proteínas PCBP2 (HEK 293T) y hnRNPK (HeLa S3), que presentan una marcada afinidad por las regiones ricas en citosinas.

GI	Acrónimo	Proteína	MW (kDa)	Células	Score
4885408	HDLBP (Vigilina)	High density lipoprotein binding protein	139,5	HEK 293T/HeLa S3	899
219520291	PKR	EIF2AK2	60	HEK 293T/HeLa S3	560
100913205	-	ATP-dependent RNA Helicase A	140	HEK 293T	984
78395094	PCBP2	Poly(rC) Binding Protein 2	37	HEK 293T	645
55956920	hnRNPA/B	heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein A/B	31	HEK 293T	121
12653174	hnRNPK	heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein K	51	HeLa S3	192
30795211	IGF2BP3	Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3	64	HeLa S3	465
24432105	CCAR2	Cell cycle and apoptosis regulator protein 2	102	HeLa S3	221

Tabla 5: Identificación de proteínas con mayor afinidad por el extremo 5' del genoma viral. Se indica el código de acceso de las proteínas en las bases de datos del NCBI (GI), el acrónimo utilizado en este trabajo y el nombre de las mismas y el peso molecular estimado (MW), la línea o líneas celulares donde fueron identificadas y el valor estadístico de la identificación por espectrometría de masas (Score).

Se identificaron en ambas líneas celulares varias proteínas del grupo de las ribonucleoproteínas nucleares, concretamente la hnRNPK (o SYNCRIP), hnRNPL, hnRNPA0, hnRNPA1, hnRNPA2/B1, PTBP1. Otras dos proteínas de este tipo la snRNPA, y la hnRNPU se identificaron solamente en HeLa S3.

Estas proteínas se localizan mayoritariamente en el núcleo pero sufren transporte hacia el citoplasma y están implicadas en la formación de complejos encargados del procesamiento y transporte de los pre-mRNAs.

La proteína de unión a poli-A, PABP, participa en la regulación de la traducción por su unión a la cola de poli-A e interacción con el factor de inicio de la traducción eIF4G, que a su vez interacciona con el factor eIF4E que reconoce el *cap* del extremo 5' de los mRNA.

GI	Acrónimo	Proteína	MW (kDa)	Células	Score
530382972	hnRNPQ	SYNCRIP protein	68,5	HEK 293T/HeLa S3	544
14165466	PTBP1	Polyrimidine tract binding protein 1	58	HEK 293T/HeLa S3	633
119612222	PABP	Poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	70	HEK 293T/HeLa S3	431
119577230	hnRNPL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	61	HEK 293T/HeLa S3	102
5803036	hnRNPA0	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	33,5	HEK 293T/HeLa S3	182
4759156	snRNPA	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A	31	HEK 293T/HeLa S3	307
4504447	hnRNPA2/B1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	37,5	HEK 293T/HeLa S3	266
75517570	hnRNPA1	HNRNPA1 protein	35	HEK 293T/HeLa S3	409
119627830	SFPQ	Splicing factor proline/glutamine-rich	78	HEK 293T	698
24234756	ILF3/NF90	Interleukin enhancer binding factor 3	98,5	HEK 293T	486
114794734	DDX3X	Human Dead-Box RNA Helicase Ddx3x	73	HEK 293T	297
119591368	(Nucleolina)	Nucleolin	78	Hela S3	308
74136883	hnRNPU	HNRNPU protein	91	Hela S3	274
15929104	MARS	MARS protein	99	Hela S3	504
5031703	G3BP1	Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding protein 1	51	Hela S3	416
45359846	G3BP2	Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding protein 2	53	Hela S3	133
7804450	LARS	Leucyl tRNA synthetase	129,5	Hela S3	183
45439306	DARS	Aspartyl-tRNA synthetase	55	Hela S3	453
532313	ILF2/NF45	NF45 protein	44,5	Hela S3	317
38201714	ELAV1/HuR	ELAV-like 1	36	Hela S3	120

Tabla 6: Identificación de proteínas con mayor afinidad por el extremo 3' del genoma viral. Se indica el código de acceso de las proteínas en las bases de datos del NCBI (GI), el acrónimo utilizado en este trabajo y el nombre de las mismas y el peso molecular estimado (MW), la línea o líneas celulares donde fueron identificadas y el valor estadístico de la identificación por espectrometría de masas (Score).

El resto de proteínas identificadas también han sido descritas por su unión a ácidos nucleicos y participación en procesos metabólicos del RNA. La Helicasa Ddx3x regula la terminación de la transcripción en el núcleo favoreciendo la separación del RNA transcrito. La proteína SFPQ actúa en la maduración de los pre-mRNAs, participando en la formación del espliceosoma. Por último, también con actividad helicasa en hélices híbridas DNA-RNA y RNA-RNA encontramos las proteínas 1 y 2 de unión a dominios SH3 de la proteína activadora de Ras-GTPasa, que además forman parte de la regulación de procesos de mantenimiento y proliferación celular al ser elementos de la cascada de transducción de la proteína Ras.

Relacionadas con el proceso de traducción encontramos específicamente en HeLa S3 la nucleolina y las tRNA sintetasas MARS, LARS y DARS. La nucleolina está implicada en la síntesis y maduración de los complejos ribosomales, mientras que las tRNA sintetasas están relacionadas con la formación de los complejos aminoacil-tRNAs.

Por último, también se han detectado proteínas implicadas en la regulación de la transcripción e integridad de los mRNAs, así las proteínas ILF2 e ILF3, están relacionadas con la expresión de interleucina 2 en células T mediante la unión y estabilización de los mRNA que la expresan. Por otra parte, la proteína similar a ELAV, participa en el reconocimiento y degradación de mRNAs, uniéndose a regiones próximas al extremo 3' y ricas en AU.

Además de las funciones celulares (Figura 20.A) de las proteínas identificadas, se estudió si había sido descrita la interacción de éstas con ácidos nucleicos o proteínas virales en calicivirus o en otras familias virales (Figura 20.B), de cara a seleccionar aquellas proteínas que potencialmente tuvieran más probabilidades de jugar un papel relevante en la infección por RaV. Se pudo comprobar que el 18% de las proteínas identificadas son descripciones nuevas de interacciones RNA-proteína en virus, y cerca de la mitad corresponden a nuevas interacciones RNA-proteína descritas en la familia *Caliciviridae*.

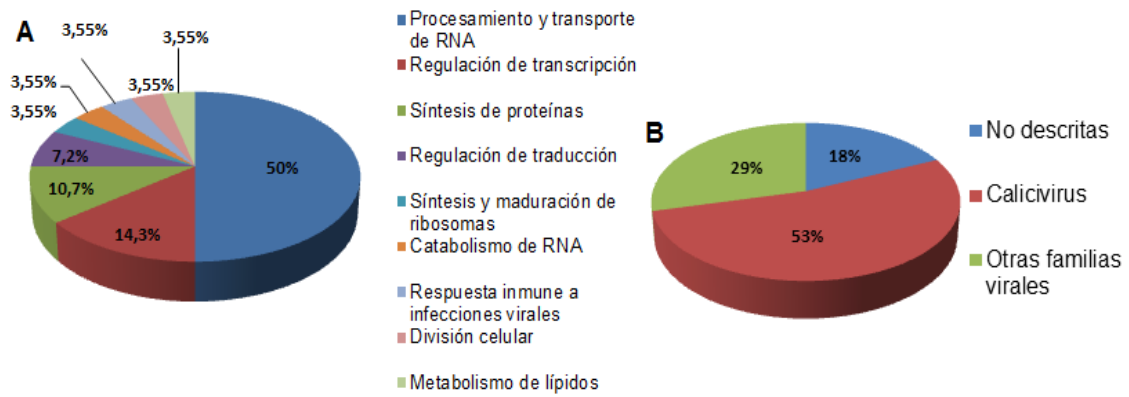


Figura 20: **A**-Gráfico de las funciones celulares desarrolladas por las proteínas identificadas por su interacción con los extremos del genoma del RaV y las proporciones relativas. **B**-Proporción de proteínas identificadas por su interacción con los extremos del genoma del RaV que no han sido descritas por su interacción con elementos virales (azul), descritas por su interacción a ácidos nucleicos o proteínas de calicivirus (rojo) y descritas por su interacción con elementos de virus pertenecientes a otras familias (verde).

A partir de los datos obtenidos por la identificación mediante espectrometría de masas, y el estudio de la función y la unión de las proteínas a distintos moldes, se consideraron como candidatas potenciales para la realización de estudios funcionales las proteínas hnRNPQ (SYNCRIP), PABP, hnRNPU, PTBP1, hnRNPA1 y hnRNPA2/B1 por su mayor preferencia por el extremo 3', y la proteína hnRNPK por su mayor unión al extremo 5'.

2. Identificación de proteínas celulares que interactúan con las proteínas NS5, NS6/7 y VP1 del RaV

Las proteínas virales que se emplearán para el estudio de estas interacciones serán la proteína unida covalentemente al extremo 5' del genoma del RaV (NS5), la proteína bifuncional con actividad RNA polimerasa dependiente de RNA y cisteín-proteasa (NS6/7) y la forma madura de la proteína estructural mayoritaria de la cápsida (VP1).

Se pretende construir tres líneas celulares estables que expresen de manera inducible y por separado las proteínas NS5, NS6/7 y VP1, todas ellas fusionadas por su extremo C-terminal con una etiqueta peptídica que permita aislar los complejos proteicos mediante la técnica de purificación en tándem por afinidad (TAP). Esta etiqueta contendrá la proteína A, una región de corte para la proteasa del virus TEV y un péptido con dominio de unión a calmodulina (CBP).

Una vez establecidas estas líneas celulares, se induce la expresión de las proteínas recombinantes y se realiza una cromatografía de afinidad en tándem, con dos pasos de purificación consecutivos en condiciones suaves, que permitan co-purificar los complejos proteicos. Tras su análisis electroforético, se seleccionan aquellas bandas que hayan purificado con los elementos virales y se identificarán mediante espectrometría de masas.

2.1 Obtención de las líneas celulares que expresen de forma inducible productos del RaV

Con el objetivo de construir líneas celulares que expresen las proteínas de fusión de manera inducible, se ha empleado la línea celular Flp-In[™] T-Rex[™]-293, derivada de la línea HEK 293T con regiones que permiten la recombinación específica de sitio de fragmentos que presente las secuencias FRT. Esta integración del gen recombinante se realizará mediante la co-transfección de plásmido pcDNA5/FRT/TO, incluyendo la etiqueta peptídica C-TAP (pCTAP) fusionada con los genes virales NS5, NS6/7 o VP1 (que denominaremos pNS5-CTAP, pNS6/7-CTAP y pVP1-CTAP, en cada caso) y el plásmido pOG-44 que aporta el gen de la recombinasa Flp.

En el estudio de la interacción de las proteínas del huésped y las proteínas NS6/7, VP1 y NS5 del RaV, es necesario contar con en una línea celular permisiva y susceptible de ser infectada por el virus, ya que tendrá todos los factores celulares necesarios para la replicación. Aunque la línea celular empleada es derivada de HEK 293T, línea permisiva y susceptible al RaV, las condiciones de cultivo son diferentes debido a la presencia de antibióticos. Para confirmar que la línea conserva dichas características, se infectaron con RaV monocapas confluentes de células Flp-InTM T-RexTM-293 en medio de cultivo conteniendo blasticidina y zeocina a una multiplicidad de infección de 5, y a las 8 horas se comprobó la existencia del efecto citopático característico del RaV (datos no mostrados).

Para la generación del plásmido pCTAP que exprese C-TAP fusionado al extremo carboxilo de cada proteína viral, en primer lugar se cortó la secuencia de la etiqueta peptídica C-TAP del plásmido comercial pZome-1-C con los enzimas *Bam*HI y *Sal*I (Figura 21) y se insertó en el plásmido pcDNA5/FRT/TO previamente digerido con *Bam*HI y *Xho*I, dando lugar tras la ligación a la eliminación de esta última diana de restricción.

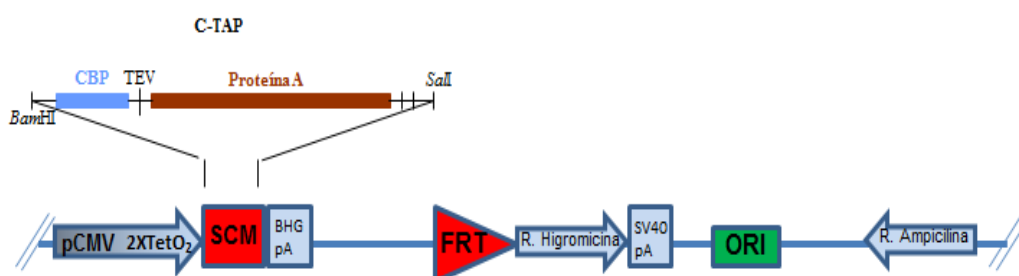


Figura 21: Diagrama esquemático de la construcción del vector pcDNA5/FRT/TO-C-TAP. Donde TEV indica la secuencia de corte para la proteasa TEV, CBP el péptido de unión a calmodulina y SCM, Sitio de Clonación Múltiple.

Las secuencias codificadoras de las proteínas virales se amplificaron mediante PCR usando los oligonucleótidos descritos en materiales y métodos, con secuencias diana para enzimas de restricción que flanquearan la región codificadora y adecuadas para la inserción del fragmento en el plásmido

pCTAP. Los productos de la PCR se purifican y se ligan en un plásmido pGEM-T.

Una vez se ha conseguido insertar los fragmentos en pGEM-T, se digieren con los enzimas que flanquean las secuencias virales, se purifican los correspondientes fragmentos (datos no mostrados) y se insertan dentro del pCTAP utilizando las dianas de restricción compatibles (Figura 22).

Se cuidó también que los insertos estuvieran en pauta de lectura y dentro del contexto de Kozak. Se comprobó la construcción secuenciando una muestra del plásmido purificado (datos no mostrados).

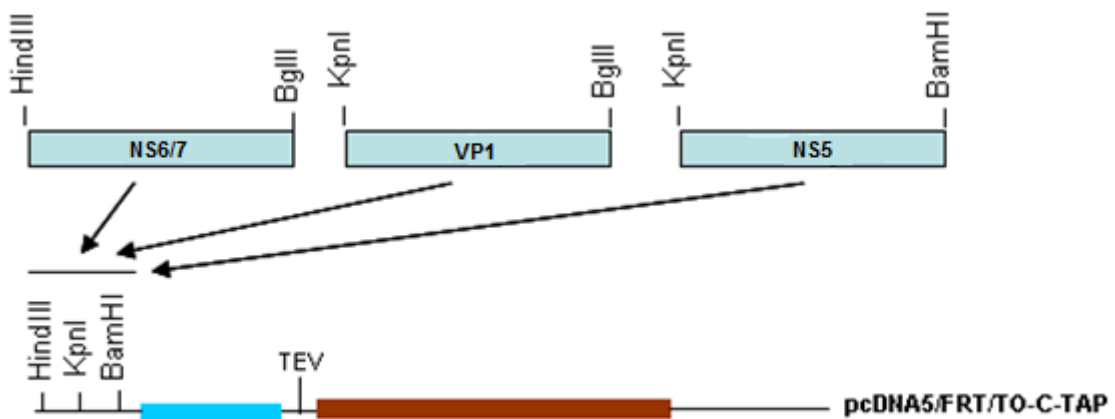


Figura 22: Esquema del procedimiento de clonación de los genes virales en el vector pcDNA5/FRT/TO-C-TAP.

Posteriormente, para confirmar que el plásmido expresaba correctamente la diana para la purificación en tándem se transfectaron 3µg de cada construcción en la línea Flp-InTM T-RexTM-293, como se describe en el apartado 2.13 de materiales y métodos. A las cuatro horas se sustituyó el medio de transfección, por medio de inducción con tetraciclina 1µg/ml. Los cultivos se recogieron a las 24 h eliminando el medio de cultivo y suspendiendo las células en PBS para su centrifugación y recogida. El sedimento de células se analizó mediante electroforesis con SDS para comprobar la expresión de los genes virales y la masa molecular relativa de las proteínas de fusión (35 kDa

para NS5-C-TAP, 96 kDa para NS6/7-C-TAP y 82 kDa VP1-C-TAP) utilizando ensayos *Western-blot* (Figura 23).

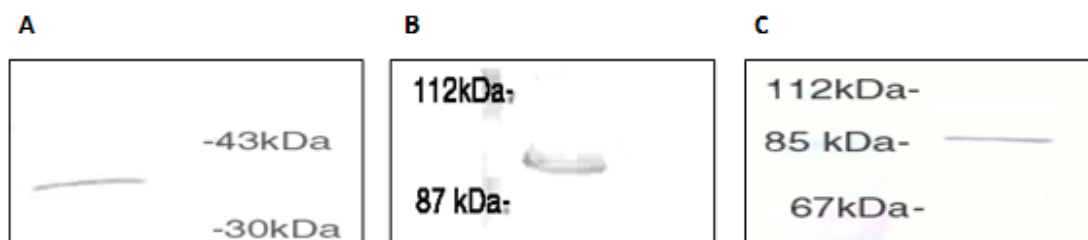


Figura 23: Análisis Western de las fusiones NS5-C-TAP (A), NS6/7-C-TAP (B) y VP1-C-TAP (C) en cultivos inducidos de células Flp-Intm T-Rextm-293 transfectadas transitoriamente con derivados del vector pCTAP que contenían fusionados en pauta de lectura los correspondientes genes virales. Para la detección de las proteínas de fusión se emplearon los anticuerpos anti-NS5, NS6/7 y VP1, descritos en el apartado 2.8 de materiales y métodos.

Para la obtención de recombinantes estables se utilizaron cultivos en placas de 6 pocillos de 10cm², que se transfectaron con 1, 3, 5 y 7 µg de los plásmidos construidos en el punto anterior, en una proporción 1:9 frente al plásmido pOG 44, que aporta el gen de la recombinasa flipasa, Una vez transfectadas las células, en el caso de que se produzca la integración, el inserto interrumpe la expresión de la β-galactosidasa y del gen de resistencia a zeocina, y confiere a las células la resistencia a higromicina. Por ello, se siembra cada monocapa transfectada en cuatro pocillos de 10cm², en presencia de medio de selección. El medio de cultivo se cambia regularmente y tras 10-14 días de selección pueden observarse focos de células que han proliferado a partir de un único clón. Estas colonias se aíslan con una pipeta y se siembran sucesivamente en placas de 24 y 6 pocillos, y posteriormente en frascos de 25 y 75 cm² para su propagación.

Para confirmar la naturaleza de los clones se comprobó su sensibilidad a zeocina y su resistencia a higromicina. Para ello a partir de pocillos de 10 cm² de células Flp-Intm T-Rextm-293 modificadas, 100% confluentes, se rompe la monocapa con tripsina y se recogen el 25% de las células en medio con zeocina y sin higromicina, y otro 25% en medio con higromicina y sin zeocina en pocillos de 10 cm². Pudo comprobarse que todas las células procedentes de los clones seleccionados morían a las 24h en el medio con zeocina (Figura 24A), mientras que en presencia de higromicina alcanzan un alto porcentaje de confluencia (Figura 24B). Se puede observar a mayores aumentos que las

células modificadas cultivadas en medio con zeocina (Figura 24C), adquieren además una morfología anómala, frente a la característica de esta línea celular (Figura 24D) cuando prolifera en medio sin zeocina. Cada uno de estos clones fueron congelados en presencia de DMSO 10%, para su posterior uso.

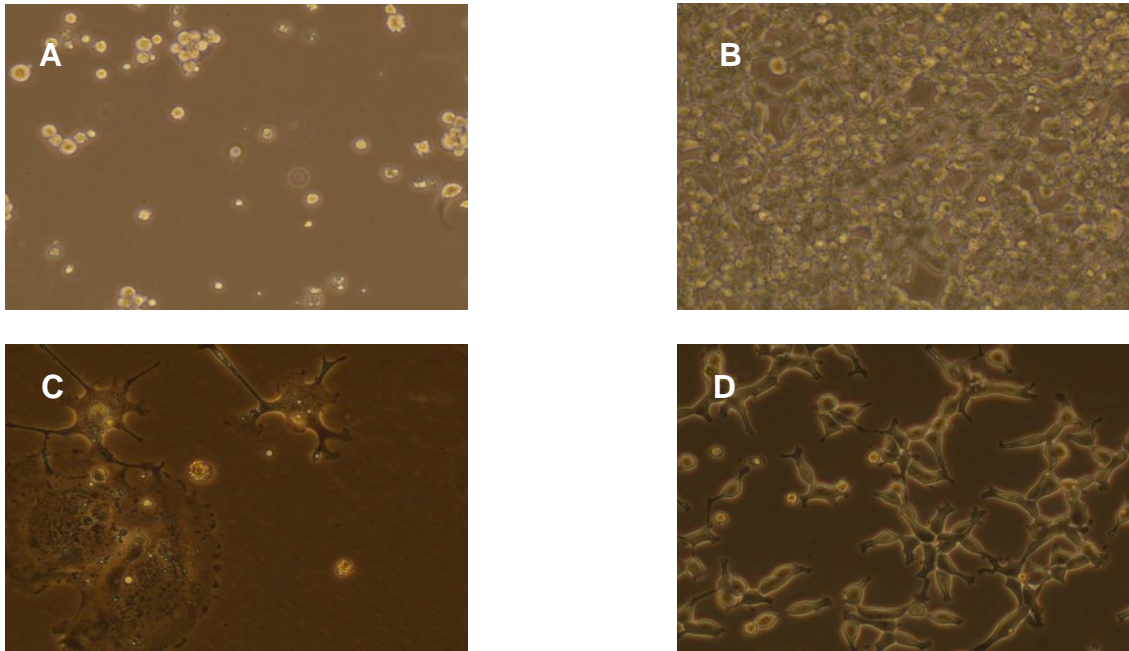


Figura 24: Cultivos de células Flp-InTm T-RexTm-293 modificadas establemente con el plásmido pNS5-CTAP en presencia de 100 µg/ml Zeocina (A, C) o en medio sin zeocina conteniendo 100 µg/ml de Higromicina (B, D). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de contraste de fases a 200 (A, B) o 400 aumentos (C, D).

Asimismo, se comprobó la presencia de la proteína de fusión recombinante mediante ensayos *Western-blot* en aquellas líneas celulares que fueron seleccionadas. De este modo se pudo constatar que los cultivos inducidos producían las proteínas correspondientes con el tamaño esperado para NS5-C-TAP (35 kDa), NS6/7-C-TAP (96 kDa) y VP1-C-TAP (82 kDa) (Figura 25) frente a aquellos cultivos no inducidos.

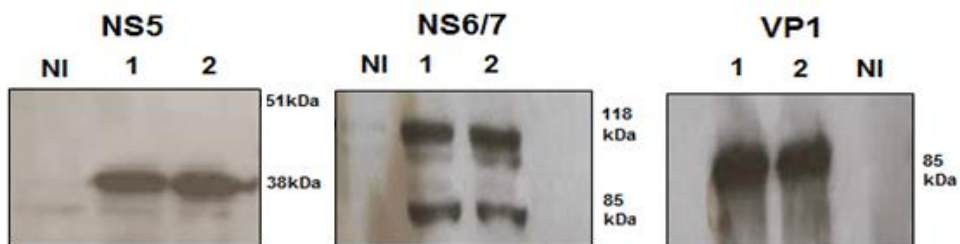


Figura 25: Análisis Western-blot de líneas celulares establecidas que expresan (A) NS5-C-TAP; (B) NS6/7-C-TAP; (C) VP1-C-TAP. Cultivos inducidos con tetraciclina durante 48 horas (1 y 2). Cultivos no inducidos (NI).

También se comprobó la cinética de inducción de los transgenes utilizando las líneas para conocer el período de inducción óptimo, tras el cual realizar las purificaciones en tándem por afinidad. Para ello, como se muestra para las células que expresan de manera inducible la fusión VP1-C-TAP (Figura 26), se añadió el medio de inducción a cultivos celulares y se recogieron muestras de las células a las 8, 12, 24, 36 y 48 horas.



Figura 26: Análisis *Western-blot*, de la expresión de la proteína VP1-C-TAP en la línea establecida. Siendo, no inducidas (NI), inducidas durante 8h., 12h., 24h., 36h. y 48h.

Tras comprobar que se consigue expresar los productos virales fusionados a C-TAP y que los tamaños son los correctos, se investigó en qué fracción celular se localiza la proteína.

Para comprobar que las proteínas recombinantes se sintetizan en el citoplasma, se llevó a cabo un ensayo de localización por inmunofluorescencia. Para ello se cultivan células de cada una de las líneas en superficies de 0,7cm², se indujeron la mitad de los pocillos para la expresión de la proteína de fusión, y los restantes se tomaron como control de no inducción. Se fijaron las células y se trataron como se describe en materiales y métodos. Cada una de las líneas se incubó con anti-suero específico contra la proteína viral, y con sueros no específicos en células inducidas y no inducidas y se observaron las preparaciones al microscopio de fluorescencia (Figura 27). En todos los casos se encontró fluorescencia sólo en aquellas células que habían sido inducidas, tanto en las células analizadas con suero específico para la proteína viral, como en las incubadas con un suero inespecífico. Este último resultado puede ser debido a reacciones de los anticuerpos con la proteína A presente en la etiqueta peptídica C-TAP de todas las construcciones analizadas. Se observó que las células modificadas para producir la proteína de fusión NS6/7-C-TAP presentaban un deterioro evidente durante el período de inducción con tetraciclina.

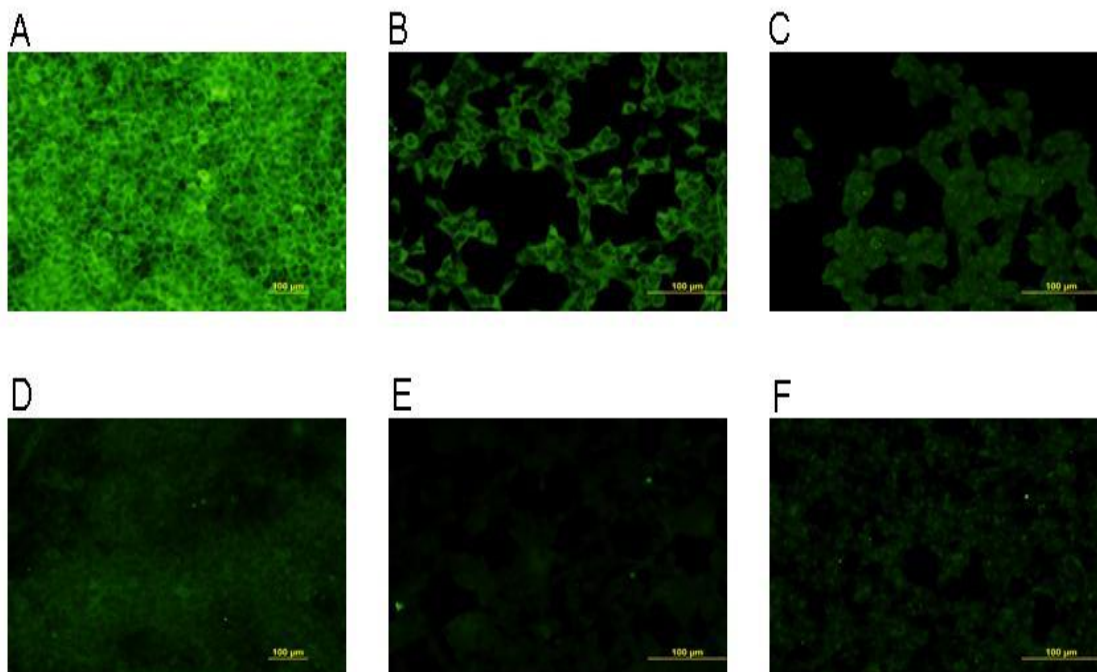


Figura 27: Análisis de inmunofluorescencia en las líneas que expresan NS5-C-TAP (A, D), VP1-C-TAP (B, E) y NS6/7-C-TAP (C, F) en células inducidas (A, B, C) y no inducidas (D, E y F) a 200 aumentos. Se incluye la barra que indica tamaño (100 µm)

En las muestras donde se detectó fluorescencia se tomaron imágenes a mayor aumento para observar la localización de las proteínas de fusión. Si bien se pudo visualizar la localización citoplasmática de NS5-C-TAP y VP1-C-TAP (se muestra esta última en la figura 28), en las células con NS6/7-C-TAP no se pudo observar esta diferenciación debido a la baja señal y el deterioro celular encontrado (datos no mostrados).

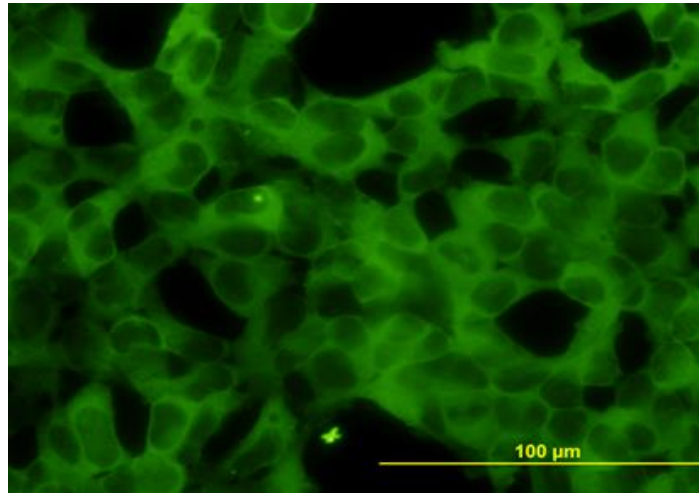


Figura 28: Detalle de la localización celular de VP1-C-TAP. Imágenes tomadas a 400 aumentos.

2.2 Cromatografía de afinidad en tándem de las fusiones NS5-C-TAP y VP1-C-TAP e identificación de las interacciones con proteínas celulares

Inicialmente se han escogido las construcciones NS5-C-TAP y VP1-C-TAP y se ha descartado la línea que expresa la proteína recombinante NS6/7-C-TAP debido a las anomalías que muestran las células en cultivo cuando son inducidas para expresar dicha fusión. Estas alteraciones no reproducen los cambios morfológicos observados en el efecto citopático del RaV, y seguramente se deban a la actividad de la proteína NS6/7 del RaV que, al estar activa, pueda afectar a componentes celulares y perjudicar al desarrollo y división de la línea celular.

Los extractos se obtienen como se describe en materiales y métodos, tras la inducción durante 48 horas de las células. Aunque inicialmente la inducción se realiza con tetraciclina, en análisis posteriores se decide utilizar la doxiciclina una vez comprobada su igual eficacia en la inducción de la expresión de las proteínas recombinantes. La razón es la mayor estabilidad de la doxiciclina en períodos de incubación superiores a 24 horas que permite mantener constantes las condiciones del cultivo celular.

Para llevar a cabo la purificación de los complejos proteicos se empleará la técnica de la purificación por afinidad en tándem (Rigaut *et al.*, 1999), a partir de las modificaciones introducidas por Jorba y colaboradores en 2008. En este caso concreto se emplean como etiquetas peptídicas la proteína A y el péptido

CBP separadas por una secuencia diana para la proteasa del virus TEV. El eluido obtenido de los dos pasos de cromatografía de afinidad se analiza electroforéticamente con el objetivo de obtener el perfil de proteínas que interaccionan con NS5 y VP1 y se seleccionan para su identificación aquellas bandas que muestran una interacción diferencial (Figura 29) con las fusiones que incluyen NS5 o VP1 respecto a un control que expresa únicamente la etiqueta peptídica C-TAP.

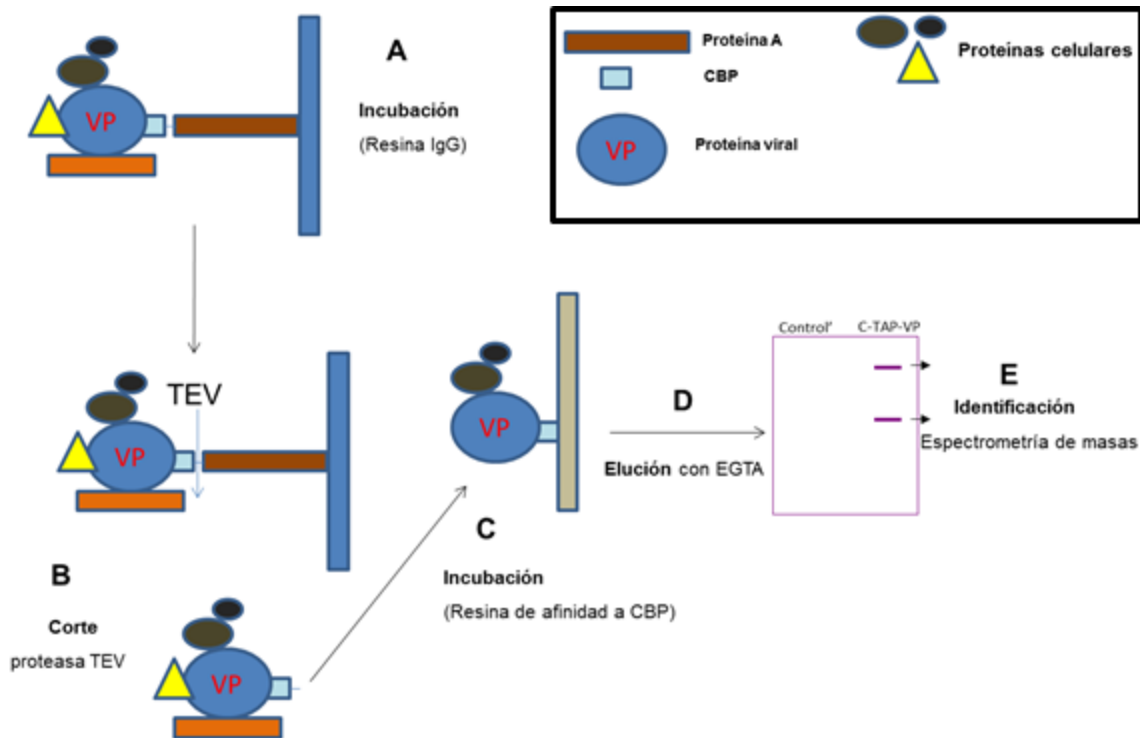


Figura 29: Esquema de la purificación por afinidad en tándem (TAP) para la identificación de proteínas celulares que interaccionan con las proteínas virales. (A) Incubación de los extractos celulares con resina de sefarosa-IgG. (B) Elución de complejos proteicos tras el corte con la proteasa TEV. (C) Incubación de los eluidos con matriz de calmodulina activada. (D) Elución con EGTA y análisis electroforético de los eluidos. Las bandas de interés son identificadas por espectrometría de masas (E).

En los primeros ensayos se detecta la presencia de las proteínas recombinantes en los extractos celulares, pero no se consiguen detectar en el sobrenadante obtenido tras el corte con la proteasa TEV de los productos procesados, ni se detectan proteínas en los eluidos en tampón de muestra de la matriz de sefarosa-IgG al ser analizados electroforéticamente y tras las tinciones con azul de coomassie o SYPRO.

Estas observaciones podrían deberse a que la proteasa TEV no estaba procesando los productos de fusión. Por otro lado, no se consigue recuperar

tampoco proteínas unidas a la matriz de sefarosa-IgG, bien por problemas con los límites de detección o la cantidad de material de partida, porque no se estaban formando uniones durante la incubación o porque se estaban perdiendo las interacciones durante los lavados.

Para solucionar la limitación en la cantidad inicial de proteína se aumentó la superficie celular inducida. El material de partida se fue escalando hasta que se partió de 500µl de extracto celular obtenido a partir de frascos de 150cm² como se indica en materiales y métodos, con un rendimiento medio de 3µg/µl. El límite de detección se consideró la observación de bandas cuando se realizaba tinción por SYPRO, dado que el nivel de detección de proteína de esta técnica está muy próximo al límite de detección necesario para la posterior identificación por espectrometría de masas. Una vez se detectaron mediante análisis SDS-PAGE y tinción con SYPRO las proteínas unidas a la matriz de sefarosa-IgG se hace necesario optimizar el rescate de los complejos tras los lavados y el corte con la proteasa TEV.

Las técnicas que se estaban empleando incluían múltiples pasos de lavado con el objetivo de reducir las uniones inespecíficas. Dichos lavados podrían estar creando condiciones que generaran dificultades para la purificación de los complejos de proteínas por lo que se hicieron modificaciones en el número de lavados y en las condiciones de corte para la proteasa TEV, realizando la incubación con la proteasa durante 3 horas a temperatura ambiente en lugar de 12 horas a 4°C.

Una vez realizada la cromatografía por afinidad en tándem y recogidas las muestras de las resinas y los eluidos en todos sus pasos para el seguimiento del proceso, se comprobó que para el producto VP1-C-TAP el corte con la proteasa TEV era correcto y que se recuperaba una cantidad significativa de proteína procesada que permitía continuar con la segunda purificación y detectar el producto CBP-VP1 en el eluido final (Figura 30).

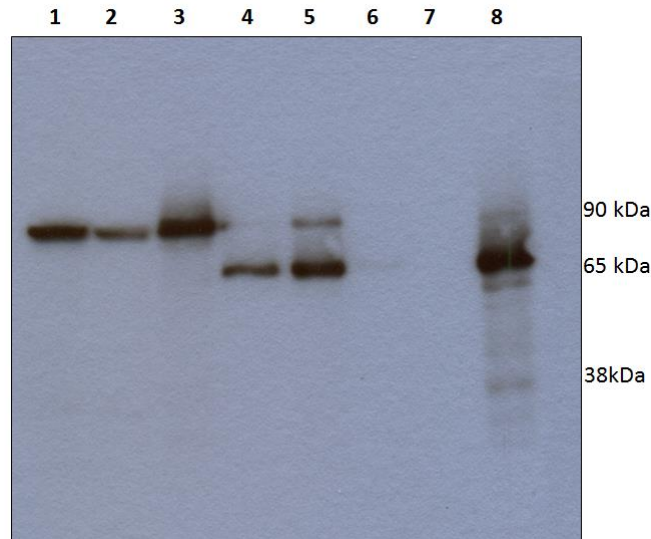


Figura 30: Análisis Western-blot utilizando anticuerpos anti-VP1 de muestras de los distintos pasos de la purificación por afinidad en tándem para la proteína de fusión VP1-C-TAP;: 1- Extracto celular inicial; 2- Sobrenadante no unido a la matriz de IgG; 3- Material unido a la matriz de IgG antes del corte con la proteasa TEV; 4- Eluido después del corte con la proteasa TEV; 5- Muestra de la matriz de IgG tras el corte con la proteasa TEV; 6- No pegado a la matriz de calmodulina; 7- Resina de afinidad a calmodulina después de eluir con EGTA; 8- Eluido final tras la elución con EGTA.

Sin embargo, a la hora de detectar las proteínas recogidas se detecta una señal muy débil en la tinción con SYPRO del análisis electroforético de los eluidos obtenidos tras el corte con la proteasa TEV (cuando se carga 1/10 parte del volumen total) y una ausencia de señal en el eluido final tras realizar los dos pasos de purificación (datos no mostrados). Para conseguir mejores niveles de detección, se decide liofilizar el volumen total del eluido obtenido tras el corte con la proteasa TEV, se resuspende y se centrifuga el contenido seco en tampón de muestra para el análisis electroforético, obteniendo de ese modo un patrón de bandas analizable.

Con el objetivo de identificar las uniones que son específicas de la VP1, se utiliza una línea celular basada en el sistema Flp-InTmT-RexTm-293 que expresa de forma inducible la etiqueta peptídica C-TAP como control. Se induce en dicha línea la expresión del péptido C-TAP y se recogen los extractos celulares que son sometidos a los mismos pasos que el producto VP1-C-TAP durante la purificación por afinidad en tándem. Se recupera el eluido final de ambas purificaciones, se liofiliza para concentrar la cantidad de proteína y se analizan electroforéticamente de forma conjunta (Figura 31). Se

observa el patrón de bandas y se seleccionan aquellas presentes en el eluido de la purificación del producto VP1-C-TAP que no están presentes en el control.

Se pudieron observar claras diferencias en el patrón de bandas para ambas muestras, de manera que no se identificó ninguna proteína purificada junto con la etiqueta C-TAP. En el caso de las proteínas recuperadas en el eluido de la purificación de VP1-C-TAP no todas pudieron ser identificadas, seguramente debido a que la cantidad de proteína de la muestra estaba por debajo del límite de detección del análisis por espectrometría de masas.

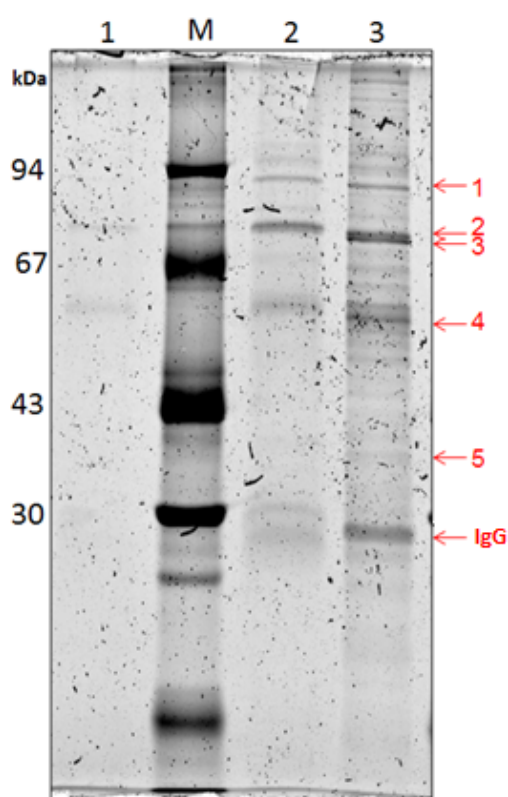


Figura 31: Análisis electroforético SDS-PAGE y tinción con SYPRO de las muestras eluidas de las resinas incubadas con extractos celulares que expresan la proteína de fusión C-TAP (1) y VP1-C-TAP (2 y 3). En las calles 1 y 3 se carga el eluido una vez liofilizado, conteniendo el total de proteína purificada. Las flechas y números en rojo indican las bandas donde se identificaron proteínas celulares por espectrometría de masas. Se indica también una sexta banda donde se identificó la IgG.

Se identificaron un total de siete proteínas en seis bandas. Seis de esas proteínas lo fueron en las bandas numeradas en la figura 31, incluida la VP1 del RaV (identificada conjuntamente en la banda número 3), y las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas (de 25 kDa), empleadas en la primera matriz

cromatográfica, en la banda identificada como IgG (Figura 31). En la tabla 7 aparecen indicadas las proteínas celulares identificadas.

Entre las proteínas identificadas se encuentran las proteínas de choque térmico, con función de chaperonas moleculares, HSP90, HSPA1A y HSPA1B.

También se ha identificado la tubulina beta (TUBB), una proteína que forma parte de los microtubulos, asociada a funciones estructurales y de transporte celular. Tanto las proteínas HSP90, HSPA1A y HSPA1B como la TUBB, tienen localización citoplásmica, coherente con la localización observada para el producto VP1-C-TAP.

Banda	GI	Acrónimo	Proteína	MW (kDa)	Score
1	119602173	HSP90	Heat shock protein 90kDa	90	74
2	167466173	HSPA1B	Heat shock 70kDa protein 1B	70	967
3	386785	HSPA1A	Heat shock protein	70	197
4	18088719	TUBB	Tubulin, beta	49	354
5	47939618	hnRNPA1	HNRNPA1 protein	35	86

Tabla 7: Proteínas identificadas tras la purificación por afinidad en tándem de la proteína recombinante VP1-C-TAP, donde se indica el número de la banda (Figura 31) a la que corresponde cada identificación, el código de acceso de la proteína en las bases de datos del NCBI (GI), el nombre de las mismas y su masa molecular estimada (MW) y el valor estadístico de la identificación por espectrometría de masas (Score).

La hnRNPA1 es una proteína de unión a RNA, implicada en el procesamiento y transporte al citoplasma de los RNA mensajeros celulares a través de su unión a la cola de poli-A, siendo su localización variable entre el núcleo y el citoplasma.

En el caso de la purificación en tándem de la proteína recombinante NS5-C-TAP, se consiguió recuperar el producto procesado CBP-NS5 tras el corte con la proteasa del virus TEV (Figura 32), pero no se detecta la proteína en los siguientes pasos de purificación, desarrollada en los mismos términos y condiciones que con el producto VP1-C-TAP.

En este caso, se observa una pérdida progresiva de la cantidad de proteínas retenidas en la matriz de IgG, seguramente debido al número de

lavados. El corte con la proteasa TEV procesa la fusión NS5-C-TAP correctamente obteniéndose el producto del tamaño esperado pero éste no se une a la matriz por afinidad a calmodulina.

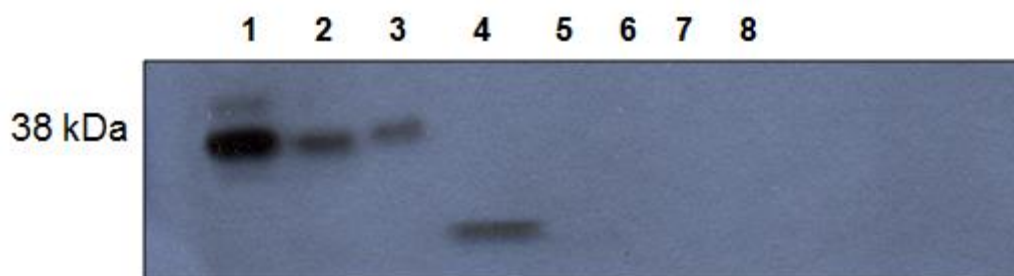


Figura 32: Análisis Western-blot utilizando anticuerpos anti-NS5 del RaV de muestras de los distintos pasos de la purificación por afinidad en tándem para la proteína de fusión NS5-C-TAP;: 1- Extracto celular inicial; 2- Sobrenadante no unido a la matriz de IgG; 3- Unido a la matriz de IgG antes del corte con la proteasa TEV; 4- Eluido del corte con la proteasa TEV; 5- Muestra de la matriz de IgG tras el corte con la proteasa TEV; 6- No pegado a la matriz de afinidad a calmodulina; 7- Resina de afinidad a calmodulina después de eluir con EGTA; 8- Eluido final tras la elución con EGTA.

Tras reducir el número de lavados y modificar las condiciones de tiempo y temperatura de incubación en el segundo paso de purificación, no se detecta la presencia de NS5 en los pasos sucesivos al corte con la proteasa.

Finalmente, debido a las dificultades descritas anteriormente, se decide realizar la cromatografía de afinidad a IgG, tanto para la fusión NS5-C-TAP como para el control C-TAP, tal y como se indica en materiales y métodos, y recoger y analizar únicamente el eluido obtenido tras el corte con la proteasa del TEV. De esta forma se podrían estar recogiendo uniones no específicas, pero se consigue detectar la presencia de la proteína NS5 en la purificación.

De igual forma que se ha hecho con la purificación en tándem de la proteína VP1-C-TAP, los eluidos recogidos son liofilizados para analizar electroforéticamente todo el contenido proteico. Dado que se observaron problemas en la detección, se decide realizar una tinción con plata compatible con la espectrometría de masas (Figura 33) y se analizan aquellas proteínas presentes en la muestra obtenida tras el corte del producto NS5-C-TAP con la proteasa del virus TEV que no están presentes en el control copurificado con la etiqueta C-TAP.

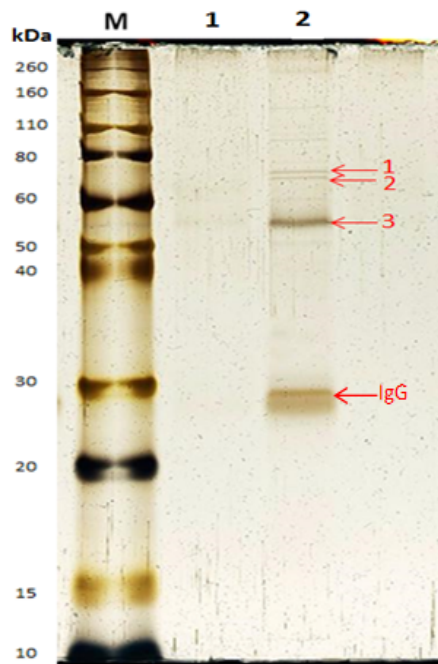


Figura 33: Análisis electroforético SDS-PAGE y tinción con plata de las muestras eluidas de las resinas incubadas con extractos celulares que expresan la proteína de fusión C-TAP (1) y NS5-C-TAP (2). Se carga el eluido una vez liofilizado, conteniendo el total de proteína purificada. Las flechas y números en rojo indican las bandas donde se identificaron proteínas celulares por espectrometría de masas. Se indica también una cuarta banda donde se identificó la IgG.

Se pudieron identificar en conjunto cuatro proteínas, tres de ellas en las bandas numeradas de la figura 33 y una cuarta en la banda que aparece por debajo del marcador de 30kDa, denominada IgG en la figura 33, donde se pueden encontrar las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas de la matriz cromatográfica. Los sobrenadantes se recogieron tras hacer pasar el eluido por una minicolumna que retenía la matriz. Por otra parte no se observó una banda correspondiente al tamaño esperado para la proteína viral NS5 que, sin embargo, se detectó en análisis Western-blot.

Entre las proteínas identificadas (Tabla 8) se encontraron dos chaperonas moleculares, las proteínas HSC70 y HSPA1A, que participan en el plegamiento y estabilización de las proteínas traducidas, así como en los procesos de regulación de la degradación de proteínas por parte del proteosoma.

Al igual que ocurría con los complejos purificados tras el corte con la proteasa de VP1-C-TAP, también se ha co-purificado la TUBB junto con el producto del procesamiento de NS5-C-TAP.

Banda	GI	Acrónimo	Proteína	MW (kDa)	Score
1	119602173	HSC70	Heat shock cognate 71kDa protein	71	600
2	167466173	HSPA1A	Heat shock 70kDa protein 1A/1B	70	423
3	386785	TUBB	Tubulin beta chain isoform B	49	137

Tabla 8: Proteínas identificadas tras la purificación por afinidad en tándem de la proteína recombinante NS5-C-TAP, donde se indica el número de la banda (Figura 33) a la que corresponde cada identificación, el código de acceso de la proteína en las bases de datos del NCBI (GI), el nombre de las mismas y la masa molecular estimada (MW) y el valor estadístico de la identificación por espectrometría de masas (Score).

Si bien es cierto que se ha identificado un número muy bajo de proteínas, aquellas identificadas son claramente específicas de los productos recombinantes NS5-C-TAP y VP1-C-TAP frente al control C-TAP.

De cara al diseño de estudios funcionales sobre la implicación de estas proteínas en la replicación del RaV, se analizaron las funciones descritas para las mismas en la célula eucariota (Figura 34.A) y su interacción con ácidos nucleicos o proteínas de calicivirus y de otras familias virales (Figura 34.B).

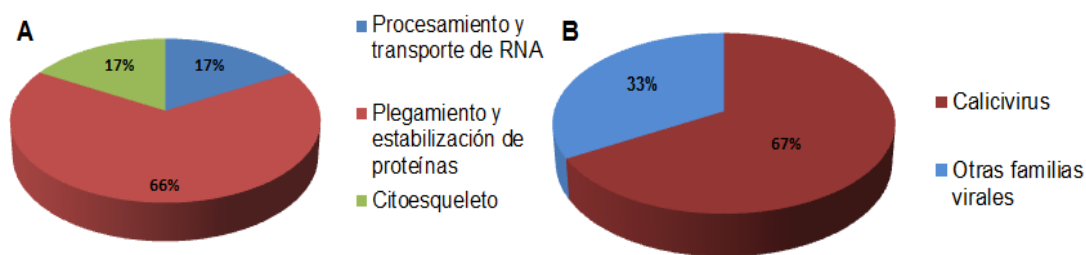


Figura 34: **A-** Gráfico de las funciones celulares desarrolladas por las proteínas identificadas por su interacción con NS5 y/o VP1 del RaV y sus proporciones relativas. **B-** Proporción de proteínas identificadas por su interacción con NS5 y/o VP1 que han sido descritas por su interacción con componentes de otros calicivirus (rojo) y descritas por su interacción con ácidos nucleicos o proteínas de virus pertenecientes a otras familias (azul).

3. Estudio funcional de proteínas que interactúan con elementos del RaV

En los estudios descritos en los apartados anteriores se han identificado varias proteínas que interactúan *in vitro* con los extremos 5' y 3' del genoma del RaV y con las proteínas NS5 y VP1 del mismo. Este escrutinio inicial identifica proteínas que se unen a los elementos virales y puede también incluir proteínas que interactúan con otras proteínas con afinidad por los componentes de RaV.

Con el objetivo de aportar datos adicionales que apoyen o refuten la implicación de las proteínas identificadas en la infección por RaV, es necesario realizar estudios funcionales complementarios.

Se confirman, mediante *Western-blot*, las interacciones de las principales candidatas con los RNAs sintéticos, con el fin de detectar posibles interacciones que pudieran no haber analizadas por espectrometría de masas. El análisis funcional se realizará comparando la producción de partículas infecciosas en presencia y ausencia de la proteína estudiada en cultivos celulares control o silenciados mediante siRNAs específicos para la proteína diana. Conocido el efecto general sobre la infección del RaV, se podrá profundizar en la caracterización funcional y delimitar el mecanismo de acción.

3.1 Selección de proteínas que interactúan con los extremos del genoma del RaV para estudios funcionales

La identificación de proteínas celulares que interactúan con los extremos del genoma del RaV, se realizó teniendo en cuenta los resultados del análisis de espectrometría de masas de las bandas obtenidas al analizar los eluidos de las cromatografías de afinidad a RNA de hasta tres réplicas experimentales empleando extractos citoplasmáticos de la línea celular HeLa S3.

Para proseguir con los estudios funcionales se tuvieron en cuenta aquellas proteínas que habían sido identificadas en al menos dos de las réplicas experimentales con valores estadísticos (score) superiores a 100 y frente a las que hubiera anticuerpos específicos comerciales para realizar los

ensayos funcionales. Considerando estos criterios, se seleccionaron un conjunto de siete proteínas (Figura 35) con capacidad de unión al RNA viral, una vez comprobada la reproducibilidad de su purificación e identificación.

Para este fin, los análisis posteriores al primer cribado se realizaron en geles SDS-PAGE de mayor tamaño, lo que permitió obtener una mayor resolución de las proteínas separadas para su mejor manipulación y procesamiento. De esta forma, se pudo constatar, que todas las bandas cortadas e identificadas mediante espectrometría de masas correspondían a una única proteína y no a un conjunto de ellas.

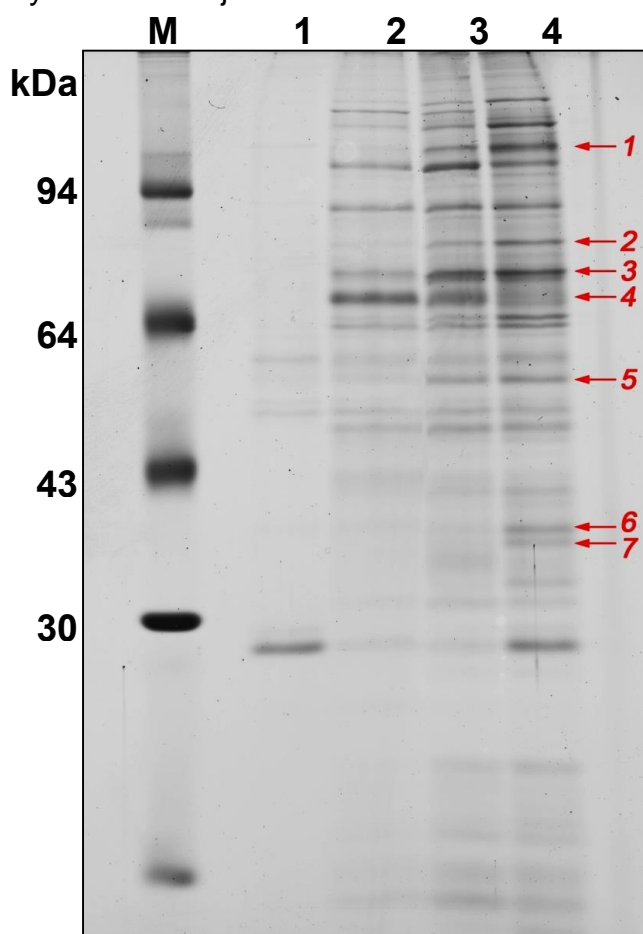


Figura 35: Resultado representativo de un análisis SDS-PAGE de los distintos eluidos obtenidos al incubar extractos de HeLa S3 con diferentes matrices. M: Marcadores; 1: Matriz no incubada con RNA; 2: Matriz incubada con el RNA de 0,45 kb del extremo 5'; 3: Matriz incubada con el RNA de 1,8 kb del extremo 5'; 4: Matriz incubada con el RNA subgenómico .

Las proteínas indicadas en la imagen se seleccionaron para su identificación en función del extremo por el que presentaban mayor afinidad (Tabla 9).

Se observa que 6 de las proteínas: hnRNPU, PABP, hnRNPQ, PTBP1, hnRNPA2/B1 y hnRNPA1 presentan una mayor afinidad por el extremo 3'.

Banda	GI	Proteína	MW (kDa)	Extremo
1	74136883	hnRNPU	91	3'
2	119612222	PABP	70	3'
3	530382972	hnRNPQ	68,5	3'
4	55958544	hnRNPK	51	5'
5	14165466	PTBP1	58	3'
6	4504447	hnRNPA2/B1	37,5	3'
7	47939618	hnRNPA1	35	3'

Tabla 9: Proteínas identificadas por su interacción a RNA, donde se indica el número de la banda (Figura 35) a la que corresponde cada identificación, el código de acceso de la proteína en las bases de datos del NCBI (GI), el acrónimo empleado para cada proteína en este trabajo, (MW) peso molecular estimado y el extremo del genoma por el que presentaban mayor afinidad.

Se pudo confirmar la presencia de estas proteínas en los eluidos resultantes de realizar cromatografías de afinidad a RNA con extractos citoplasmáticos de HeLa S3 y HEK 293T, mediante ensayos Western-blot empleando anticuerpos específicos (Figura 36).

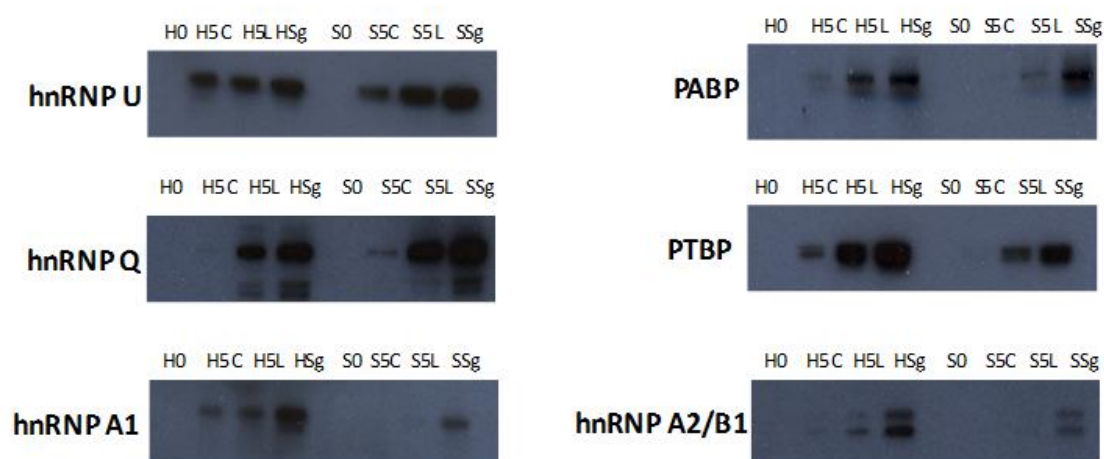


Figura 36: Análisis Western-blot utilizando en cada caso los anticuerpos contra la proteína indicada. Las calles indican si se utilizaron extractos de HEK 293T (H) o HeLa S3 (S) y el RNA con el que se incubaron, siendo una matriz sin RNA (0), el fragmento de 0,45kb del extremo 5' (5C), el 1,83kb del extremo 5' (5L) o el sgRNA (Sg).

Como se observa (Figura 36), a pesar de que todas las proteínas estudiadas han sido identificadas inicialmente por su capacidad de unión específica al extremo 3' del genoma del RaV, la mayoría de ellas también interaccionan con el extremo 5'. Únicamente la proteína hnRNPA2/B1 mostró tener mayor preferencia por su unión al extremo 3'. Los resultados del análisis de las interacciones en ambas líneas celulares fueron similares aunque en el caso de las proteínas PABP y hnRNPA1, se observan diferencias según la línea celular utilizada, siendo más intensa la interacción con el extremo 3' cuando se emplean extractos de HeLa S3.

A partir de estos resultados, se seleccionó la proteína PABP como uno de los candidatos para la realización de estudios funcionales complementarios. Adicionalmente se tuvo en cuenta para esta selección la función de la PABP como proteína reguladora de la traducción en eucariotas y picornavirus, su especificidad por el extremo 3' del RaV y su procesamiento por parte de la actividad proteasa NS6 en otros miembros de la familia calicivirus.

De un modo similar a lo descrito anteriormente se analizaron los eluidos obtenidos de las cromatografías de afinidad a RNA para comprobar molecularmente la especificidad de la hnRNPK por el extremo 5' y su afinidad en función de la línea celular (Figura 37).

En el análisis Western-blot se observa que la interacción es específica entre la hnRNPK y los RNAs sintéticos que poseen la secuencia del extremo 5' del genoma del RaV. Esta interacción, además, se encuentra cuando incubamos dichos RNAs con extractos citoplasmáticos de HeLa S3 mientras que tras la incubación con extractos de HEK 293T no se detecta hnRNPK en el eluido final (Figura 37).



Figura 37: Análisis Western-blot utilizando los anticuerpos anti-hnRNPK. 1– Eluido de la cromatografía con extractos de HEK 293T y sin RNA en la matriz; 2- con RNA de 0,45 kb del extremo 5'; 3- con RNA de 1,8 kb del extremo 5'; 4- con RNA subgenómico; 5- Eluido de la cromatografía con extractos de HeLa S3 y sin RNA en la matriz; 6- con RNA de 0,45 kb del extremo 5'; 7- con RNA de 1,8 kb del extremo 5'; 8- Con extractos de HeLa S3 con una matriz con RNA subgenómico

La especificidad de la hnRNPK por el extremo 5' del genoma del RaV y la falta de datos publicados sobre el papel de esta proteína en la infección viral fueron los criterios utilizados para seleccionar esta proteína para realizar estudios funcionales complementarios.

3.2 Estudio funcional de la proteína PABP

La estrategia que se empleará consistirá en la supresión de la expresión de la proteína mediante la inactivación de los RNAs mensajeros, utilizando la técnica de silenciamiento génico, Las transfecciones de siRNAs se llevarán a cabo inicialmente tanto en células HeLa S3 como en células HEK 293T por ser las líneas donde se realizaron las identificaciones y la confirmación molecular. Las transfecciones de los siRNAs específicos para la PABP se llevaron a cabo como se indica en materiales y métodos.

Se empleó un control negativo donde se añadirá un siRNA testado que no produce el silenciamiento inespecífico de genes celulares y al que llamaremos siRNA irrelevante. De esta forma se podrá evaluar la toxicidad de la técnica, no asociada al silenciamiento de proteínas celulares, y diferenciar el efecto causado por el silenciamiento específico de la PABP.

Inicialmente se realizaron las pruebas sobre monocapas de células HEK 293T en superficies que fueron previamente recubiertas de polilisina para facilitar la adherencia y evitar la separación de la monocapa durante los pasos de lavado y cambio de medio. En los primeros ensayos se utiliza el par de

siRNAs que denominamos PA-1, descritos en el apartado 1.8 de materiales y métodos. Se pretende encontrar las condiciones adecuadas para reducir en el mayor grado posible la expresión de la proteína PABP.

Con este objetivo, se transfectan monocapas de HEK 293T en pocillos de 10cm² como se describe en materiales y métodos, con concentraciones de 25nM de los siRNAs irrelevante y PA-1. A las 48 horas después de la transfección, se recogen y siembran la mitad de las muestras para realizar una segunda transfección con las mismas especies de siRNA a una concentración de 15nM. El objetivo es comparar los niveles de silenciamiento con la realización de uno o dos pasos de transfección y la evolución temporal.

Se recogen las células transfectadas a las 48, 72 y 96 horas post transfección (h.p.t), se extrae el RNA total y se cuantifica. Se igualan las concentraciones de RNA total y se parte de la misma cantidad para la realización de la RT-PCR, los cDNAs obtenidos se analizan mediante PCR cuantitativa empleando las sondas Taqman descritas en el apartado 1.8 de materiales y métodos. De esta manera, las condiciones iniciales están proporcionadas y la cantidad de DNA cuantificado indicará la medida de las cantidades relativas de mRNA de la PABP presentes en cada muestra. Las cantidades obtenidas de las muestras tratadas con el siRNA irrelevante se consideran las condiciones para un 100% de expresión (Figura 38).

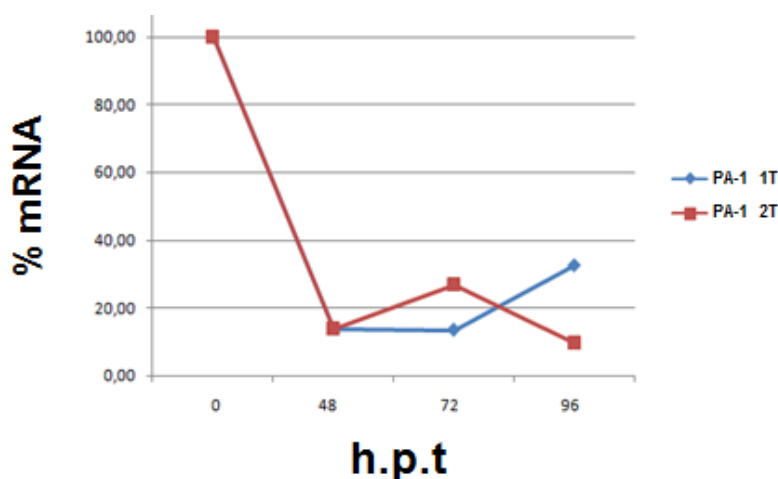


Figura 38: Cantidad relativa de mRNA de la PABP en las células transfectadas con siRNAs específicos (PA-1) respecto al mRNA de la misma proteína en células HEK 293T transfectadas con siRNA irrelevante a las 0, 48, 72 y 96 horas post transfección (h.p.t). Las líneas indican los valores medios de las réplicas en las que se realiza una sola transfección (azul 1T) o dos transfecciones (rojo 2T).

Se observa una reducción drástica en la presencia de mRNAs productoras de la proteína PABP a las 48 h.p.t y se mantiene hasta las 72 horas en porcentajes entre el 10 y el 20% del total expresado por las células transfectadas con el siRNA irrelevante. Tras las 96 horas, la reducción sólo se mantiene en aquellas células donde se ha realizado un segundo proceso de transfección de siRNAs.

El objetivo es estudiar cómo la ausencia de la PABP afecta a la infección por RaV, de manera que se recogen muestras para el análisis proteico en todos los puntos. El análisis Western-blot con anticuerpos anti-PABP y anti- β -actina como control de carga no reveló ninguna diferencia en cuanto a la cantidad de PABP en las células tratadas respecto al control a las 48, 72 y 96 h.p.t (datos no mostrados). Por este fenómeno, y porque los cultivos de células HEK 293T mostraban un deterioro de la monocapa y aspecto anómalo que dificulta su manipulación, se decide emplear la línea HeLa S3 en futuras transfecciones.

Para optimizar el silenciamiento, se emplearon los silenciadores descritos como PA-1 y PA-2 (#1 y #2, respectivamente, en figura 39) además del siRNA irrelevante (Neg en figura 39). Se realizó un solo paso de transfección empleando dos concentraciones distintas (25 y 50nM) y se recogieron muestras para el análisis de proteínas a las 48, 72 y 96 h.p.t.

El análisis Western-blot reveló un silenciamiento significativo en las muestras transfectadas a una concentración de 50 nM, alcanzando el máximo silenciamiento a las 72 h.p.t. (Figura 39), mientras que los silenciamientos realizados con concentraciones de 25nM, mostraron niveles de expresión ligeramente inferiores a los alcanzados en HEK 293T. No obstante, no se mostró deterioro de los cultivos celulares transfectados por inspección microscópica, ni se observaron diferencias de viabilidad con cultivos no transfectados cuando se analizaron los cultivos mediante el test con MTT (datos no mostrados).

Los niveles de expresión se cuantificaron mediante el programa informático del analizador Odyssey y empleando como control de carga los niveles de β -actina para corregir las posibles diferencias debidas a errores de carga de las muestras analizadas.

Se observa una importante reducción de la expresión cuando el silenciamiento se realiza empleando concentraciones de 50nM de los silenciadores PA-1 y -2, obteniéndose disminuciones entre el 65 y el 80% de la expresión basal de PABP.

Para estudiar el efecto que el silenciamiento de la expresión de PABP tiene en la infección del RaV, se utilizarán dichas condiciones para la transfección de los siRNAs.

Las infecciones con el RaV se realizaron por triplicado a las 56 h.p.t. a una m.o.i de 0,1 y se analizó la producción viral en punto final a las 16 horas post infección (h.p.i), siendo 72 h.p.t, para todos los tratamientos. De esta manera tanto la infección como la recogida tienen lugar en períodos donde se mantiene el silenciamiento de la PABP.

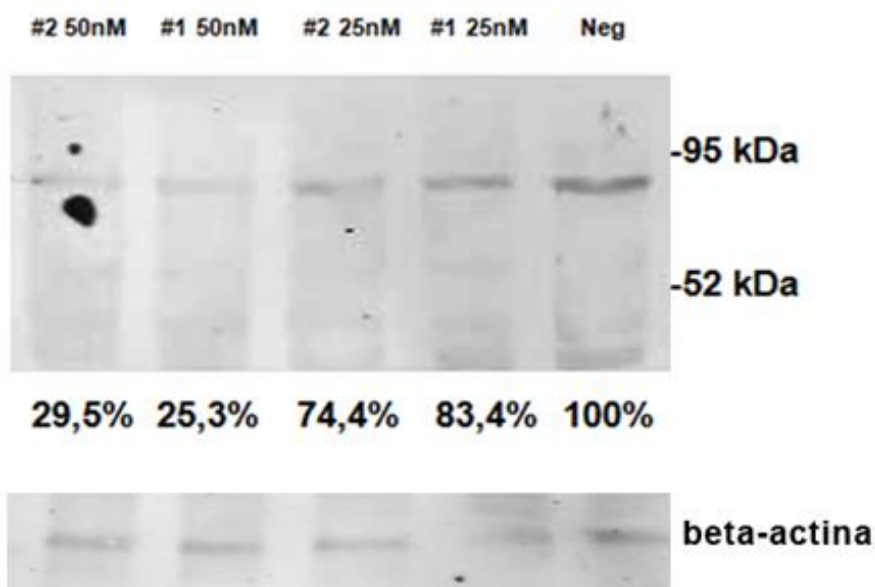


Figura 39: Western-blot con anticuerpos anti-PABP en HeLa S3 silenciadas con los siRNA irrelevante a 50nM (Neg) y los siRNA (25 y 50nM) frente a PABP (#1 y #2) a las 72h.p.t.. Los porcentajes relativos de expresión respecto a células control se estandarizaron utilizando anticuerpos anti- β -actina. La imagen muestra un experimento representativo.

Se emplea una m.o.i de 0,1 para aumentar la posibilidades de ver diferencias entre los distintos tratamientos. Los sobrenadantes recogidos de las células infectadas tras los tramientos con los siRNAs irrelevantes y anti-mRNA

de la PABP, se recogen para el análisis del título viral en células Vero mediante el método de TCID₅₀ (Tabla 10).

Se observa que la reducción de la expresión de la PABP tiene un efecto negativo sobre la replicación del RaV, lo que parece indicar que la proteína es necesaria para el desarrollo eficiente de la infección. Concretamente se observa una reducción del título viral de entre 1 y 1,5 unidades logarítmicas respecto a las células tratadas con un siRNA irrelevante, lo que equivale a reducciones superiores al 90% en el título viral.

Los experimentos fueron realizados por triplicado y, como se observa en los datos de desviación típica y coeficiente de variación, se reprodujeron sin diferencias significativas.

Título viral a 16 h.p.i (0,1 m.o.i)

siRNA	Promedio (log TCID ₅₀ /ml)	Desviación típica	Coficiente de variación (%)
Irrelevante	6,57	0,1	2,06
PA#1	5,56	0,2	2,83
PA#2	5,05	0,1	3,02

Tabla 10: Título viral de los sobrenadantes recogidos a las 16 horas tras la infección con RaV en células transfectadas con siRNA Irrelevante (Irrelevante), siRNA PA-1 (PA#1) y siRNA PA-2 (PA#2). Se indican los valores promedio de las titulaciones, las desviaciones típicas y los coeficientes de variación. Los datos representados muestran el análisis de tres réplicas experimentales.

Durante la infección por RaV, la proteína PABP, de localización citoplasmática, podría sufrir modificaciones en forma de relocalización celular, modificación de la expresión o procesamiento. Para estudiar estas posibilidades, se preparó un ensayo de inmunofluorescencia para analizar la localización y expresión de la proteína PABP durante la evolución de la infección.

La localización celular de la PABP durante la infección se investigó empleando simultáneamente anticuerpos de conejo anti-PABP y anticuerpos de cobaya anti-RaV y, posteriormente, secundarios anti-conejo (rojo) y anti-cobaya (verde). Se toman muestras de células no infectadas (0 h.p.i), infectadas a las 4 h.p.i y células infectadas a las 8 h.p.i. con una m.o.i de 5, y se observan las células en un microscopio de fluorescencia comparando la misma imagen bajo

filtros para detectar la fluorescencia roja (correspondiente a la detección de la PABP) y verde (RaV) (Figura 40).

En las imágenes se observa la localización citoplasmática de la PABP, que no se modifica durante las 8 horas de infección. Sin embargo, se produce una pérdida de la señal en estadios tardíos de la infección que puede ser debida a la degradación de la proteína. La expresión de proteína viral aumenta progresivamente durante el desarrollo de la infección y se localiza en el citoplasma de las células HeLa S3, indicando por tanto que tanto la producción de proteínas virales como la localización y posible degradación de la PABP tienen lugar en el mismo compartimento celular.

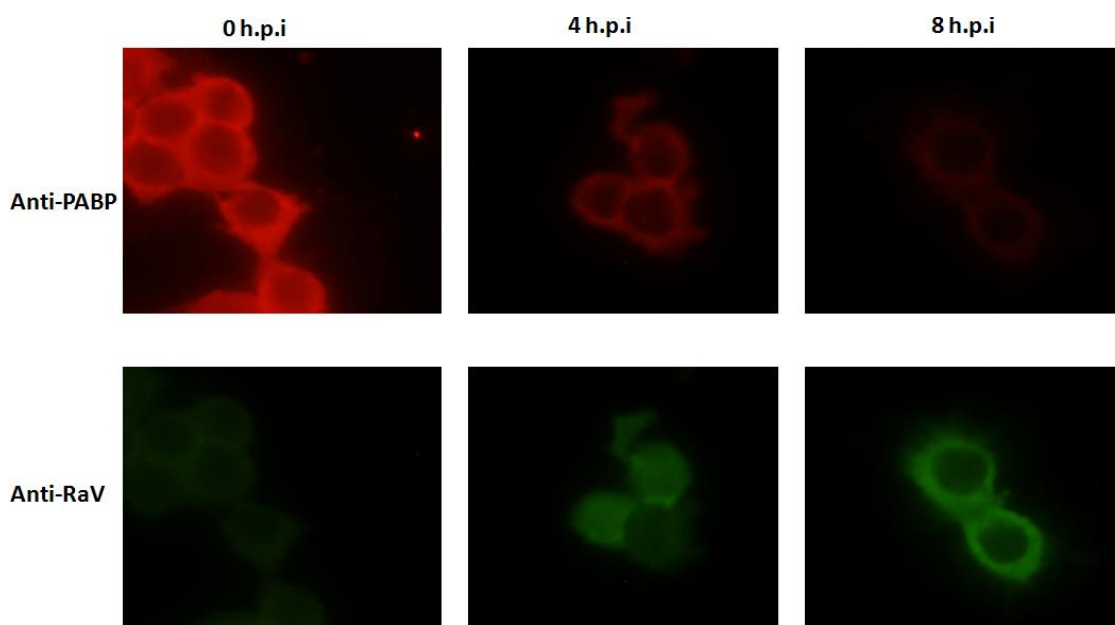


Figura 40: Análisis de inmunofluorescencia en células infectadas con RaV a las 0, 4 y 8 h.p.i., empleando anticuerpos de conejo anti-PABP, anticuerpos de cobaya anti-RaV y secundarios anti-cobaya (rojo) y anti-cobaya (verde). Imágenes tomadas a 400 aumentos.

3.3 Estudio funcional de la proteína hnRNPK

En el caso de la proteína hnRNPK, observamos una clara diferencia en cuanto a su interacción con los extremos del genoma del RaV y en función de la línea celular de manera que no se observa la interacción en HEK 293T y en HeLa S3 sólo ocurre con el extremo 5' del genoma.

Para investigar si esta interacción es específica del extremo 5' del RaV se produce, mediante transcripción *in vitro*, un RNA biotinilado sintético correspondiente al mRNA del gen de la luciferasa (De 1,8 kb), se realiza una

cromatografía de afinidad de extractos citoplasmáticos de HeLa S3 a este RNA y se compara el eluido obtenido con aquellos obtenidos cuando se emplean los mismos extractos para estudiar la afinidad a RNAs correspondientes a las primeras 451 y 1831 bases del extremo 5' del genoma del RaV.

El análisis Western-blot de los eluidos (Figura 41) muestra que la unión de la proteína a la secuencia del extremo 5' del genoma del RaV es específica y que ésta no se observa cuando se utiliza el mRNA de la luciferasa. Estos resultados indican que dicha unión no se produce por la presencia de secuencias características de un mRNA, sino que debe encontrarse únicamente en la secuencia característica del extremo 5' del genoma del RaV.

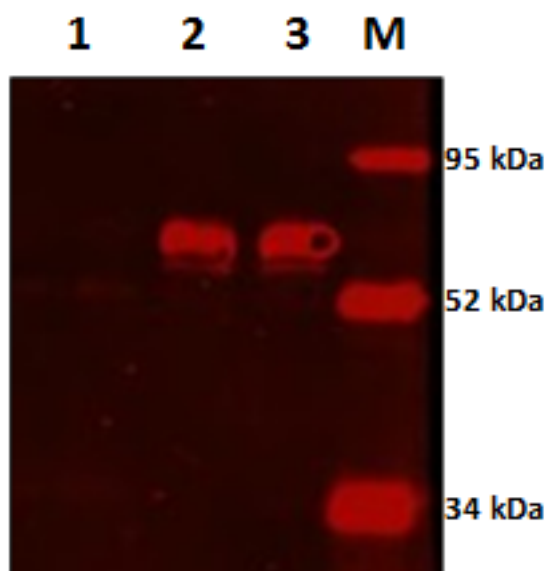


Figura 41: Análisis Western-blot empleando anticuerpos anti-hnRNPK.1– Eluido tras incubar extractos citoplasmáticos de HeLa S3 con RNA de la luciferasa; 2-Eluido tras incubar extractos citoplasmáticos de HeLa S3 con el RNA del extremo 5' de 1,8kb; 3- con el RNA del extremo 5' de 0,45kb; M-Marcadores.

Para estudiar funcionalmente el efecto que la unión específica de la proteína hnRNPK al extremo 5' del RaV pueda tener sobre la replicación del virus, se parte de una estrategia experimental similar a la utilizada para el estudio del efecto de la PABP. Se estudia la producción de partículas infecciosas en ausencia y presencia de la ribonucleoproteína, partiendo de cultivos celulares de HeLa S3 previamente transfectados con siRNAs irrelevantes o siRNAs frente al mRNA de la proteína hnRNPK. Las condiciones de las

transfecciones y la descripción de los siRNAs empleados (denominados #A y #B en adelante) se describe en materiales y métodos.

Inicialmente se realizaron ensayos para optimizar las condiciones del silenciamiento de la expresión de la hnRNPK comprobando cómo era afectada en función de la concentración de siRNAs empleados. Se emplearon concentraciones de 25 y 50nM de los siRNAs irrelevante, anti-hnRNPK-A y anti-hnRNPK-B, y se analizaron las diferencias del grado de expresión de la hnRNPK mediante análisis Western-blot. Se utilizaron anticuerpos anti-tubulina alfa como control de carga (Figura 42).

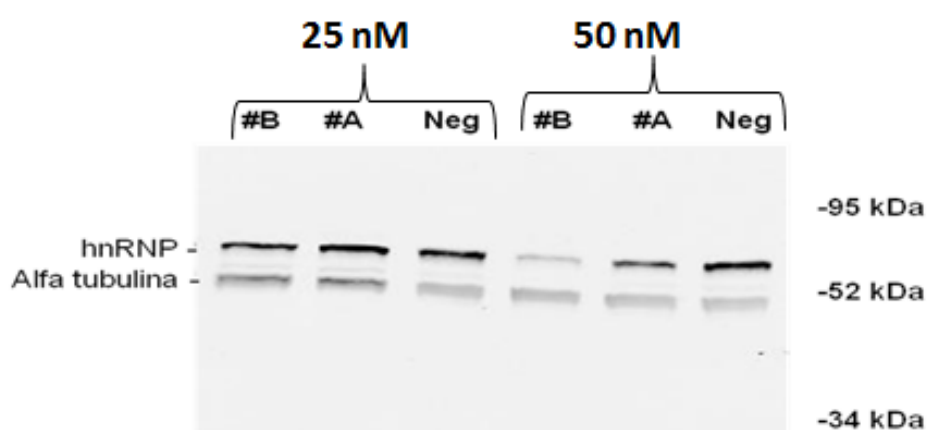


Figura 42: Análisis Western-blot de la expresión de la proteína hnRNPK a las 48 h.p.t a concentraciones de 25 y 50 nM empleando siRNAs irrelevante (Neg), y siRNAs anti-hnRNPK (#A y #B). Se han utilizado anticuerpos anti- α -tubulina para la detección del control de carga.

El mayor descenso en la cantidad de proteína expresada se produjo a concentraciones de 50nM, y se observó una clara diferencia en los dos pares de siRNAs (#A y #B) utilizados para el silenciamiento, de manera que se obtuvieron mayores inhibiciones de la hnRNPK cuando se utilizaron como silenciadores los siRNA denominados #B.

Cuando se realizaron los ensayos de transfección, también se observó que los tratamientos no causaran anomalías ni descenso en la viabilidad celular de los cultivos mediante análisis con MTT (datos no mostrados).

Paralelamente se estudió la evolución de la expresión de la hnRNPK en células transfectadas, tomando muestras a las 48 y 72 h.p.t y analizando la expresión mediante análisis Western-blot. El nivel de expresión se mide utilizando el software del analizador Odyssey, tomando el control de carga

como referencia para estandarizar los valores medidos e indicando en cada calle el porcentaje de expresión de la proteína respecto al valor máximo (Figura 43).

Entre las 48 y las 72 h.p.t. se observa en las células tratadas con los siRNA denominados #B frente a la hnRNPK, fuertes silenciamientos que sitúan la expresión de la proteína entre el 10 y el 30% del valor observado en aquellas células tratadas con un siRNA irrelevante. Sin embargo, en los ensayos realizados con los siRNA #A se obtienen grados de expresión entre el 35 y el 50%.

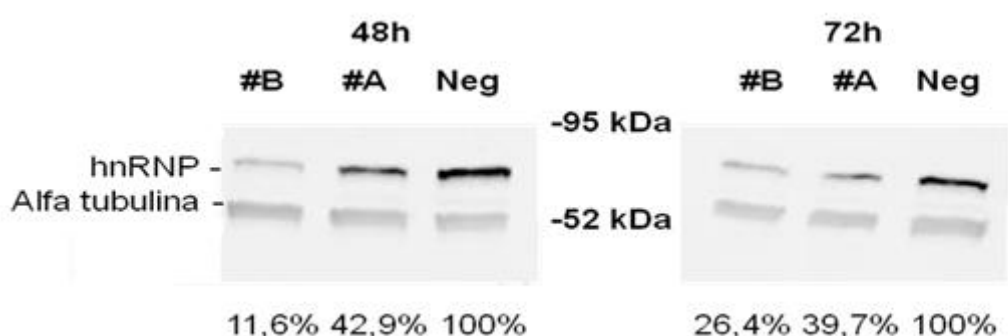


Figura 43: Análisis Western-blot de la expresión de la proteína hnRNPK a las 48 y 72 h.p.t. empleando siRNAs irrelevante (Neg), y dos tipos de siRNAs anti-hnRNPK (#A y #B). Se han utilizado anticuerpos anti- α tubulina para la detección del control de carga y la medición de la expresión de la hnRNPK. La imagen muestra un resultado representativo.

En los experimentos posteriores se seguirán utilizando ambos silenciadores de la hnRNPK a pesar de su diferente eficacia a la hora de silenciar la expresión de la proteína. Si se observa el mismo efecto en ambos tratamientos, aunque sea en diferente grado, se puede inferir con bastante probabilidad que se debe al silenciamiento de la proteína diana.

Con estas condiciones experimentales se procedió a estudiar el efecto que el silenciamiento de la hnRNPK tiene sobre la infección por RaV. Para ello se utilizaron células HeLa S3 transfectadas con los siRNAs irrelevantes, #A y #B infectando a las 56 h.p.t. a una multiplicidad de infección de 0,01. Las infecciones se realizaron por triplicado para cada uno de los tratamientos y se recogieron los sobrenadantes resultantes en punto final a las 16 h.p.i. para su titulación, a las 72 h.p.t, para comprender un espacio de tiempo en el que la

expresión de la proteína esté reducida durante el desarrollo de los ciclos de replicación del RaV. Se titularon los sobrenadantes de las replicas experimentales en células Vero como se indica en materiales y métodos y se compararon los resultados (Tabla 11).

Se observa que hay un aumento significativo de producción viral en aquellos cultivos donde se ha silenciado la expresión de la hnRNPK. A pesar de las diferencias en cuanto al grado de silenciamiento obtenido con los siRNAs #A y #B, el título viral es muy similar en ambos tratamientos y suponen un aumento en una potencia de 10 respecto a las células control no silenciadas.

Del análisis de los títulos virales se desprende que la hnRNPK juega un papel negativo en la replicación del RaV, por lo que se hace necesario estudiar aquellos pasos que puedan ser más sensibles a esta interacción negativa.

Título viral a 16 h.p.i (0,01 m.o.i)

siRNA	Promedio (log TICD ₅₀ /ml)	Desviación típica	Coefficiente de variación (%)
Irrelevante	4,58	0,15	3,14
#A	5,75	0,25	4,34
#B	5,83	0,48	8,22

Tabla 11: Título viral de los sobrenadantes recogidos a las 16 horas tras la infección con RaV en células transfectadas con siRNA Irrelevante (Irrelevante), siRNA hnRNPK-A (#A) y siRNA hnRNPK-B (#B). Se indican los valores promedio de las titulaciones, desviaciones típicas y los coeficientes de variación. Los datos representados muestran el análisis de las tres réplicas experimentales.

Se comienza estudiando la producción de péptidos virales en células silenciadas y control. Para ello se emplearon superficies de 10cm² de células HeLa S3 transfectadas con los siRNAs contra la hnRNPK e irrelevante, e infectadas a las 48 h.p.t. con RaV a una multiplicidad de infección de 1. A las 6 horas después de la infección se recoge el cultivo y se analiza mediante Western-blot los niveles de las proteínas virales VP1 (Figura 44.A), incluida en la ORF2 y expresada a partir del RNA subgenómico del RaV, y la proteína 2C (Figura 44.B), expresada a partir del RNA genómico dentro de la ORF1 y cuya secuencia codificante se localiza próxima al extremo 5' del genoma del RaV.

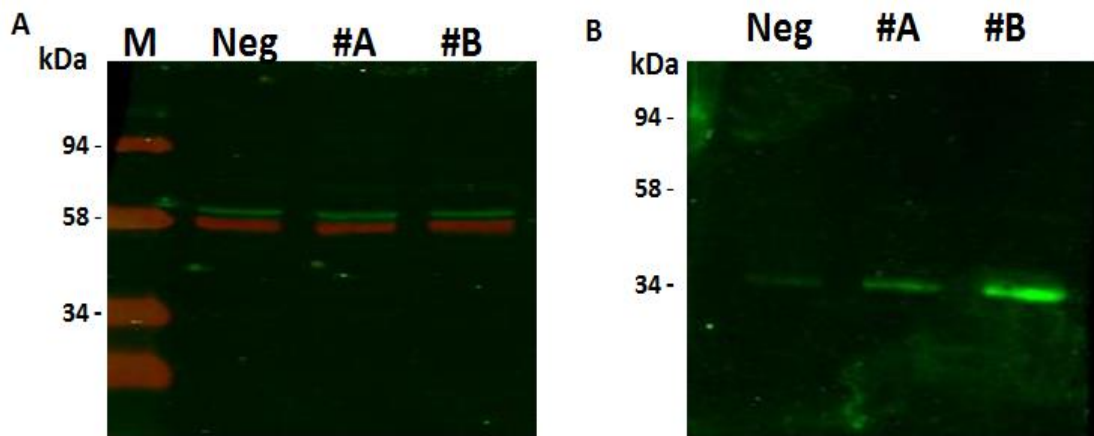


Figura 44: Análisis Western-blot de la expresión de proteínas virales en células HeLa S3 transfectadas con un siRNA irrelevante (Neg); silenciadas con siRNA A (#A) y silenciadas con siRNA B (#B) a las 6 h.p.i. con RaV. A) Empleando anticuerpos anti-VP1 (verde) y α -tubulina (rojo) como control de carga. B) Detección de la proteína 2C con anticuerpos específicos (verde). M-Marcadores de peso molecular.

No se observan diferencias significativas entre los tratamientos con los diferentes siRNAs en ninguna de las réplicas para la expresión de la proteína de la cápsida VP1. En el caso de la expresión de la poliproteína de la ORF1 que se detecta mediante anticuerpos anti-2C se obtuvieron resultados contradictorios. Mientras en una de las replicas se observaron claras diferencias de expresión, indicando que la supresión de la hnRNPK aumenta la traducción de la ORF1, en las otras dos réplicas no se observaron diferencias.

Se busca también estudiar si la localización celular de la hnRNPK varía durante la infección. Es conocido que esta proteína se localiza mayoritariamente en el núcleo pero que existen mecanismos de transporte entre el núcleo y el citoplasma. Mediante inmunofluorescencia se detecta la presencia y localización de la hnRNPK en células HeLa S3 sin infectar e infectadas a las 4 y 8 horas después de la infección a una m.o.i. de 5. Simultáneamente se utilizan anticuerpos de cobaya anti-RaV para detectar la expresión de proteína viral (Figura 45).

Si bien se observa que la hnRNPK se localiza mayoritariamente en el núcleo en células no infectadas y durante las etapas tempranas de la replicación del RaV, esta proteína sufre un cambio de localización en fases más tardías, siendo transportada al citoplasma donde comparte espacio con la síntesis de elementos virales.

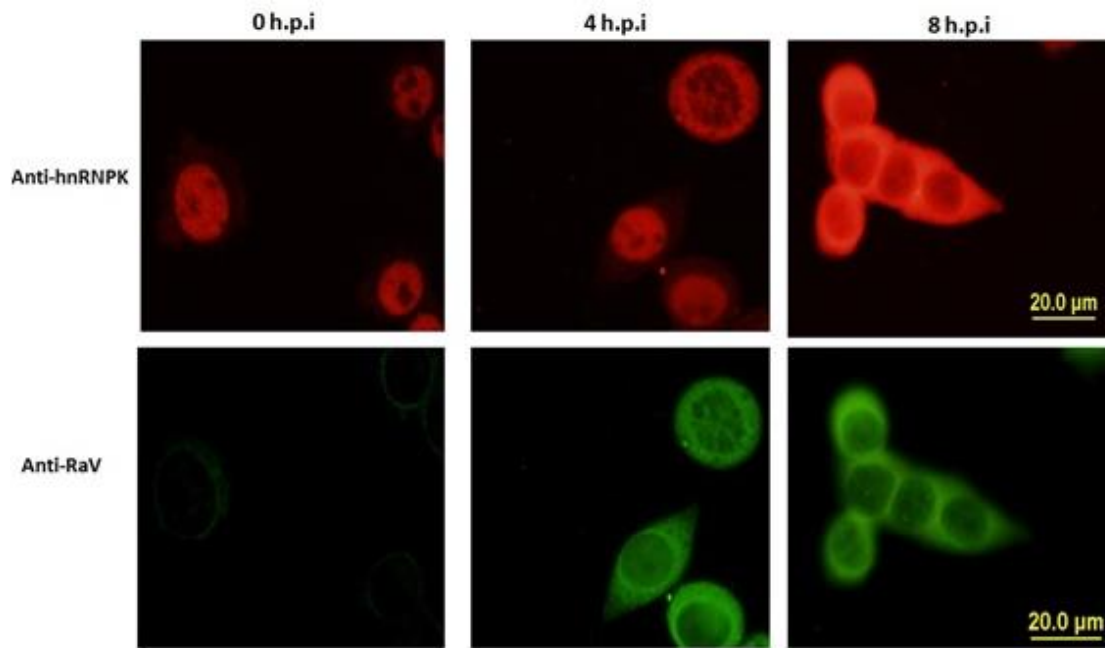


Figura 45: Análisis de inmunofluorescencia en células infectadas con RaV a las 0, 4 y 8 h.p.i.. Como anticuerpos se emplean anticuerpos de conejo anti-hnRNPk, anticuerpos de cobaya anti-RaV y secundarios anti-conejo (rojo) y anti-cobaya (verde). Imágenes tomadas a 400 aumentos.

DISCUSIÓN

1. Identificación de proteínas celulares que interaccionan con los extremos del genoma viral

La regulación de procesos moleculares que tienen lugar durante la replicación de los calicivirus necesita la participación en *cis* de secuencias y estructuras presentes en los RNAs virales, pero estos elementos son insuficientes para formar los complejos y estructuras necesarias para una replicación efectiva por lo que se depende en gran medida de la interacción con factores proteicos que regulen estos procesos en *trans* (Sandoval-Jaime y Gutiérrez-Escolano, 2009).

Las proteínas identificadas pueden presentar una interacción directa con alguno o los tres RNAs sintéticos, o indirecta mediante su unión con otras proteínas.

La profundización en la función de estas interacciones necesita de estudios *in vivo*, para lo que se debe contar con un modelo viral capaz de ser propagado en cultivos celulares, como el RaV. No obstante, al no disponer de un cDNA infectivo no se han podido comprobar directamente las secuencias necesarias para la replicación del virus, por lo que inicialmente se han querido estudiar transcritos de RNAs que contienen las secuencias de los extremos 5' y 3' del genoma del RaV.

Los RNAs sintéticos incluyen las secuencias correspondientes a las principales estructuras y regiones de regulación del RaV, hay que tener en cuenta que al no tratarse de gRNAs completos se pueden dar estructuras que no tienen lugar durante la infección y dar lugar a uniones artefactuales o a la pérdida de algunas proteínas de interés. La relevancia funcional de las interacciones encontradas *in vitro* debe ser confirmada molecularmente y ensayada posteriormente en cultivos celulares.

Para la identificación de las interacciones se ha puesto a punto un sistema de cromatografía de afinidad a RNA, modificado a partir del método empleado por Galán y colaboradores en 2009, en el cual se fijan los RNAs sintéticos y marcados con biotina a una matriz de estreptavidina y se incuban con extractos celulares.

Se probaron diferentes marcajes con 14-CTP-Biotina debido a que la proporción de biotina presente en el RNA podría afectar a la eficiencia de la transcripción y el exceso de marcaje podría alterar la formación de estructuras secundarias. Teniendo esto en cuenta, y la necesidad de que el marcaje debe ser detectable y eficaz, se utilizaron concentraciones relativas de 1:5 y 1:2 respecto a CTP no marcado. Al estudiar la presencia de marcaje por biotina mediante ensayo *dot-blot*, se observó que ambas especies de RNA incorporaban el nucleótido marcado, por lo que se decidió utilizar para la cromatografía la proporción 1:5 (14-CTP-Biotina : CTP), ya que permite un marcaje detectable y adecuado, y no afecta al rendimiento de la transcripción o a la movilidad e integridad de los RNAs transcritos siendo, a su vez, el marcaje más laxo y, por tanto, aquel que afectara en menor medida a la estructura de los RNAs sintéticos.

Una vez establecidas las condiciones para la síntesis de los RNAs se ponen a punto las condiciones para llevar a cabo la cromatografía por afinidad a RNA. Se emplearán extractos citoplasmáticos de las líneas celulares de origen humano HeLa S3 y HEK 293T. Estas líneas son permisivas y susceptibles a la infección por RaV y nos permitirán identificar mediante espectrometría de masas las proteínas copurificadas dado que disponemos de las secuencias completas de las proteínas humanas en las bases de datos.

La obtención de los extractos citoplasmáticos se realiza mediante rotura de la membrana celular por choque osmótico en una disolución hipotónica y en presencia de inhibidores de proteasas. Este procedimiento permite separar las fracciones nuclear, membranosa y citoplasmática, pero aunque se realiza en condiciones suaves, puede dar lugar a la rotura de las membranas y de estructuras y compartimentos internos, alterando las proporciones relativas de las proteínas presentes y dando lugar a concentraciones no fisiológicas que infravaloren o sobrevaloren la presencia de determinadas proteínas. Esto puede ocasionar interacciones no fisiológicas o la pérdida o disminución de afinidad con alguna proteína de interés.

Para la adsorción del RNA biotinado se emplea como matriz una resina de sefarosa con estreptavidina conjugada. Los lavados y separación de fases se realizarán por centrifugación lo que podría arrastrar algunas proteínas que interaccionan con la matriz y no con los RNAs biotinados. Estas uniones

inespecíficas podrían dar lugar a la identificación de falsas interacciones. Para evitar esto se realizaron varios pasos de incubación de los extractos citoplasmáticos con resinas en ausencia de RNA previamente a su incubación con las matrices con RNA biotinado adsorbido, esperando eliminar aquellas proteínas que eluían por su unión a la resina y no al RNA. Si bien este proceso puede dar lugar a la pérdida de alguna proteína que interaccione con los complejos, reduce el fondo y garantiza que se identifiquen aquellas interacciones más fuertes y específicas. Además, en todos los ensayos se utilizaron como control negativo los eluidos de la incubación de estos extractos con resinas sin RNA biotinado adsorbido para detectar la presencia de uniones no específicas.

Las condiciones para la incubación y adsorción de los RNAs marcados se ensayaron a diferentes temperaturas y diferentes cantidades de RNA, siempre en presencia de una disolución de alto contenido en sal que permitiera el estiramiento de las moléculas de RNA para favorecer su exposición y unión a la matriz. Se encontró una mayor capacidad para unir proteínas cuando se empleaban cantidades superiores de RNAs sintéticos y cuando éstos eran incubados a 37°C durante 90 minutos para su adsorción (Figura 16 y Figura 17), posiblemente debido a que temperaturas más elevadas dificultan la formación de los puentes de hidrógeno necesarios para el mantenimiento de estructuras secundarias, estando más expuestas todas las regiones de dichos RNAs y, por tanto, la biotina para unirse a la estreptavidina.

Se analizaron los eluidos recogidos tras la incubación de extractos no infectados procedentes de HeLa S3 y HEK 293-T con matrices conteniendo los diferentes RNAs marcados y una matriz control sin RNA (Fig.R.9). Del análisis electroforético se escogieron para su identificación aquellas bandas que, no apareciendo en los eluidos obtenidos tras la incubación con la matriz sin RNA utilizada como control, mostraban diferente afinidad (que no necesariamente especificidad) en función de la línea celular empleada como fuente de proteínas o del RNA adsorbido unido a la matriz (Fig.R.9.B).

El análisis de algunas de las bandas cortadas no condujo a la identificación de una proteína, especialmente aquellas en que la señal era muy tenue, cerca del límite de detección de la técnica, probablemente debido a una baja cantidad de proteína o a que durante el procesamiento de la muestra se

pudo haber perdido parte de la misma. También se encontraron queratinas en las identificaciones de algunas bandas (datos no mostrados) que no se tuvieron en cuenta al no poder descartar que fueran una contaminación sufrida durante la manipulación del material.

Entre las proteínas identificadas (Tablas 5 y 6) se encontraron diferencias en función de la línea celular y del tipo de RNA empleado. Mientras las diferencias entre líneas celulares fueron exclusivas y no se identificó la correspondiente proteína en ambas líneas, en el caso de la interacción con los extremos 3' y 5' nos referimos a una mayor afinidad en función de la diferencia de intensidad observada en el análisis electroforético de los eluidos de las respectivas cromatografías de afinidad. De esta forma, algunas proteínas como la hnRNPQ, la hnRNPU y la PTBP1, mostraron una mayor señal cuando utilizamos el RNA correspondiente al extremo 3' del genoma pero también fueron identificadas cuando se analizaron los extractos frente al RNA que comprende las primeras 1,8 kb del extremo 5'. Esto puede deberse a que dichas proteínas interaccionan con secuencias presentes en ambos RNAs o han coprecipitado dentro de los complejos RNA-proteína a través de interacciones proteína-proteína.

La mayoría son proteínas relacionadas con el metabolismo del RNA, ya sea con su síntesis, su procesamiento o su traducción, o han sido identificadas como proteínas de unión a RNA. Si bien las interacciones RNA-proteína suelen ser debidas a la presencia de dominios con afinidad por secuencias o estructuras determinadas que se pueden encontrar en un amplio número de RNAs diferentes, la especificidad de las funciones desarrolladas por estas uniones viene determinada, también, por su contexto y la participación de otros factores proteicos (Singh y Valcárcel, 2005). Por dicha razón, vamos a evaluar las proteínas identificadas como posibles candidatas para realizar estudios funcionales de cara a profundizar sobre qué papel pueden jugar en la replicación viral y si son susceptibles de ser utilizadas como posibles dianas terapéuticas.

La única proteína de las identificadas que no presenta dominios de unión a RNA descritos, es la proteína CCAR2, que está implicada en la regulación del ciclo celular. Podría representar una proteína de unión a RNA nueva o haber

sido aislada en los complejos por su interacción proteína-proteína con otros factores celulares.

La HDLBP, ligada a la fisiología del colesterol, presenta dominios KH, secuencias de aproximadamente 70 aminoácidos conservadas evolutivamente con gran afinidad por RNAs y DNAs de cadena sencilla y ha sido descrita su unión al extremo 5' del MNV *in vitro* (Vashist *et al.*, 2012). Cabe destacar también que los procesos de entrada del MNV son dependientes de colesterol (Perry y Wobus, 2010; Gerondopoulos *et al.*, 2010), lo que puede relacionarse con la función fisiológica de la proteína HDLBP, aunque datos experimentales obtenidos en nuestro laboratorio indican que la internalización y liberación del genoma de RaV ocurre por endocitosis mediada por clatrina y acidificación de las vesículas (González Molleda, 2008). Al igual que la HDLBP, la proteína IGF2BP3, implicada en la regulación de la expresión del mRNA del factor de crecimiento tipo insulina-2, presenta dominios KH, que seguramente sean los responsables de su interacción con los RNAs sintéticos.

También encontramos los dominios KH en las proteínas PCBP2 y hnRNPk, identificadas por su interacción con los RNAs con la secuencia del extremo 5' del genoma del RaV, lo que parece indicar la presencia de una o varias secuencias en esta región del genoma por la que los dominios KH presentan una alta afinidad. Ambas proteínas presentan una gran afinidad por regiones ricas en citosinas gracias a estos dominios, aunque se encuentran diferencias en la presencia de otros dominios de unión a RNA y DNA que podrían explicar las diferencias de afinidad y funcionales (Leffers *et al.*, 1995). Así, la PCBP2 interacciona *in vitro* con la PABP (Wang *et al.*, 1999) y parece estabilizar los mRNAs celulares para la traducción, mientras que la hnRNPk está implicada en procesos de regulación de la transcripción y traducción y en el procesamiento y transporte de los mRNAs celulares (Bomsztyk *et al.*, 2004), funciones similares al resto de las hnRNPs, aunque su especificidad por residuos de poli-citosina es característica dentro de este grupo y puede explicar la afinidad diferencial de esta proteína por el extremo 5' del RaV respecto a otras hnRNPs. También está implicada en la regulación del ciclo de división celular, donde actúa como represor de la apoptosis independiente de p53 (Xiao *et al.*, 2013) siendo un actor importante en el desarrollo de ciertos procesos tumorales (Barboro *et al.*, 2014).

Se encontró interesante que ambas proteínas se hayan identificado a partir de extractos celulares diferentes (PCBP2 cuando se usaron extractos de HEK 293T y hnRNPK con extractos de HeLa S3). Este fenómeno podría ser debido a posibles diferencias en las concentraciones relativas de ambas proteínas entre líneas celulares o a diferencias de afinidad. Aunque la proteína PCBP2 tiene localización citoplasmática y no hay indicios que expliquen una diferente concentración en ambas líneas, la proteína hnRNPK es una proteína de localización nuclear que puede encontrarse en el citoplasma cuando es transportada y se ha encontrado un aumento significativo de la concentración citoplasmática en algunas células tumorales (Carpenter *et al.*, 2006), siendo una explicación posible que justificara una mayor disponibilidad citoplasmática en la línea tumoral HeLa S3. Además de este fenómeno, que podría respaldar una diferencia en la proporción relativa de hnRNPK entre ambas líneas celulares, también sería necesario que la hnRNPK tuviera una mayor afinidad que la PCBP2 por las mismas secuencias del extremo 5' del genoma del RaV que permitiera el desplazamiento por competencia de las interacciones PCBP2–RNAs sintéticos.

Por sus propiedades moleculares y funciones fisiológicas no es de extrañar que la coevolución entre virus y célula huésped haya dado lugar a interacciones de la PCBP2 o la hnRNPK con ácidos nucleicos y proteínas virales que actúen sobre la eficiencia del ciclo replicativo.

En el caso de la PCBP2, participa en la replicación de los poliovirus (Familia *Picornaviridae*) tanto en los procesos de traducción dependiente de IRES (Blyn *et al.*, 1996; Gamarnik y Andino, 1997) como en la regulación de la replicación del RNA mediante interacción con la 3CD viral y la PABP, permitiendo la circularización del genoma (Parsley *et al.*, 1997; Gamarnik y Andino, 1998; Herold y Andino, 2001). Su papel en calicivirus ha sido estudiado dentro del género *Norovirus*, donde se ha descrito su interacción *in vitro* con el extremo 5' del *virus Norwalk* (Gutiérrez-Escolano *et al.*, 2000) y del MNV (Vashist *et al.*, 2012) y su participación en la circularización del genoma mediante su interacción con la proteína hnRNPA1, favoreciendo la replicación viral (López-Manríquez *et al.*, 2013).

La proteína hnRNPK participa en diversos procesos en la replicación de virus RNA de polaridad positiva. En el género *Enterovirus*, de la familia

Picornaviridae, se ha descrito la importancia de la interacción de la hnRNPK con la región UTR del extremo 5' del genoma y la relocalización citoplasmática durante el proceso infectivo (Lin *et al.*, 2008). En miembros de las familias *Flaviviridae*, la hnRNPK interacciona con la proteína de la nucleocápsida del virus Dengue (Chang *et al.*, 2001) y el RNA viral del HCV (Poenisch *et al.*, 2015) pudiendo participar en los procesos de ensamblaje y empaquetamiento del RNA (Poenisch *et al.*, 2015). En calicivirus ha sido descrita, por una metodología similar a la empleada en este trabajo, como una proteína que se une *in vitro* a los extremos 5' y 3' del genoma del MNV (Vashist *et al.*, 2012), si bien no se ha estudiado qué papel juega en la replicación del virus, por lo que se desconoce la importancia de dichas interacciones.

Las restantes proteínas identificadas también son conocidas por su capacidad de unión a RNA. La RNA helicasa A-dependiente de ATP y la EIF2AK2 (PKR) han sido identificadas por su interacción a RNAs virales (Isken *et al.*, 2003; Dabo y Meurs, 2012) y la hnRNPA/B, que participa en los procesos de transcripción, procesamiento y transporte de los mRNAs celulares, se une *in vitro* al extremo 3' del MNV (Vashist *et al.*, 2012). La RNA helicasa A- ATP dependiente tiene localización citoplasmática y nuclear y separa RNAs bicatenarios e híbridos RNA-DNA, participando de la finalización de la transcripción. Al estar presente en el citoplasma y participar en la separación de estructuras bicatenarias de RNA, podría jugar un papel importante en la replicación de las hebras de polaridad positiva y negativa de los RNAs genómico y subgenómico del RaV.

La función de la EIF2AK2 (PKR) está relacionada con la defensa innata frente a las infecciones virales a través de la vía del interferón. En concreto, se relaciona con el reconocimiento de RNAs bicatenarios, que sólo pueden ser producidos durante la replicación de virus RNA. Si bien es cierto que la cromatografía de afinidad a RNA se realiza con RNA monocatenario, la presencia de estructuras secundarias podría explicar el reconocimiento por parte de la EIF2AK2 (PKR). El efecto de esta proteína sobre la replicación del RaV sería negativo, pero sería interesante observar si se han desarrollado mecanismos que permitan evadir la acción de la PKR como ocurre en el HCV donde la interacción con la NS5A viral bloquea la PKR (Gale *et al.*, 1997). La existencia de una disminución de la respuesta por PKR en células tumorales

respecto a las no tumorales, permite diseñar y ensayar estrategias terapéuticas empleando virus RNA con acción oncolítica en base a su mayor capacidad de propagación en células deficientes en PKR (Balachandran y Barber, 2007), esto abre puertas al estudio de la sensibilidad de la infección por RaV a la acción de la PKR y, ya que no se ha podido reproducir la patología en conejos, ser un posible candidato para realizar ensayos en conejos orientados a estudiar su potencial en terapias antitumorales.

Entre las proteínas que interactúan con mayor afinidad por el extremo 3' del genoma del RaV encontramos proteínas relacionadas con los procesos de transcripción, traducción, procesamiento y transporte del RNA, habiendo sido descritas la mayoría como proteínas de unión a RNA monocatenario o bicatenario. Para seleccionar qué proteínas se estudiarán funcionalmente, se analizan sus funciones fisiológicas e interacciones con otros virus.

Las proteínas G3BP1 y G3BP2 presentan actividad helicasa en DNA bicatenario, híbridos DNA-RNA y RNA-RNA y participa de la regulación de procesos de mantenimiento y división celular relacionados con la cascada de transducción de la proteína Ras. Durante la infección viral pueden contribuir a la formación de los gránulos de estrés como parte de la respuesta antiviral, aunque la presencia de estos factores ha sido descrita como necesaria para una correcta replicación del virus *Chikungunya* de la familia *Togaviridae* (Scholte *et al.*, 2015).

La función de las proteínas MARS, DARS y LARS está relacionada con la formación de los complejos aminoacil-tRNA necesarios para incorporar, respectivamente, los aminoácidos metionina, aspartato y leucina durante la síntesis de proteínas. No se han descrito interacciones de estas proteínas con RNAs virales.

La proteína ELAV1 (también HuR) está implicada en la regulación de la expresión génica estabilizando los mRNAs, mediante su unión a regiones ricas en adenina y uracilo (AREs) presentes en las UTRs próximas al extremo 3' de los mRNAs. La interacción de ELAV1 con regiones del extremo 3' del RNA del virus *Sindbis* provocan la relocalización citoplasmática de la proteína y afectan al metabolismo del RNA de la célula huésped (Barnhart *et al.*, 2013). En calicivirus se ha descrito la interacción de esta proteína *in vitro* con el extremo

3' del genoma del MNV (Vashist *et al.*, 2012) si bien su rol en la replicación del mismo permanece sin ser estudiado funcionalmente.

Implicadas en la regulación de la expresión de la interleucina 2 en linfocitos T se identificaron las proteínas ILF2 e ILF3, factores de transcripción para la RNA polimerasa–DNA dependiente II eucariota, con dominios de unión a RNA de cadena doble que permiten la interacción con mRNAs para su estabilización. Otras funciones que presentan la ILF2 e ILF3 en la célula están relacionadas con la regulación negativa de las rutas de degradación de los microRNAs y reparación de ADN. En infecciones virales tienen un efecto negativo al favorecer la actividad de la PKR y formación de gránulos de estrés (Wen *et al.*, 2014). En el caso de la ILF3 (NF90), se ha descrito su interacción *in vitro* con el RNA del flavivirus BVDV (Isken *et al.*, 2003), pero no se caracterizado su función en la replicación viral.

La proteína SFPQ es un factor nuclear que participa en la formación del espliceosoma para el procesamiento de los pre-mRNAs. En infecciones virales se ha descrito su importancia para la transcripción y poliadenilación de mRNAs del virus *Influenza* (Landeras-Bueno *et al.*, 2011).

La helicasa de RNA, DDX3X participa en varios procesos celulares, tanto en el núcleo (regulación de la transcripción, formación de complejos de ribonucleoproteínas, procesamiento de los pre-mRNAs y transporte de mRNAs al citoplasma) como en el citoplasma (base de datos del NCBI). Está implicada en los procesos de replicación, transcripción y traducción de varios virus (Li *et al.*, 2014; Ko *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2011). En calicivirus, interacciona con el extremo 3' del genoma del MNV y es importante para la replicación eficiente del MNV (Vashist *et al.*, 2012). Por su importancia en la replicación del HIV, la DDX3X se considera una posible diana terapéutica y se están desarrollando estrategias para intentar inhibir su acción (Radi *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta que esta helicasa es importante para la replicación del MNV, el desarrollo de estos fármacos podría ser también de aplicación en el tratamiento de infecciones en calicivirus.

Una proteína que ha sido identificada sólo en HeLa S3 y por su interacción con RNAs sintéticos de los extremos 3' y 5' del RaV, aunque con mayor intensidad al extremo 3', es la nucleolina. Es una proteína presente en el

nucléolo que participa en la síntesis y maduración de los ribosomas. Interacciona con RNAs y proteínas virales (Waggoner y Sarnow, 1998; Balinsky *et al.*, 2013) y es importante para la traducción dependiente de IRES en PV (Izumi *et al.*, 2001) y la replicación de virus RNA de polaridad positiva (Balinsky *et al.*, 2013) y de polaridad negativa como el virus de la Rabia (Oksayan *et al.*, 2015). En calicivirus ha sido identificada *in vitro* por su unión a secuencias del extremo 5' del genoma en el MNV (Vashist *et al.*, 2012) y con las NTRs presentes en el extremo 3' de los genomas de NV y FCV y la proteína NS6/7 recombinante del NV y NS6/7 en FCV (Cancio-Lonches *et al.*, 2011), teniendo, en este último caso, relevancia para el desarrollo de la infección por FCV (Cancio-Lonches *et al.*, 2011).

Entre los factores celulares identificados se encuentra un grupo de proteínas que se describirán conjuntamente por las similitudes funcionales que presentan en la célula eucariota, las ribonucleoproteínas nucleares hnRNPQ (o SYNCRIP), hnRNPL, hnRNPA0, hnRNPA1, hnRNPA2/B1 y la snRNPA, y la hnRNPU. Estas RNPs presentan dominios de unión a RNA y se localizan en el núcleo, pudiendo ser transportadas entre núcleo y citoplasma. Están implicadas en la formación de los complejos ribonucleoproteicos necesarios para el procesamiento de los pre-mRNAs (y snRNA en el caso de la snRNPA) y el transporte de mRNAs al citoplasma. Si bien estas son las características funcionales generales, se han descrito funciones alternativas diferentes entre las RNPs. Los dominios de unión a RNA presentes en estas proteínas tienen afinidades diferentes por secuencias específicas que pueden explicar las diferencias de actividad. Cabe mencionar también, que el aislamiento de estas proteínas no indica una interacción directa con los RNAs sintéticos, sino que puede tratarse de interacciones indirectas mediante uniones proteína-proteína (Kim *et al.*, 2000).

Por sus características estructurales y funcionales, estas proteínas pueden tener una función circunstancial en el ciclo replicativo de un amplio rango de virus, principalmente mediante interacciones proteína-RNA. Se ha descrito la interacción de las proteínas hnRNPU, hnRNPQ, hnRNPA0, hnRNPA1 y hnRNPA2/B1 con el extremo 3' del genoma del coronavirus TGEV (Galán *et al.*, 2009) y en este mismo virus el silenciamiento de la proteína

hnRNPQ ha mostrado un descenso en el título viral (Galán *et al.*, 2009), probablemente por ser un regulador positivo de la replicación del RNA viral como sugieren los estudios realizados en el MHV, también de la familia *Coronaviridae* (Choi *et al.*, 2004). En calicivirus se ha descrito la unión *in vitro* de la hnRNPL al extremo 5' del NV (Gutiérrez-Escolano *et al.*, 2000) y de las proteínas hnRNPQ, hnRNPU y hnRNPA2/B1 al extremo 5' del MNV y hnRNPA1 y hnRNPA2/B1 al extremo 3' del mismo virus (Vashist *et al.*, 2012).

Las interacciones hnRNPA1-RNA viral son un claro exponente de la versatilidad de las relaciones entre proteínas de la célula huésped y elementos virales. Se ha descrito su interacción con la secuencia líder y regiones intergénicas de la hebra de polaridad negativa del MHV (Li *et al.*, 1997), indicando un posible papel en la transcripción de los coronavirus, con el extremo 5' en enterovirus (Familia *Picornaviridae*), regulando la traducción dependiente de IRES (Lin *et al.*, 2009) y con el extremo 5' del virus Sindbis (Familia *Togaviridae*) regulando la traducción dependiente de *cap* y la replicación del genoma (Lin *et al.*, 2009; Gui *et al.*, 2010). A estas funciones debemos añadir que en los calicivirus, además de la interacción *in vitro* con el extremo 3' del genoma del MNV (Vashist *et al.*, 2012), se ha estudiado su papel en la circularización del genoma del MNV, mediante su interacción con el RNA viral y la proteína PCBP2, que sería necesaria para una eficiente replicación del virus (López-Manríquez *et al.*, 2013).

También al grupo de las RNPs pertenece la PTBP1, una proteína implicada en los procesos post-transcripcionales y transporte de los RNAs celulares, mediante su unión al RNA en regiones ricas en poli-pirimidinas. Tiene un papel regulador en la traducción dependiente de IRES en poliovirus (Kafasla *et al.*, 2010) y en coronavirus interacciona *in vitro* con los extremos 5' y 3' del genoma del TGEV (Galán *et al.*, 2009) donde posiblemente juegue un papel como regulador negativo de la transcripción y de los procesos post-transcripcionales (Sola *et al.*, 2011) que contrasta con el papel positivo que desempeña como regulador de la transcripción en otros coronavirus como el MHV (Li *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2002). Las interacciones de hnRNPA1 y PTBP1 con secuencias del genoma del MHV (Huang y Lai, 1999; 2001) sugieren la posibilidad de que la regulación de la replicación y transcripción de

RNAs en este virus pueda ser favorecida por la circularización de los RNAs. En calicivirus se ha descrito la interacción *in vitro* de la PTBP1 con los extremos 5' y 3' del NV (Gutiérrez-Escolano *et al.*, 2000; 2003) y con el extremo 3' del MNV, donde su silenciamiento disminuye la producción de virus (Vashist *et al.*, 2012). En el FCV se han descrito en profundidad aspectos funcionales de la PTBP1 durante la infección. Mediante su unión al extremo 5' del gRNA y sgRNA, afecta a la replicación del virus, encontrándose diferencias dependientes de la temperatura del cultivo, por lo que se sugiere un posible rol como chaperona molecular en el plegamiento del RNA vírico (Karakasiolitis *et al.*, 2006). Durante la infección por FCV sufre transporte hacia el citoplasma, pudiendo regular negativamente la traducción y de manera positiva la replicación y transcripción de RNAs del FCV (Karakasiolitis *et al.*, 2010), lo que permite proponer un posible papel en la regulación del paso de la traducción a la replicación.

Otra de las proteínas reconocidas por el RaV es la PABP, que se une a las regiones de poli-adenina presentes en los mRNAs celulares. También participa en la regulación de la traducción y en los procesos de degradación de los mRNAs. Interacciona con el factor de inicio de la traducción eIF4G, que a su vez interacciona con el factor eIF4E que reconoce el Cap del extremo 5' de los mRNAs. Estas interacciones conducirían a la circularización del mRNA en eucariotas mediante la formación de un puente RNA-proteína-proteína-RNA (Wells *et al.*, 1998) estabilizando las estructuras y regulando positivamente la eficacia del proceso. En la infección por poliovirus también se encuentra circularización del genoma mediada por la interacción de la PABP con el extremo 3' del genoma y con la PCBP, que de esta forma estabiliza y acerca los extremos del genoma viral mediante interacciones RNA-Proteína-Proteína-RNA y favorece la síntesis de la hebra negativa por parte de la RNA polimerasa-RNA dependiente (Herold y Andino, 2001). También está implicada en la traducción dependiente de IRES, siendo un factor necesario para el proceso mediante su interacción con eIF4G (Svitkin *et al.*, 2001). Se ha descrito el procesamiento de la PABP por parte de la proteasa viral 2A (Kerekatte *et al.*, 1999) lo que puede representar un mecanismo complementario al corte del factor eIF4G por parte de la proteasa 2A, para la inhibición de la traducción dependiente de *cap* en la célula huésped, y por parte de la proteasa 3A,

inhibiendo tanto la traducción dependiente de cap (Kuyumcu-Martínez et al., 2004) como la traducción dependiente de IRES (Bonderoff et al., 2008), lo que parece indicar un mecanismo de regulación del cambio de la traducción a la replicación del RNA en picornavirus. Dentro de los coronavirus, encontramos que la PABP interacciona con el extremo 3' del genoma del coronavirus bovino y del TGEV, siendo importante para síntesis de RNA y la replicación viral, respectivamente (Spagnolo y Hogue, 2000; Galán et al., 2009).

En calicivirus se ha demostrado que la PABP interacciona *in vitro* con el extremo 3' del NV y del MNV (Gutiérrez-Escolano et al., 2003; Vashist et al., 2012), al igual que se ha observado experimentalmente en este trabajo con el RaV, sin que se haya profundizado funcionalmente en dichas interacciones. De manera similar a lo que ocurre en poliovirus, se ha descrito que la PABP puede ser procesada *in vitro* por la proteasa recombinante NS6/7 de norovirus y de FCV, produciéndose un procesamiento en tiempos tardíos de la infección (7 y 8 h.p.i) de la PABP y una inhibición de la traducción de proteínas celulares durante la infección por FCV (Kuyumcu-Martínez et al., 2004).

Se ha analizado la información relativa a las funciones e interacciones conocidas entre estas proteínas y RNAs virales, teniendo siempre en cuenta que dichas interacciones pueden ser directas, por unión al RNA, o indirectas mediante interacciones proteína-proteína y que no necesariamente se reproducen en cultivos celulares, donde las interacciones se desarrollan en un diferente contexto molecular que puede afectar al desarrollo y consecuencias de las mismas.

De esta forma, muchas de esas proteínas presentan diferentes afinidades y actividad en función del virus y sus características moleculares y estructurales. También se han observado en este trabajo diferencias de afinidad en función de la línea celular (Tabla 5 y Tabla 6) que son un primer paso para conocer las diferencias que establecen el rango de huésped de un virus. Por otra parte, seguramente haya diferencias en función del desarrollo de la infección ya que, a medida que ésta progresa, altera la concentración relativa de proteínas del medio y las estructuras y entorno donde se llevan a cabo las reacciones (por ejemplo, la que tienen lugar en los complejos de replicación).

A partir la metodología desarrollada en este trabajo que ha permitido identificar hasta 28 proteínas celulares que interaccionan *in vitro* con RNAs sintéticos de los extremos 5' y 3' del RaV, se puede profundizar en las relaciones virus-huésped en otros calicivirus. Otros aspectos que pueden estudiarse a través de esta cromatografía de afinidad RNA, son las interacciones *in vitro* con RNAs sintéticos de polaridad negativa o la utilización de extractos de diferentes cultivos celulares, infectados a diferentes tiempos o no infectados. Dichas interacciones sólo van a poder ser estudiadas funcionalmente en virus que puedan ser propagados en cultivos celulares como el RaV, pero ofrecen un conjunto de datos interesantes sobre las interacciones virus-huésped y sirven como punto de partida para investigar la biología molecular de los calicivirus y poder desarrollar estrategias antivirales.

Una vez puesta a punto la técnica nos permitiría también estudiar otros RNAs sintéticos que presenten estructuras de interés, como los extremos 5' y 3' de la hebra de polaridad negativa de los RNAs genómico y subgenómico del RaV, donde encontraríamos el promotor necesario para la formación del RNA subgenómico (Yunus *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015) y las secuencias complementarias a las UTRs de las hebras positivas que probablemente jueguen un papel importante en el inicio de la síntesis de las cadenas de polaridad positiva. Otra de las opciones de estudio que se abren, es poder analizar también la afinidad de los extractos celulares por RNAs sintéticos de los extremos del genoma de otros calicivirus, como por ejemplo el RHDV o el NV, si bien la falta de una línea celular permisiva y susceptible a estos virus impediría profundizar en un estudio funcional de las interacciones y no aportaría más información que identificar posibles interacciones *in vitro*. No obstante, puede ser interesante comprobar si se reproducen experimentalmente las interacciones observadas entre proteínas celulares y los RNAs sintéticos de los extremos del genoma del RaV a un nivel comparativo para observar similitudes y diferencias en los patrones de interacción que permitan entender mejor las diferencias moleculares en sus ciclos de replicación y rango de huésped.

También se abre la posibilidad de estudiar extractos de células infectadas por RaV a diferentes tiempos post-infección. Este ensayo puede

aportar información sobre los cambios que se produce en las interacciones entre los RNAs virales y proteínas celulares debidos a la alteración del medio interno mediante redistribución, degradación y expresión aumentada de ciertas proteínas celulares y la expresión de proteínas virales. Sin embargo, el RaV se replica en el citoplasma dentro de estructuras membranosas llamadas complejos de replicación (Casais *et al.*, 2008) que no podrían ser aislados por la metodología utilizada en este trabajo, de manera que se encontraría una mezcla de los contenidos de citoplasma y complejos de replicación que no representaría la distribución de macromoléculas que, por compartimentación, encontramos durante la infección. Por otro lado las líneas HeLa S3 y HEK 293-T, a diferencia de las células Vero, presentan respuesta innata inducida por interferón y algunos elementos de este sistema pueden afectar a la integridad de moléculas implicadas en las interacciones que estarían protegidas dentro de los complejos de replicación durante una infección ordinaria. No podemos olvidar también, que en el contexto de una infección los RNAs sintéticos tendrían que competir con las interacciones que ocurren entre los RNAs virales y las proteínas celulares, disminuyendo la cantidad de moléculas disponibles y las posibilidades de que se produzcan interacciones que puedan ser copurificadas, analizadas y detectadas por la metodología empleada.

Por esa razón, es importante analizar funcionalmente el papel de las proteínas identificadas en la replicación del RaV para, posteriormente, estudiar los procesos afectados.

2 Identificación de proteínas celulares que interactúan con las proteínas NS5, NS6/7 y VP1 del RaV

El resultado de estas interacciones depende en gran medida del contexto molecular y las interrelaciones entre elementos del virus y la célula hospedadora, pudiendo dar lugar a relaciones circunstanciales que, directa o indirectamente, favorezcan o inhiban la propagación viral.

Para la identificación de proteínas celulares que potencialmente pueden participar en estos procesos junto con proteínas virales del RaV, se necesita una técnica que, a diferencia de los ensayos de doble híbrido que tienen lugar

en sistemas de levaduras y que sólo permiten identificar interacciones entre proteínas previamente conocidas, pueda ser empleada en cultivos celulares permisivos y susceptibles a la infección del RaV y que permita la identificación de complejos de proteínas para su posterior identificación, por lo que se ha optado por desarrollar una variante de la técnica de purificación en tándem por afinidad (TAP) inicialmente descrita por Rigaut y colaboradores en 1999 con las modificaciones que permitieron identificar proteínas celulares capaces de interactuar con el complejo RNA polimerasa-RNA dependiente formado por las proteínas PA, PB1 y PB2 del virus influenza, descritas por Jorba y colaboradores en 2008. Si bien la técnica fue diseñada para sistemas de levaduras, ha sido adaptada a líneas celulares de mamífero, incluidas células humanas (Jorba *et al.*, 2008).

No obstante, la técnica no está exenta de posibles alteraciones debidas a la manipulación de las células (pérdida de la estructura interna, modificando las concentraciones relativas de proteínas), a la actividad de las proteasas (que podría cortar alguna de las proteínas celulares) y a los pasos de lavado y elución que, si bien tienen la ventaja de eliminar las posibles uniones inespecíficas y transitorias, pueden producir una pérdida progresiva de aquellas interacciones que tengan importancia funcional pero sean menos estables o más débiles. Por otro lado, al fusionar las proteínas con una etiqueta peptídica podemos alterar la estructura de la proteína dando lugar a uniones artefactuales o a la pérdida de interacciones por motivos estéricos.

Por sus características funcionales y su relevancia durante el ciclo infectivo de los calicivirus, se seleccionaron las proteínas NS5 (VPg), NS6/7 (Cisteín-proteasa/RNA polimerasa-RNA dependiente) y VP1 (proteína mayoritaria de la cápsida). Para construir la proteína de fusión se añadió la secuencia correspondiente a la etiqueta peptídica a continuación de la región 3' del gen viral. De esta forma queda libre el extremo amino de las proteínas, que por su importancia funcional es probable que sufra interacciones relevantes para el proceso infectivo. Próximo al extremo amino de la NS5 se encuentra el residuo de tirosina que sirve como cebador para la síntesis de RNA viral, descrito por primera vez en la VPg del RHDV (Machín *et al.*, 2001) y en la región amino de la VP1 encontramos el dominio S implicado en la interacción

con la VP2 en NV y la NS7 del MNV (Vongpunsawad *et al.*, 2013; Subba-Reddy *et al.*, 2012) regulando positivamente la replicación de RNA y siendo probablemente una región imprescindible para la encapsidación del genoma y la formación de la cápsida. En el caso de la proteína bifuncional NS6/7, cerca del extremo amino encontramos la actividad cisteín-proteasa encargada del procesamiento de los productos virales y que puede procesar también proteínas celulares como la PABP (Kuyumcu-Martínez *et al.*, 2004). Sería interesante en futuros estudios repetir la metodología empleada en este trabajo fusionando la etiqueta para la purificación TAP al extremo amino de la NS6/7 para poder identificar las interacciones que tienen lugar cuando se deja libre la región RNA polimerasa- RNA dependiente y comparar las proteínas identificadas en ambas estrategias.

La etiqueta peptídica que se ha seleccionado para este trabajo, bajo la denominación de C-TAP, contiene en el extremo carboxilo la proteína A de *S. aureus*, para la realización de una primera cromatografía de afinidad a IgG, la secuencia de corte para la proteasa del virus TEV y en la zona del extremo amino el péptido de unión a calmodulina para realizar la cromatografía de afinidad a calmodulina. La masa molecular de esta fusión es de 19 kDa. Las razones por las que se decide utilizar esta etiqueta son la especificidad del corte por la proteasa TEV, que necesita la secuencia de siete aminoácidos E-x-x-Y-x-Q-G/S, siendo "x" un aminoácido variable. Dicha secuencia no se encuentra en las proteínas virales. El otro motivo es que tras el corte obtenemos la proteína de interés unida a CBP, un péptido con un tamaño molecular aproximado de 4 kDa que tiene una menor probabilidad de afectar a la estructura de los productos virales, y por tanto a las interacciones que tienen lugar en la célula.

La estrategia que se desarrolla para expresar las proteínas de fusión consiste en crear líneas celulares establecidas que expresen las proteínas recombinantes por inducción con el objetivo de tener un sistema reproducible donde todas las células contengan la construcción y se puedan controlar las condiciones de tiempo y superficie cultivada, procediendo todas las células de un clon original y empleando en un sistema que permitiera una sola copia del gen recombinante por célula, de cara a obtener concentraciones no demasiado

elevadas de las proteínas cuando se realizara la inducción. Se descartó la posibilidad de realizar transfecciones transitorias que implicarían tener que transfectar e inducir en cada experimento, se encontrarían variaciones en las eficiencias de transfección y no se podría determinar el número exacto de copias del gen que estaría traduciendo cada cultivo, generando problemas de manipulación, control de condiciones y reproducibilidad.

Para la generación de líneas establecidas que expresen de manera inducible y por separado las proteínas recombinantes, se trabajó con el sistema celular Flp-InTm T-RexTm-293, que permite la integración sitio-específica del plásmido recombinante. El inserto interrumpirá el gen de resistencia a zeocina, de manera que sólo aquellas células donde se haya incorporado correctamente serán sensibles a zeocina y resistentes a higromicina, sin que la inserción afecte a otra zona del genoma. La línea celular produce un represor del operador Tet de manera constitutiva. La tetraciclina y la doxiciclina se unen al represor provocando en éste un cambio conformacional que impide su unión a la región operadora, permitiendo la expresión del inserto, que sólo se producirá cuando añadamos tetraciclina o doxiciclina al medio, pudiendo controlar los tiempos de expresión.

Aunque la línea HEK 293T es permisiva y susceptible a la infección por RaV, la línea Flp-InTm T-RexTm-293 presenta modificaciones y va a ser cultivada en presencia de antibióticos de selección que podrían afectar a la replicación del virus. La infección con RaV en presencia de antibióticos de selección, generó un efecto citopático equivalente al mostrado cuando se infecta la línea HEK 293T indicando que ambas líneas son permisivas y susceptibles a la infección.

La cotransfección de los plásmidos pNS5-CTAP, pNS6/7-CTAP y pVP1-CTAP con pOG44, en cada caso, se hizo manteniendo la relación entre los plásmidos y a diferentes concentraciones finales para conseguir diferentes densidades de células transfectadas. Para confirmar que la inserción de los plásmidos recombinantes tuvo lugar en la región FRT se testó la sensibilidad de los clones a zeocina observando una mortalidad elevada a las 24 horas que no ocurría cuando eran cultivadas en medio con higromicina y sin zeocina (Figura 24).

La detección intracelular por inmunofluorescencia de las proteínas NS5-C-TAP, NS6/7-C-TAP y VP1-C-TAP permitió corroborar que solo eran producidas cuando el cultivo era inducido (Figura 27) y que su localización era citoplasmática (Figura 28) en el caso de NS5-C-TAP y VP1-C-TAP. Se encontró la misma reacción cruzada entre sueros que se observó en el análisis *Western-blot*, probablemente por la expresión de la proteína A en la etiqueta peptídica y su unión a IgGs.

Sin embargo, en los cultivos donde se indujo la expresión de NS6/7-C-TAP no se pudo distinguir adecuadamente la localización celular debido a que se observó una señal débil y difusa que no permitía distinguir adecuadamente las estructuras celulares. La apariencia de estas células resultaba anómala en comparación con los otros cultivos celulares inducidos y no inducidos, lo que sugiere un posible deterioro y pérdida de viabilidad de las células. El daño producido no se parece morfológicamente al efecto citopático causado por el RaV y su origen podría encontrarse en la actividad cisteín-proteasa de NS6/7-C-TAP sobre proteínas del huésped como la PABP (Kuyumcu-Martínez *et al.*, 2004) o la eIF4G (Willcocks *et al.*, 2004) afectando a procesos celulares como la síntesis de proteínas. Otra de las causas que se barajan es la actividad RNA polimerasa-RNA dependiente de la misma proteína que, utilizando RNAs celulares como molde, podría dar lugar a la formación de RNAs bicatenarios que pudieran activar los mecanismos de inmunidad innata de la célula. La toxicidad de la expresión de NS6/7 en levaduras ya había sido observada por Kaiser y colaboradores (2006) sin que se estudiara qué actividad o actividades estaban implicadas.

Podría comprobarse experimentalmente qué actividad está teniendo lugar, por un lado comprobando si hay procesamiento de proteínas celulares, en especial aquellas que son diana de la proteasa NS6/7 del vesivirus FCV (Kuyumcu-Martínez *et al.*, 2004; Willcocks *et al.*, 2004) o valorando si se produce la síntesis de RNA utilizando otros RNAs como molde. Mutando específicamente los centros activos de ambas funciones para inhibir su actividad, de forma alterna y generando un doble mutante, se estudiaría si alguna de esas actividades está produciendo el daño celular. Por último, tanto con la proteína NS6/7 como con NS5 y VP1, sería interesante añadir la etiqueta

peptídica para la purificación TAP al extremo amino de las distintas proteínas y estudiar las diferencias encontradas en la identificación de proteínas celulares entre las diferentes construcciones.

Debido a que hay indicios de alteración del medio intracelular con la expresión de la proteína NS6/7-C-TAP, se realiza la puesta a punto de las cromatografías de afinidad en tándem con las líneas celulares que expresan de manera inducible las construcciones NS5-C-TAP y VP1-C-TAP.

Una vez se analicen electroforéticamente los complejos purificados debemos descartar aquellas uniones que ocurren de manera inespecífica, bien sea por su afinidad a la matriz o a la etiqueta peptídica. Se usará como control la línea celular Flp-InTm T-RexTm-293 modificada para expresar de manera inducible la construcción C-TAP. Los extractos obtenidos tras la inducción de esta línea serán tratados de igual manera durante la purificación en tándem que los obtenidos de células que expresan NS5-C-TAP y VP1-C-TAP, de manera que al analizar los patrones de proteínas purificados podamos descartar aquellas bandas que aparezcan como producto de someter a la etiqueta peptídica en solitario a los distintos pasos de cromatografía, corte y la lavado.

Los ensayos se realizaron en las líneas establecidas tras la inducción con doxiciclina durante 48 horas y sin infectar, debido a que en células infectadas las proteínas recombinantes tendrían que competir con las respectivas proteínas virales por los factores celulares. No obstante, para el futuro se tiene en cuenta la posibilidad de realizar las purificaciones TAP en células infectadas a distintos tiempos, estudiando la variación en el patrón de interacciones y para comprobar la reproducibilidad de las encontradas en ausencia de infección. También nos permitiría observar si se forman interacciones entre las proteínas de fusión y las proteínas virales producidas durante el ciclo replicativo del RaV. Por último, mencionar que esta metodología permitiría construir líneas celulares que expresaran proteínas recombinantes procedentes de otros virus como el NV y el RHDV que, aunque no presenten un modelo que permita el estudio en cultivos celulares, en relación a lo observado en el RaV, nos indicaría la posibilidad de que dichos

factores celulares tengan una función similar en el ciclo infeccioso de estos virus.

Inicialmente se encontraron dificultades en la purificación por afinidad en tándem, tanto para recuperar y detectar electroforéticamente la proteína unida a la matriz que contenía IgG como para detectar el producto procesado tras el corte con la proteasa TEV. Aunque los procesos de lavado se hagan en condiciones suaves modifican el entorno en el que se producen las interacciones, bien sea por razones mecánicas o de composición del medio, pudiendo impedir su formación o facilitando la disgregación de los complejos, por lo que se redujo el número de lavados respecto a los indicados por Jorba y colaboradores (2008). Al seguir sin detectar las proteínas purificadas mediante SYPRO (cuyo límite de detección es muy cercano al de la técnica de espectrometría de masas) se aumentó la cantidad de células inducidas y procesadas.

Las condiciones del procesamiento de NS5-C-TAP y VP1-C-TAP por la proteasa TEV se modifican para ser realizado a temperatura ambiente y durante tres horas, ya que temperaturas superiores favorecen el aumento de la actividad molecular y aumentan las posibilidades de que se produzcan cortes efectivos. Mediante *Western-blot* se pudieron detectar tras el corte con la proteasa TEV la presencia de los productos VP1-C-CBP (66 kDa) y NS5-C-CBP (19 kDa) (Figura 30 y Figura 32). Cabe mencionar que en el caso de NS5-C-CBP lavados e incubaciones posteriores daban lugar a la pérdida de detección de la proteína. La reducción del número de lavados no permitió evitar esta pérdida, razón por la cual se realizó la purificación de la proteína NS5-C-TAP hasta el corte con la proteasa TEV y se analiza electroforéticamente dicho eluido.

A pesar de las modificaciones introducidas, apenas se consiguieron observar dos o tres bandas muy tenues mediante electroforesis SDS-PAGE tras el corte con la proteasa y ninguna banda en los pasos que incluían incubación y elución con la resina de afinidad a calmodulina. Con el objetivo de concentrar la muestra para poder visualizar más bandas, se liofilizaron los eluidos y se analizaron electroforéticamente (Figura 31 y Figura 33).

Si bien al realizar sólo la cromatografía de afinidad a IgG y eluir cortando con la proteasa TEV se corría el riesgo de haber aislado uniones inespecíficas, el reducido número de bandas aisladas nos indica que sólo han permanecido las uniones más fuertes, las que presentan una mayor afinidad y aquellas más específicas.

Entre las proteínas identificadas se encontró en ambos casos las cadenas ligeras de las IgGs (de aproximadamente 25 kDa) y la proteasa TEV (27 kDa). Aunque se utilizaron minicolumnas para eliminar la resina es posible que algunas IgGs se desprendieran y permanecieran en el sobrenadante tras el corte con la proteasa de manera que, al igual que ésta, desaparecerían con un segundo paso de cromatografía de afinidad a calmodulina. Otra posibilidad sería que las IgGs interaccionaran y precipitaran con las proteínas celulares que, a su vez, copurificaban junto con las proteínas recombinantes. La VP1-C-CBP se identificó en la tercera banda del respectivo gel, mientras que la NS5-C-CBP no se pudo visualizar tras la tinción del análisis SDS-PAGE pero fue detectada su presencia mediante *Western-blot*.

La mayoría de las bandas más tenues no fueron identificadas debido a que la poca cantidad de proteína presente no permitió su correcto análisis. Debido al algoritmo usado por MASCOT para asignar valores estadísticos a las identificaciones (Pappin *et al.*, 1993), cuando se trabaja con cantidades de proteína muy bajas (cercanas a los límites de detección de la técnica) aumenta la dificultad de analizar un número de péptidos estadísticamente amplio y por tanto se pueden obtener valores de *score* inferiores a lo esperado en condiciones óptimas. No obstante, las identificaciones con *score* inferior a 100 observadas (Tabla 7) presentan una probabilidad superior al 98% de no ser debidas a un falso positivo, por lo que se consideran identificaciones válidas y significativas (p-valor de 0,05).

Entre las proteínas identificadas encontramos varios miembros de la familia de las proteínas de choque térmico de 70 kDa, concretamente la HSPA1A y HSPA1B unidas a los complejos formados con VP1-C-CBP y de nuevo HSPA1A y HSC70 formando parte de las uniones con NS5-C-CBP. En la célula eucariota funcionan como chaperonas moleculares y están implicadas en la estabilización y correcto plegamiento de las proteínas, evitando la formación de agregados. También participan en la degradación de proteínas formando

parte de la cascada del proteosoma mediado por la señalización con ubiquitina. Aunque éstas son las funciones generales de este grupo de proteínas, también se han referido actividades características durante la infección viral, como la función ATPasa en la desestructuración de las vesículas cubiertas de clatrina de la HSC70, implicada en la entrada por esta vía del flavivirus JEV (Chuanj *et al.*, 2015) y siendo también una buena candidata a participar en la entrada mediada por clatrina del FCV y del RaV (Stuart y Brown, 2006; González Molleda, 2008). Relacionada con las funciones fisiológicas de esta familia de proteínas también se encuentra actividad chaperona durante la infección de algunos virus, como la desarrollada durante la replicación de reovirus (Kaufer *et al.*, 2012) y en el ensamblaje de las partículas virales en enterovirus (Macejak y Sarnow, 1992).

En el FCV, las proteínas del choque térmico de la familia de las HSP70, retrasan la aparición del efecto citopático y son negativas para la propagación viral al actuar como proteínas inhibitoras de la apoptosis (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2015). Una interacción de proteínas virales como VP1 y NS5 con estas chaperonas, podría favorecer el proceso de apoptosis, y con ello la propagación viral, al secuestrar estas proteínas celulares y disminuir su disponibilidad para inhibir la apoptosis en la célula huésped.

La proteína HSP90 es una chaperona molecular que permite el correcto plegamiento de proteínas específicas mediante su actividad ATPasa y se identificó por su asociación a los complejos formados en presencia de VP1-C-CBP. Se ha descrito HSP90 como una proteína importante para la replicación de varios virus de DNA y RNA (Geller *et al.*, 2012), incluyendo el virus Ebola (Smith *et al.*, 2010) o Influenza (Chase *et al.*, 2008). En algunos virus RNA de polaridad negativa, parte de su actividad durante la infección va ligada a la capacidad de HSP90 para estabilizar y evitar la degradación de la RNA polimerasa-RNA dependiente viral (Connor *et al.*, 2007). En *enterovirus 71* se ha descrito la importancia de la HSP90 para la entrada del virus y el ensamblaje de la cápsida (Tsou *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). Todo ello indica la posibilidad de que la inhibición de HSP90 mediante fármacos ya disponibles pueda ser utilizada como una terapia antiviral de amplio espectro.

En calicivirus se ha descrito la HSP90 como una proteína capaz de interactuar *in vitro* con el RNA del MNV (Vashist *et al.*, 2012) y que es

necesaria para la replicación del mismo virus y para la estabilidad de la proteína estructural y el correcto ensamblaje de la cápsida de HuNoV y MNV (Vashist *et al.*, 2015). Se ha descrito que inhibidores de la HSP90 como 17-DMAG (en fase preclínica) y Novobiocina (ya aprobado para uso antibiótico) disminuyen el título viral del MNV, haciendo de HSP90 una posible diana terapéutica para el tratamiento de las infecciones por calicivirus (Vashist *et al.*, 2015).

La tubulina beta (TUBB) es un componente estructural de los microtúbulos del citoesqueleto, formados por la polimerización de dímeros tubulina alfa/tubulina beta. Está implicada en los procesos de transporte intracelular y al igual que HSPA1A fue identificada en los complejos asociados tanto a NS5-C-CBP como a VP1-C-CBP.

Las interacciones entre proteínas virales y tubulina suelen conllevar o la desestructuración del entramado de microtúbulos, favoreciendo la propagación del virus, como ocurre por la interacción entre la proteína NS1 del virus Influenza con la tubulina beta (Han *et al.*, 2012) o la reorganización de la red de microtúbulos, para favorecer la formación de estructuras que ayuden en la síntesis de moléculas virales y formación de nuevas partículas, como se sugiere que ocurre entre la proteína VP1 del MNV y la tubulina alfa (Hyde *et al.*, 2012).

Las proteínas celulares HSP90 y la tubulina han podido ser identificadas en las partículas virales de virus con envuelta como el paramixovirus NDV (Ren *et al.*, 2012) y el coronavirus IBV (Kong *et al.*, 2010). Se desconoce si lo mismo ocurre en calicivirus y si este fenómeno se debe a que dichas proteínas quedan localizadas circunstancialmente en el interior de la partícula tras realizar una actividad previa a su formación, o desempeñan algún rol adicional como podría ser favorecer el transporte intracelular de las moléculas virales por la red de microtúbulos en el caso de la tubulina o evitar la degradación de proteínas virales como la nucleocápsida, en el caso de la HSP90.

Entre las proteínas identificadas mencionadas hasta este punto se producen una red de interacciones que nos impiden saber cuáles son uniones directas o indirectas con NS5 y VP1. De esta forma, según consta en la base de datos del NCBI, ha sido descrita la interacción de HSP90 con TUBB, HSPA1A, HSPA1B y HSC70, de TUBB con HSPA1A y entre HSC70 y

HSPA1A. Uniendo estos datos a las interacciones que se han descrito en este trabajo de esas mismas proteínas con NS5 y VP1, sería más apropiado hablar de complejos interrelacionados, y no de interacciones individuales. Esto complica los estudios funcionales que deben llevarse a cabo para comprender mejor cómo afectan dichas proteínas a la replicación del RaV, aunque no impide hacer aproximaciones individuales (estudiar si dos proteínas coimmunoprecipitan en ausencia de otros factores, mapear la región de las proteínas virales y celulares implicadas en la unión, estudiar el impacto sobre la replicación viral u otros procesos del ciclo infeccioso –replicación de RNA, traducción, encapsidación, ensamblaje- del silenciamiento o inhibición de un factor, etcétera) e integrar los resultados en un sistema conjunto.

A pesar de que, por otros estudios realizados previamente con la VPg (Chaudry *et al.*, 2006; Daughenbaugh *et al.*, 2003, 2006; Goodfellow *et al.*, 2005; Hosmillo *et al.*, 2014; Chung *et al.*, 2014), se esperaba la identificación de factores de inicio de la traducción asociados a NS5, su ausencia es probablemente debida a que dichas proteínas interactúan con el extremo carboxilo de la VPg (Chung *et al.*, 2014), que en la estrategia empleada tiene unido, en primera instancia, la etiqueta C-TAP y tras el corte de la proteasa C-CBP, lo que puede inhibir dichas interacciones ocultando la región de unión, haciéndola inaccesible o generando un plegamiento no fisiológico de la proteína NS5 en la región del extremo carboxilo.

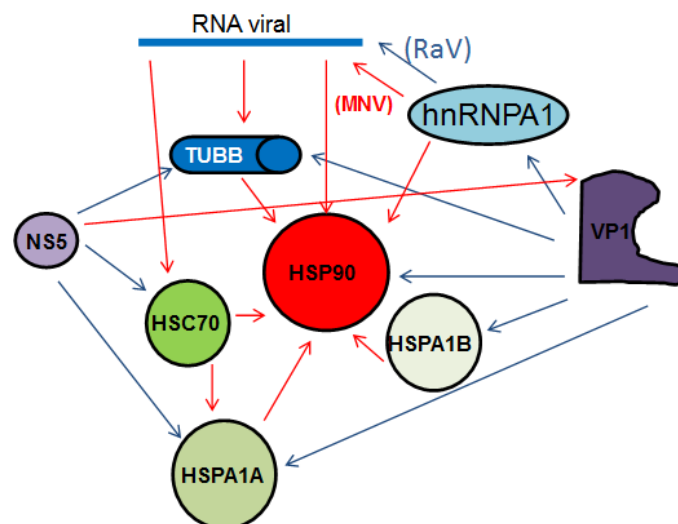


Figura 46: Representación de las interacciones entre las proteínas celulares identificadas, VP1, NS5 y RNA de calicivirus. Las flechas azules corresponden a las interacciones descritas por primera vez en esta tesis, las flechas rojas corresponden a interacciones descritas en otros trabajos pero no confirmadas en RaV.

A estas proteínas hay que añadir la hnRNPA1, copurificada con VP1-CBP y que ya había sido identificada en este mismo trabajo como una proteína que interacciona con el extremo 3' del genoma del RaV en HEK 293T y HeLa S3 (Tabla 6). Las funciones e interacciones de esta proteína a nivel celular y en algunas infecciones virales ya han sido tratadas en el apartado 1 de la discusión, pero su interacción con la VP1 presenta nueva e interesante información de cara a discutir sobre la función de esta proteína durante la infección del RaV. La hnRNPA1 está implicada en la circularización del genoma del MNV junto con PCBP2 y aunque es una proteína de localización mayoritariamente nuclear sufre relocalización citoplasmática durante la infección por el mismo virus, siendo importante para el proceso infeccioso (López-Manríquez *et al.*, 2013). La acción de estas proteínas sería necesaria para mediar el acercamiento de los extremos, que no puede ser regulado únicamente *in cis* a partir de las secuencias y estructuras presentes en el RNA, y aportar estabilidad frente a posibles degradaciones, pudiendo también regular aspectos relacionados con la traducción o la replicación del RNA viral. Por otro lado, la unión de la hnRNPA1 a la región amino de la VP1, donde se localiza el dominio S, podría suponer la localización de los RNAs en un entorno favorable para la síntesis de RNA por parte de la RNA polimerasa-RNA dependiente (Subba-Reddy *et al.*, 2012). Y aunque es una proteína de localización mayoritariamente nuclear sufre relocalización citoplasmática durante la infección por MNV (López-Manríquez *et al.*, 2013)

Nuestros datos y los publicados previamente permitirían proponer un modelo integrado (Figura 47) de interacciones macromoleculares relevantes para la replicación de los calicivirus.

En este modelo se postula la creación de un entorno favorable mediante las distintas interacciones descritas en este trabajo entre la tubulina beta, las chaperonas moleculares y las proteínas virales VP1 y NS5. Estos complejos favorecerían por un lado el correcto plegamiento y estabilidad de las moléculas virales, evitando su degradación, y el acercamiento entre VP1 y VPg que puede ser clave para la encapsidación selectiva del gRNA y sgRNA y la correcta formación de partículas virales. En el entorno del dominio S de la VP1 se situaría el RNA viral, mediante su interacción con hnRNPA1 y de ésta con VP1, y la NS6/7, mediante su interacción con VP1. Mediante la circularización del

RNA y el aumento de la frecuencia de las interacciones de éste con la RNA polimerasa dependiente de RNA se llevaría a cabo una síntesis más eficiente *de novo* de la hebra negativa. La finalización de este proceso en el entorno de la VP1 aumentaría los encuentros de la hebra negativa y de NS6/7 con NS5, aumentando la eficiencia de la síntesis de gRNA y sgRNA que emplea como cebador la tirosina de la NS5.

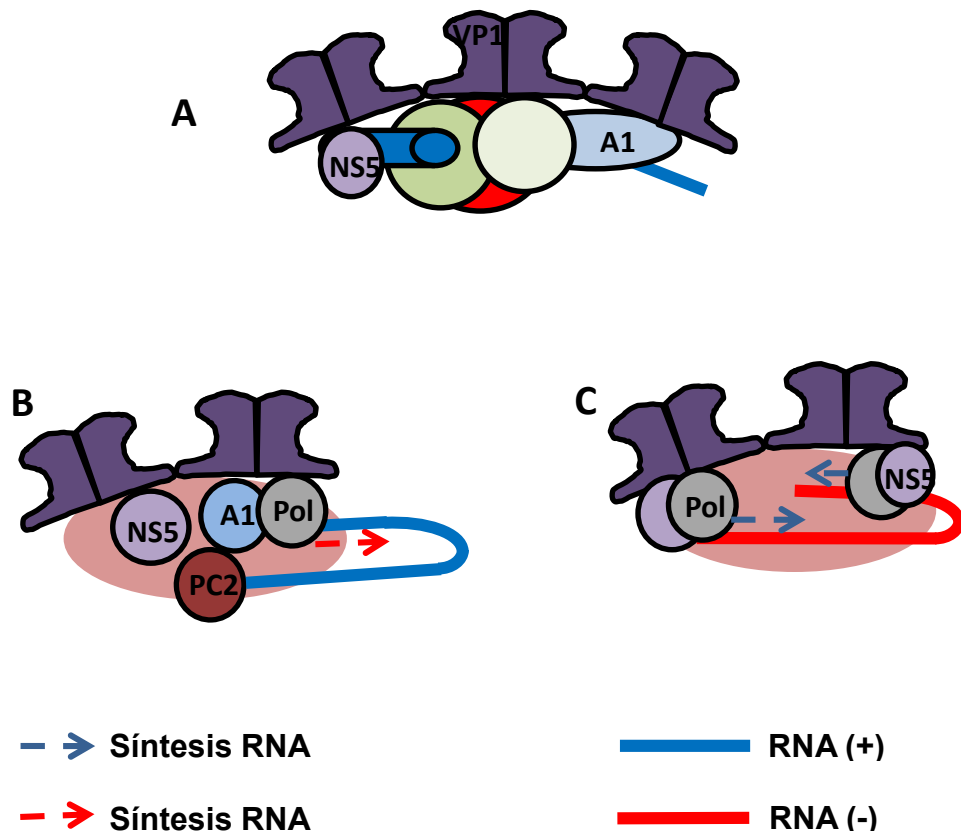


Figura 47: Esquema del modelo propuesto de interacción entre las proteínas identificadas en esta tesis doctoral. (A) Complejo VP1, NS5 y hnRNPA1 (A1) con el extremo 3' del genoma del RaV. Las figuras circulares y tubular en 49.A representan las proteínas TUBB, HSP90, HSC70, HSPA1A y HSPA1B en el mismo código de colores que en la Figura 46. Los elementos anteriores, junto con la circularización del genoma mediada por A1 y PC2 (PCBP2) y la interacción de la polimerasa con la VP1 en MNV (López-Manríquez *et al.*, 2013, Subba-Reddy *et al.*, 2012) se proponen para modelo de la síntesis *de novo* de RNA de polaridad negativa (B). Este complejo a su vez favorecería la eficiencia de la síntesis dependiente de proteína cebadora (NS5)(C). El complejo formado por la tubulina y las HSPs antes citadas se representan con un fondo rojo en las figuras 49.B y 49.C.

Para completar este modelo sería necesario conocer la actividad de otros factores celulares que pueden formar parte de estos complejos. Tanto la PCBP2 como la hnRNPA1 pueden interactuar con la PTBP1 (Han *et al.*, 2014; Huang y Lai, 2001), propuesta como una proteína reguladora del cambio del proceso de traducción al de replicación del RNA viral en FCV (Karakasiolitis

et al., 2010). En el inicio de la síntesis *de novo* de la hebra de polaridad positiva es posible que sea necesaria la interacción con proteínas celulares, siendo buena candidata la nucleolina por su interacción con el extremo 3' del RNA y la NS6/7 del FCV (Cancio-Lonches *et al.*, 2011). Para el avance de la polimerasa y evitar problemas de estabilidad, plegamiento y la correcta separación de las hebras negativa y positiva encontraríamos a la helicasa DDX3X (Vashist *et al.*, 2012).

Cabe mencionar la importancia de las identificaciones realizadas en este trabajo de cara a realizar estudios funcionales que puedan ayudar a entender mejor los procesos moleculares del ciclo infectivo y, desde un punto de vista más aplicado, poder diseñar estrategias antivirales más efectivas. Las interacciones de la hnRNPA1 con la VP1 y el RNA del RaV, descritas en esta tesis, podrían ser afectadas por compuestos como la apigenina, que ha demostrado su capacidad para disociar complejos hnRNPA1-RNA viral en la infección del *enterovirus 71* (Zhang *et al.*, 2014).

Inhibir proteínas celulares conlleva el riesgo de poder reducir la viabilidad celular o producir alteraciones que descontrolen su ciclo de división, pero generaría menos resistencias farmacológicas ya que afectaría a una proteína con menor variabilidad fenotípica debido a la fiabilidad de las DNA polimerasas celulares. Por otra parte, este tipo de terapia afectaría a una estrategia conjunta de interacciones moleculares que posiblemente necesite de varios cambios en el genoma viral para ser resistida, mientras que intentar inhibir con moléculas específicas las proteínas virales o la interacción puntual de éstas con proteínas celulares encontraría más dificultades debido a la alta tasa de error de las RNA-polimerasas dependientes de RNA que permite la presencia simultánea de múltiples genotipos en una misma progenie viral, aumentando la probabilidad de que aparezcan mutaciones que generen fenotipos resistentes a un principio activo determinado.

3. Estudio funcional de proteínas que interactúan con elementos del RaV

Las proteínas identificadas en este estudio pueden participar en diferentes actividades durante la infección viral, regulando positiva o negativamente ciertos procesos moleculares, o ayudando a la creación de un entorno favorable que facilite el desarrollo de diferentes pasos necesarios para la infección.

Por otro lado, las interacciones *in vitro* no son necesariamente reproducibles *in vivo*, con lo cual podrían haber sido identificadas como consecuencia de las condiciones de la técnica experimental empleada y no participar o no jugar un papel relevante en el ciclo de replicación del RaV, razón por la cual la primera aproximación funcional será conocer la influencia cualitativa sobre el proceso infeccioso de las proteínas que se decida estudiar, previamente a la profundización sobre qué mecanismos están implicados.

En esta tesis los estudios funcionales se realizaron paralelamente a la puesta a punto de las purificaciones TAP y, por tanto, se comenzaron con anterioridad a conocer las proteínas que interactuaban con la NS5 y VP1 viral por lo que se tuvieron en cuenta únicamente aquellas proteínas identificadas por su asociación a los complejos formados en presencia de los RNAs sintéticos de los extremos del genoma del RaV.

En base a la información analizada, la reproducibilidad de las identificaciones y por la disponibilidad de anticuerpos específicos, se ha reducido el grupo de candidatas potenciales para la caracterización funcional a las proteínas hnRNPQ (SYNCRIP), PABP, hnRNP1, PTBP1, hnRNPA1 y hnRNPA0 por su interacción con el extremo 3' del genoma del RaV y la hnRNPK por su interacción con los RNAs sintéticos del extremo 5' del genoma del RaV.

La hnRNP1 interacciona tanto con los RNAs sintéticos del extremo 5' como con el del extremo 3' en ambas líneas celulares con una señal intensa (Figura 36) que sugiere una fuerte unión a ambos extremos independientemente de la línea celular. La similitud de secuencias entre los extremos 5' del gRNA y del sgRNA, puede explicar que algunas proteínas interactúen con los diferentes RNAs sintéticos empleados en este trabajo.

Las proteínas PTBP1 y hnRNPQ (SYNCRIP) también presentan unión a RNAs con las secuencias del extremo 5' del RaV (Figura 36). Esta unión presenta la curiosidad de ser dependiente de línea celular, así mientras la unión de la PTBP1 al RNA sintético de 0,45 kb tiene lugar en HEK 293T pero no en HeLa S3, en la hnRNPQ observamos el fenómeno inverso. Esto viene a mostrar cómo las interacciones proteína-RNA dependen del contexto molecular y no sólo de los elementos implicados. Una de las posibles explicaciones en el caso de la PTBP1, proteína de unión a regiones ricas en poli-pirimidinas, es que compita con otras proteínas presentes en HeLa S3 que no lo estén en HEK 293T o lo estén en menor medida, o que necesite de la acción combinada de elementos celulares que se dé en HEK 293T pero no en HeLa S3. Un ejemplo sería la hnRNPK, capaz de unirse a los RNAs sintéticos del extremo 5' en HeLa S3 pero no HEK 293T y que por ser una proteína de unión a poli-citosinas, pueda competir y desplazar a la PTBP1 en su unión por dichas secuencias. El estudio sobre la actividad de la proteína PTBP1 en el ciclo replicativo del RaV parece poco prometedor en cuanto a la posibilidad de describir nuevas características funcionales de la proteína celular que es, hasta la fecha, la mejor estudiada respecto a su función e implicación en la replicación de los calicivirus (Karakasiolitis *et al.*, 2006, 2010; Vashist *et al.*, 2012).

Las proteínas hnRNPA1 y hnRNPA0 presentan una clara especificidad por el extremo 3' en HeLa S3, sin embargo en HEK 293T hay cierta afinidad, aunque en menor medida, por los RNAs sintéticos del extremo 5' del genoma del RaV (Figura 36). La explicación de estas diferencias se puede encontrar, al igual que ocurre con PTBP1, en la presencia de otros factores celulares que favorezcan la formación de complejos con el extremo 5'. En el caso de la interacción de hnRNPA1 con el extremo 5' del RaV en HEK 293T pero no en HeLa S3, una explicación probable es que lo haga de manera indirecta mediante la asociación a PCBP2, no encontrada por su unión al extremo 5' cuando se usaron extractos de células HeLa S3, y en consonancia con los modelos de circularización del genoma en MNV (López-Manríquez *et al.*, 2013). Esta circularización podía producirse también con otros factores celulares como por ejemplo mediante interacción con PTBP1 como ocurre en el coronavirus MHV (Huang y Lai, 2001).

A la dificultad para realizar estudios funcionales individuales con estas proteínas que plantea la participación de otros factores para definir las afinidades, hay que añadir que el grupo de las proteínas hnRNPA y A/B realizan funciones similares y en muchos casos pueden ser reemplazadas por otras proteínas del mismo grupo (Lin *et al.*, 2009) aumentando la dificultad técnica para estudiar la función en la infección viral de hnRNPA1 y hnRNPA0.

La identificación realizada, con posterioridad a estos ensayos, de hnRNPA1 por su copurificación con VP1 (Figura 31 y tabla 7), abre nuevos aspectos y estrategias para el estudio de las funciones potenciales de esta proteína en la infección que se han discutido en el apartado 2 de la discusión.

En el caso de la PABP, además de la esperable y clara afinidad por el extremo 3' con presencia de una cola de poli-adenina, se observa una afinidad evidente por el RNA sintético de 1,83 kb del extremo 5' en HEK 293T y apenas detectable en HeLa S3. Esta observación concuerda con la identificación de la interacción de PCBP2 con RNAs sintéticos del extremo 5' del genoma de RaV cuando se utilizan extractos de HEK 293T y no con HeLa S3 (Tabla 5) y la interacción de PCBP2 con PABP, ya observada en otras infecciones virales (Herold y Andino, 2001).

Además de la mayor afinidad (aunque no especificidad) por el extremo 3' y las características moleculares y funcionales de la PABP, se tiene en cuenta el único estudio funcional realizado hasta la fecha con la PABP en calicivirus, que describe el procesamiento de la proteína celular en la fase tardía del ciclo infeccioso por la proteasa del FCV, inhibiendo la traducción del huésped (Kuyumcu-Martínez *et al.*, 2004). Esta inhibición de la traducción también puede ser debida al procesamiento del factor eIF4G (Willcocks *et al.*, 2004) y podría afectar a la traducción de mensajeros virales.

Se considera interesante profundizar en el rol que puede desempeñar la PABP en la replicación del RaV ya que es posible que pueda tener un papel como regulador, aún no descrito, de la traducción del virus mediante la circularización del genoma por su interacción con el extremo 3' y con el factor eIF4G que, a su vez, interacciona con la proteína VPg (Chung *et al.*, 2014) al igual que otros factores necesarios para el inicio de la traducción (Chaudry *et al.*, 2006; Daughenbaugh *et al.*, 2003, 2006; Goodfellow *et al.*, 2005; Hosmillo *et al.*, 2014).

Especialmente interesante resulta la afinidad de la hnRNPK por los RNAs sintéticos del extremo 5' del RaV cuando se utilizaron extractos de HeLa S3 pero no con los de HEK 293T, sobre todo teniendo en cuenta que la PCBP2 se ha identificado por su afinidad a los mismos RNAs sólo cuando se utilizaron extractos de HEK 293T (Tabla 5) y que ambas proteínas presentan dominios KH, con alta afinidad por las secuencias ricas en citosinas. Las causas de la diferencia observada en función de la línea celular de procedencia del extracto pueden ser debidas a una competencia por las mismas secuencias del extremo 5' unida a posibles diferencias de afinidad entre ambas proteínas (Leffers *et al.*, 1995) que se vieran afectadas por variaciones de concentración, distribución o factores necesarios para la formación de complejos ribonucleoproteicos entre líneas celulares.

La especificidad de la unión de la hnRNPK a los RNAs sintéticos del extremo 5' se confirmó molecularmente, así como que esa interacción sólo ocurría cuando se empleaban extractos de células HeLa S3 (Figura 37). Se observa también que, a pesar de ser una proteína con una masa molecular estimada de 51 kDa, la hnRNPK migra en geles SDS-PAGE como una proteína de aproximadamente 65 kDa. Variaciones iguales o similares respecto al tamaño esperado han sido observadas en otras publicaciones mencionadas en este trabajo (Van Domselaar *et al.* 2013; Vashist *et al.*, 2012).

El acercamiento experimental utilizado para profundizar en el rol que la PABP y la hnRNPK juegan en la replicación del RaV es la interferencia de los mensajeros celulares que expresan estas proteínas mediante siRNAs

La técnica no está exenta de inconvenientes que se deben tener en cuenta a la hora de diseñar experimental los análisis a realizar y de cara al análisis de los resultados obtenidos. Aunque las secuencias son específicas para mensajeros celulares concretos, puede producirse un efecto *off-target* que inhiba de manera inespecífica la expresión de otras proteínas (Jackson *et al.*, 2003). Aunque las secuencias de los siRNAs empleados en este trabajo han sido comprobadas por el proveedor mediante análisis en BLAST, para no coincidir las secuencias de otros genes celulares, utilizaremos dos conjuntos de siRNAs de manera que, si obtenemos en ambos un silenciamiento de la proteína y observamos un mismo efecto sobre la replicación viral diferente de lo encontrado en células no silenciadas, podemos relacionar con fiabilidad la

diferencia observada en células silenciadas e infectadas con la ausencia de la proteína diana. El riesgo de un efecto inespecífico aumenta a mayores concentraciones de siRNAs, de manera que se utilizarán las concentraciones más bajas de entre las ensayadas que consigan un silenciamiento por encima del 60%.

Por otro lado, el silenciamiento de proteínas concretas puede tener efectos colaterales sobre el metabolismo y fisiología de las células, afectando a su viabilidad. Tanto el silenciamiento de PABP como el de hnRNPK fueron testados mediante ensayos MTT y no se observaron diferencias de viabilidad celular respecto a cultivos no tratados o tratados con siRNAs irrelevantes.

El silenciamiento en HeLa S3 se hizo en una sola transfección (para evitar un posible efecto rebote y la manipulación reiterada de los cultivos) con dos combinaciones de siRNAs (PA-1 y PA-2) frente al control con siRNA irrelevante. En HeLa S3 se encontraron diferencias en los niveles de PABP que nos indicaron que se alcanzaba un mayor grado de silenciamiento a las 72 h.p.t. cuando se usaban concentraciones de 50 nM de PA-1 y PA-2. Los grados de silenciamiento de la PABP se situaron entre 65-80% en todos los casos medidos en ambos siRNAs, valores que se consideran adecuado para iniciar el estudio del efecto que tiene la disminución de PABP en la infección del RaV.

Bajo estas condiciones de silenciamiento génico se lleva a cabo la infección con RaV. Para aumentar la posibilidad de observar las diferencias debidas al silenciamiento se infectó a una baja multiplicidad de infección (0,1) y se recogieron las muestras para titulación tras dos ciclos replicativos, lo que permitiría realizar una primera infección en la que, según la aplicación de la distribución de Poisson (Ellis y Delbrück, 1939), el 90,5% de las células no estarían infectadas y el 9% lo estarían por una sola partícula viral. De esta forma, la progenie de este primer ciclo replicativo ya se habría visto afectada por el silenciamiento de la PABP y acumularía el efecto sufrido de cara a iniciar un segundo ciclo de replicación, que tendría lugar en células silenciadas a una m.o.i más elevada. El efecto de ambos ciclos replicativos en presencia de células silenciadas permitirá valorar mejor el efecto del bloqueo de la expresión de PABP que infectando durante un ciclo replicativo a baja o alta m.o.i.

De los resultados observados se deduce que la PABP es una proteína necesaria para una infección eficiente del RaV, ya que la inhibición de su

expresión en HeLa S3 provoca un fuerte descenso (superior al 90%) en la producción de partículas infectivas.

Se estudia también la localización celular de la PABP a distintos tiempos de infección (Figura 40) para comprobar si sufría modificación, como ocurre con otras proteínas celulares durante una infección viral (Lin *et al.*, 2008; Karakasiolitis *et al.*, 2010). Durante todo el proceso infectivo la PABP se localiza en el citoplasma sin sufrir modificaciones. Sin embargo, se observa una disminución de la señal a medida que avanza la infección, siendo mayor a las 8 h.p.i. causada, muy probablemente, por la degradación de la PABP por acción de la proteasa NS6/7, al igual que ocurre durante la infección del FCV (Kuyumcu-Martínez *et al.*, 2004), y que permitiría bloquear la síntesis de proteínas del huésped.

El procesamiento de la PABP por la proteasa viral puede parecer, en primera instancia, contradictorio con los datos obtenidos en este trabajo que indican la necesidad de la proteína celular para una multiplicación efectiva del RaV.

Aunque no haya otros estudios funcionales sobre la implicación de la PABP en los procesos moleculares de la infección por calicivirus, se ha sugerido que puede ser un elemento que, al igual que ocurre con los mRNAs celulares (Wang *et al.*, 1999), permita la circularización de mensajeros virales (Thorne y Goodfellow, 2014) mediante su interacción con eIFG (Chung *et al.*, 2014) formando parte del complejo de inicio de la traducción con la VPg (Chaudry *et al.*, 2006; Daughenbaugh *et al.*, 2003, 2006; Goodfellow *et al.*, 2005; Hosmillo *et al.*, 2014; Chung *et al.*, 2014). También cabría la posibilidad de que, como ocurre en poliovirus, la PABP mediante interacción con PCBP2 y con la RNA polimerasa-RNA dependiente, sea necesaria para la replicación del RNA viral (Herold y Andino, 2001), sin embargo, no hay ningún resultado experimental hasta la fecha que apoye este modelo en calicivirus, donde una función de unión al extremo 3' y a la polimerasa viral para iniciar la síntesis de RNA la podrían desempeñar otras proteínas celulares como la nucleolina (Cancio-Lonches *et al.*, 2011). Lo más probable sería que la importancia de la PABP en la infección por RaV, descrita en esta tesis, tenga relación con una regulación positiva del proceso de traducción, si bien harían falta estudios en mayor profundidad para comprobarlo, ya que no se puede descartar que los

calicivirus presenten una estrategia alternativa de regulación de la circularización de los mensajeros virales durante la traducción, como ocurre en *rotavirus* (Piron *et al.*, 1998) donde la proteína viral NSP3 desplaza a la PABP de su interacción con eIF4G, inhibiendo la síntesis de proteínas celulares y favoreciendo la de proteínas virales.

De tener la PABP un rol positivo sobre la traducción viral, el procesamiento de la PABP descrito en FCV (Kuyumcu-Martínez *et al.*, 2004) y los resultados obtenidos en este trabajo con RaV (Figura 40), además de provocar la inhibición de la traducción de la célula huésped, podría provocar la supresión de la traducción de mensajeros virales. Esta modificación de la PABP que se observa tanto en FCV como en Rav, ocurre en las etapas finales de la infección (Kuyumcu-Martínez *et al.*, 2004; Figura 40).

Estos datos permiten sugerir un control sobre la acción de la PABP dependiente de la cantidad de proteína viral producida (siendo el factor regulador la concentración de NS6/7), de manera que la PABP sería necesaria para las etapas iniciales de la infección regulando positivamente la traducción como se ha propuesto anteriormente. A medida que se incrementan las concentraciones de proteína viral producto de la traducción, aumentan las probabilidades de interacción (y procesamiento) entre la PABP y la NS6/7, lo que daría lugar a un incremento en la degradación de PABP a medida que se produce más proteína. Esto puede ser, a su vez, un mecanismo de regulación del paso de la traducción a la replicación de RNA viral, e incluso puede favorecer la encapsidación del genoma al eliminar una proteína celular con fuerte afinidad por la cola de poli-adenina, lo que podría suponer dificultades estructurales o funcionales a la incorporación de gRNA y sgRNA virales.

De esta forma, la regulación de la traducción del gRNA sería llevada a cabo por proteínas como PABP y los factores de inicio de la traducción, disponibles en el citoplasma celular. A medida que avanza la infección la relocalización del núcleo al citoplasma de varias ribonucleoproteínas como PTBP1 y hnRNPA1 (Karakasiolitis *et al.*, 2010; López-Manríquez *et al.*, 2013) y el procesamiento de los elementos reguladores de la traducción por la proteasa viral, favorecerían el proceso de replicación del RNA. Dado que la traducción del gRNA y la síntesis de la hebra antisentido no pueden tener lugar simultáneamente utilizando el mismo molde de RNA, debido a que son

procesos que requieren de complejos moleculares que se desplazan en sentidos opuestos, la armonización entre ambos depende en gran medida de las interacciones entre elementos virales y factores celulares que tienen lugar durante la infección.

La proteína hnRNPK se estudia, entre otras razones ya discutidas anteriormente, por su capacidad de asociarse de manera específica con los RNAs sintéticos del extremo 5' del RaV cuando se utilizan extractos de HeLa S3.

El hecho de que la proteína hnRNP K muestre una alta y específica afinidad por secuencias y/o estructuras presentes en el extremo 5' del genoma del RaV y no por secuencias del extremo 5' de otros mRNAs eucariotas, no permite deducir qué función desempeña o cómo afecta al proceso replicativo del RaV.

Al igual que en el estudio de la PABP, la infección con RaV en células control y silenciadas para la expresión de hnRNPK se realiza a baja multiplicidad de infección y en dos ciclos replicativos para observar mejor las diferencias que pudieran ser debidas al silenciamiento de la proteína celular y que fueran acumuladas a lo largo de ambos ciclos infectivos.

Llama la atención que no haya apenas diferencias en los títulos virales observados cuando el tratamiento se hacía con siRNA A o B, teniendo en cuenta que si hay diferencias en el grado de silenciamiento que obtenemos con cada uno de ellos. Esto puede ser debido a que la función negativa que tiene la hnRNPK sobre la replicación del RaV tenga que ver con el desarrollo de procesos celulares, que puedan ser negativos para el virus, como podría ser impedir mecanismos de apoptosis (Xiao *et al.*, 2013) para la liberación del virus, como ocurre con otras proteínas celulares durante la infección del FCV (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2015). La interacción de elementos virales con proteínas implicadas en la inhibición de la apoptosis descritas en esta tesis, como hnRNPK y proteínas del choque térmico, podría ser un mecanismo positivo para la propagación del virus mediante competencia en la unión a dichas proteínas celulares, reduciendo la disponibilidad de éstas y favoreciendo el proceso apoptótico para la liberación del virus.

Se analizó la expresión de las proteínas virales 2C (codificada por la ORF1) y VP1 (codificada por la ORF2) en células control y silenciadas

infectadas con el RaV (Figura 44), para valorar si el silenciamiento de hnRNPK mostraba diferencias de expresión viral, teniendo en cuenta que se une al extremo 5' del gRNA pero no al sgRNA (Figura 37). No se encontraron variaciones en la cantidad de VP1 producida entre células control y silenciadas para la hnRNPK, sin embargo con la proteína 2C se obtuvo un aumento en su expresión en células silenciadas en una de las réplicas experimentales, no encontrándose tal diferencia en las otras dos réplicas analizadas. Estos resultados son contradictorios y posiblemente debidos a un error técnico o de procesamiento de las muestras, lo que impide sacar conclusiones sobre el efecto del silenciamiento en la expresión de la ORF1 y hacen necesarios más experimentos que ofrezcan resultados reproducibles.

El estudio mediante inmunofluorescencia de la localización de la hnRNPK en células infectadas con RaV (Figura 45) muestra que en células HeLaS3 no infectadas la proteína se localiza mayoritariamente en el núcleo, siendo muy reducida la señal presente en el citoplasma. Sin embargo, a medida que avanza la infección por RaV es transportada hacia el citoplasma, encontrando que a las 8 horas post-infección es detectada con mayor intensidad en la región citoplasmática. El transporte entre el núcleo y el citoplasma es común a varias ribonucleoproteínas implicadas en el procesamiento y transporte de RNAs celulares, y en el caso de la hnRNPK ya ha sido descrito en la infección por enterovirus (Lin *et al.*, 2008) donde, contrariamente a lo que ocurre en la infección por RaV, la hnRNPK juega un papel positivo en la propagación viral.

De cara a la realización de más estudios que permitan caracterizar el rol de la hnRNPK en la infección del RaV, se manejan varias hipótesis que podrían explicar por qué tiene un efecto negativo sobre la replicación de este virus.

Por un lado, la unión específica y con alta afinidad de la hnRNPK con el extremo 5' se puede explicar por la presencia de regiones ricas en citosinas, especialmente entre los nucleótidos 207-222 y 266-272, con las cuales puede interactuar la proteína celular mediante los dominios KH. Estas regiones también son diana para otras proteínas celulares que pueden jugar un papel positivo en la infección por calicivirus como la PCBP2 (López-Manríquez *et al.*, 2013) también con dominios KH, o la PTBP1 (Karakasiolitis *et al.*, 2006; 2010). Se produciría una competencia por la unión a dichas regiones que podría

desplazar a la PCBP2 y a la PTBP1, debido a una mayor afinidad de la hnRNPK, dificultando o impidiendo que tuvieran lugar los procesos en los que pueden participar estas proteínas celulares durante la replicación viral. Otra posibilidad que se baraja, relacionada con su capacidad de unión a secuencias y/o estructuras características del extremo 5' del genoma del RaV, sería que la unión de hnRNPK al RNA viral podría dificultar su encapsidación por parte de la proteína de la cápsida (Poenisch *et al.*, 2015). Para profundizar en estos estudios se necesitaría disponer de un clon infectivo del RaV y poder estudiar la viabilidad de mutaciones que eliminaran las secuencias y estructuras ricas en citosinas, cómo afectarían estas a la unión del extremo 5' con las distintas proteínas celulares y la inmunoprecipitación de complejos formados durante la infección en presencia y ausencia de las mismas. También sería interesante estudiar la eficiencia de encapsidación del genoma viral ante un silenciamiento y una sobreexpresión de la hnRNPK.

La acción negativa de la hnRNPK sobre la propagación del RaV, puede también ser debida a la función que realiza en procesos celulares interrelacionados con el desarrollo de la infección. En este punto, lo más probable es que guarde relación con la función de la hnRNPK como proteína que ayuda a mantener niveles elevados de inhibidores de las caspasas, inhibiendo la apoptosis (Xiao *et al.*, 2013). La interacción entre el extremo 5' del genoma del RaV y la hnRNPK disminuye la disponibilidad de la ribonucleoproteína, evitando la inhibición de la apoptosis y favoreciendo la propagación de la progenie viral.

También cabe mencionar que es posible que la hnRNPK pueda jugar varios roles durante la infección, incluido algún rol positivo en alguno de los procesos que tienen lugar durante la misma, si bien el balance global de la acción de esta proteína se ha mostrado negativo en tanto que su ausencia favorece la propagación del RaV.

A falta de concretar el mecanismo de acción de la hnRNPK en la infección por RaV, esta tesis ofrece la primera descripción de la función de hnRNPK en calicivirus, actuando como un factor negativo en la propagación del RaV y abriendo la puerta a nuevas vías de investigación sobre el ciclo replicativo de estos virus y el desarrollo de estrategias antivirales.

CONCLUSIONES

1. Se han identificado 28 proteínas celulares capaces de unirse a RNAs sintéticos biotinados de distinta longitud, derivados de los extremos 5' y 3' del genoma del *vesivirus de conejo* (RaV).
2. Cinco de estas proteínas: SYNCRIP (hnRNPQ), hnRNPU, PABP, PTBP1 y hnRNPA1 mostraron capacidad de unirse a ambos extremos del genoma del RaV.
3. Las proteínas HDLBP (Vigilina), EIF2AK2 (PKR), RNA Helicasa A- ATP dependiente, PCBP2, hnRNPA/B, hnRNPK, IGF2BP3 y CCAR2 fueron identificadas por su unión preferente a secuencias del extremo 5' del RaV.
4. Quince de las proteínas identificadas: hnRNPL, hnRNPA0, hnRNPA2/B1, snRNPA, SFPQ, DDX3X, ILF3 (NF90), Nucleolina, ILF2 (NF45), ELAVL1, LARS, MARS, DARS, G3BP1 y G3BP2 mostraron unión preferente a secuencias del extremo 3' del RaV.
5. Se han obtenido líneas celulares modificadas establemente capaces de producir de forma inducible las proteínas virales NS5, NS6/7 o VP1 fusionadas por el carboxilo terminal con una etiqueta peptídica.
6. El análisis de los extractos citoplasmáticos de las células modificadas e inducidas mediante sistemas de cromatografía de afinidad en tándem ha permitido identificar 6 proteínas celulares que interaccionan con los ligandos NS5 y/o VP1.
7. Las proteínas TUBB y HSPA1A mostraron capacidad de interacción, directa o mediada por otros factores no identificados, tanto con la NS5 como con la VP1.
8. La proteína HSC70 interaccionó solamente con la NS5 mientras que las proteínas HSPA1B, HSP90 y hnRNPA1 fueron identificadas por su unión preferente a la VP1.
9. El análisis funcional del papel de la proteína celular PABP, mediante el uso de siRNAs, sugiere que esta proteína desempeña un papel positivo en el ciclo replicativo del RaV, observándose un descenso del 90% en la progenie viral en los cultivos infectados y silenciados.

10. El estudio del papel de la proteína hnRNPK, utilizando siRNAs, sugiere que ésta desempeña un papel negativo en el ciclo replicativo del RaV produciéndose un aumento de 10 veces en los títulos virales cuando se silencia su expresión en los cultivos celulares infectados.
11. Los estudios de inmunolocalización de hnRNPK sugieren que esta proteína, normalmente ubicada en el núcleo celular, se traslada al citoplasma como consecuencia de la infección con el RaV.

BIBLIOGRAFÍA

- Abente, E. J., Sosnovtsev, S. V., Sandoval-Jaime, C., Parra, G. I., Bok, K., Green, K. Y., 2013.** The feline calicivirus leader of the capsid protein is associated with cytopathic effect. *J.Virol.* 87, 3003-3017.
- Abrantes, J., Esteves, P. J., van der, L. W., 2008.** Evidence for recombination in the major capsid gene VP60 of the rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *Arch.Virol.* 153, 329-335.
- Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M., Carstens, E. B., 2013.** Recently agreed changes to the International Code of Virus Classification and Nomenclature. *Arch.Virol.* 158, 2633-2639.
- Ahlquist, P., Noueiry, A. O., Lee, W. M., Kushner, D. B., Dye, B. T., 2003.** Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J.Virol.* 77, 8181-8186.
- Alhatlani, B., Vashist, S., Goodfellow, I., 2015.** Functions of the 5' and 3' ends of calicivirus genomes. *Virus Res.* 206, 134-143.
- Ali, N., Pruijn, G. J., Kenan, D. J., Keene, J. D., Siddiqui, A., 2000.** Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *J.Biol.Chem.* 275, 27531-27540.
- Almazan, F., Galan, C., Enjuanes, L., 2004.** The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J.Virol.* 78, 12683-12688.
- Alonso, C., Oviedo, J. M., Martin-Alonso, J. M., Diaz, E., Boga, J. A., Parra, F., 1998.** Programmed cell death in the pathogenesis of rabbit hemorrhagic disease. *Arch.Virol.* 143, 321-332.
- Alvarez-Sanchez, C., Cancio-Lonches, C., Mora-Heredia, J. E., Santos-Valencia, J. C., Barrera-Vazquez, O. S., Yocupicio-Monroy, M., Gutierrez-Escolano, A. L., 2015.** Negative effect of heat shock on feline calicivirus release from infected cells is associated with the control of apoptosis. *Virus Res.* 198, 44-52.
- Andino, R., Boddeker, N., Silvera, D., Gamarnik, A. V., 1999.** Intracellular determinants of picornavirus replication. *Trends Microbiol.* 7, 76-82.
- Arias, A., Thorne, L., Goodfellow, I., 2014.** Favipiravir elicits antiviral mutagenesis during virus replication in vivo. *Elife.* 3, e03679.
- Arnaud, N., Dabo, S., Maillard, P., Budkowska, A., Kalliampakou, K. I., Mavromara, P., Garcin, D., Hugon, J., Gatignol, A., Akazawa, D., Wakita, T., Meurs, E. F., 2010.** Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation. *PLoS.One.* 5, e10575.
- Bailey, D., Kaiser, W. J., Hollinshead, M., Moffat, K., Chaudhry, Y., Wileman, T., Sosnovtsev, S. V., Goodfellow, I. G., 2010.** Feline calicivirus p32, p39 and p30 proteins localize to the endoplasmic reticulum to initiate replication complex formation. *J.Gen.Virol.* 91, 739-749.
- Balachandran, S., Barber, G. N., 2007.** PKR in innate immunity, cancer, and viral oncolysis. *Methods Mol.Biol.* 383, 277-301.

- Balinsky, C. A., Schmeisser, H., Ganesan, S., Singh, K., Pierson, T. C., Zoon, K. C., 2013.** Nucleolin interacts with the dengue virus capsid protein and plays a role in formation of infectious virus particles. *J.Virol.* 87, 13094-13106.
- Baltimore, D., 1971.** Expression of animal virus genomes. *Bacteriol.Rev.* 35, 235-241.
- Barboro, P., Ferrari, N., Balbi, C., 2014.** Emerging roles of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) in cancer progression. *Cancer Lett.* 352, 152-159.
- Barnhart, M. D., Moon, S. L., Emch, A. W., Wilusz, C. J., Wilusz, J., 2013.** Changes in cellular mRNA stability, splicing, and polyadenylation through HuR protein sequestration by a cytoplasmic RNA virus. *Cell Rep.* 5, 909-917.
- Barral, P. M., Morrison, J. M., Drahos, J., Gupta, P., Sarkar, D., Fisher, P. B., Racaniello, V. R., 2007.** MDA-5 is cleaved in poliovirus-infected cells. *J.Virol.* 81, 3677-3684.
- Barral, P. M., Sarkar, D., Fisher, P. B., Racaniello, V. R., 2009.** RIG-I is cleaved during picornavirus infection. *Virology* 391, 171-176.
- Belliot, G., Sosnovtsev, S. V., Chang, K. O., Babu, V., Uche, U., Arnold, J. J., Cameron, C. E., Green, K. Y., 2005.** Norovirus proteinase-polymerase and polymerase are both active forms of RNA-dependent RNA polymerase. *J.Virol.* 79, 2393-2403.
- Belliot, G., Sosnovtsev, S. V., Chang, K. O., McPhie, P., Green, K. Y., 2008.** Nucleotidylylation of the VPg protein of a human norovirus by its proteinase-polymerase precursor protein. *Virology* 374, 33-49.
- Belliot, G., Sosnovtsev, S. V., Mitra, T., Hammer, C., Garfield, M., Green, K. Y., 2003.** In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J.Virol.* 77, 10957-10974.
- Berke, T., Matson, D. O., 2000.** Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch.Virol.* 145, 1421-1436.
- Bertolotti-Ciarlet, A., Crawford, S. E., Hutson, A. M., Estes, M. K., 2003.** The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J.Virol.* 77, 11603-11615.
- Blakeney, S. J., Cahill, A., Reilly, P. A., 2003.** Processing of Norwalk virus nonstructural proteins by a 3C-like cysteine proteinase. *Virology* 308, 216-224.
- Blyn, L. B., Swiderek, K. M., Richards, O., Stahl, D. C., Semler, B. L., Ehrenfeld, E., 1996.** Poly(rC) binding protein 2 binds to stem-loop IV of the poliovirus RNA 5' noncoding region: identification by automated liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 11115-11120.
- Blyn, L. B., Towner, J. S., Semler, B. L., Ehrenfeld, E., 1997.** Requirement of poly(rC) binding protein 2 for translation of poliovirus RNA. *J.Virol.* 71, 6243-6246.

- Boga, J. A., Martin Alonso, J. M., Casais, R., Parra, F., 1997.** A single dose immunization with rabbit haemorrhagic disease virus major capsid protein produced in *Saccharomyces cerevisiae* induces protection. *J.Gen.Virol.* 78 (Pt 9), 2315-2318.
- Bok, K., Prikhodko, V. G., Green, K. Y., Sosnovtsev, S. V., 2009.** Apoptosis in murine norovirus-infected RAW264.7 cells is associated with downregulation of survivin. *J.Virol.* 83, 3647-3656.
- Bomszyk, K., Denisenko, O., Ostrowski, J., 2004.** hnRNP K: one protein multiple processes. *Bioessays* 26, 629-638.
- Bonderoff, J. M., Larey, J. L., Lloyd, R. E., 2008.** Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C proteinase inhibits viral internal ribosome entry site-mediated translation. *J.Virol.* 82, 9389-9399.
- Bradford, M. M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72, 248-254.
- Bull, R. A., Hansman, G. S., Clancy, L. E., Tanaka, M. M., Rawlinson, W. D., White, P. A., 2005.** Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg.Infect.Dis.* 11, 1079-1085.
- Burgui, I., Aragon, T., Ortin, J., Nieto, A., 2003.** PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J.Gen.Virol.* 84, 3263-3274.
- Burkard, C., Verheije, M. H., Wicht, O., van Kasteren, S. I., van Kuppeveld, F. J., Haagmans, B. L., Pelkmans, L., Rottier, P. J., Bosch, B. J., de Haan, C. A., 2014.** Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner. *PLoS.Pathog.* 10, e1004502.
- Burnette, W. N., 1981.** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal.Biochem.* 112, 195-203.
- Burnham, A. J., Gong, L., Hardy, R. W., 2007.** Heterogeneous nuclear ribonuclear protein K interacts with Sindbis virus nonstructural proteins and viral subgenomic mRNA. *Virology* 367, 212-221.
- Cancio-Lonches, C., Yocupicio-Monroy, M., Sandoval-Jaime, C., Galvan-Mendoza, I., Urena, L., Vashist, S., Goodfellow, I., Salas-Benito, J., Gutierrez-Escolano, A. L., 2011.** Nucleolin interacts with the feline calicivirus 3' untranslated region and the protease-polymerase NS6 and NS7 proteins, playing a role in virus replication. *J.Virol.* 85, 8056-8068.
- Carlsson, B., Lindberg, A. M., Rodriguez-Diaz, J., Hedlund, K. O., Persson, B., Svensson, L., 2009.** Quasispecies dynamics and molecular evolution of human norovirus capsid P region during chronic infection. *J.Gen.Virol.* 90, 432-441.
- Carpenter, B., McKay, M., Dundas, S. R., Lawrie, L. C., Telfer, C., Murray, G. I., 2006.** Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly localised and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Br.J.Cancer* 95, 921-927.

- Casais, R., Molleda, L. G., Machin, A., del, B. G., Manso, A. G., Dalton, K. P., Coto, A., Alonso, J. M., Prieto, M., Parra, F., 2008.** Structural and functional analysis of virus factories purified from Rabbit vesivirus-infected Vero cells. *Virus Res.* 137, 112-121.
- Chakravarty, S., Hutson, A. M., Estes, M. K., Prasad, B. V., 2005.** Evolutionary trace residues in noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity. *J.Virol.* 79, 554-568.
- Chang, C. J., Luh, H. W., Wang, S. H., Lin, H. J., Lee, S. C., Hu, S. T., 2001.** The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) interacts with dengue virus core protein. *DNA Cell Biol.* 20, 569-577.
- Chang, K. O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Kim, Y., Saif, L. J., Green, K. Y., 2004.** Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 8733-8738.
- Chase, G., Deng, T., Fodor, E., Leung, B. W., Mayer, D., Schwemmle, M., Brownlee, G., 2008.** Hsp90 inhibitors reduce influenza virus replication in cell culture. *Virology* 377, 431-439.
- Chaudhry, Y., Nayak, A., Bordeleau, M. E., Tanaka, J., Pelletier, J., Belsham, G. J., Roberts, L. O., Goodfellow, I. G., 2006.** Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. *J.Biol.Chem.* 281, 25315-25325.
- Chen, R., Neill, J. D., Estes, M. K., Prasad, B. V., 2006.** X-ray structure of a native calicivirus: structural insights into antigenic diversity and host specificity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103, 8048-8053.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J., Marks, R. M., 1997.** Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat.Med.* 3, 866-871.
- Choi, H. P., Juarez, S., Ciordia, S., Fernandez, M., Bargiela, R., Albar, J. P., Mazumdar, V., Anton, B. P., Kasif, S., Ferrer, M., Steffen, M., 2013.** Biochemical Characterization of Hypothetical Proteins from. *PLoS.One.* 8, e66605.
- Choi, K. S., Huang, P., Lai, M. M., 2002.** Polypyrimidine-tract-binding protein affects transcription but not translation of mouse hepatitis virus RNA. *Virology* 303, 58-68.
- Choi, K. S., Mizutani, A., Lai, M. M., 2004.** SYNCRIP, a member of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein family, is involved in mouse hepatitis virus RNA synthesis. *J.Virol.* 78, 13153-13162.
- Chuang, C. K., Yang, T. H., Chen, T. H., Yang, C. F., Chen, W. J., 2015.** Heat shock cognate protein 70 isoform D is required for clathrin-dependent endocytosis of Japanese encephalitis virus in C6/36 cells. *J.Gen.Virol.* 96, 793-803.
- Chung, L., Bailey, D., Leen, E. N., Emmott, E. P., Chaudhry, Y., Roberts, L. O., Curry, S., Locker, N., Goodfellow, I. G., 2014.** Norovirus translation requires an interaction between the C Terminus of the genome-linked viral

protein VPg and eukaryotic translation initiation factor 4G. *J.Biol.Chem.* 289, 21738-21750.

Clarke, I. N., Lambden, P. R., 2000. Organization and expression of calicivirus genes. *J.Infect.Dis.* 181 Suppl 2, S309-S316.

Clarke, I. N., Estes, M. K., Green, K. Y., Hansman, G. S., Knowles, N. J., Koopmans, M. K., Matson, D. O., Meyers, G. Neill, J. D., Radford, A., Smith, A. W., Studdert, M. J., Thiel, H. J., Vinjé, J., 2011. *Caliciviridae*. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. pp 977-986. San Diego: Elsevier.

Connor, J. H., McKenzie, M. O., Parks, G. D., Lyles, D. S., 2007. Antiviral activity and RNA polymerase degradation following Hsp90 inhibition in a range of negative strand viruses. *Virology* 362, 109-119.

Dabo, S., Meurs, E. F., 2012. dsRNA-dependent protein kinase PKR and its role in stress, signaling and HCV infection. *Viruses*. 4, 2598-2635.

Daughenbaugh, K. F., Fraser, C. S., Hershey, J. W., Hardy, M. E., 2003. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J.* 22, 2852-2859.

Daughenbaugh, K. F., Wobus, C. E., Hardy, M. E., 2006. VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Virology* 33, 33.

Day, J. M., Ballard, L. L., Duke, M. V., Scheffler, B. E., Zsak, L., 2010. Metagenomic analysis of the turkey gut RNA virus community. *Virology* 7, 313.

Desmyter, J., Melnick, J. L., Rawls, W. E., 1968. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J.Virology* 2, 955-961.

Devaraj, S. G., Wang, N., Chen, Z., Chen, Z., Tseng, M., Barretto, N., Lin, R., Peters, C. J., Tseng, C. T., Baker, S. C., Li, K., 2007. Regulation of IRF-3-dependent innate immunity by the papain-like protease domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J.Biol.Chem.* 282, 32208-32221.

Di, M. B., Marsilio, F., Roy, P., 2007. Assembly of feline calicivirus-like particle and its immunogenicity. *Vet.Microbiol.* 120, 173-178.

Domingo, E., Sheldon, J., Perales, C., 2012. Viral quasispecies evolution. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 76, 159-216.

Dos, R. F., Carrasco, M., Doyle, T., Brierley, I., 2004. Programmed -1 ribosomal frameshifting in the SARS coronavirus. *Biochem.Soc.Trans.* 32, 1081-1083.

Dunham, D. M., Jiang, X., Berke, T., Smith, A. W., Matson, D. O., 1998. Genomic mapping of a calicivirus VPg. *Arch.Virology* 143, 2421-2430.

Ellis, E. L., Delbruck, M., 1939. THE GROWTH OF BACTERIOPHAGE. *J.Gen.Physiol* 22, 365-384.

Ettayebi, K., Hardy, M. E., 2003. Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J.Virology* 77, 11790-11797.

- Farkas, T., Sestak, K., Wei, C., Jiang, X., 2008.** Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J.Virol.* 82, 5408-5416.
- Fernandez-Vega, V., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., King, A. D., Mitra, T., Gorbalenya, A., Green, K. Y., 2004.** Norwalk virus N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells. *J.Virol.* 78, 4827-4837.
- Fricks, C. E., Hogle, J. M., 1990.** Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J.Virol.* 64, 1934-1945.
- Fullerton, S. W., Blaschke, M., Coutard, B., Gebhardt, J., Gorbalenya, A., Canard, B., Tucker, P. A., Rohayem, J., 2007.** Structural and functional characterization of sapovirus RNA-dependent RNA polymerase. *J.Virol.* 81, 1858-1871.
- Galan, C., Sola, I., Nogales, A., Thomas, B., Akoulitchev, A., Enjuanes, L., Almazan, F., 2009.** Host cell proteins interacting with the 3' end of TGEV coronavirus genome influence virus replication. *Virology* 391, 304-314.
- Gale, M. J., Jr., Korth, M. J., Tang, N. M., Tan, S. L., Hopkins, D. A., Dever, T. E., Polyak, S. J., Gretch, D. R., Katze, M. G., 1997.** Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 230, 217-227.
- Gamarnik, A. V., Andino, R., 1997.** Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5' noncoding region of poliovirus RNA. *RNA.* 3, 882-892.
- Gamarnik, A. V., Andino, R., 1998.** Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev.* 12, 2293-2304.
- García Manso, A., 2014.** Tesis Doctoral: Estrategias de genética reversa aplicadas al *vesivirus de conejo*. Universidad de Oviedo (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular).
- Geller, R., Taguwa, S., Frydman, J., 2012.** Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication. *Biochim.Biophys.Acta* 1823, 698-706.
- Germi, R., Crance, J. M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W., Zarski, J. P., Drouet, E., 2002.** Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology* 292, 162-168.
- Gerondopoulos, A., Jackson, T., Monaghan, P., Doyle, N., Roberts, L. O., 2010.** Murine norovirus-1 cell entry is mediated through a non-clathrin-, non-caveolae-, dynamin- and cholesterol-dependent pathway. *J.Gen.Virol.* 91, 1428-1438.
- Glass, P. J., Zeng, C. Q., Estes, M. K., 2003.** Two nonoverlapping domains on the Norwalk virus open reading frame 3 (ORF3) protein are involved in the formation of the phosphorylated 35K protein and in ORF3-capsid protein interactions. *J.Virol.* 77, 3569-3577.
- González Molleda, L., 2008.** Tesis Doctoral: Caracterización molecular de un nuevo calicivirus de conejo. Universidad de Oviedo (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular).

- Gonzalez-Reyes, S., Garcia-Manso, A., del, B. G., Dalton, K. P., Gonzalez-Molleda, L., Arrojo-Fernandez, J., Nicieza, I., Parra, F., 2009.** Role of annexin A2 in cellular entry of rabbit vesivirus. *J.Gen.Virol.* 90, 2724-2730.
- Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Gioldasi, I., Gerondopoulos, A., Natoni, A., Labrie, L., Laliberte, J. F., Roberts, L., 2005.** Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep.* 6, 968-972.
- Green, K. Y., Ando, T., Balayan, M. S., Berke, T., Clarke, I. N., Estes, M. K., Matson, D. O., Nakata, S., Neill, J. D., Studdert, M. J., Thiel, H. J., 2000.** Taxonomy of the caliciviruses. *J.Infect.Dis.* 181 Suppl 2, S322-S330.
- Green, K. Y., Mory, A., Fogg, M. H., Weisberg, A., Belliot, G., Wagner, M., Mitra, T., Ehrenfeld, E., Cameron, C. E., Sosnovtsev, S. V., 2002.** Isolation of enzymatically active replication complexes from feline calicivirus-infected cells. *J.Virol.* 76, 8582-8595.
- Gui, H., Lu, C. W., Adams, S., Stollar, V., Li, M. L., 2010.** hnRNP A1 interacts with the genomic and subgenomic RNA promoters of Sindbis virus and is required for the synthesis of G and SG RNA. *J.Biomed.Sci.* 17, 59.
- Gutierrez-Escolano, A. L., Brito, Z. U., del Angel, R. M., Jiang, X., 2000.** Interaction of cellular proteins with the 5' end of Norwalk virus genomic RNA. *J.Virol.* 74, 8558-8562.
- Gutierrez-Escolano, A. L., Vazquez-Ochoa, M., Escobar-Herrera, J., Hernandez-Acosta, J., 2003.** La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 311, 759-766.
- Hall, A. J., Lopman, B. A., Payne, D. C., Patel, M. M., Gastanaduy, P. A., Vinje, J., Parashar, U. D., 2013.** Norovirus disease in the United States. *Emerg.Infect.Dis.* 19, 1198-1205.
- Han, W., Xia, Q., Yin, B., Peng, X. Z., 2014.** Ribotrap analysis of proteins associated with FHL3 3'untranslated region in glioma cells. *Chin Med.Sci.J.* 29, 78-84.
- Han, X., Li, Z., Chen, H., Wang, H., Mei, L., Wu, S., Zhang, T., Liu, B., Lin, X., 2012.** Influenza virus A/Beijing/501/2009(H1N1) NS1 interacts with beta-tubulin and induces disruption of the microtubule network and apoptosis on A549 cells. *PLoS.One.* 7, e48340.
- Hanahan, D.** 1985. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. En D.M. Glover, DNA cloning: a practical approach, Vol. 1, pp. 1109-1122.
- Hansman, G. S., Oka, T., Takeda, N., 2008.** Sapovirus-like particles derived from polyprotein. *Virus Res.* 137, 261-265.
- Herbert, T. P., Brierley, I., Brown, T. D., 1997.** Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J.Gen.Virol.* 78 (Pt 5), 1033-1040.
- Herold, J., Andino, R., 2001.** Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol.Cell* 7, 581-591.

- Herold, J., Siddell, S. G., 1993.** An 'elaborated' pseudoknot is required for high frequency frameshifting during translation of HCV 229E polymerase mRNA. *Nucleic Acids Res.* 21, 5838-5842.
- Hilgard, P., Stockert, R., 2000.** Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* 32, 1069-1077.
- Hogbom, M., Jager, K., Robel, I., Unge, T., Rohayem, J., 2009.** The active form of the norovirus RNA-dependent RNA polymerase is a homodimer with cooperative activity. *J.Gen.Virol.* 90, 281-291.
- Hope, D. A., Diamond, S. E., Kirkegaard, K., 1997.** Genetic dissection of interaction between poliovirus 3D polymerase and viral protein 3AB. *J.Virol.* 71, 9490-9498.
- Hosmillo, M., Chaudhry, Y., Kim, D. S., Goodfellow, I., Cho, K. O., 2014.** Sapovirus translation requires an interaction between VPg and the cap binding protein eIF4E. *J.Virol.* 88, 12213-12221.
- Huang, P., Lai, M. M., 1999.** Polypyrimidine tract-binding protein binds to the complementary strand of the mouse hepatitis virus 3' untranslated region, thereby altering RNA conformation. *J.Virol.* 73, 9110-9116.
- Huang, P., Lai, M. M., 2001.** Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein a1 binds to the 3'-untranslated region and mediates potential 5'-3'-end cross talks of mouse hepatitis virus RNA. *J.Virol.* 75, 5009-5017.
- Huang, P., Farkas, T., Marionneau, S., Zhong, W., Ruvoen-Clouet, N., Morrow, A. L., Altaye, M., Pickering, L. K., Newburg, D. S., LePendu, J., Jiang, X., 2003.** Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. *J.Infect.Dis.* 188, 19-31.
- Hyde, J. L., Gillespie, L. K., Mackenzie, J. M., 2012.** Mouse norovirus 1 utilizes the cytoskeleton network to establish localization of the replication complex proximal to the microtubule organizing center. *J.Virol.* 86, 4110-4122.
- Hyde, J. L., Mackenzie, J. M., 2010.** Subcellular localization of the MNV-1 ORF1 proteins and their potential roles in the formation of the MNV-1 replication complex. *Virology* 406, 138-148.
- Hyde, J. L., Sosnovtsev, S. V., Green, K. Y., Wobus, C., Virgin, H. W., Mackenzie, J. M., 2009.** Mouse norovirus replication is associated with virus-induced vesicle clusters originating from membranes derived from the secretory pathway. *J.Virol.* 83, 9709-9719.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H., 1990.** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Isken, O., Grassmann, C. W., Sarisky, R. T., Kann, M., Zhang, S., Grosse, F., Kao, P. N., Behrens, S. E., 2003.** Members of the NF90/NFAR protein group are involved in the life cycle of a positive-strand RNA virus. *EMBO J.* 22, 5655-5665.
- Izumi, R. E., Valdez, B., Banerjee, R., Srivastava, M., Dasgupta, A., 2001.** Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res.* 76, 17-29

- Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., Linsley, P. S., 2003.** Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat.Biotechnol.* 21, 635-637.
- Jiang, X., Wang, M., Graham, D. Y., Estes, M. K., 1992.** Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J.Virol.* 66, 6527-6532.
- Jones, M. K., Watanabe, M., Zhu, S., Graves, C. L., Keyes, L. R., Grau, K. R., Gonzalez-Hernandez, M. B., Iovine, N. M., Wobus, C. E., Vinje, J., Tibbetts, S. A., Wallet, S. M., Karst, S. M., 2014.** Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science* 346, 755-759.
- Jorba, N., Juarez, S., Torreira, E., Gastaminza, P., Zamarrero, N., Albar, J. P., Ortin, J., 2008.** Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors. *Proteomics.* 8, 2077-2088.
- Kafasla, P., Morgner, N., Robinson, C. V., Jackson, R. J., 2010.** Polypyrimidine tract-binding protein stimulates the poliovirus IRES by modulating eIF4G binding. *EMBO J.* 29, 3710-3722.
- Kaiser, W. J., Chaudhry, Y., Sosnovtsev, S. V., Goodfellow, I. G., 2006.** Analysis of protein-protein interactions in the feline calicivirus replication complex. *J.Gen.Virol.* 87, 363-368.
- Kapikian, A. Z., 2000.** The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *J.Infect.Dis.* 181 Suppl 2, S295-S302.
- Karakasiliotis, I., Chaudhry, Y., Roberts, L. O., Goodfellow, I. G., 2006.** Feline calicivirus replication: requirement for polypyrimidine tract-binding protein is temperature-dependent. *J.Gen.Virol.* 87, 3339-3347.
- Karakasiliotis, I., Vashist, S., Bailey, D., Abente, E. J., Green, K. Y., Roberts, L. O., Sosnovtsev, S. V., Goodfellow, I. G., 2010.** Polypyrimidine tract binding protein functions as a negative regulator of feline calicivirus translation. *PLoS.One.* 5, e9562.
- Kaufer, S., Coffey, C. M., Parker, J. S., 2012.** The cellular chaperone hsc70 is specifically recruited to reovirus viral factories independently of its chaperone function. *J.Virol.* 86, 1079-1089.
- Kerekatte, V., Keiper, B. D., Badorff, C., Cai, A., Knowlton, K. U., Rhoads, R. E., 1999.** Cleavage of Poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease in vitro and in vivo: another mechanism for host protein synthesis shutoff? *J.Virol.* 73, 709-717.
- Kim, J. H., Hahm, B., Kim, Y. K., Choi, M., Jang, S. K., 2000.** Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm. *J.Mol.Biol.* 298, 395-405.
- Klumperman, J., Locker, J. K., Meijer, A., Horzinek, M. C., Geuze, H. J., Rottier, P. J., 1994.** Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. *J.Virol.* 68, 6523-6534.
- Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S. H., Zevenhoven-Dobbe, J. C., van der, M. Y., Koster, A. J., Mommaas, A. M., Snijder, E. J., 2008.** SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS.Biol.* 6, e226.

- Ko, C., Lee, S., Windisch, M. P., Ryu, W. S., 2014.** DDX3 DEAD-box RNA helicase is a host factor that restricts hepatitis B virus replication at the transcriptional level. *J.Virol.* 88, 13689-13698.
- Kong, Q., Xue, C., Ren, X., Zhang, C., Li, L., Shu, D., Bi, Y., Cao, Y., 2010.** Proteomic analysis of purified coronavirus infectious bronchitis virus particles. *Proteome.Sci.* 8, 29.
- Konig, M., Thiel, H. J., Meyers, G., 1998.** Detection of viral proteins after infection of cultured hepatocytes with rabbit hemorrhagic disease virus. *J.Virol.* 72, 4492-4497.
- Koonin, E. V., Gorbalenya, A. E., Purdy, M. A., Rozanov, M. N., Reyes, G. R., Bradley, D. W., 1992.** Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 8259-8263.
- Kreutz, L. C., Seal, B. S., 1995.** The pathway of feline calicivirus entry. *Virus Res.* 35, 63-70.
- Kuyumcu-Martinez, M., Belliot, G., Sosnovtsev, S. V., Chang, K. O., Green, K. Y., Lloyd, R. E., 2004.** Calicivirus 3C-like proteinase inhibits cellular translation by cleavage of poly(A)-binding protein. *J.Virol.* 78, 8172-8182.
- Kuyumcu-Martinez, N. M., Van Eden, M. E., Younan, P., Lloyd, R. E., 2004.** Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol.Cell Biol.* 24, 1779-1790.
- L'Homme, Y., Sansregret, R., Plante-Fortier, E., Lamontagne, A. M., Ouardani, M., Lacroix, G., Simard, C., 2009.** Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae. *Virus Genes* 39, 66-75.
- Laemmli, U. K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lai, M. M., 1998.** Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes: a parallel to DNA-dependent RNA transcription. *Virology* 244, 1-12.
- Lamphear, B. J., Yan, R., Yang, F., Waters, D., Liebig, H. D., Klump, H., Kuechler, E., Skern, T., Rhoads, R. E., 1993.** Mapping the cleavage site in protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma of the 2A proteases from human Coxsackievirus and rhinovirus. *J.Biol.Chem.* 268, 19200-19203.
- Landeras-Bueno, S., Jorba, N., Perez-Cidoncha, M., Ortin, J., 2011.** The splicing factor proline-glutamine rich (SFPQ/PSF) is involved in influenza virus transcription. *PLoS.Pathog.* 7, e1002397.
- Lauring, A. S., Andino, R., 2010.** Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS.Pathog.* 6, e1001005.
- Lee, E., Pavy, M., Young, N., Freeman, C., Lobigs, M., 2006.** Antiviral effect of the heparan sulfate mimetic, PI-88, against dengue and encephalitic flaviviruses. *Antiviral Res.* 69, 31-38.

- Leffers, H., Dejgaard, K., Celis, J. E., 1995.** Characterisation of two major cellular poly(rC)-binding human proteins, each containing three K-homologous (KH) domains. *Eur.J.Biochem.* 230, 447-453.
- Leuthold, M. M., Dalton, K. P., Hansman, G. S., 2015.** Structural analysis of a rabbit hemorrhagic disease virus binding to histo-blood group antigens. *J.Virol.* 89, 2378-2387.
- Li, C., Ge, L. L., Li, P. P., Wang, Y., Dai, J. J., Sun, M. X., Huang, L., Shen, Z. Q., Hu, X. C., Ishag, H., Mao, X., 2014.** Cellular DDX3 regulates Japanese encephalitis virus replication by interacting with viral un-translated regions. *Virology* 449, 70-81.
- Li, H. P., Huang, P., Park, S., Lai, M. M., 1999.** Polypyrimidine tract-binding protein binds to the leader RNA of mouse hepatitis virus and serves as a regulator of viral transcription. *J.Virol.* 73, 772-777.
- Li, H. P., Zhang, X., Duncan, R., Comai, L., Lai, M. M., 1997.** Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 binds to the transcription-regulatory region of mouse hepatitis virus RNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 9544-9549.
- Liao, Q., Wang, X., Wang, D., Zhang, D., 2014.** Complete genome sequence of a novel calicivirus from a goose. *Arch.Virol.* 159, 2529-2531.
- Lin, J. Y., Li, M. L., Huang, P. N., Chien, K. Y., Horng, J. T., Shih, S. R., 2008.** Heterogeneous nuclear ribonuclear protein K interacts with the enterovirus 71 5' untranslated region and participates in virus replication. *J.Gen.Virol.* 89, 2540-2549.
- Lin, J. Y., Shih, S. R., Pan, M., Li, C., Lue, C. F., Stollar, V., Li, M. L., 2009.** hnRNP A1 interacts with the 5' untranslated regions of enterovirus 71 and Sindbis virus RNA and is required for viral replication. *J.Virol.* 83, 6106-6114.
- Lin, X., Thorne, L., Jin, Z., Hammad, L. A., Li, S., Deval, J., Goodfellow, I. G., Kao, C. C., 2015.** Subgenomic promoter recognition by the norovirus RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 43, 446-460.
- Liu, J., Henao-Mejia, J., Liu, H., Zhao, Y., He, J. J., 2011.** Translational regulation of HIV-1 replication by HIV-1 Rev cellular cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3. *J.Neuroimmune.Pharmacol.* 6, 308-321.
- Lochridge, V. P., Jutila, K. L., Graff, J. W., Hardy, M. E., 2005.** Epitopes in the P2 domain of norovirus VP1 recognized by monoclonal antibodies that block cell interactions. *J.Gen.Virol.* 86, 2799-2806.
- Lopes, A. M., Dalton, K. P., Magalhaes, M. J., Parra, F., Esteves, P. J., Holmes, E. C., Abrantes, J., 2015.** Full genomic analysis of new variant rabbit hemorrhagic disease virus revealed multiple recombination events. *J.Gen.Virol.* 96, 1309-1319.
- Lopez-Manriquez, E., Vashist, S., Urena, L., Goodfellow, I., Chavez, P., Mora-Heredia, J. E., Cancio-Lonches, C., Garrido, E., Gutierrez-Escolano, A. L., 2013.** Norovirus genome circularization and efficient replication are facilitated by binding of PCBP2 and hnRNP A1. *J.Virol.* 87, 11371-11387.
- Lopman, B. A., Brown, D. W., Koopmans, M., 2002.** Human caliciviruses in Europe. *J.Clin.Virol.* 24, 137-160.

- Luttermann, C., Meyers, G., 2007.** A bipartite sequence motif induces translation reinitiation in feline calicivirus RNA. *J.Biol.Chem.* 282, 7056-7065.
- Luttermann, C., Meyers, G., 2009.** The importance of inter- and intramolecular base pairing for translation reinitiation on a eukaryotic bicistronic mRNA. *Genes Dev.* 23, 331-344.
- Macejak, D. G., Sarnow, P., 1992.** Association of heat shock protein 70 with enterovirus capsid precursor P1 in infected human cells. *J.Virol.* 66, 1520-1527.
- Machin, A., Martin Alonso, J. M., Dalton, K. P., Parra, F., 2009.** Functional differences between precursor and mature forms of the RNA-dependent RNA polymerase from rabbit hemorrhagic disease virus. *J.Gen.Virol.* 90, 2114-2118.
- Machin, A., Martin Alonso, J. M., Parra, F., 2001.** Identification of the amino acid residue involved in rabbit hemorrhagic disease virus VPg uridylylation. *J.Biol.Chem.* 276, 27787-27792.
- Makino, A., Shimojima, M., Miyazawa, T., Kato, K., Tohya, Y., Akashi, H., 2006.** Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. *J.Virol.* 80, 4482-4490.
- Marin, M. S., Casais, R., Alonso, J. M., Parra, F., 2000.** ATP binding and ATPase activities associated with recombinant rabbit hemorrhagic disease virus 2C-like polypeptide. *J.Virol.* 74, 10846-10851.
- Marionneau, S., Ruvoen, N., Le Moullac-Vaidye, B., Clement, M., Cailleau-Thomas, A., Ruiz-Palacois, G., Huang, P., Jiang, X., Le, P. J., 2002.** Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 122, 1967-1977.
- Martin Alonso, J. M., Casais, R., Boga, J. A., Parra, F., 1996.** Processing of rabbit hemorrhagic disease virus polyprotein. *J.Virol.* 70, 1261-1265.
- Martin-Alonso, J. M., Skilling, D. E., Gonzalez-Molleda, L., del, B. G., Machin, A., Keefer, N. K., Matson, D. O., Iversen, P. L., Smith, A. W., Parra, F., 2005.** Isolation and characterization of a new Vesivirus from rabbits. *Virology* 337, 373-383.
- Mathapati, B. S., Mishra, N., Rajukumar, K., Nema, R. K., Behera, S. P., Dubey, S. C., 2010.** Entry of bovine viral diarrhea virus into ovine cells occurs through clathrin-dependent endocytosis and low pH-dependent fusion. *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim* 46, 403-407.
- Matsuura, Y., Tohya, Y., Mochizuki, M., Takase, K., Sugimura, T., 2001.** Identification of conformational neutralizing epitopes on the capsid protein of canine calicivirus. *J.Gen.Virol.* 82, 1695-1702.
- Matsuura, Y., Tohya, Y., Onuma, M., Roerink, F., Mochizuki, M., Sugimura, T., 2000.** Expression and processing of the canine calicivirus capsid precursor. *J.Gen.Virol.* 81, 195-199.
- McCormick, C. J., Salim, O., Lambden, P. R., Clarke, I. N., 2008.** Translation termination reinitiation between open reading frame 1 (ORF1) and ORF2 enables capsid expression in a bovine norovirus without the need for production of viral subgenomic RNA. *J.Virol.* 82, 8917-8921.

- McFadden, N., Bailey, D., Carrara, G., Benson, A., Chaudhry, Y., Shortland, A., Heeney, J., Yarovinsky, F., Simmonds, P., Macdonald, A., Goodfellow, I., 2011.** Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4. *PLoS.Pathog.* 7, e1002413.
- Meerovitch, K., Svitkin, Y. V., Lee, H. S., Lejbkowitz, F., Kenan, D. J., Chan, E. K., Agol, V. I., Keene, J. D., Sonenberg, N., 1993.** La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J.Virol.* 67, 3798-3807.
- Meyers, G., 2003.** Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism. *J.Biol.Chem.* 278, 34051-34060.
- Meyers, G., 2007.** Characterization of the sequence element directing translation reinitiation in RNA of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus. *J.Virol.* 81, 9623-9632.
- Meyers, G., Wirblich, C., Thiel, H. J., 1991.** Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology* 184, 677-686.
- Mikalsen, A. B., Nilsen, P., Froystad-Saugen, M., Lindmo, K., Eliassen, T. M., Rode, M., Evensen, O., 2014.** Characterization of a novel calicivirus causing systemic infection in atlantic salmon (*Salmo salar* L.): proposal for a new genus of caliciviridae. *PLoS.One.* 9, e107132.
- Mitra, T., Sosnovtsev, S. V., Green, K. Y., 2004.** Mutagenesis of tyrosine 24 in the VPg protein is lethal for feline calicivirus. *J.Virol.* 78, 4931-4935.
- Morales, M., Barcena, J., Ramirez, M. A., Boga, J. A., Parra, F., Torres, J. M., 2004.** Synthesis in vitro of rabbit hemorrhagic disease virus subgenomic RNA by internal initiation on (-)sense genomic RNA: mapping of a subgenomic promoter. *J.Biol.Chem.* 279, 17013-17018.
- Naphtine, S., Lever, R. A., Powell, M. L., Jackson, R. J., Brown, T. D., Brierley, I., 2009.** Expression of the VP2 protein of murine norovirus by a translation termination-reinitiation strategy. *PLoS.One.* 4, e8390.
- Neill, J. D., 1990.** Nucleotide sequence of a region of the feline calicivirus genome which encodes picornavirus-like RNA-dependent RNA polymerase, cysteine protease and 2C polypeptides. *Virus Res.* 17, 145-160.
- Neill, J. D., 2002.** The subgenomic RNA of feline calicivirus is packaged into viral particles during infection. *Virus Res.* 87, 89-93.
- Ng, K. K., Cherney, M. M., Vazquez, A. L., Machin, A., Alonso, J. M., Parra, F., James, M. N., 2002.** Crystal structures of active and inactive conformations of a caliciviral RNA-dependent RNA polymerase. *J.Biol.Chem.* 277, 1381-1387.
- Ng, T. F., Marine, R., Wang, C., Simmonds, P., Kapusinszky, B., Bodhidatta, L., Oderinde, B. S., Wommack, K. E., Delwart, E., 2012.** High variety of known and new RNA and DNA viruses of diverse origins in untreated sewage. *J.Virol.* 86, 12161-12175.

- Nokhbeh, M. R., Hazra, S., Alexander, D. A., Khan, A., McAllister, M., Suuronen, E. J., Griffith, M., Dimock, K., 2005.** Enterovirus 70 binds to different glycoconjugates containing alpha2,3-linked sialic acid on different cell lines. *J.Virol.* 79, 7087-7094.
- Ohlinger, V. F., Haas, B., Thiel, H. J., 1993.** Rabbit hemorrhagic disease (RHD): characterization of the causative calicivirus. *Vet.Res.* 24, 103-116.
- Oka, T., Katayama, K., Ogawa, S., Hansman, G. S., Kageyama, T., Ushijima, H., Miyamura, T., Takeda, N., 2005.** Proteolytic processing of sapovirus ORF1 polyprotein. *J.Virol.* 79, 7283-7290.
- Oksayan, S., Nikolic, J., David, C. T., Blondel, D., Jans, D. A., Moseley, G. W., 2015.** Identification of a role for nucleolin in rabies virus infection. *J.Virol.* 89, 1939-1943.
- Oliver, S. L., Asobayire, E., Dastjerdi, A. M., Bridger, J. C., 2006.** Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. *Virology* 350, 240-250.
- Ortin, J., Parra, F., 2006.** Structure and function of RNA replication. *Annu.Rev.Microbiol.* 60, 305-326.
- Ossiboff, R. J., Parker, J. S., 2007.** Identification of regions and residues in feline junctional adhesion molecule required for feline calicivirus binding and infection. *J.Virol.* 81, 13608-13621.
- Panjwani, A., Strauss, M., Gold, S., Wenham, H., Jackson, T., Chou, J. J., Rowlands, D. J., Stonehouse, N. J., Hogle, J. M., Tuthill, T. J., 2014.** Capsid protein VP4 of human rhinovirus induces membrane permeability by the formation of a size-selective multimeric pore. *PLoS.Pathog.* 10, e1004294.
- Pappin, D. J., Hojrup, P., Bleasby, A. J., 1993.** Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr.Biol.* 3, 327-332.
- Pariente, N., Sierra, S., Airaksinen, A., 2005.** Action of mutagenic agents and antiviral inhibitors on foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.* 107, 183-193.
- Parsley, T. B., Towner, J. S., Blyn, L. B., Ehrenfeld, E., Semler, B. L., 1997.** Poly (rC) binding protein 2 forms a ternary complex with the 5'-terminal sequences of poliovirus RNA and the viral 3CD proteinase. *RNA.* 3, 1124-1134.
- Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D., Wimmer, E., 1998.** Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* 393, 280-284.
- Payment, P., y Trudel, M.** 1993. Isolation and identification of viruses. *Methods and Techniques in Virology.* Marcel Dekker, New York, 19-40.
- Perales, C., Domingo, E., 2015.** Antiviral Strategies Based on Lethal Mutagenesis and Error Threshold. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*
- Perry, J. W., Wobus, C. E., 2010.** Endocytosis of murine norovirus 1 into murine macrophages is dependent on dynamin II and cholesterol. *J.Virol.* 84, 6163-6176.
- Pfeiffer, J. K., Kirkegaard, K., 2005.** Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice. *PLoS.Pathog.* 1, e11.

- Pfister, T., Wimmer, E., 2001.** Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *J.Virol.* 75, 1611-1619.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J., Poncet, D., 1998.** Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* 17, 5811-5821.
- Poenisch, M., Metz, P., Blankenburg, H., Ruggieri, A., Lee, J. Y., Rupp, D., Rebhan, I., Diederich, K., Kaderali, L., Domingues, F. S., Albrecht, M., Lohmann, V., Erfle, H., Bartenschlager, R., 2015.** Identification of HNRNPK as Regulator of Hepatitis C Virus Particle Production. *PLoS.Pathog.* 11, e1004573.
- Poyry, T. A., Kaminski, A., Connell, E. J., Fraser, C. S., Jackson, R. J., 2007.** The mechanism of an exceptional case of reinitiation after translation of a long ORF reveals why such events do not generally occur in mammalian mRNA translation. *Genes Dev.* 21, 3149-3162.
- Prasad, B. V., Hardy, M. E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M. G., Estes, M. K., 1999.** X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286, 287-290.
- Radford, A. D., Coyne, K. P., Dawson, S., Porter, C. J., Gaskell, R. M., 2007.** Feline calicivirus. *Vet.Res.* 38, 319-335.
- Radford, A. D., Turner, P. C., Bennett, M., McArdle, F., Dawson, S., Glenn, M. A., Williams, R. A., Gaskell, R. M., 1998.** Quasispecies evolution of a hypervariable region of the feline calicivirus capsid gene in cell culture and in persistently infected cats. *J.Gen.Virol.* 79 (Pt 1), 1-10.
- Radi, M., Falchi, F., Garbelli, A., Samuele, A., Bernardo, V., Paolucci, S., Baldanti, F., Schenone, S., Manetti, F., Maga, G., Botta, M., 2012.** Discovery of the first small molecule inhibitor of human DDX3 specifically designed to target the RNA binding site: towards the next generation HIV-1 inhibitors. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 22, 2094-2098.
- Ren, X., Xue, C., Kong, Q., Zhang, C., Bi, Y., Cao, Y., 2012.** Proteomic analysis of purified Newcastle disease virus particles. *Proteome.Sci.* 10, 32.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., Seraphin, B., 1999.** A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat.Biotechnol.* 17, 1030-1032.
- Rohayem, J., Munch, J., Rethwilm, A., 2005.** Evidence of recombination in the norovirus capsid gene. *J.Virol.* 79, 4977-4990.
- Rohayem, J., Robel, I., Jager, K., Scheffler, U., Rudolph, W., 2006.** Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by norovirus 3Dpol. *J.Virol.* 80, 7060-7069.
- Ruvoen-Clouet, N., Ganiere, J. P., ndre-Fontaine, G., Blanchard, D., Le, P. J., 2000.** Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family. *J.Virol.* 74, 11950-11954.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2^a edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

- Sandoval-Jaime, C., Gutierrez-Escolano, A. L., 2009.** Cellular proteins mediate 5'-3' end contacts of Norwalk virus genomic RNA. *Virology* 387, 322-330.
- Scholte, F. E., Tas, A., Albuлесcu, I. C., Zusinaite, E., Merits, A., Snijder, E. J., van Hemert, M. J., 2015.** Stress granule components G3BP1 and G3BP2 play a proviral role early in Chikungunya virus replication. *J.Virol.* 89, 4457-4469.
- Schwegmann-Wessels, C., Bauer, S., Winter, C., Enjuanes, L., Laude, H., Herrler, G., 2011.** The sialic acid binding activity of the S protein facilitates infection by porcine transmissible gastroenteritis coronavirus. *Viol.J.* 8, 435.
- Seitsonen, J. J., Shakeel, S., Susi, P., Pandurangan, A. P., Sinkovits, R. S., Hyvonen, H., Laurinmaki, P., Yla-Pelto, J., Topf, M., Hyypia, T., Butcher, S. J., 2012.** Structural analysis of coxsackievirus A7 reveals conformational changes associated with uncoating. *J.Virol.* 86, 7207-7215.
- Shen, X., Masters, P. S., 2001.** Evaluation of the role of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 as a host factor in murine coronavirus discontinuous transcription and genome replication. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 2717-2722.
- Sibilia, M., Boniotti, M. B., Angoscini, P., Capucci, L., Rossi, C., 1995.** Two independent pathways of expression lead to self-assembly of the rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J.Virol.* 69, 5812-5815.
- Simmonds, P., Karakasiliotis, I., Bailey, D., Chaudhry, Y., Evans, D. J., Goodfellow, I. G., 2008.** Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Res.* 36, 2530-2546.
- Singh, R., Valcarcel, J., 2005.** Building specificity with nonspecific RNA-binding proteins. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 12, 645-653.
- Smiley, J. R., Chang, K. O., Hayes, J., Vinje, J., Saif, L. J., 2002.** Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus. *J.Virol.* 76, 10089-10098.
- Smith, A. W., Berry, E. S., Skilling, D. E., Barlough, J. E., Poet, S. E., Berke, T., Mead, J., Matson, D. O., 1998.** In vitro isolation and characterization of a calicivirus causing a vesicular disease of the hands and feet. *Clin.Infect.Dis.* 26, 434-439.
- Smith, D. R., McCarthy, S., Chrovian, A., Olinger, G., Stossel, A., Geisbert, T. W., Hensley, L. E., Connor, J. H., 2010.** Inhibition of heat-shock protein 90 reduces Ebola virus replication. *Antiviral Res.* 87, 187-194.
- Someya, Y., Takeda, N., Miyamura, T., 2005.** Characterization of the norovirus 3C-like protease. *Virus Res.* 110, 91-97.
- Sola, I., Galan, C., Mateos-Gomez, P. A., Palacio, L., Zuniga, S., Cruz, J. L., Almazan, F., Enjuanes, L., 2011.** The polypyrimidine tract-binding protein affects coronavirus RNA accumulation levels and relocalizes viral RNAs to novel cytoplasmic domains different from replication-transcription sites. *J.Virol.* 85, 5136-5149.

- Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Chang, K. O., Onwudiwe, O., Green, K. Y., 2005.** Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J.Virol.* 79, 4012-4024.
- Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Chang, K. O., Prikhodko, V. G., Thackray, L. B., Wobus, C. E., Karst, S. M., Virgin, H. W., Green, K. Y., 2006.** Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J.Virol.* 80, 7816-7831.
- Sosnovtsev, S. V., Garfield, M., Green, K. Y., 2002.** Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *J.Virol.* 76, 7060-7072.
- Sosnovtsev, S. V., Prikhod'ko, E. A., Belliot, G., Cohen, J. I., Green, K. Y., 2003.** Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. *Virus Res.* 94, 1-10.
- Sosnovtsev, S. V., Green, K. Y., 2000.** Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology* 277, 193-203.
- Sosnovtsev, S. V., Sosnovtseva, S. A., Green, K. Y., 1998.** Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *J.Virol.* 72, 3051-3059.
- Sosnovtseva, S. A., Sosnovtsev, S. V., Green, K. Y., 1999.** Mapping of the feline calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein. *J.Virol.* 73, 6626-6633.
- Spagnolo, J. F., Hogue, B. G., 2000.** Host protein interactions with the 3' end of bovine coronavirus RNA and the requirement of the poly(A) tail for coronavirus defective genome replication. *J.Virol.* 74, 5053-5065.
- Stuart, A. D., Brown, T. D., 2007.** Alpha2,6-linked sialic acid acts as a receptor for Feline calicivirus. *J.Gen.Virol.* 88, 177-186.
- Stuart, A. D., Brown, T. D., 2006.** Entry of feline calicivirus is dependent on clathrin-mediated endocytosis and acidification in endosomes. *J.Virol.* 80, 7500-7509.
- Subba-Reddy, C. V., Goodfellow, I., Kao, C. C., 2011.** VPg-primed RNA synthesis of norovirus RNA-dependent RNA polymerases by using a novel cell-based assay. *J.Virol.* 85, 13027-13037.
- Subba-Reddy, C. V., Yunus, M. A., Goodfellow, I. G., Kao, C. C., 2012.** Norovirus RNA synthesis is modulated by an interaction between the viral RNA-dependent RNA polymerase and the major capsid protein, VP1. *J.Virol.* 86, 10138-10149.
- Svitkin, Y. V., Imataka, H., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., Liebig, H. D., Sonenberg, N., 2001.** Poly(A)-binding protein interaction with eIF4G stimulates picornavirus IRES-dependent translation. *RNA.* 7, 1743-1752.
- Taube, S., Perry, J. W., Yetming, K., Patel, S. P., Auble, H., Shu, L., Nawar, H. F., Lee, C. H., Connell, T. D., Shayman, J. A., Wobus, C. E., 2009.** Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for murine noroviruses. *J.Virol.* 83, 4092-4101.

- Thorne, L. G., Goodfellow, I. G., 2014.** Norovirus gene expression and replication. *J.Gen.Virol.* 95, 278-291.
- Tohya, Y., Yokoyama, N., Maeda, K., Kawaguchi, Y., Mikami, T., 1997.** Mapping of antigenic sites involved in neutralization on the capsid protein of feline calicivirus. *J.Gen.Virol.* 78 (Pt 2), 303-305.
- Tsou, Y. L., Lin, Y. W., Chang, H. W., Lin, H. Y., Shao, H. Y., Yu, S. L., Liu, C. C., Chitra, E., Sia, C., Chow, Y. H., 2013.** Heat shock protein 90: role in enterovirus 71 entry and assembly and potential target for therapy. *PLoS.One.* 8, e77133.
- Uncapher, C. R., DeWitt, C. M., Colonno, R. J., 1991.** The major and minor group receptor families contain all but one human rhinovirus serotype. *Virology* 180, 814-817.
- van Kuppeveld, F. J., Hoenderop, J. G., Smeets, R. L., Willems, P. H., Dijkman, H. B., Galama, J. M., Melchers, W. J., 1997.** Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *EMBO J.* 16, 3519-3532.
- van, D. R., de Poot, S. A., Remmerswaal, E. B., Lai, K. W., ten, B., I, Bovenschen, N., 2013.** Granzyme M targets host cell hnRNP K that is essential for human cytomegalovirus replication. *Cell Death.Differ.* 20, 419-429.
- Vashist, S., Urena, L., Gonzalez-Hernandez, M. B., Choi, J., de, R. A., Rocha-Pereira, J., Neyts, J., Hwang, S., Wobus, C. E., Goodfellow, I., 2015.** Molecular chaperone Hsp90 is a therapeutic target for noroviruses. *J.Virol.* 89, 6352-6363.
- Vashist, S., Urena, L., Chaudhry, Y., Goodfellow, I., 2012.** Identification of RNA-protein interaction networks involved in the norovirus life cycle. *J.Virol.* 86, 11977-11990.
- Vazquez, A. L., Alonso, J. M., Parra, F., 2000.** Mutation analysis of the GDD sequence motif of a calicivirus RNA-dependent RNA polymerase. *J.Virol.* 74, 3888-3891.
- Vazquez, A. L., Martin Alonso, J. M., Casais, R., Boga, J. A., Parra, F., 1998.** Expression of enzymatically active rabbit hemorrhagic disease virus RNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J.Virol.* 72, 2999-3004.
- Vongpunsawad, S., Venkataram Prasad, B. V., Estes, M. K., 2013.** Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. *J.Virol.* 87, 4818-4825.
- Waggoner, S., Sarnow, P., 1998.** Viral ribonucleoprotein complex formation and nucleolar-cytoplasmic relocalization of nucleolin in poliovirus-infected cells. *J.Virol.* 72, 6699-6709.
- Wang, R. Y., Kuo, R. L., Ma, W. C., Huang, H. I., Yu, J. S., Yen, S. M., Huang, C. R., Shih, S. R., 2013.** Heat shock protein-90-beta facilitates enterovirus 71 viral particles assembly. *Virology* 443, 236-247.
- Wang, R. Y., Li, K., 2012.** Host factors in the replication of positive-strand RNA viruses. *Chang Gung.Med.J.* 35, 111-124.

- Wang, Y., Zhang, X., 1999.** The nucleocapsid protein of coronavirus mouse hepatitis virus interacts with the cellular heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in vitro and in vivo. *Virology* 265, 96-109.
- Wang, Z., Day, N., Trifillis, P., Kiledjian, M., 1999.** An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA in vitro. *Mol.Cell Biol.* 19, 4552-4560.
- Wells, S. E., Hillner, P. E., Vale, R. D., Sachs, A. B., 1998.** Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol.Cell* 2, 135-140.
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K., Walther, P., Fuller, S. D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., Bartenschlager, R., 2009.** Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host.Microbe* 5, 365-375.
- Wen, X., Huang, X., Mok, B. W., Chen, Y., Zheng, M., Lau, S. Y., Wang, P., Song, W., Jin, D. Y., Yuen, K. Y., Chen, H., 2014.** NF90 exerts antiviral activity through regulation of PKR phosphorylation and stress granules in infected cells. *J.Immunol.* 192, 3753-3764.
- Willcocks, M. M., Carter, M. J., Roberts, L. O., 2004.** Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF4G and inhibition of host-cell protein synthesis during feline calicivirus infection. *J.Gen.Virol.* 85, 1125-1130.
- Winter, C., Schwegmann-Wessels, C., Cavanagh, D., Neumann, U., Herrler, G., 2006.** Sialic acid is a receptor determinant for infection of cells by avian Infectious bronchitis virus. *J.Gen.Virol.* 87, 1209-1216.
- Wirblich, C., Sibilial, M., Boniotti, M. B., Rossi, C., Thiel, H. J., Meyers, G., 1995.** 3C-like protease of rabbit hemorrhagic disease virus: identification of cleavage sites in the ORF1 polyprotein and analysis of cleavage specificity. *J.Virol.* 69, 7159-7168.
- Wirblich, C., Thiel, H. J., Meyers, G., 1996.** Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies. *J.Virol.* 70, 7974-7983.
- Wolf, S., Reetz, J., Hoffmann, K., Grundel, A., Schwarz, B. A., Hanel, I., Otto, P. H., 2012.** Discovery and genetic characterization of novel caliciviruses in German and Dutch poultry. *Arch.Virol.* 157, 1499-1507.
- Wolf, S., Reetz, J., Otto, P., 2011.** Genetic characterization of a novel calicivirus from a chicken. *Arch.Virol.* 156, 1143-1150.
- Xiao, Z., Ko, H. L., Goh, E. H., Wang, B., Ren, E. C., 2013.** hnRNP K suppresses apoptosis independent of p53 status by maintaining high levels of endogenous caspase inhibitors. *Carcinogenesis* 34, 1458-1467.
- Yu, G., Zhang, D., Guo, F., Tan, M., Jiang, X., Jiang, W., 2013.** Cryo-EM structure of a novel calicivirus, Tulane virus. *PLoS.One.* 8, e59817.
- Yunus, M. A., Lin, X., Bailey, D., Karakasiliotis, I., Chaudhry, Y., Vashist, S., Zhang, G., Thorne, L., Kao, C. C., Goodfellow, I., 2015.** The murine norovirus core subgenomic RNA promoter consists of a stable stem-loop that can direct accurate initiation of RNA synthesis. *J.Virol.* 89, 1218-1229.

Zhang, W., Qiao, H., Lv, Y., Wang, J., Chen, X., Hou, Y., Tan, R., Li, E., 2014. Apigenin inhibits enterovirus-71 infection by disrupting viral RNA association with trans-acting factors. *PLoS.One.* 9, e110429.

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