



FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Estudio de las vías de señalización intracelulares
implicadas en el ciclo infeccioso del Virus de la Peste
Porcina Africana

TESIS DOCTORAL

José Ignacio Quetglas Mas

2007



FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Estudio de las vías de señalización intracelulares
implicadas en el ciclo infectivo del Virus de la Peste
Porcina Africana

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias por:

José Ignacio Quetglas Mas

Director de la Tesis:

Dra. Covadonga Alonso Martí

Tutor de la Tesis:

Dr. Antonio Talavera

El presente trabajo ha sido realizado en el **Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA)** y financiado con una beca de **Formación de Personal Investigador** del Ministerio de Educación y Ciencia.

Madrid, 2007

Mas no abandonéis toda esperanza. Del día de mañana nada sabemos aún. La solución se encuentra a menudo a la subida del Sol.
Legolas

El Señor de los Anillos
JRR Tolkien

NO TE DETENGAS

No dejes que termine el día sin haber crecido un poco, sin haber sido feliz, sin haber aumentado tus sueños. No te dejes vencer por el desaliento. (...) Aunque el viento sople en contra, la poderosa obra continúa: Tú puedes aportar una estrofa. No dejes nunca de soñar, porque en sueños es libre el hombre.

Walt Whitman

a mi madre
a Katia, a María José y a Tolo
a Dani
a Sara

AGRADECIMIENTOS

Hace más de cuatro años que me concedieron la beca para realizar esta tesis y recuerdo perfectamente lo lejos que quedaba entonces este día. Aún ahora que estoy escribiendo las últimas líneas de esta tesis, me cuesta creer que este momento haya llegado. Y así es, esta etapa llega a su fin. Esta etapa de mi vida, en la que tanto he crecido y en la que a tantas y tantas personas he conocido, está inevitablemente ligada a mi estancia en Madrid. Todas las experiencias acumuladas en este intervalo hacen que esta etapa de mi vida sea la más rica y la más bonita de las que me ha tocado vivir. No sería justo entonces, no aprovechar este momento para recordar a todos aquellos que han hecho posible de alguna manera que haya llegado hasta aquí. Con la mirada puesta en el futuro, no puedo más que esperar que la siguiente etapa me aporte tanto como esta que ya termina.

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. Covadonga Alonso la oportunidad de realizar una tesis en su laboratorio. Muchas gracias Cova, por haber depositado tu confianza en mí, por tu paciencia, por tu preocupación y tu cariño cuando he tenido una mala racha. A José Ángel quería agradecerle su disponibilidad y el tiempo dedicado en las reuniones de grupo, aportando su experiencia científica y sus atinados consejos. Y cómo no, a su perenne buen humor y el buen trato que siempre me ha dispensado. Quería agradeceros también a ambos haber financiado estos últimos meses de la tesis, en los que ya no contaba con la beca.

Me gustaría aprovechar este espacio para agradecer al Dr. Eduardo Páez la posibilidad de dar mis primeros pasitos en la ciencia. En su laboratorio, y con las clases magistrales de Paco, un tío grande donde los haya, aprendí las técnicas de la virología clásica y empecé a educar el ojo para el microscopio.

Quería agradecer al Dr. Antonio Talavera la tutela de esta tesis y la premura con la que la leyó y evaluó.

Quería agradecer especialmente la pericia y saber hacer de los servicios de microscopía confocal y electrónica de la Facultad de Medicina de la Autónoma,

sobretudo a Lucía y a Covadonga, que han hecho posible la realización de las bonitas fotografías que salen en esta tesis.

A los Drs. K. Burridge y O. Gjoerup, me gustaría agradecerles la cesión de plásmidos esenciales para el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. "Astuneta" García Bernal, por sus excelentes indicaciones sobre los "pulldowns" y ceder tan amablemente material y protocolos para que esta tesis llegara a buen puerto. Menos mal que estabas ahí.

Evidentemente, a Bruno tengo mucho que agradecerle, por muchas cosas. Él se encargó de enseñarme todas las técnicas del laboratorio y a desenvolverme con soltura. Aunque, sin desmerecer en absoluto todo lo anterior, he de reconocer que he aprendido más con él sobre "las cosas" de la vida que del laboratorio. Con todas las horas que hemos pasado juntos era inevitable, y siempre es interesante conocer tu punto de vista. Gracias por tu amistad y por haberme apoyado siempre que lo he necesitado. Sin tu presencia en el laboratorio, no sé que habría sido de todo esto.

No quiero olvidarme del resto de compañeros del laboratorio, ya que de todos he aprendido algo. A Gema quería agradecerle que fuera la primera en ocuparse de mí cuando aterricé en el laboratorio. Eres una tía excelente y espero que nuestra amistad permanezca inalterable con el paso del tiempo, aunque estemos cada vez más alejados. A Félix quiero agradecerle sus buenos consejos científicos y las risas que nos echamos juntos. A Inma quiero agradecerle todos los momentos divertidos que nos ha hecho pasar en el laboratorio y conseguir que el final de la tesis haya sido bastante más interesante y entretenido. Tía, ¡eres la leche! A Mariano, por el intercambio cultural de léxico y muchas cosas más, científicas también, por supuesto. Se te ha echado de menos. Al clan del comedor: Ismael, Nacho, Edu, y recientemente, Carmen. Por hacer de la comida uno de los mejores momentos del día, sin discusión. Esto sí que lo voy a echar de menos, ¡qué pena no tener a Mr. Spock cerca para teletransportarme a la hora de comer! Sois c... A Edu de un modo especial, por fundar conmigo el clan del comedor y ser tan buena persona y, por ende, tan buen amigo. Ahora que estás de enhorabuena, ya no te puedo llevar en la maleta.

A Carmen, a Silvia y a Lali, por hacerme reír tanto y animarme siempre que lo necesito. Al resto de integrantes del equipo y del Z, por haber aportado su granito de arena. En especial a Carlitos y también a Rafa, por haberme ofrecido su amistad desde el principio y por todos los buenos consejos que siempre me da.

A Toni, porque nunca podré devolvarte un favor tan grande como abrirme las puertas de Herrera Oria. Por todo lo que hemos compartido, antes, durante y después de compartir piso. Por haberte abierto a mí y haberme hecho participe de tus inquietudes. Y cómo no, por haber insistido en fundar "Los Astunetas Roleros". Menudo personaje que estás hecho.

A Gonzalo y a Rodrigo, o a la viejita y al manteca, por hacer de mis comienzos en Madrid el trampolín a la persona que ahora soy. Gracias por todo lo que me habéis aportado. Siempre estaréis en mi corazón. Que el espíritu de Herrera Oria perdure para siempre.

A toda la panda del CJB, en especial a David "Astuneta", Nacho, Alfredo, Myriam, Gema, Isra y Josué. Fue duro separarse de todos vosotros para ir al INZA.

A Myriam, por ser tan especial y estar siempre ahí, para lo que se la necesite.

A los Astunetas Roleros: Toni, David, Isra, Enrique, Rafa y Nicolás. Gloriosas jornadas las de aquellos días... ¿Volverán alguna vez?

A Isra, por todas las charlas, sobretodo nocturnas, que hemos tenido. Por esa conexión futbolística y por esas partidas tan curradas.

A Mijalis, por encarnar todo aquello que muchas veces a uno le gustaría ser. A Carlos, por ser tan buen comensal. A Zaira, por ser simplemente genial. A la Familia Feliz, por seguir ahí después de tanto tiempo.

A Marco, por hacerme la vida mucho más amena y divertida en el piso. No sé lo que haría yo solo con el muñeco. Eres un gran tipo.

A mi familia, que tanto ha sacrificado para que yo llegase hasta aquí, sobretodo en el plano afectivo. Nunca podré devolveros todos estos años que he pasado lejos de vosotros.

A María José y Antonio, por abrirme las puertas de su casa con tanto afecto y cariño, y por hacerlo todo siempre tan fácil. A Eva y Josepín, esos cuñados de moda, y a Ruth y Chus por ser tan majetes.

Al "clásico", a Dani, por enseñarme el significado de la palabra amistad. Gracias por haber estado siempre ahí, maestro. Estoy en deuda contigo, por muchas cosas. ¿Podré compensarte algún día?

A Sara, la "fisio", por haber estado desde el principio vinculada a este proyecto. Eres la persona que más me ha apoyado. Gracias por haber soportado estoicamente todas mis dudas y vacilaciones, por comprenderme tan bien y hacerme la vida tan fácil. Me has aportado infinidad de cosas y me has enseñado que los sueños pueden tocarse con las manos. Has cambiado mi vida para siempre.

Por supuesto, a todos los "sucs" que se han cruzado en mi camino que, quieran o no, también han influido de alguna manera en todo esto.

Por último, quería dedicar unas líneas a la memoria de Pepe Malpica, que tan tristemente nos abandonó este año. Echaremos de menos tu fina ironía y tu excelente sentido del humor.

Abreviaturas

AC:	Adenilato ciclasa
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AMPc:	Adenosín monofosfato cíclico
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	ARN mensajero
ATCC:	Colección Americana de Cultivos Tipo
ATP:	Adenosín trifosfato
Ba71V:	Aislado del VPPA obtenido en Badajoz en 1971 adaptado a células Vero
BSA:	Seroalbúmina bovina
cél/s:	Célula/s
CMV:	Citomegalovirus
DAG:	Diacilglicerol
DLC8:	Cadena ligera de 8 kDa de la dineína citoplasmática
DMEM:	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DO:	Densidad óptica
EDTA:	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
ELISA:	Ensayo inmunoabsorbente enzimático
ERK:	Kinasas reguladas por señales extracelulares
FPP:	Farnesilpirofosfato
FTasa:	Farnesiltransferasa
GAP:	Proteína activadora de GTPasas
GDI:	Inhibidor de la disociación a GDP
GDP:	Guanosín difosfato
GEF:	Factor intercambiador del nucleótido de guanosina
GFP:	Proteína verde fluorescente
GGPP:	Geranilgeranilpirofosfato
GGTasa-I/II:	Geranilgeraniltransferasa I/II
GPCR:	Receptor acoplado a proteínas G heterotriméricas
GST:	Glutation-S-Transferasa
GTP:	Guanosín trifosfato
HEPES:	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HMG-CoA:	3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A
hpi:	Horas post-infección
Hsp:	Proteína de choque térmico
HTLV-I:	Virus linfotrópico humano de células T tipo I
IAP:	Proteínas inhibidoras de apoptosis
IF:	Inmunofluorescencia
IFI:	Inmunofluorescencia indirecta
IgG:	Inmunoglobulina de tipo G

iNOS:	Sintasa inducible de óxido nítrico
IP3:	Inositol-(1,4,5)-trifosfato
IPTG:	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
JNK:	Kinasa N-terminal de Jun
kDa:	Kilodalton
Kpb:	Kilopares de bases
LB:	Luria-Bertani
MAPK:	Proteínas kinasas activadas por mitógenos
mdi:	Multiplicidad de infección
MEK:	MAP kinasa o ERK kinasa
MEM:	Medio de Eagle modificado
Mn-SOD:	Manganeso-superóxido dismutasa
mpi:	Minutos post-infección
MTOC:	Centro organizador de microtúbulos
ND:	No determinado
NP-40:	Nonidet P-40
ORF:	Pauta de lectura abierta
PAK:	Kinasa activada p21
pb:	Pares de bases
PBD:	Dominio de unión a PAK
PBS:	Tampón fosfato salino
PDK-1:	Kinasa dependiente de fosfoinosítido-1
PI:	Fosfatidilinositol
PI3K:	Fosfoinosítido-3-kinasa
PI3P:	Fosfatidilinositol-3-fosfato
PIP3:	Fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato
PKA/B/C:	Proteína kinasa A/B/C
PKR:	Proteína kinasa dependiente de ARN de doble cadena
PLC:	Fosfolipasa C
PMSF:	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PP:	Pirofosfato
PP1:	Fosfatasa celular 1
PPA:	Peste Porcina Africana
RBD:	Dominio de unión a Ras tipo Raf
RE:	Retículo endoplasmático
ROCK:	Kinasa Rho
RSK:	Kinasas ribosomales S6
RTK:	Receptor tirosina kinasa
SBF:	Suero bovino fetal

SDS:	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SFV:	Virus del Bosque de Semliki
SV40:	Virus de Simio 40
U-0126:	1,4- diamino-2,3-diciano-1,4-bis[2- aminofeniltio] butadieno
ufp:	unidad formadora de placas
VHB:	Virus de la Hepatitis B
VHC:	Virus de la Hepatitis C
VHH-8:	Virus Herpes Humano 8
VHS:	Virus Herpes Simplex
VIH:	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VPPA:	Virus de la Peste Porcina Africana
VRS:	Virus Respiratorio Sincitial
VSV:	Virus de la Estomatitis Vesicular
VV:	Virus Vaccinia
WB:	Western Blot

Índice

ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN	
1. ENTRADA DE LOS VIRUS EN LAS CÉLULAS	5
2. SUPERFAMILIA RAS	8
2.1. La familia Ras	9
2.2. La familia Rho	11
3. FAMILIA DE LA FOSFOINOSÍTIDO-3-KINASA (PI3K)	12
4. FAMILIA DE LA PROTEÍNA KINASA C (PKC)	14
5. SUPERFAMILIA DE LAS PROTEÍNAS KINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK)	15
6. VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA)	17
6.1. El virus y la enfermedad	17
6.2. Genoma del VPPA	18
6.3. Morfología del virión	21
6.4. Ciclo infectivo	22
6.4.1. Entrada del virus	22
6.4.2. Transcripción y replicación del genoma	23
6.4.3. Ensamblaje y morfogénesis de los viriones	23
6.4.4. Salida de los viriones	24
6.5. Manipulación de las vías de señalización celulares por el VPPA ...	24
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. REACTIVOS	33

1.1. Anticuerpos y cromógenos.....	33
1.2. Espectros de absorción y emisión de fluoróforos.....	33
1.3. Inhibidores.....	34
1.4. Lípidos de la ruta biosintética del colesterol.....	34
1.5. Plásmidos.....	34
2. CULTIVOS CELULARES.....	35
3. VIRUS E INFECCIONES VIRALES.....	35
3.1. Virus empleados.....	35
3.2. Obtención de inóculos y purificación del VPPA.....	35
3.3. Infecciones con el VPPA.....	36
3.4. Titulación de inóculos del VPPA.....	36
4. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS VERO.....	37
5. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CASPASA 3.....	37
6. ANÁLISIS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	37
6.1. Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana (Western Blot).....	37
6.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	38
6.3. Expresión y purificación de las proteínas GST-PBD y GST-RBD.....	39
6.4. Cuantificación de la GTPasa Rho-A activa.....	40
6.5. Ensayo de precipitación de Rac1, Cdc42 y Rap1 activos (“pull-down”).....	40
7. MICROSCOPIA.....	41
7.1. Microscopía de fluorescencia convencional.....	41
7.2. Microscopía Confocal.....	41
7.3. Microscopía Electrónica de Transmisión.....	41

8. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	42
8.1. Cepas bacterianas.....	42
8.2. Transformación de cepas bacterianas.....	42
8.3. Obtención de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>.....	42
RESULTADOS	
1. PAPEL DE LA RUTA BIOSINTÉTICA DEL COLESTEROL EN EL CICLO INFECTIVO DEL VPPA.....	47
1.1. Inhibición de la ruta biosintética del colesterol mediante lovastatina.....	47
1.1.1. Efecto de la lovastatina en la obtención de progenie vírica.....	48
1.1.2. Efecto de la lovastatina en la capacidad infectiva del VPPA.....	50
1.2. Inhibición de la prenilación de proteínas celulares.....	50
1.2.1. Efecto de los inhibidores de prenilación en la producción de virus.....	53
1.2.2. Efecto de los inhibidores de prenilación en la capacidad infectiva del VPPA.....	54
2. PAPEL DE LA FAMILIA DE LAS GTPASAS RHO EN EL CICLO INFECTIVO DEL VPPA.....	56
2.1. Efecto de la inhibición de las GTPasas Rho en la producción de virus.....	56
2.2. Implicación de las GTPasas Rho en la acetilación de los microtúbulos durante la entrada del VPPA.....	57
2.3. Determinación del grado de activación de las GTPasas Rho durante la entrada del VPPA.....	59
2.4. Efecto de la inhibición de las GTPasas Rho en la síntesis de proteínas virales.....	60
2.5. Efecto de la inhibición de las GTPasas Rho en la capacidad infectiva del VPPA.....	62
2.6. Efecto de interferir la actividad de Rac1 en la internalización de partículas virales.....	62

2.7. Efecto de la inhibición de las GTPasas Rho en el estado del citoesqueleto en los tiempos tardíos de la infección por el VPPA....	65
2.7.1. Estudio del citoesqueleto de actina.....	65
2.7.2. Estudio de los filamentos intermedios de vimentina.....	67
2.7.3. Estudio del citoesqueleto de tubulina.....	68
2.7.4. Estudio del aparato de Golgi.....	69
2.8. Efecto de la inhibición de las GTPasas Rho en la constitución de la factoría viral y la morfogénesis de los viriones.....	71
3. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE ACTIVACIÓN DE RAP1 DURANTE LA ENTRADA DEL VPPA.....	73
4. PAPEL DE LA FAMILIA DE LA PI3K EN EL CICLO INFECTIVO DEL VPPA.....	74
4.1. Efecto de la inhibición de la PI3K en la producción de virus.....	74
4.2. Efecto de la inhibición de la PI3K en la capacidad infectiva del VPPA.....	76
4.3. Efecto de la inhibición de la PI3K en la síntesis de proteínas virales.....	77
5. PAPEL DE LA FAMILIA DE LA PKC EN EL CICLO INFECTIVO DEL VPPA.....	77
5.1. Efecto de la inhibición de la PKC en la producción de virus.....	77
5.2. Efecto de la inhibición de la PKC en la capacidad infectiva del VPPA.....	80
5.3. Efecto de la inhibición de la PKC en la síntesis de proteínas virales.....	80
6. PAPEL DE LA FAMILIA DE LAS ERK/MAPK EN EL CICLO INFECTIVO DEL VPPA.....	81
6.1. Efecto de la inhibición de las ERK/MAPK en la producción de virus.....	81
6.2. Efecto de la inhibición de las ERK/MAPK en la capacidad infectiva del VPPA.....	81
6.3. Efecto de la inhibición de las ERK/MAPK en la síntesis de proteínas virales.....	83

DISCUSIÓN

1. Efecto de la lovastatina y los inhibidores de prenilación en el ciclo infectivo del VPPA.....	89
2. Papel de las GTPasas Rho en el ciclo infectivo del VPPA.....	92
3. Activación de Rap1.....	98
4. Papel de las familias de kinasas PI3K, PKC y ERK/MAPK en el ciclo infectivo del VPPA.....	99
5. Modelo de la entrada del VPPA en las células Vero.....	101

CONCLUSIONES	107
---------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA	111
---------------------	------------

Abstract

African swine fever virus (ASFV) is a large, enveloped icosahedral deoxyvirus, which induces an acute and haemorrhagic disease of swine characterized by severe immunosuppression and apoptosis induction. It is the only member of the Asfarviridae family. ASFV multiplies in the cytoplasm of the infected cells and enters the cells by a process of adsorptive endocytosis, and exploiting dynein-dependent microtubule transport.

Statins are 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors. HMG-CoA reductase produces mevalonic acid, a precursor for cholesterol biosynthesis and generation of isoprenoids that modify specific cell proteins posttranslationally. In the present work, we show that lovastatin decreased both infectivity and virus production. Virus infectivity was restored by the addition of mevalonate and geranylgeranylpyrophosphate, but not by cholesterol. Virus production was only recovered by the addition of mevalonate. Cell treatment with a geranylgeranyl transferase inhibitor, but not a farnesyl transferase inhibitor, specifically inhibited entry of ASFV. Cell treatment with both inhibitors reduced virus production, although farnesyl transferase inhibitor only achieved it when it was added before virus entry.

Rho GTPases belongs to Ras superfamily and are geranylgeranylated. These proteins regulate cytoskeleton and vesicular trafficking. Rho proteins participate in several viruses entry as Vaccinia Virus and Adenovirus. Early during infection, ASFV induced the acetylation of microtubules and Rac1 activation. Cell treatment with a specific inhibitor of these proteins reduced microtubular acetylation but not virus infectivity. Nevertheless, virus production was decreased, but only when inhibitor was added before virus entry. Synthesis of viral proteins was not affected in presence of Rho inhibitor. Examination of viral factories in presence of inhibitor (added before virus entry) by electron microscopy, showed great accumulation of precursor membranes and few mature and immature viruses. In addition to this accumulation, we observed a large quantity of immature viruses in the plasma membrane. By pull-down assay, we determined that Rap1 (member of Ras family) was activated during virus entry, just like Rac1.

The use of inhibitors of PI3K, PKC and ERK/MAPK families showed that ASFV entry depends on PI3K and PKC, not on ERK/MAPK. Inhibition of PI3K and PKC before virus entry decreased viral protein synthesis and virus production, while inhibition of ERK/MAPK, before or after virus entry, reduced virus production without affecting synthesis of virus proteins.

In conclusion, ASFV entry requires activity of geranylgeranylated proteins, PI3K and PKC, not Rho and ERK/MAPK families. For virus production, ASFV requires all of them and farnesylated proteins.

Introducción

1. ENTRADA DE LOS VIRUS EN LAS CÉLULAS

Los virus son parásitos intracelulares obligados y, como tales, dependen de la maquinaria de las células que infectan para generar su progenie viral. El ciclo infectivo de los virus se divide generalmente en las siguientes etapas: adsorción del virión a receptores de la membrana plasmática de la célula; penetración en la célula, ya sea por endocitosis o por fusión de la envuelta del virión y de la membrana plasmática; transporte del virión desde la periferia de la célula hasta su lugar de replicación, que puede ser en el citoplasma o en el núcleo; replicación del genoma y síntesis de las proteínas virales; ensamblaje del genoma y las proteínas víricas para generar los nuevos viriones; transporte de los viriones a la periferia de la célula y/o lisis de la célula para salir de ella e infectar nuevas células (Knipe, 2007).

El citoesqueleto es el responsable de mantener la arquitectura de las células, permitir la migración celular, la mitosis y también el transporte intracelular de los orgánulos citoplásmicos, los ARNm, proteínas y demás componentes celulares. No es de extrañar entonces que prácticamente todos los virus dependan de él en alguna o todas las etapas enumeradas anteriormente. Los virus han desarrollado diversas estrategias para hacerse con el control del citoesqueleto y explotarlo en beneficio propio (Dohner, *et al.*, 2005; Dohner y Sodeik, 2005; Radtke, *et al.*, 2006).

Durante el proceso de entrada de los virus en las células, el citoesqueleto se convierte en el protagonista absoluto. Sin su participación, los virus, con diámetros que van desde los 15 hasta varios cientos de nm, no podrían alcanzar, por mera difusión y por azar, la localización subcelular específica donde van a replicarse, debido a la elevada viscosidad que presenta el citoplasma, que no permite la libre difusión de partículas mayores de 500 kDa. La viscosidad del citoplasma se debe a la alta concentración de proteínas, los orgánulos citoplasmáticos y la barrera que supone el propio citoesqueleto (Luby-Phelps, 2000; Verkman, 2002; Dauty y Verkman, 2005). El concurso del citoesqueleto es igualmente valioso durante la exocitosis de la nueva progenie vírica. Finalmente, el citoesqueleto puede ser importante para el transporte de los genomas y proteínas virales producidos al lugar de ensamblaje de los nuevos viriones.

El citoesqueleto está formado por tres tipos distintos de filamentos: los microfilamentos de actina (Pollard y Borisy, 2003; Winder y Ayscough, 2005), los filamentos intermedios (Kim, S. y Coulombe, 2007) y los microtúbulos (Watanabe, *et al.*, 2005). La regulación del citoesqueleto es llevada a cabo por un buen número de kinasas y fosfatasas, distintas GTPasas y proteínas con capacidad de unirse a la actina y la tubulina (Faix y Grosse, 2006; Hoefen y Berk, 2006; Sheetz, *et al.*, 2006; Yazdani y Terman, 2006). El transporte a través del citoesqueleto es posible gracias a la actividad

de los motores moleculares asociados a este, que son capaces de transportar una carga (como vesículas, orgánulos o virus) obteniendo energía a partir de la hidrólisis de ATP. La miosina es la proteína motora asociada al sistema de la actina (Krendel y Mooseker, 2005; ver también www.mrc-lmb.cam.ac.uk/myosin/myosin.html), mientras que el transporte a través de los microtúbulos es llevado a cabo por los miembros de las familias de la dineína (Vallee, *et al.*, 2004; Hook y Vallee, 2006) y la kinesina (Vale, 2003; Yildiz y Selvin, 2005; ver también www.proweb.org/kinesin/).

Los filamentos de actina son responsables del transporte en la periferia celular y posiblemente en el núcleo, aunque los baculovirus utilizan este sistema para transportarse por el citoplasma y alcanzar el núcleo de las células que infectan (Charlton y Volkman, 1993; Lanier y Volkman, 1998; van Loo, *et al.*, 2001). La barrera cortical de actina en la membrana plasmática puede ser un obstáculo para la entrada de ciertos virus (Marsh y Bron, 1997). Esta podría ser la razón por la que muchos virus utilizan la vía endosomal para entrar en las células (Sieczkarski y Whittaker, 2005).

Los microtúbulos son los responsables del transporte entre el núcleo y la periferia de la célula. Los microtúbulos tienen una polaridad intrínseca, con los polos o extremos bien diferenciados. El extremo con la tasa más alta de polimerización recibe el nombre de extremo positivo, mientras que el otro extremo se conoce como extremo negativo. La orientación de los microtúbulos en las células suele ser con los extremos positivos situados en la periferia celular y los negativos próximos al núcleo, bastante juntos y estabilizados por su unión al centro organizador de microtúbulos (MTOC). Por lo general, el transporte hacia el extremo negativo es realizado por las dineínas, mientras que el transporte hacia el extremo positivo de los microtúbulos es llevado a cabo por las kinesinas.

Los virus pueden entrar en las células utilizando varias rutas endocíticas diferentes o bien por fusión de su envuelta con la membrana plasmática. Las dos vías endocíticas mejor estudiadas son las mediadas por vesículas recubiertas de clatrina y las caveolas. Como ejemplos de virus que entran por vesículas recubiertas de clatrina tenemos el virus del bosque de Semliki (SFV), el virus de la gripe, el virus de la estomatitis vesicular (VSV) y los adenovirus (Marsh y Helenius, 1980; Matlin, *et al.*, 1981, 1982; Doxsey, *et al.*, 1987; Meier, *et al.*, 2002). El virus mejor estudiado que entra por caveolas es el virus de simio 40 (SV40; Norkin, 1999; Pelkmans, *et al.*, 2001; Pelkmans, *et al.*, 2002). Entre los virus que entran por fusión directa entre su envuelta y la membrana plasmática están el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus del sarampión y el virus herpes simplex (VHS; Sodeik, 2000; Smith y Helenius, 2004; Dohner y Sodeik, 2005). Una vez que han entrado en la célula, los virus suelen utilizar

Virus	Motor microtubular	Receptor Viral	Referencias
Adenovirus	Dineína citoplasmática 1	Cápsida	Kelkar, <i>et al.</i> , 2004
Herpes Simplex 1	DYNC11 (cadena intermedia de la dineína citoplasmática)	U(L)34	Ye, G. J., <i>et al.</i> , 2000
	DYNLT1 y DYNLT3 (cadenas ligeras de la dineína citoplasmática Tctex1 y Rp3)	VP26	Douglas, <i>et al.</i> , 2004
	Kinesina 1 (kinesina convencional)/cadena pesada	US11	Diefenbach, <i>et al.</i> , 2002
Lyssavirus	DYNLL (cadena ligera de 8 kDa de la dineína citoplasmática)	Fosfoproteína	Jacob, <i>et al.</i> , 2000
Parvovirus Canino	Dineína citoplasmática 1	Cápsida	Suikkanen, <i>et al.</i> , 2003
Vaccinia	Dineína citoplasmática 1	A27L	Ploubidou, <i>et al.</i> , 2000; Sanderson, <i>et al.</i> , 2000; Ward, 2005
	Kinesina 1 (kinesina convencional)/cadena ligera	A36R y ND	Gead, <i>et al.</i> , 2001; Rietdorf, <i>et al.</i> , 2001; Ward y Moss, 2001; Newsome, <i>et al.</i> , 2004; Ward y Moss, 2004; Herrero-Martínez, <i>et al.</i> , 2005
VIH	DYNC111	Complejo de retrotranscripción	McDonald, <i>et al.</i> , 2002
	DYNLL (cadena ligera de 8 kDa de la dineína citoplasmática)	Integrasa	de Soultrait, <i>et al.</i> , 2002
	Kinesina KIF4	Gag	Kim, W., <i>et al.</i> , 1998
Virus de la Gripe	DYNC111	ND	Lakadamyali, <i>et al.</i> , 2003
Virus de la Polio	DYNLT1 (cadena ligera de la dineína citoplasmática Tctex1)	Receptor celular CD155	Mueller, <i>et al.</i> , 2002; Ohka, <i>et al.</i> , 2004
Virus de la Rabia	DYNLL (cadena ligera de 8 kDa de la dineína citoplasmática)	Proteína P	Raux, <i>et al.</i> , 2000
Virus Espumoso	DYNLL (cadena ligera de 8 kDa de la dineína citoplasmática)	Proteína Gag	Petit, <i>et al.</i> , 2003
VPPA	DYNLL (cadena ligera de 8 kDa de la dineína citoplasmática)	p54	Alonso, <i>et al.</i> , 2001
	Kinesina 1 (kinesina convencional)/cadena ligera	ND	Jouvenet, <i>et al.</i> , 2004

Tabla 1. Relación de interacciones descritas entre motores microtubulares y virus. La nomenclatura utilizada en esta tabla para la dineína se ajusta a la introducida recientemente por Pfister y colaboradores (2005). Entre paréntesis figura la nomenclatura clásica. Consultar el trabajo de Martínez-Moreno y colaboradores para ver una lista más exhaustiva de interacciones virales con DYNLL (Martínez-Moreno, *et al.*, 2003). No se ha demostrado para todos los receptores virales mostrados aquí un papel directo en el transporte de las partículas virales. ND: No determinado.

el transporte microtubular mediado por la dineína para alcanzar su lugar de replicación subcelular. Los virus que no utilizan una vesícula para viajar por el citoplasma, que sería la que se uniría directamente al complejo de la dineína, suelen unirse directamente a alguno de los componentes del complejo motor de la dineína a través de alguna de sus proteínas de la cápsida. Para salir de las células infectadas, muchos virus utilizan el transporte de la kinesina, lo que les permite llegar hasta las inmediaciones de la membrana plasmática y así poder salir de la célula para infectar otras e iniciar otra vez su ciclo infectivo (Tabla 1).

La entrada de los virus en las células provoca la activación de múltiples cascadas de señalización, entre las que pueden estar implicados distintos miembros de las familias de la fosfoinosítido-3-kinasa (PI3K), la proteína kinasa C (PKC), las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK) y las GTPasas Rho, entre otras. La activación de las vías de señalización reguladas por estas proteínas puede permitir tanto el transporte de los virus como la expresión de genes virales y celulares que favorezcan de alguna manera la replicación de los virus y la generación de nueva progenie viral.

2. SUPERFAMILIA RAS

La superfamilia Ras comprende un extenso y heterogéneo conjunto de proteínas G monoméricas que está compuesto por unos 150 miembros en humanos. Esta familia de proteínas se encuentra muy conservada evolutivamente. Se han descrito miembros en diversos grupos taxonómicos muy alejados filogenéticamente como *S. cerevisiae*, *Drosophila*, *C. elegans* y plantas, entre otros, además de hallarse también en mamíferos (Colicelli, 2004). En base a su secuencia y similitudes funcionales, esta superfamilia se divide en 5 ramas principales: Ras, Rho, Rab, Ran y Arf.

Estas proteínas G monoméricas son similares bioquímica y funcionalmente a las subunidades α de las proteínas G heterotriméricas. Estas pequeñas GTPasas funcionan como sofisticados moduladores en un amplio y complejo rango de procesos celulares gracias a sus variaciones estructurales, modificaciones post-traduccionales que dictaminan localizaciones subcelulares específicas y a las distintas proteínas que les sirven de reguladores y/o efectores.

Estas GTPasas presentan una elevada afinidad por los nucleótidos de guanosina. Actúan como interruptores moleculares alternando entre un estado inactivo, en unión a GDP, y un estado activo, en unión a GTP (Vetter y Wittinghofer, 2001). Las proteínas GEF (factor intercambiador del nucleótido de guanosina, del inglés) actúan como activadores al favorecer el intercambio del GDP por el GTP, mucho más abundante en el citoplasma (Schmidt, A. y Hall, 2002). Estas GTPasas poseen una baja

tasa de hidrólisis del GTP y para conseguir su desactivación es necesaria la intervención de las proteínas GAP (proteína activadora de GTPasas), que aceleran su actividad GTPasa intrínseca (Bernards y Settleman, 2004). La unión a GTP provoca un cambio conformacional que permite la unión de la GTPasa a sus efectores, antes de desactivarse y quedar en su conformación inactiva, unida a GDP (Figura 1).

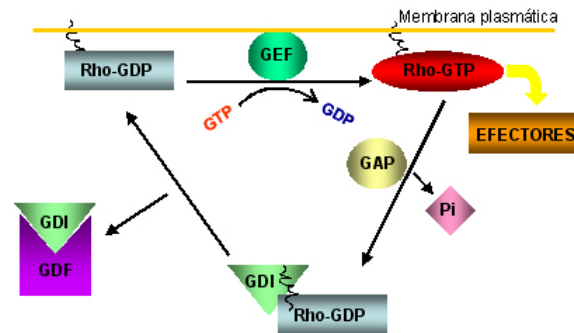


Figura 1. Ciclo de activación y desactivación de las GTPasas de la familia Rho.

La mayoría de los miembros de la superfamilia Ras precisa para su activación de la incorporación de un lípido a su estructura. La mayoría de los componentes de las familias Ras y Rho son modificados en su extremo carboxi-terminal por un grupo prenilo (Cox y Der, 2002), que puede ser el farnesilpirofosfato (FPP) o el geranilgeranilpirofosfato (GGPP), debido a la acción de las enzimas farnesiltransferasa (FTasa) y geranilgeraniltransferasa I (GGTasa-I), respectivamente (Figura 2). Las proteínas Rab presentan una secuencia carboxi-terminal distinta a la de Ras y Rho que también puede ser prenilada, aunque únicamente por GGPP y por una enzima exclusiva: la geranilgeraniltransferasa II (GGTasa-II). Los miembros de la familia Arf pueden ser miristoilados y Ras y Rho palmitoilados. Estas modificaciones post-traduccionales son esenciales para la asociación a membrana de estas proteínas y también para dirigir su actividad a localizaciones subcelulares específicas.

Las familias Ras y Rho son reguladas además por las proteínas GDI (inhibidor de la disociación a GDP; Figura 1), que enmascaran el grupo prenilo y mantienen a las GTPasas inactivas en el citoplasma (Seabra y Wasmeier, 2004; Dovas y Couchman, 2005).

2.1. La familia Ras

Las proteínas Ras son unas de las oncoproteínas más estudiadas debido a su implicación en el desarrollo de múltiples tumores (Repasky, *et al.*, 2004). Estas proteínas son activadas por diversos estímulos extracelulares e interaccionan con múltiples efectores que disparan distintas cascadas de señalización implicadas en

procesos como la regulación del citoesqueleto, la expresión de ciertos genes, la proliferación, diferenciación y supervivencia celulares.

La vía de señalización mejor caracterizada de Ras es la que comienza con la activación en la membrana plasmática del receptor tirosina kinasa (RTK) del factor de crecimiento epidérmico. La estimulación de este receptor promovería la activación de Ras, que a su vez activaría a Raf. Raf fosforilaría (y activaría) a MEK1/2 y este a su vez a ERK1/2. La activación mediada por fosforilación de ERK1/2 provocaría su translocación al núcleo de la célula, donde sería capaz de fosforilar a diversos factores de transcripción de la familia Ets, facilitando así la transcripción de distintos genes (Repasky, *et al.*, 2004).

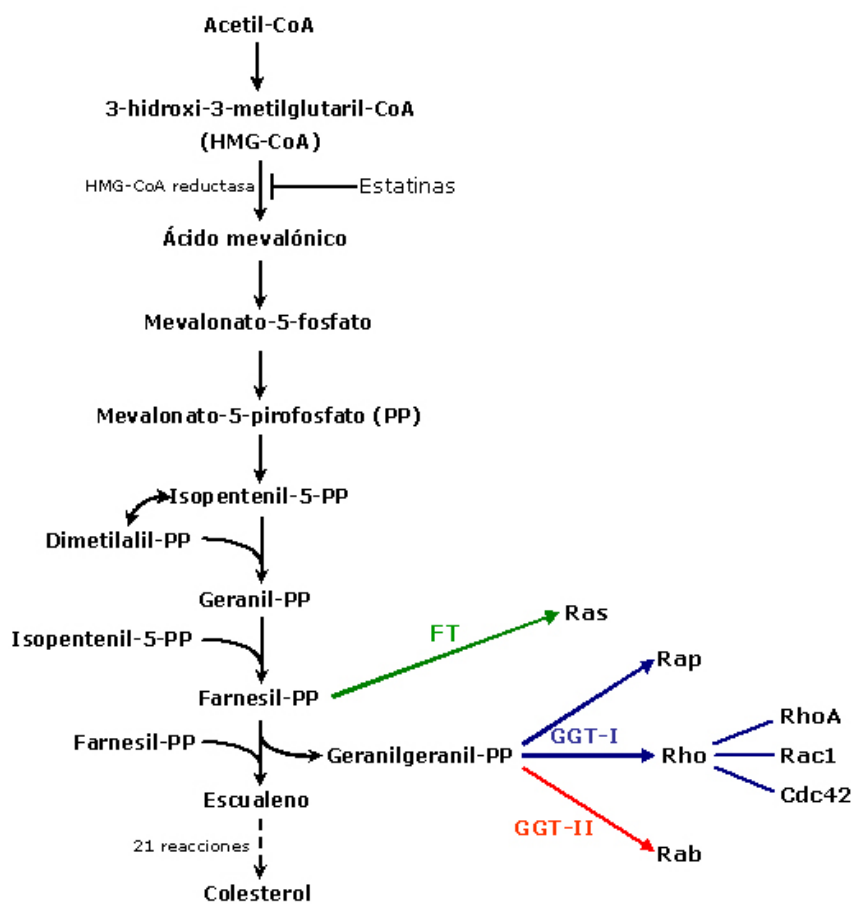


Figura 2. Ruta bioquímica de la síntesis del colesterol. En las primeras etapas de la biosíntesis del colesterol se generan los grupos prenilo, que son incorporados a distintos miembros de la superfamilia Ras (Goldstein y Brown, 1990).

Miembros destacados de la familia Ras son R-Ras, H-Ras, Ral y Rap. La proteína Rap está compuesta por dos subfamilias: Rap1 y Rap2. Ambas están implicadas en la regulación de distintos eventos celulares. En el caso de Rap1, este estaría implicado en procesos como la adhesión celular (Bos, *et al.*, 2003), regulación de las ERK/MAPK (Vossler, *et al.*, 1997), fagocitosis en macrófagos (Caron, *et al.*, 2000;

Schmidt, A., *et al.*, 2001) y polaridad celular (Schwamborn y Puschel, 2004). La localización subcelular de Rap1 es muy variada y puede encontrarse en la membrana plasmática, en endosomas (Pizon, *et al.*, 1994), en la región perinuclear (Mochizuki, *et al.*, 2001) y en Golgi (Caron, 2003). La presencia de Rap1 en distintos compartimentos endosomales sugiere su participación en la regulación del tráfico de vesículas.

2.2. La familia Rho

Las proteínas Rho también son activadas en respuesta a estímulos procedentes del exterior de la célula y las vías de señalización que controlan regulan principalmente el citoesqueleto de actina, el ciclo celular y la expresión de genes (Etienne-Manneville y Hall, 2002).

Esta familia está compuesta de unos 23 miembros (Bustelo, *et al.*, 2007) siendo los más estudiados RhoA, Rac1 y Cdc42 (Figura 3). Los efectos de la acción de estas tres proteínas en el citoesqueleto de la actina están bien estudiados y cada una de ellas regula aspectos muy diferentes: RhoA promueve la formación de fibras de estrés y el ensamblaje de las uniones focales; Rac1 controla la formación de los lamelipodios; Cdc42 regula la génesis de filopodios y microespículas de actina. En consecuencia, las GTPasas Rho están implicadas en procesos tales como la regulación de la polaridad celular, la migración celular, la forma de la célula, las interacciones célula-matriz extracelular y célula-célula, así como la regulación de la endocitosis y la exocitosis (Ridley, 2001; Qualmann y Mellor, 2003). Asimismo, se ha visto también que estas GTPasas son capaces de controlar los microtúbulos. RhoA sería capaz de mediar la estabilización de los microtúbulos y promover la orientación de los mismos (Cook, *et al.*, 1998; Palazzo, *et al.*, 2001). Rac1 puede interaccionar directamente con monómeros de tubulina y también promover la polimerización de los microtúbulos (Best, *et al.*, 1996; Daub, *et al.*, 2001). El crecimiento de los propios microtúbulos es capaz, a su vez, de activar Rac1 para promover la formación de lamelipodios en fibroblastos (Waterman-Storer, *et al.*, 1999).

Las funciones de las proteínas Rho no se limitan solamente al control del citoesqueleto, sino que también pueden regular distintas cascadas de señalización como las JNK/MAPK y la PI3K (Zheng, *et al.*, 1994; Vojtek y Cooper, 1995; Bokoch, *et al.*, 1996). Para conocer más en detalle la implicación de estas GTPasas en otras vías de señalización así como para consultar una relación exhaustiva de sus efectores se puede consultar la base de datos contenida en el dominio de Internet www.thebiogrid.org.

Más recientemente se ha descrito la implicación de estas proteínas G monoméricas en la entrada en las células de varios virus como el adenovirus tipo 2 (Li, *et al.*, 1998a), el VV (Locker, *et al.*, 2000) y el VHH-8 (Naranatt, *et al.*, 2005), así como

también en otros pasos del ciclo infeccioso de los virus, como sucede en el caso del virus respiratorio sincitial (VRS), en el que la activación de RhoA permite la formación de los sincitios y la correcta morfogénesis de los viriones (Gower, *et al.*, 2001; Gower, *et al.*, 2005).

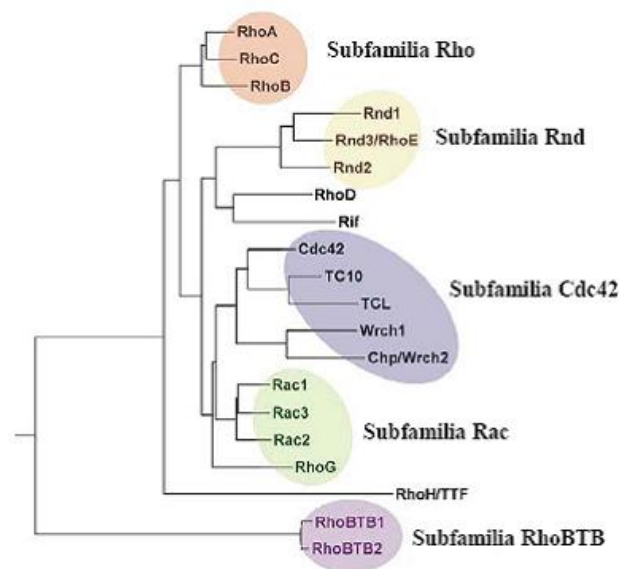


Figura 3. Dendrograma de las distintas subfamilias que componen la familia Rho (Burridge y Wennerberg, 2004).

3. FAMILIA DE LA FOSFOINOSÍTILO-3-KINASA (PI3K)

La familia de la PI3K comprende una serie de enzimas capaces de catalizar la transferencia del grupo fosfato- γ de una molécula de ATP a la posición D3 del anillo inositol del fosfatidilinositol (PI) y de algunos fosfoinosítidos. Los lípidos que se generan por la acción de la PI3K actúan como moléculas de señalización para distintas cascadas bioquímicas implicadas en procesos como la supervivencia celular, regulación del citoesqueleto, migración celular y tráfico de vesículas, entre otros (Wymann y Pirola, 1998; Hawkins, *et al.*, 2006).

En base a homologías estructurales y de secuencia, la familia de la PI3K puede dividirse en tres clases principales de enzimas: Clase I, II y III (Figura 4).

Las PI3Ks de la clase I están formadas por heterodímeros compuestos de una subunidad catalítica de unos 110 kDa y una subunidad reguladora. Las PI3Ks de clase I generan principalmente (*in vivo*) el fosfoinosítido PI(3,4,5)P₃ (PIP3) a partir del PI(4,5)P₂. A su vez, el PIP3 es desfosforilado en la posición D5 por distintas fosfatasa (Woscholski y Parker, 1997), generándose PI(3,4)P₂. Las PI3Ks de clase IA son activadas por RTK y las de clase IB son activadas por receptores acoplados a proteínas

G heterotriméricas (GPCR). Un hecho común a todas las enzimas de la clase I es que son activadas también por Ras.

Los lípidos PIP3 y PI(3,4)P₂ generados por la activación de las PI3Ks de clase I regulan la actividad de múltiples efectores, entre los que se encuentran las quinasas de serina/treonina Akt/proteína quinasa B (PKB; Alessi, *et al.*, 1996; Franke, *et al.*, 1997; Klippel, *et al.*, 1997) y la quinasa dependiente de fosfoinosítido-1 (PDK-1; Alessi, *et al.*, 1997a; Alessi, *et al.*, 1997b; Stokoe, *et al.*, 1997; Stephens, *et al.*, 1998), varios GEFs de Rac1 y Arf (Han, *et al.*, 1998; Leever, *et al.*, 1999; Rameh y Cantley, 1999; Roth, 1999; Cote, *et al.*, 2005), así como varios GAPs de Arf (Hammonds-Odie, *et al.*, 1996; Krugmann, *et al.*, 2002), y las PKC nuevas (ϵ , η) y atípicas (ζ , λ ; Toker y Cantley, 1997), principalmente.

Gracias a la acción de estos efectores sobre distintas rutas de señalización, las PI3Ks de clase I pueden gobernar el citoesqueleto, controlar la expresión génica, la

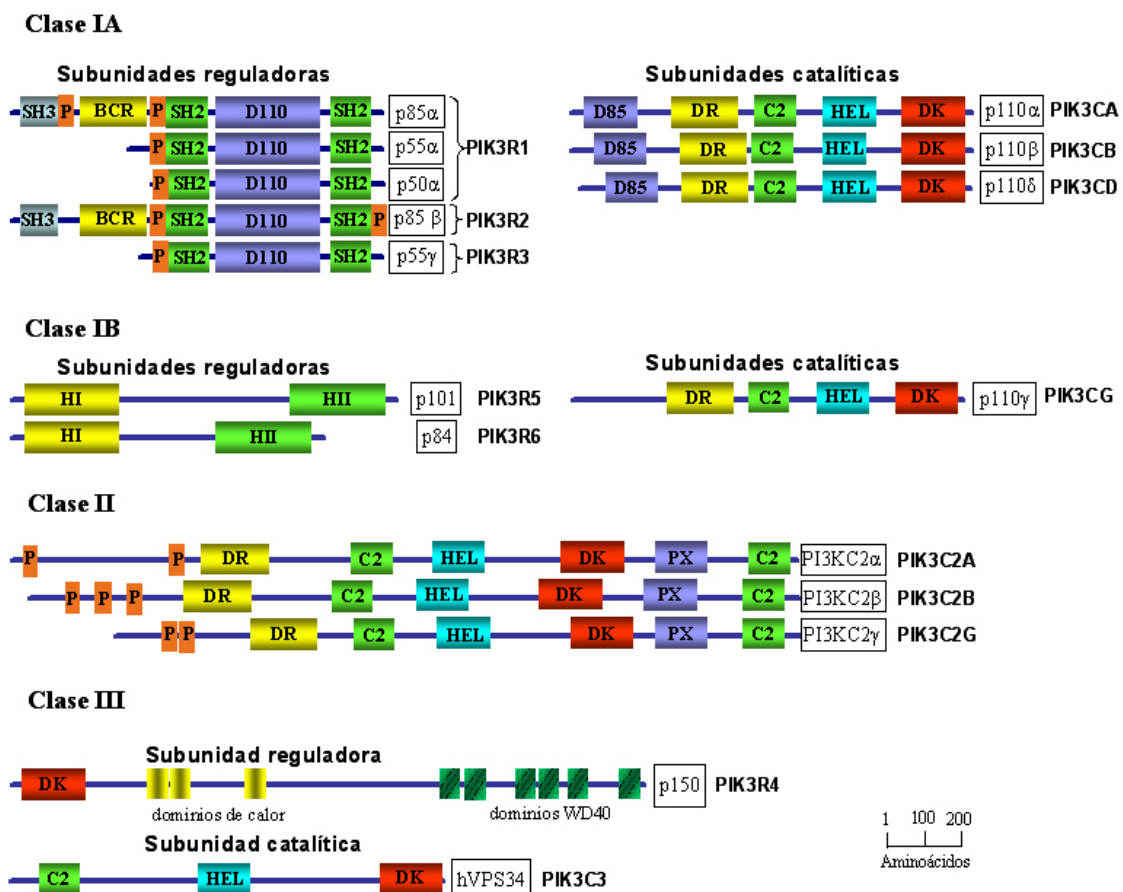


Figura 4. Familia de la fosfoinosítido-3-quinasa. Representación esquemática de la estructura secundaria de los distintos miembros de la familia de la PI3K. BCR, receptor de la célula B; C2, dominio de unión a Ca²⁺; D85, dominio de interacción con la subunidad p85; D110, dominio de interacción con la subunidad p110; DK, dominio con actividad quinasa; DR, dominio de unión a Ras; HI, dominio con homología I; HII, dominio con homología II; HEL, hélice; P, residuo de fosforilación; PX, dominio con homología a phox; SH2/3, dominio con homología a Src de clase 2/3 (Hawkins, *et al.*, 2006).

supervivencia celular y la síntesis de proteínas. El control sobre el citoesqueleto sería posible gracias a su capacidad de activar el GEF Vav (Han, *et al.*, 1998; Ma, *et al.*, 1998), que es un activador específico de Rac1. La activación de las PKCs también permitiría a las PI3K controlar el citoesqueleto y regular la proliferación celular por la activación de la cascada de las ERK/MAPK. Las PKCs pueden ser activadas por las PI3Ks a través de PIP3 (PKCs atípicas; Toker y Cantley, 1997) y PDK-1 (Chou, *et al.*, 1998; Le Good, *et al.*, 1998), enzima considerada activadora universal de las PKCs (Toker, 1998, 2000). Se ha demostrado que PKC ζ puede activar Raf-1 y MEK *in vivo* (Cai, *et al.*, 1997; Schonwasser, *et al.*, 1998).

Las PI3Ks de clase II y clase III generan fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) mediante la fosforilación del PI *in vivo*. La localización de la clase II en determinados compartimentos celulares sugiere su participación en procesos endocíticos (Wheeler y Domin, 2006). La función de la clase III consistiría en definir y controlar el paso de proteínas y membranas a través de los compartimentos endosomales y lisosomales (Lindmo y Stenmark, 2006).

La familia de la PI3K participa en la entrada de diferentes virus como los adenovirus (Li, *et al.*, 1998b) y el VHH-8 (Naranatt, *et al.*, 2003).

4. FAMILIA DE LA PROTEÍNA KINASA C (PKC)

La familia enzimática de la PKC consta de 10-15 miembros, según los criterios de clasificación (Mellor y Parker, 1998), con actividad serina treonina kinasa que son activados por distintas señales extracelulares. Estas enzimas juegan importantes papeles en la apoptosis, diferenciación y proliferación celular, reorganización del citoesqueleto de actina y transducción de señales, principalmente (Mellor y Parker, 1998; Toker, 1998; Larsson, 2006).

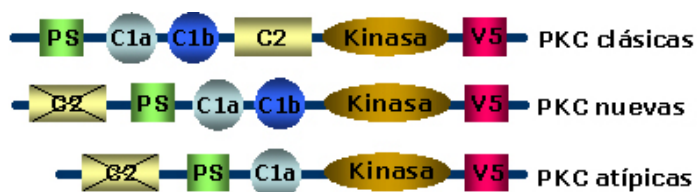


Figura 5. Familia de la Proteína Kinasa C. Representación esquemática de la estructura secundaria de los distintos miembros de la familia de la PKC. C1a/b, dominios con dedos de Zn, responsables de la unión a DAG y fosfolípidos; C2, dominio de unión a Ca²⁺; kinasa, dominio con actividad kinasa; PS, pseudosustrato, dominio inhibidor; V5, dominio variable.

La familia de la PKC (Figura 5) se divide en tres grupos, en base a su secuencia y sus requerimientos de activación: convencionales o clásicas (α , β I, β II, γ ; requieren diacilglicerol (DAG) y Ca²⁺ para su activación), nuevas (δ , ϵ , η , θ ; requieren

DAG) y atípicas (ζ , λ/ι ; no requieren DAG ni Ca^{2+}). Todas ellas requieren para su activación la presencia como cofactor de un fosfolípido aniónico, generalmente la fosfatidilserina. Además de este cofactor común, cada subfamilia requiere de manera específica para su activación la participación de otros cofactores, como el DAG y el Ca^{2+} . El DAG se genera por la actividad enzimática de una fosfolipasa de tipo C (PLC), que hidroliza fosfolípidos de inositol en DAG y distintos fosfatos de inositol como el inositol-(1,4,5)-trifosfato (IP3). Este último es capaz de estimular la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares. Para que la activación de las PKCs sea completa es necesaria su fosforilación en el dominio catalítico mediada por PDK-1 (Chou, *et al.*, 1998; Le Good, *et al.*, 1998), el cual es un efector de PI3K (ver el apartado “Familia de la PI3K”).

Se ha descrito recientemente el papel de esta familia de kinasas como una importante reguladora de la endocitosis y el reciclaje de varias moléculas (Becker y Hannun, 2003, 2004). Una de las funciones clave de la familia de la PKC sería la de anular la señalización ejercida por los receptores al ser capaz de fosforilar algunos de ellos y guiarlos así a su degradación (Raymond, 1991; Webb, *et al.*, 2000; Bhattacharyya, *et al.*, 2002; Luttrell y Lefkowitz, 2002). Además, las PKCs parecen controlar el tráfico vesicular de transportadores (Loder y Melikian, 2003; Jayanthi, *et al.*, 2004), canales (Nakamura, *et al.*, 1997; Awayda, 2000) y proteínas de membrana (Le, *et al.*, 2002; Upla, *et al.*, 2004).

Las PKCs pueden participar en la transducción de señales al fosforilar a varios miembros de las MAPK (ver el apartado “Familia de la PI3K”).

Por último, se ha demostrado la participación de las PKCs en los procesos de entrada en la célula de distintos virus: virus de la gripe (Sieczkarski, *et al.*, 2003), VHH-8 (Naranatt, *et al.*, 2003) y VV (Locker, *et al.*, 2000); así como en la transducción de señales durante el ciclo infeccioso del VRS (Monick, *et al.*, 2001), el SV40 (Dangoria, *et al.*, 1996) o el VV (de Magalhaes, *et al.*, 2001).

5. SUPERFAMILIA DE LAS PROTEÍNAS KINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK)

Esta superfamilia de kinasas está constituida por las siguientes familias: ERK, JNK, p38MAPK y ERK5 (Bogoyevitch y Court, 2004; Chuderland y Seger, 2005; Rubinfeld y Seger, 2005). Todas estas familias conforman vías de señalización intracelulares que se activan en respuesta a distintos estímulos extracelulares y que están implicadas en procesos celulares como proliferación, diferenciación, respuesta al estrés y la apoptosis.

La activación de cada una de estas cascadas de señalización es iniciada por proteínas G monoméricas o por proteínas adaptadoras que transmiten las señales a kinasas que reciben el nombre general de kinasa de kinasa de MAPK (MAP3K; Uhlik, *et al.*, 2004). Desde las MAP3Ks, la señal es transmitida hacia abajo en la cascada activando de manera secuencial a la kinasa de MAPK (MAPKK), MAPK, y con frecuencia también a las proteínas kinasas activadas por MAPK (MAPKAPKs).

De estas cascadas bioquímicas la mejor estudiada es la correspondiente a ERK. Esta vía de señalización es activada por estímulos extracelulares como hormonas y factores de crecimiento, entre otros. En la figura 6 se representan de manera esquemática los miembros y los distintos activadores y ejecutores de esta cascada (Yoon y Seger, 2006). En ella se puede apreciar que múltiples activadores pueden iniciar esta cascada bioquímica, transmitiendo su señal a diferentes MAP3Ks. Todas estas señales convergen en unas únicas MAPKK: MEK1 y MEK2, las cuales son las únicas que a su vez pueden fosforilar y activar a ERK1 y ERK2. ERK1/2, por medio de su acción directa, o a través de distintos efectores como las proteínas kinasas ribosomales S6 1-4 (RSK1-4), puede fosforilar distintos sustratos citosólicos (Yoon y Seger, 2006) o translocarse al núcleo para fosforilar y regular la actividad de varios factores de transcripción tales como Ets, Elk, Jun y Myc (Lewis, *et al.*, 1998; Hindley y Kolch, 2002), con la consiguiente expresión de genes requeridos para la progresión del ciclo celular (Schlessinger y Bar-Sagi, 1994; Kolch, 2000; Chang, *et al.*, 2003). Entre los sustratos citosólicos podemos encontrar proteínas del citoesqueleto como la paxilina (Lewis, *et al.*, 2000; Ishibe, *et al.*, 2003; Ishibe, *et al.*, 2004; Yoon y Seger, 2006). ERK puede interaccionar también con componentes del citoesqueleto como la tubulina o la vimentina, lo que le permite llegar hasta sus dianas específicas, sin que ello implique la fosforilación de la proteína del citoesqueleto implicada (Reszka, *et al.*, 1995; Perlson, *et al.*, 2005).

La señalización mediada por las ERK/MAPK puede encontrarse vinculada también a la endocitosis mediada por receptor, típicamente de RTK y GPCR, y se realiza mediante vesículas recubiertas de clatrina (Di Fiore y De Camilli, 2001; McPherson, *et al.*, 2001). Ejemplos de proteínas que permiten esta señalización localizada de las ERK/MAPK son las β -arrestinas, que ensambladas con ERK guían a los GPCR a los endosomas tempranos (DeFea, *et al.*, 2000; Luttrell, *et al.*, 2001; Shenoy y Lefkowitz, 2003; Tohgo, *et al.*, 2003), y MP1 (MEK “partner”-1, del inglés), que permite la interacción entre MEK y ERK y se encuentra en los endosomas tardíos (Schaeffer, *et al.*, 1998; Teis, *et al.*, 2002).

La integridad de la vía de señalización de las ERK/MAPK no es solamente importante para el correcto funcionamiento de distintos aspectos de la célula, sino

también para el éxito de la infección de numerosos virus como el VHH-8 (Naranatt, *et al.*, 2003; Sharma-Walia, *et al.*, 2005), el VIH (Yang y Gabuzda, 1999), el VV (de Magalhaes, *et al.*, 2001), el virus de la gripe (Pleschka, *et al.*, 2001), los adenovirus (Bruder y Kovesdi, 1997), el VHB y el VHC (Benn y Schneider, 1994; Hayashi, *et al.*, 2000), el VRS (Chen, *et al.*, 2000; Monick, *et al.*, 2001) y el papilomavirus humano (Payne, *et al.*, 2001), entre otros muchos.

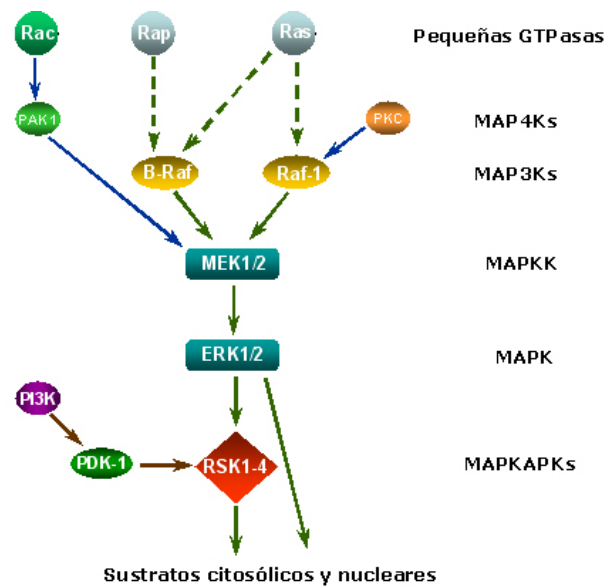


Figura 6. Representación esquemática de la cascada de señalización de ERK. Las flechas discontinuas representan activaciones indirectas y las flechas continuas activaciones directas (Yoon y Seger, 2006).

6. VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA)

6.1. El virus y la enfermedad

El VPPA es el agente etiológico de la Peste Porcina Africana (PPA), enfermedad altamente contagiosa que afecta a la mayoría de miembros de la familia *Suidae*. La PPA presenta un cuadro prácticamente asintomático en sus hospedadores naturales, que son los cerdos salvajes africanos. Estos animales pueden ser persistentemente infectados, convirtiéndose en portadores del virus. El VPPA pertenece al grupo de los arbovirus y, como tal, es capaz de infectar las garrapatas que parasitan a estos animales. Las garrapatas se convierten así en los principales transmisores del virus en el ciclo salvaje del VPPA, actuando además como importantes reservorios del VPPA en la naturaleza (Plowright, *et al.*, 1969; Thomson, *et al.*, 1980; Thomson, 1985).

Las células diana del virus en el animal son las de la línea monocito/macrófago (Gómez-Villamandos, *et al.*, 2003). La PPA puede presentarse en una forma aguda y altamente virulenta provocando casi el 100% de mortalidad en el

cerdo doméstico, o en una forma mucho menos virulenta y prácticamente asintomática, con una elevada supervivencia de los animales infectados que pasan a convertirse en portadores crónicos de la enfermedad (Wilkinson, *et al.*, 1981; Leitao, *et al.*, 2001; Kleiboeker, 2002; Boinas, *et al.*, 2004). La patogenia del cuadro clínico agudo se caracteriza principalmente por fiebre alta, cianosis, anorexia, hemorragias pronunciadas, esplenomegalia y una severa inmunosupresión por apoptosis (Gómez-Villamandos, *et al.*, 1995; Carrasco, *et al.*, 1996; Ramiro-Ibáñez, *et al.*, 1996; Oura, *et al.*, 1998; Salguero, *et al.*, 2004).

Actualmente, no existe tratamiento para la enfermedad ni se dispone de una vacuna eficaz para evitar la aparición de los brotes, teniendo como única solución a los mismos el sacrificio de todos los animales afectados y de todos aquellos potencialmente expuestos al virus. Como consecuencia, los brotes de PPA provocan graves pérdidas económicas en las regiones y países donde aparecen. En España, la PPA se considera erradicada desde el año 1994 (BOE 213 / 1995). En Europa, desde 1999, solamente se han producido brotes en la isla de Cerdeña (Italia) y recientemente (2007) en Georgia, donde los brotes han aparecido con una elevada virulencia, teniendo que ser sacrificados miles de animales. Por el contrario, la PPA es endémica en la mayor parte de los países del África subsahariana.

El VPPA es el único miembro descrito de la familia *Asfarviridae* (Dixon, L. K., Escribano, J.M., Martins, C., Rock, D.L., Salas, M.L. and Wilkinson, P.J., 2005). Por sus características morfológicas es muy parecido a la familia *Iridoviridae* y por las de su genoma a la familia *Poxviridae*. Iyer y colaboradores proponen un origen evolutivo común para las tres familias junto a las familias *Phycodnaviridae* y *Mimiviridae* (Iyer, *et al.*, 2006).

6.2. Genoma del VPPA

La estructura del genoma del VPPA es muy parecida a la de los Poxvirus y consta de una molécula de ADN lineal bicatenario con los extremos unidos covalentemente entre sí (González, *et al.*, 1986). Las pautas de lectura abiertas (ORFs) se encuentran separadas entre sí por menos de 200 pb y pueden ser transcritas desde las dos cadenas del genoma. Actualmente hay secuenciados 9 aislados de campo (www.virology.ca), y un aislado adaptado a cultivo celular procedente de un aislado de campo español, denominado Ba71V (Enjuanes, *et al.*, 1976; Yáñez, *et al.*, 1995). La longitud de estos genomas varía entre 170 y 192 kpb. Estas diferencias se deben a la pérdida o ganancia de secuencias en ambos extremos del genoma. Estas regiones codifican ORFs de 6 familias multigénicas distintas, así como otros genes. El número de

ORF	Proteína y Función	Tiempo Expresión	Referencias
Metabolismo de los Ácidos Nucleicos			
A240L	Timidilato kinasa	Temprana	Yáñez, <i>et al.</i> , 1993b
EP1242L	ARN polimerasa, subunidad II	Tardía	Yáñez, <i>et al.</i> , 1993a
F1055L	Helicasa de la superfamilia II; Similar a la proteína de Herpes UL9.	ND	Sussman, <i>et al.</i> , 1993; Yáñez, <i>et al.</i> , 1995
F334L	Subunidad pequeña de la Ribonucleótido reductasa	ND	Bournsnel, <i>et al.</i> , 1991
F778R	Subunidad grande de la Ribonucleótido reductasa	ND	Bournsnel, <i>et al.</i> , 1991
G1207R	ADN polimerasa α	Temprana-tardía	Rodríguez, J. M., <i>et al.</i> , 1993b
I243L	Factor de transcripción SH	Temprana-tardía	Rodríguez, J. M., <i>et al.</i> , 1992b; Dixon, L. K., <i>et al.</i> , 1994; Yáñez, <i>et al.</i> , 1995
K196R	Timidina kinasa	Temprana	Blasco, <i>et al.</i> , 1990
NP1450L	ARN polimerasa, subunidad I	Temprana	Yáñez, <i>et al.</i> , 1993a
NP419L	ADN ligasa	Tardía	Yáñez y Viñuela, 1993
O174L	ADN polimerasa tipo X	ND	Oliveros, <i>et al.</i> , 1997; García-Escudero, <i>et al.</i> , 2003
P1192R	ADN Topoisomerasa II	Tardía	García-Beato, <i>et al.</i> , 1992a
Interacción Virus-Célula			
A179L	p21, homólogo a Bcl-2 celular.	Temprana-tardía	Afonso, <i>et al.</i> , 1996; Brun, <i>et al.</i> , 1996
A224L	Homólogo a proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs)	ND	Neilan, <i>et al.</i> , 1997a
A238L	Homólogo a I κ B; Inhibe expresión TNF- α ; Regula expresión iNOS	Temprana	Neilan, <i>et al.</i> , 1997b; Granja, <i>et al.</i> , 2006a; Granja, <i>et al.</i> , 2006b
B119L	Homóloga a ERV1 de <i>S. cerevisiae</i> y a E10R de VV; Fosforilación oxidativa	ND	Yáñez, <i>et al.</i> , 1995
DP71L	Homólogo a ICP34.5 de HSV y MyD116	Temprana	Zsak, <i>et al.</i> , 1996
EP153R	Homólogo a lectinas tipo C		Neilan, <i>et al.</i> , 1999
EP402R	Homólogo a CD2	Tardía	Rodríguez, J. M., <i>et al.</i> , 1993a
QP383R	Proteína tipo Nifs, piridoxal aminotransferasa dependiente de fosfato; Metabolismo redox	ND	Yáñez, <i>et al.</i> , 1995; Dixon, L. K., <i>et al.</i> , 2004
Proteínas Estructurales e involucradas en Morfogénesis			
A104R	Histona	Tardía	Borca, <i>et al.</i> , 1996
A137R	p11.5	Tardía	Alcamí, <i>et al.</i> , 1993
B438L	p49; Necesaria para formar los vértices de la cápsida	Tardía	Galindo, <i>et al.</i> , 2000b; Epifano, <i>et al.</i> , 2006b
B602L	Chaperona; Necesaria para el correcto plegamiento de p72	Tardía	Cobbold, <i>et al.</i> , 2001; Epifano, <i>et al.</i> , 2006a

B646L	p72; Mayoritaria de la cápsida	Tardía	López-Otín, <i>et al.</i> , 1990; García-Escudero, <i>et al.</i> , 1998
CP204L	Fosfoproteína p30; Entrada del virus	Temprana	Afonso, <i>et al.</i> , 1992; Prados, <i>et al.</i> , 1993; Gómez-Puertas, <i>et al.</i> , 1998
CP2475L	Poliproteína pp220; Precursora de las proteínas estructurales p150, p37, p14 y p34.	Tardía	Simón-Mateo, <i>et al.</i> , 1993
CP530R	Poliproteína pp60 precursora de las proteínas estructurales p35 y p15.	Tardía	Simón-Mateo, <i>et al.</i> , 1997
D117L	p17; Dominio transmembrana	ND	Simón-Mateo, <i>et al.</i> , 1995
E120R	p14.5; Se une a ADN; Necesaria para el transporte de los viriones a la membrana plasmática	Tardía	Martínez-Pomares, <i>et al.</i> , 1997; Andrés, <i>et al.</i> , 2001b
E183L	p54; Une DLC8; Necesaria para reclutar membranas del RE; Adsorción del virus	Tardía	Rodríguez, F., <i>et al.</i> , 1994; Gómez-Puertas, <i>et al.</i> , 1998; Alonso, <i>et al.</i> , 2001; Rodríguez, J. M., <i>et al.</i> , 2004
K78R	Fosfoproteína p10; Se une a ADN	ND	Salas, M. L., <i>et al.</i> , 1988; Muñoz, <i>et al.</i> , 1993
KP177R	p22; Dominio transmembrana	Temprana	Camacho y Viñuela, 1991
O61R	p12; Dominio transmembrana; Adsorción del virus	Tardía	Carrascosa, A. L., <i>et al.</i> , 1991; Alcamí, <i>et al.</i> , 1992; Almazán, <i>et al.</i> , 1993
S273R	Proteasa de la familia SUMO-1; Procesamiento de pp220 y pp60	Tardía	Andrés, <i>et al.</i> , 2001a; Alejo, <i>et al.</i> , 2003
Otras enzimas con funciones desconocidas			
B318L	Preniltransferasa	Tardía	Alejo, <i>et al.</i> , 1997; Alejo, <i>et al.</i> , 1999
I215L	Enzima de conjugación a ubiquitina	Temprana	Rodríguez, J. M., <i>et al.</i> , 1992b
R298L	Proteína Serina Kinasa estructural	ND	Baylis, <i>et al.</i> , 1993

Tabla 2. Relación de los genes más importantes hallados en el genoma del VPPA. La nomenclatura utilizada para las ORFs es la utilizada por Rodríguez y colaboradores (1992a); Tabla adaptada de Yáñez y colaboradores (1995). ND: No determinado.

genes que codifica el genoma de cada aislado oscila entre 160 y 175 (151 en el aislado Ba71V). De todos estos genes, 110 están presentes en una sola copia en todos los aislados. De estos genes conservados, 39 codifican proteínas cuya función es conocida, 42 contienen motivos presentes en otras proteínas y de las 29 restantes se desconoce su función.

Entre las proteínas codificadas por el genoma del virus se encuentran enzimas involucradas en la replicación, transcripción y reparación del genoma viral, proteínas estructurales de la partícula viral, proteínas implicadas en la evasión del sistema inmune y diversas enzimas con actividad kinasa, de conjugación a ubiquitina, preniltransferasa o inhibidoras de la apoptosis (Tabla 2). Muchas de las proteínas codificadas por el VPPA no son esenciales para la replicación del virus en las células,

pero sí pueden cumplir papeles importantes en la replicación en el hospedador y la transmisión del virus.

La expresión génica del VPPA parece seguir un mecanismo en cascada, similar al descrito para los poxvirus (Moss, 2001), aunque no se conocen muy bien los mecanismos específicos que regulan esta expresión secuencial. Inmediatamente después de la entrada del virus en la célula comienza la expresión de los genes tempranos. Estos genes codifican enzimas implicadas en el metabolismo de nucleótidos y la replicación del ADN, así como factores de transcripción necesarios para la expresión de los genes tardíos. El silenciamiento de la mayoría de estos genes coincide con la puesta en marcha de la replicación del genoma viral. En ese momento se inicia la transcripción de los genes tardíos (Salas, *et al.*, 1986). Los genes tardíos codifican las proteínas estructurales del virión y enzimas como polimerasas y factores de transcripción tempranos que serán empaquetados en los viriones (Kuznar, *et al.*, 1980; Salas, J., *et al.*, 1988; Peña, *et al.*, 1993). Algunos genes no siguen este patrón de expresión y su transcripción se da durante todo el ciclo infectivo.

6.3. Morfología del virión

Las partículas virales del VPPA poseen una estructura compleja que guardan muchas similitudes con las partículas de la familia *Iridoviridae*. El virión consta de un nucleoide electrodenso constituido por el genoma del virus junto con las enzimas y los factores necesarios para la transcripción de los genes tempranos en el inicio de la infección. El nucleoide está rodeado por una cubierta de proteínas que en su mayoría proceden del procesamiento de las poliproteínas pp220 y pp60 (Carrascosa, J. L., *et al.*, 1986; Andrés, *et al.*, 1997; Andrés, *et al.*, 2002). Esta cubierta de proteínas es envuelta por una doble membrana lipídica procedente del RE (Cobbold, *et al.*, 1996; Andrés, *et al.*, 1998), sobre la que se ensambla la proteína p72 (ORF B646L; proteína mayoritaria del virión) formando la cápsida (Cobbold y Wileman, 1998; García-Escudero, *et al.*, 1998). Los vértices de la cápsida estarían formados por la proteína codificada por el gen B438L (Epifano, *et al.*, 2006b), mientras que otras proteínas como la p54 (ORF E183L) y la codificada por el gen XP124L, se integran en la membrana lipídica (Rodríguez, F., *et al.*, 1996; Rouiller, *et al.*, 1998; Netherton, C., *et al.*, 2004; Rodríguez, J. M., *et al.*, 2004).

La cápsida del virus presenta una simetría icosaédrica, está constituida por 1892-2172 capsómeros y tiene un diámetro de 170-190 nm. Los viriones que salen de la célula por gemación quedan englobados en una envuelta lipídica adicional (Figura 7).

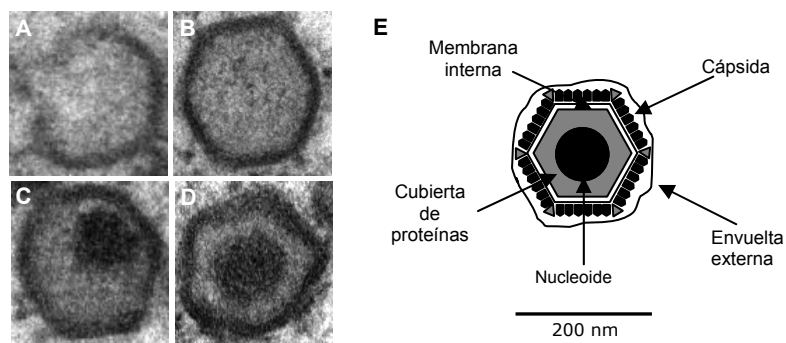


Figura 7. Morfología del virión del VPPA. A-D) Distintas etapas de la morfogénesis de los viriones, desde el plegamiento de las membranas del RE para dar la forma icosaédrica característica (A y B), hasta las formas más maduras con la condensación del material genético y la consiguiente aparición del nucleoide (C y D). E) Representación esquemática de la partícula viral.

6.4. Ciclo infectivo

6.4.1. Entrada del virus

El ciclo infectivo del VPPA tiene una duración de unas 18-24 horas (Costa, 1990) y empezaría, como en todos los virus, con la unión de una partícula de virus a una célula diana. Esta unión a la célula se daría por la unión a uno o varios receptores presentes en la membrana plasmática (Galindo, *et al.*, 1997). En macrófagos, el marcador de superficie CD163 podría determinar qué subpoblaciones celulares serían susceptibles de ser infectadas por el virus (McCullough, *et al.*, 1999; Sánchez-Torres, *et al.*, 2003). Estudios de microscopía electrónica y con drogas que afectan al pH de los lisosomas, apuntan a que la entrada del VPPA sería por endocitosis mediada por receptor, sin que hiciera falta la participación de elementos del citoesqueleto. El core del virus sería liberado en el citoplasma tras la fusión de la envuelta del virus y la membrana del endosoma. Este proceso es dependiente de pH y de la presencia de colesterol en la membrana del endosoma (Geraldés y Valdeira, 1985; Valdeira y Geraldés, 1985; Alcamí, *et al.*, 1989; Bernardes, *et al.*, 1998; Valdeira, *et al.*, 1998). Se desconoce el tipo de vesícula endocítica a través de la cual entraría el VPPA, aunque existen indicios de que podría ser a través de vesículas recubiertas de clatrina (Valdeira y Geraldés, 1985; Alcamí, *et al.*, 1989). La entrada por caveolas podría descartarse debido al tamaño del virión (Chung, *et al.*, 2005). Las proteínas del virus p12 (ORF O61R), p72 y p54 parecen estar implicadas en la unión del virus a las células, mientras que la p30 (ORF CP204L) estaría implicada en la internalización del virus (Alcamí, *et al.*, 1992; Angulo, *et al.*, 1993; Borca, *et al.*, 1994; Gómez-Puertas, *et al.*, 1998). Una vez que el virus ha entrado en la célula, se dirige a la región perinuclear para comenzar su replicación. Para ello el virus utiliza el transporte microtubular mediado por la dineína (Alonso, *et al.*, 2001).

6.4.2. Transcripción y replicación del genoma

La transcripción de los genes tempranos empieza en el citoplasma tras la desencapsidación del virus, y no requiere la ARN polimerasa II celular (Salas, J., *et al.*, 1988), ya que el VPPA codifica la suya propia (Yáñez, *et al.*, 1993a). La transcripción temprana está fuertemente regulada en el tiempo y los ARNm son similares a los eucarióticos, presentando modificaciones como la poliadenilación en el extremo 3' (Almazán, *et al.*, 1992; Almazán, *et al.*, 1993; Rodríguez, J. M., *et al.*, 1996).

La expresión de los genes tempranos termina cuando se inicia la replicación del genoma viral. En un primer paso, el genoma del VPPA entra en el núcleo, posiblemente por la acción de la proteína p37 (Eulalio, *et al.*, 2004; Eulalio, *et al.*, 2007), donde empieza la síntesis de fragmentos de ADN subgenómicos. Estos fragmentos de ADN se trasladan al citoplasma, donde se continúa y completa su síntesis (García-Beato, *et al.*, 1992b; Rojo, *et al.*, 1999). La replicación del genoma del VPPA es similar a la descrita para los poxvirus (Moss, 2001), salvo que en los poxvirus no es necesario el paso por el núcleo. En el caso del VPPA, el paso del genoma por el núcleo celular podría ser debido a la necesidad de la actividad primasa de las subunidades de la ADN polimerasa celular α , de la que el virus parece carecer (Yáñez, *et al.*, 1995; Rojo, *et al.*, 1999).

6.4.3. Ensamblaje y morfogénesis de los viriones

La replicación del genoma en el citoplasma se da en la región perinuclear cercana al MTOC (Heath, *et al.*, 2001), en lo que se denomina factoría viral. En las factorías virales se acumulan también las proteínas estructurales que formarán parte de los nuevos viriones, junto con los genomas generados y las membranas procedentes del RE (Cobbold, *et al.*, 1996; Andrés, *et al.*, 1998). En la formación de las factorías participan distintos elementos del citoesqueleto. Los microtúbulos son necesarios para la formación de las factorías, y junto con ellos la dineína (Carvalho, *et al.*, 1988; Alonso, *et al.*, 2001). Las factorías son englobadas en un acúmulo de filamentos intermedios (vimentina), que recuerda a la formación de los agresomas (Carvalho, *et al.*, 1988; Johnston, *et al.*, 1998; García-Mata, *et al.*, 1999; Heath, *et al.*, 2001). La reagrupación de la vimentina alrededor de las factorías también es dependiente de los microtúbulos (Stefanovic, *et al.*, 2005).

La proteína p54 del virus es insertada en las membranas del RE y en consecuencia queda integrada en la membrana que rodea el nucleoide del virión (Rodríguez, F., *et al.*, 1996; Rodríguez, J. M., *et al.*, 2004). Se ha descrito la interacción de p54 con la cadena ligera de 8 kDa de la dineína (DLC8; Alonso, *et al.*, 2001). Esta interacción podría permitir el reclutamiento de las membranas del RE en las factorías

virales, y también el transporte de los viriones desde la membrana plasmática hasta las proximidades del núcleo.

Todos los procesos que se dan en las factorías requieren mucha energía, y esta es aportada por las mitocondrias, que son reagrupadas por medio de los microtúbulos alrededor de la factoría viral (Rojo, *et al.*, 1998; Hernández, *et al.*, 2006).

6.4.4. Salida de los viriones

Una vez que los viriones han sido formados y completado su maduración, son transportados hasta la periferia de la célula utilizando el transporte microtubular mediado por el motor de la kinesina (de Matos y Carvalho, 1993; Jouvenet, *et al.*, 2004). La proteína codificada por el gen E120R es esencial para el transporte de los viriones hasta la periferia celular, puesto que en su ausencia los viriones quedan retenidos en la factoría viral (Andrés, *et al.*, 2001b). Una vez que los viriones alcanzan la membrana plasmática son capaces de estimular la polimerización de actina, produciendo prolongaciones tipo filopodio con una partícula vírica en el extremo de dicha prolongación (Jouvenet, *et al.*, 2006). A diferencia de lo que sucede con las prolongaciones generadas por el VV (Cudmore, *et al.*, 1995; Rietdorf, *et al.*, 2001), no se ha demostrado que el VPPA pueda infectar a las células vecinas por medio de estas proyecciones.

6.5. Manipulación de las vías de señalización celulares por el VPPA

El VPPA utiliza varias estrategias para combatir las respuestas de defensa del hospedador (Dixon, L. K., *et al.*, 2004). Una de ellas consiste en alterar algunas vías de señalización celulares encaminadas a la estimulación del sistema inmune, como la actividad transcripcional del NF κ B, responsable de la expresión de varias citoquinas y quimioquinas (Ghosh, *et al.*, 1998). El VPPA inhibe la actividad del NF κ B mediante la interacción de la proteína codificada por el gen A238L (pA238L) con la subunidad p65 de NF κ B (Powell, *et al.*, 1996; Revilla, *et al.*, 1998). pA238L también interacciona con e inhibe la fosfatasa calcineurina, inhibiendo en consecuencia la activación del factor de transcripción NFAT (Miskin, *et al.*, 1998; Miskin, *et al.*, 2000). Otra estrategia seguida por el VPPA podría ser la de inhibir la respuesta antiviral ejercida por el interferón en los macrófagos, en la que podrían estar implicados varios miembros de las familias multigénicas 360 y 530 (Afonso, *et al.*, 2004). La proteína codificada por el gen DP71L, homóloga a la proteína ICP 34.5 del HSV-1 (Zsak, *et al.*, 1996; Tulman y Rock, 2001), interacciona con la fosfatasa celular 1 (PP1), lo que podría evitar el paro en la síntesis de proteínas en la célula mediada por la proteína kinasa dependiente de ARN de doble cadena (PKR; Rivera, *et al.*, 2007).

La infección por el VPPA provoca la muerte de la célula por apoptosis (Carrascosa, A. L., *et al.*, 2002; Hernáez, *et al.*, 2004a; Hernáez, *et al.*, 2004b; Netherton, *et al.*, 2004). Para retrasarla, el virus codifica al menos tres proteínas que actúan como inhibidores de la apoptosis, retrasando su desenlace. Una de estas proteínas es la codificada por el gen A224L, que es similar a la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP; Chacón, *et al.*, 1995; Nogal, *et al.*, 2001). La expresión de A224L resulta en la inhibición de la actividad de la caspasa 3 y en un descenso de la muerte celular. Otra de estas proteínas es la codificada por el gen A179L, que es un homólogo viral de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Neilan, *et al.*, 1993; Afonso, *et al.*, 1996; Revilla, *et al.*, 1997; Brun, *et al.*, 1998). La familia Bcl-2 ejerce su efecto antiapoptótico por interactuar con e inhibir a los miembros de las familias proapoptóticas Bax y las proteínas “sólo-BH3”. La tercera proteína codificada por el virus con actividad antiapoptótica es la codificada por el gen EP153R (Hurtado, *et al.*, 2004). Esta proteína es una lectina tipo C (Galindo, *et al.*, 2000a), y es capaz de reducir la actividad de transactivación de la proteína celular p53, cuya transcripción es inducida por la infección del VPPA (Granja, *et al.*, 2004). La actividad de la caspasa 3 es más elevada en aquellas células infectadas con un virus mutante de delección de este gen, que en células infectadas con el virus salvaje (Hurtado, *et al.*, 2004).

Los ejemplos aquí presentados ilustran la capacidad del VPPA para manipular la maquinaria de las células y hacerse con el control de sus vías de señalización. Esta capacidad resulta de gran importancia para que el VPPA pueda replicarse y evitar las defensas del hospedador. A pesar de conocer con tanto detalle la participación y el estado de cada componente del citoesqueleto en las distintas etapas del ciclo infectivo del VPPA, se desconocen las señales bioquímicas que el VPPA es capaz de manipular para regular el estado del citoesqueleto en cada etapa de su ciclo infectivo. La presente tesis doctoral pretende arrojar algo de luz sobre esta cuestión, intentando desentrañar qué vías de señalización podrían estar implicadas en el control del VPPA sobre el citoesqueleto, especialmente durante la entrada y el transporte del VPPA desde la periferia de la célula hasta las proximidades del núcleo.

Objetivos

Los virus requieren de la integridad de distintas vías de señalización intracelular en diferentes fases de su ciclo infeccioso como la entrada, el transporte desde la membrana plasmática hasta su lugar de replicación en la célula, la constitución de la factoría viral, la morfogénesis de los viriones y la exocitosis de la progenie vírica generada. Estas vías de señalización pueden estar reguladas por algunas de las más importantes familias de kinasas, por distintos miembros de las familias de GTPasas Ras y Rho e incluso por los lípidos responsables de las modificaciones postraduccionales de dichas proteínas. Por ello, para el trabajo de la presente tesis doctoral nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Estudiar la importancia de la ruta biosintética del colesterol y, más en concreto, de los isoprenoides farnesilpirofosfato y geranilgeranilpirofosfato, en el ciclo infeccioso del VPPA.
2. Estudiar la implicación de las GTPasas Rho en el ciclo infeccioso del VPPA en las células Vero, más en concreto, en el proceso de entrada del virus en la célula.
3. Estudiar la participación de las familias de kinasas PI3K, PKC y ERK/MAPK en distintas etapas del ciclo infeccioso del VPPA.

Materiales y Métodos

1. REACTIVOS

1.1. Anticuerpos y cromógenos (Tabla 3)

Anticuerpo primario (*)	Uso/Dilución	Procedencia
Anti-actina (C)	WB / 1:250	Sigma
Anti-CDC42 (R)	WB / 1:250	BD Transduction Laboratories
Anti-p30 (R)	WB / 1:500 IFI / 1:200	Dr. José M. Escribano (INIA, Madrid)
Anti-p72	Clon 18BG3 (R)	WB / 1: 5000
	Clon 1BC11(R)	IFI / 1:1000
Anti-Rac1 (R)	WB / 1:1000	BD Transduction Laboratories
Anti-Rap1 (C)	WB / 1: 200	Santa Cruz
Anti- α -tubulina (R)	WB / 1:4000	Sigma
	IFI / 1:2000	
Anti- α -tubulina acetilada (R)	WB / :1:2000	Sigma
	IFI / 1:2000	
Anti-Vimentina CY3 (R)	IF / 1:200	Sigma
Anticuerpo secundario	Uso/Dilución	Procedencia
Anti IgG de conejo-HRP	WB / 1:4000	Amersham Biosciences
Anti IgG de ratón-HRP	WB / 1:5000	Amersham Biosciences
Anti IgG de ratón Alexa Fluor™ 488	IFI / 1:300	Molecular Probes
Anti IgG de ratón Alexa Fluor™ 594	IFI / 1:200	Molecular Probes
Cromógeno	Uso/Dilución	Procedencia
BODIPY TR	IF / 1:200	Molecular Probes
Hoechst 33258	IF / 1 μ g/ml	Sigma
Texas Red-X-faloidina	IF / 1:40	Molecular Probes

1.2. Espectros de absorción y emisión de fluoróforos (Tabla 4)

Fluoróforo	Máxima absorción (nm)	Máxima emisión (nm)
Alexa Fluor™ 488	495	519
Alexa Fluor™ 594	590	617
BODIPY TR	589	617
Hoechst 33258	352	461
Texas Red	595	615

1.3. Inhibidores (Tabla 5)

Inhibidor	Diana	Casa Comercial
Calfofina C	PKC	Calbiochem
FTI-277	Farnesiltransferasa (FTasa)	Calbiochem
GGTI-286	Geranilgeraniltransferasa-I (GGTasa-I)	Calbiochem
Lovastatina (Mevinolina)	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa)	Sigma
Toxina B	Rho, Rac y Cdc42	Calbiochem
U-0126	MEK	Stressgen
Wortmannina	PI3K	Stressgen

1.4. Lípidos de la ruta biosintética del colesterol (Tabla 6)

Lípido	Casa Comercial
Colesterol	Sigma
FPP	Sigma
GGPP	Sigma
Mevalonato	Sigma

1.5. Plásmidos (Tabla 7)

Plásmido	Descripción	Procedencia
pcDNA3-GFP-Rac1-WT	Expresa en células de mamífero la proteína verde fluorescente en fusión a la proteína Rac1 en su forma nativa.	Dr.O.Gjoerup
pcDNA3-GFP-Rac1-Q61L	Expresa en células de mamífero la proteína verde fluorescente en fusión a la proteína Rac1 con una mutación que la mantiene en un estado activo permanentemente.	Dr.O.Gjoerup
pcDNA3-GFP-Rac1-17N	Expresa en células de mamífero la proteína verde fluorescente en fusión a la proteína Rac1 con una mutación que la mantiene en un estado inactivo permanentemente.	Dr.O.Gjoerup
pGEX-2T-PBD	Expresa en <i>E. coli</i> la proteína Glutation-S-Transferasa (GST) en fusión al dominio de la proteína PAK1B (aminoácidos 56-141; Liu, B. P. y Burrige, 2000) que se une tanto a Rac1 como a Cdc42 en su estado activo.	Dr.K.Burrige
pGEX-4T3-RBD	Expresa en <i>E. coli</i> la proteína Glutation-S-Transferasa (GST) en fusión al dominio de la proteína RalGDS (aminoácidos 1-97; Herrmann, <i>et al.</i> , 1996) que se une a Rap1 en su estado activo.	Dr. D. García-Bernal

2. CULTIVOS CELULARES

Se utilizó la línea celular Vero (ATCC CCL81) derivada de fibroblastos de riñón de mono verde africano para realizar las infecciones con VPPA.

Las células Vero se cultivaron en DMEM (Cambrex) suplementado con suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor (30 min. a 56° C) al 5% (v/v, Cambrex), L-glutamina 2mM (Gibco), penicilina 100 UI/ml (Gibco) y estreptomicina 100 µg/ml (Gibco). Las células crecieron en condiciones controladas de temperatura (37° C) y CO₂ (5%), subcultivándose cada 2 días empleando tripsina/EDTA (0.25% y 0.025% p/v respectivamente; Gibco) para despegarlas de los frascos de cultivo. Para hacer los pases de cultivo, las células se contaban con una cámara de Neubauer y tiñéndolas con el colorante vital azul de Tripán (Merck). El azul Tripán fue utilizado también para evaluar la toxicidad de las distintas drogas usadas en los experimentos.

3. VIRUS E INFECCIONES VIRALES

3.1. Virus empleados

Aislado Ba71V (Enjuanes, *et al.*, 1976) de VPPA adaptado a la línea celular Vero e incapaz de producir una infección eficaz en el macrófago porcino.

Virus Ba71-54GFP, generado a partir del aislado Ba71V. Expresa la proteína estructural p54 en fusión a GFP en el locus del gen Timidina Kinasa (K196R). El locus original de p54 está anulado para evitar la competición entre ambas p54 a la hora de incorporarse a la partícula viral (Hernández, *et al.*, 2006).

3.2. Obtención de inóculos y purificación del VPPA

Para obtener inóculos procedentes de diferentes aislados del VPPA, se infectaron monocapas confluentes de células Vero con el aislado Ba71V a una multiplicidad de infección de 0.1 ufp/cél, dejando transcurrir la infección a 37° C y CO₂ al 5% hasta observar un efecto citopático generalizado (de 3 a 4 días). Entonces, se recogieron las células y el medio y se sonicaron al 50% de potencia con un sonicador de sonda (Sonopuls, Bandelin) 3 veces durante 10 segundos. A continuación se centrifugaron a 2200 x g durante 10 minutos a 4° C para eliminar los restos celulares. Los sobrenadantes se centrifugaron a 27000 x g durante 4 horas a 4° C. Finalmente, el sedimento obtenido fue resuspendido en 4 ml de medio con 5% de SBF y almacenado a -80° C hasta su uso.

Para purificar parcialmente el inóculo de VPPA obtenido, éste se centrifugó a través de un colchón de sacarosa al 40% en PBS a 40000 x g durante 20 minutos a 4° C. No obstante, el mayor grado de purificación, que asegura una contaminación por fracciones de membrana menor del 1%, se consiguió empleando gradientes de Percoll, descrito por Carrascosay colaboradores (1985).

Los inóculos de virus (ufp/ml) se titularon por plaqueo en agarosa de diluciones decimales seriadas del inóculo obtenido (ver apartado 3.4).

3.3. Infecciones con el VPPA

Se realizaron siempre sobre células Vero sembradas la noche anterior a diferentes mdi, según el experimento. Las células a infectar se sembraron a una densidad de 9×10^4 céls/cm², salvo en los experimentos en los que había que transfectar o realizar inmunofluorescencia indirecta (IFI), en los que se sembraron $2,5 \times 10^4$ céls/cm². El inóculo vírico se añadió siempre sobre el mínimo volumen necesario para cubrir el tapiz celular. Se dejó transcurrir un periodo de adsorción de 90 minutos a 37° C, tras el cual se retiró el inóculo y se añadió medio fresco.

Cuando las infecciones se realizaron en presencia de alguna droga se procedió generalmente de tres formas diferentes: una de ellas fue mantener la droga en el cultivo durante todo el experimento (generalmente 24 horas, incubando las células con ella antes, durante y después de la adsorción del virus); otra consistió en incubar las células antes y durante la adsorción del virus, lavando las células tras la adsorción para eliminar la droga; en la tercera se añadió la droga 3 horas después de la adsorción del virus, considerando que a ese tiempo los viriones ya han alcanzado su destino dentro de la célula y han empezado su ciclo replicativo.

Cuando la droga utilizada fue la calfostina C, se incubaron las células durante 3h en la cabina de flujo laminar con la luz encendida con el fin de activar la droga. Transcurridas las 3h, se siguió con el experimento, dejando las células en el incubador de CO₂.

En todos los casos, tras la adsorción, se lavaron las células tres veces con medio fresco para eliminar los viriones que no se hubieran unido a las células.

3.4. Titulación de inóculos del VPPA

Las titulaciones se realizaron por plaqueo en agarosa sobre monocapas de células Vero al 80% de confluencia, infectadas con diluciones decimales seriadas del

inóculo viral, permitiendo una adsorción en medio con SBF al 5% a 37° C durante 90 minutos. A continuación se retiró el inóculo viral y se añadió una mezcla de MEM (Gibco) 2X completo más agarosa de bajo punto de fusión (Gibco) al 2% atemperada a 37° C, en proporción 1:1. Las placas producidas por Ba71V se tiñeron y contabilizaron con cristal violeta (Sigma) 1% (p/v) a los 10-15 días.

4. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS VERO

Para la transfección de las células Vero se empleó el polímero catiónico jetPEITM (“Poly-Plus Transfection”), añadiendo 1µg de plásmido más 1,2 µl de jetPEITM a 5·10⁴ céls., siguiendo las indicaciones del fabricante.

Las células una vez transfectadas, se mantuvieron en cultivo durante 24h para permitir la expresión de las proteínas codificadas por los plásmidos.

5. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CASPASA 3

La actividad de la caspasa 3 fue determinada con un ensayo fluorimétrico de extractos de células Vero incubadas con calfofostina C a distintas concentraciones durante 24h, las tres primeras en presencia de luz. Para ello se utilizó el kit comercial “Caspase-3 Fluorimetric Assay Kit” (Sigma) y se siguieron las recomendaciones del fabricante. El sustrato utilizado para la caspasa 3 estaba acoplado al fluorocromo AMC y se utilizó como inhibidor específico el DEVD-CHO. Para la detección de emisión de fluorescencia se utilizó un fluorímetro lector de placas, dotado del láser y filtros adecuados (Tecan). Las longitudes de onda empleadas en la excitación y detección del AMC fueron 360 y 460 nm.

6. ANÁLISIS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

6.1. Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana (Western Blot)

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE; (Laemmli, 1970) usando el sistema de dos tampones (discontinuos), con concentraciones de acrilamida (Acrilamida: bisacrilamida al 40%; BioRad) del 10 al 15%, dependiendo del tamaño de la proteína a estudiar. Una vez separadas, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa con un poro de 0.45 µm (Bio-Rad) por transferencia húmeda a 100 V constantes durante 1 hora y media. Tras la transferencia las membranas se teñían con Rojo Ponceau (Sigma) para

comprobar el éxito de la transferencia. El sistema de electroforesis usado fue Mini PROTEAN 3 Cell de Bio Rad.

Para la inmunodetección de las proteínas sobre dicha membrana se adaptó el protocolo de Bakkali (Bakkali, *et al.*, 1994) a las recomendaciones de la casas comerciales suministradoras de los anticuerpos empleados (Tabla nº). Para el revelado, se empleó ECL™ “Western Blotting Detection Reagents” (Amersham Biosciences), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial y exponiendo las membranas a películas autorradiográficas (Amersham Biosciences).

Las muestras celulares fueron recogidas en tampón RIPA (salvo las muestras de los “pull-downs”; ver apartado 5.5), incubadas 20 minutos a 4° C con agitación (noria) y centrifugadas 10 minutos a 16000 x g a 4° C. Los sobrenadantes fueron transferidos a tubos nuevos y almacenados a -80° C hasta su uso. Se utilizó el reactivo de Bradford (BioRad) para determinar la concentración de proteínas en las muestras y poder cargar así en los geles cantidades equivalentes de cada muestra (30µg).

6.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Las células se sembraron a una densidad de $2,5 \times 10^4$ céls/cm² sobre cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro (Geber-Lab). Una vez transcurrido el tiempo de infección o transfección deseado, las células se fijaron con paraformaldehído (Sigma) al 3.7 % en PBS durante 10 minutos y se permeabilizaron con Triton X-100 (Sigma) al 0.1 % en PBS durante 15 minutos. Una vez fijadas y permeabilizadas, las muestras se bloquearon con BSA (Sigma) al 2% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Las células se incubaron con la correspondiente dilución del anticuerpo primario (Tabla nº) en PBS, durante 1 hora a 37° C en cámara húmeda, mientras que la incubación con la dilución correspondiente del anticuerpo secundario se realizó durante 30 minutos en cámara húmeda y oscuridad a temperatura ambiente. Después de cada paso se lavaron las células con PBS.

Al hacer dobles marcajes, siempre se seleccionaron combinaciones de fluoróforos que tuvieran una máxima distancia en el espectro de emisión (Tabla nº).

La detección de ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante un lavado de las células durante 3 minutos con 1 µg/ml de Hoechst 33258 (Molecular Probes, Invitrogen) en PBS.

Para montar el cubreobjetos sobre el portaobjetos se utilizaron 10 μ l de medio de montaje FluorsaveTM (Calbiochem) y finalmente se sellaron las muestras con laca de uñas.

En los experimentos en los que se contabilizaron el número de células infectadas en cultivo, se fijaron las células a las 3 horas post-infección (hpi) y se incubaron con un anticuerpo frente a la proteína viral de expresión temprana p30. Así podíamos detectar discriminar las células infectadas de las no infectadas. Todas las células fueron marcadas con Hoechst 33258. Para calcular los porcentajes de infección, en cada tratamiento se contabilizaron el número de células infectadas y las totales de 30 campos. Cada experimento se repitió tres veces.

6.3. Expresión y purificación de las proteínas GST-PBD y GST-RBD

Estas proteínas fueron expresadas en la cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3). Se cultivaron 200 ml de bacterias a 37° C en LB (Duchefa) a partir de un preinóculo de 20 ml hasta alcanzar una DO a 600 nm de entre 0.6 y 0.8. En ese punto se indujo la expresión de la proteína añadiendo al cultivo IPTG (Sigma) a una concentración de 0,3 mM, permitiéndose la expresión durante 3 horas. A continuación fueron recogidas las bacterias por centrifugación y fueron resuspendidas en 10 ml de tampón de lisis (20 mM HEPES (Sigma) pH=7.5, 120 mM NaCl (Duchefa), 10% glicerol (Duchefa), 2 mM EDTA (Sigma), inhibidores de proteasas (CompleteTM “mini EDTA-free”; Roche), lisozima 1 mg/ml). Una vez resuspendidas se incubaron durante 30 minutos a 4° C. Transcurrido este tiempo, se sonicó la suspensión dos veces durante 20 segundos cada una usando un sonicador de sonda al 70% de potencia. Tras la sonicación, se centrifugó la muestra a 27000 x g 15 minutos a 4° C. Al sobrenadante se le añadió el detergente no iónico NP-40 (Sigma) a una concentración final del 0,5%. A continuación se añadieron 600 μ l de Glutathione SepharoseTM 4B (Amersham Biosciences) al 50% para purificar la proteína GST-PBD o GST-RBD, y se dejó la mezcla agitando 1 hora a 4° C. Transcurrida la hora se lavó la sefariosa con tampón de lisis con NP-40 tres veces y tres veces más con tampón de lisis sin NP-40.

La cantidad de proteína obtenida se determinó mediante SDS-PAGE y posterior tinción con azul brillante de Coomassie (Sigma). Para estimar la cantidad de proteína obtenida se cargaron en los geles cantidades conocidas de BSA, comparándose las bandas de las distintas proteínas por densitometría (Tina 2.0).

6.4. Cuantificación de la GTPasa Rho-A activa

Se utilizó el kit comercial G-LISA™ “RhoA Activation Assay Biochem Kit™” (basado en absorbancia; Cytoskeleton). Se cultivaron e infectaron células Vero a diferentes tiempos (Apartado 6.5) y se procesaron siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.5. Ensayo de precipitación de Rac1, Cdc42 y Rap1 activos (“pull-down”)

Se siguió la metodología descrita en (García-Bernal, *et al.*, 2005) con ciertas modificaciones: Células Vero infectadas a diferentes tiempos a una mdi=5 ufp/cél ($7 \cdot 10^6$ céls. por tiempo) se lavaron 2 veces con PBS frío y se recogieron en 0,5 ml de tampón de lisis frío (50mM Tris (Sigma) pH=7.4, 100mM NaCl, 1% NP-40, 10% glicerol, 2mM MgCl₂ (Sigma), inhibidores de proteasas). Las muestras se incubaron 20 minutos a 4° C con agitación (noria), se centrifugaron 10 minutos a 16000 x g a 4° C. Se separó una pequeña alícuota del sobrenadante para detectar por western blot la cantidad total de Rac1, Cdc42 o Rap1 según el caso. El resto se congeló en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -80° C hasta su uso.

Para detectar los niveles de Rac1 y Cdc42 activos se incubaron las muestras obtenidas con 30 µg de GST-PBD (GST-RBD en el caso de Rap1) durante 1 hora a 4° C con agitación. Tras la incubación se lavó el complejo GST-PBD-Rac1/Cdc42 o GST-RBD-Rap1 unido a sefarosa dos veces con tampón de lisis (en el que se habían sustituido los inhibidores de proteasas por PMSF (Sigma) 1mM). Tras el último lavado, se resuspendió la sefarosa en 30 µl de tampón Laemmli 1X (Laemmli, 1970). Las muestras fueron analizadas por western blot. Para estimar el grado de activación de las GTPasas a lo largo de la infección, se densitometraron (Tina 2.0) las bandas correspondientes, relativizándose el valor obtenido de cada muestra con la cantidad de la GTPasa total correspondiente, detectada y estimada también por western blot y densitometría.

Las células fueron cultivadas con medio sin suero durante 24h antes de la realización del experimento y a una densidad de $6 \cdot 10^4$ céls/cm² para mantener la actividad de las GTPasas en un estado basal.

7. MICROSCOPIA

7.1. Microscopía de fluorescencia convencional

De manera rutinaria, se empleó un microscopio dotado de cámara digital (Leica) y de los filtros necesarios para detectar la emisión de fluorescencia de los fluoróforos y cromógenos utilizados y descritos en esta tesis.

7.2. Microscopía Confocal

El microscopio confocal utilizado fue el TCS SP2 (Leica) dotado de 6 líneas de láser en el espectro visible (458, 476, 488, 514, 543 y 633 nm.) y 2 líneas en el ultravioleta (351, 364 nm). La adquisición de imágenes se realizó empleando el programa informático LEICA Confocal Software versión 2.5TM. Para el procesamiento final de las imágenes obtenidas se empleó Adobe Photoshop 8.0TM.

7.3. Microscopía Electrónica de Transmisión

El microscopio electrónico utilizado fue el modelo JEOL JEM 10-10, el cual tenía acoplada una cámara digital de la casa Bioscan, modelo GATAN. El procesamiento final de las imágenes obtenidas se llevó a cabo con Adobe Photoshop 8.0TM.

Las muestras se obtuvieron a partir de células infectadas en presencia o ausencia de toxina B a 16hpi. Las células fueron tripsinizadas y centrifugadas para ser concentradas. Tras un lavado con PBS, las células fueron fijadas con glutaraldehído (Sigma) al 2,5% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente agitándose en una noria. Transcurrido este tiempo las células fueron centrifugadas y fueron lavadas con PBS 3 veces, durando 10 minutos cada lavado. Tras los lavados las células fueron resuspendidas en agar (Conda) al 3% y centrifugadas para concentrarlas.

Los bloques de agar con los sedimentos de células fueron cortados en secciones de 1-2 mm de grosor. Las secciones se lavaron con PBS y fueron incubadas en una solución de tetróxido de osmio al 1% en PBS durante 90 minutos a temperatura ambiente. Tras la osmificación las células fueron lavadas 3 veces con PBS. Una vez lavadas, las secciones fueron deshidratadas e incluidas en molde. A continuación, se hicieron cortes ultrafinos, colocados en rejillas de barrotes, que fueron sometidas a contraste con acetato de uranilo y plomo Reynold's.

8. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

8.1. Cepas bacterianas

DH5 α (ATCC 700790): cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) empleada de forma estándar para la obtención y conservación de los vectores empleados (Hanahan, 1983).

BL21 (DE3): Cepa de *E. coli* que expresa la ARN polimerasa del bacteriófago T7 de forma constitutiva, bajo un promotor inducible por IPTG. Empleada para la expresión y purificación de proteínas exógenas.

Todas las cepas se cultivaron en medio LB (Duchefa) líquido con ampicilina (100 μ g/ml; Duchefa) a 37° C con agitación constante hasta alcanzar la DO a 600 nm deseada. La conservación de las cepas se realizó en medio LB con glicerol (Duchefa) al 15% y almacenadas a -80° C.

8.2. Transformación de cepas bacterianas

Se prepararon células competentes de las cepas bacterianas DH5 α y BL21 (DE3), por el método de cloruro de rubidio (Sigma; Hanahan, 1983). Para la transformación de dichas células competentes con vectores plasmídicos se empleó el método de transformación por choque térmico (Studier, 1991).

8.3. Obtención de ADN plasmídico de *E. coli*

Un cultivo de 100 ml de células DH5 α transformadas con el vector de interés, era suficiente para la extracción y purificación del ADN plasmídico empleando Plasmid Midi Kit (Qiagen). La cuantificación y estimación de pureza del ADN obtenido se realizó midiendo absorbancia a 260 y 280nm en el espectrofotómetro Gene Quant I (Amersham Biosciences).

Para la obtención de ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* de menor volumen, se empleó QIAprep spin Mini Kit (Qiagen).

Resultados

1. PAPEL DE LA RUTA BIOSINTÉTICA DEL COLESTEROL EN EL CICLO INFECTIVO DEL VPPA

1.1. Inhibición de la ruta biosintética del colesterol mediante lovastatina

Las estatinas son un grupo de compuestos que actúan como inhibidores de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa. Este enzima, a partir de HMG-CoA, genera ácido mevalónico como precursor de la ruta biosintética del colesterol (Figura 2; Goldstein y Brown, 1990). Debido a su acción inhibidora sobre la HMG-CoA reductasa, las estatinas son utilizadas como agentes terapéuticos para tratar la hipercolesterolemia (Grundy, 1988; Corsini, *et al.*, 1995). Los isoprenoides FPP y GGPP son generados también como precursores durante la biosíntesis del colesterol. Estas moléculas son incorporadas postraduccionalmente a proteínas como las GTPasas de la familia Rho. El bloqueo de la síntesis de estos compuestos por las estatinas conlleva la inhibición de las GTPasas Rho y, por tanto, los procesos regulados por estas, como el estado del citoesqueleto, quedan afectados (Koch, *et al.*, 1997). La acción de las estatinas es capaz también de inhibir la infección de virus como el VIH por su efecto negativo sobre las GTPasas Rho (del Real, *et al.*, 2004).

El VPPA requiere la presencia de colesterol en la membrana celular y la explotación del citoesqueleto para llevar a cabo su ciclo infectivo (Carvalho, *et al.*, 1988; de Matos y Carvalho, 1993; Bernardes, *et al.*, 1998; Alonso, *et al.*, 2001). Con el fin de estudiar si la actividad de las estatinas podía afectar a la replicación del VPPA, se analizó el efecto de la lovastatina en la producción de virus y en la capacidad infectiva del VPPA.

Antes de comenzar los experimentos con virus, se estudió la viabilidad de las células Vero incubadas durante 24 o 48h con distintas concentraciones de lovastatina. La incubación durante tiempos tan largos se realizó para asegurar la máxima depleción posible de colesterol y los isoprenoides en las células. En presencia de lovastatina, las células perdieron su morfología característica y sufrieron una fuerte retracción, siendo estos efectos similares a los descritos en la bibliografía (Schmidt, R. A., *et al.*, 1982; Bifulco, *et al.*, 1993). Las células toleraron bien la presencia de lovastatina en el medio, empezando a aparecer mayor cantidad de células muertas cuando la concentración de lovastatina alcanzaba 10 y 50 μ M (Figura 8). La viabilidad celular en el cultivo, en presencia de lovastatina, fue evaluada utilizando azul de Tripán.

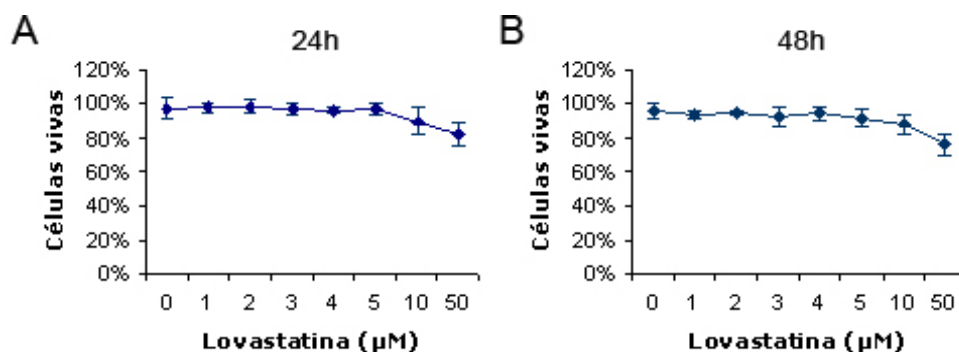


Figura 8. Estudio de la viabilidad celular en presencia de lovastatina. Las células fueron incubadas durante 24h (A) o 48h (B) antes de ser contabilizadas con la tinción vital azul de Tripán. Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

1.1.1. Efecto de la lovastatina en la obtención de progenie vírica

Para estudiar el posible efecto de la lovastatina en la producción de virus, células Vero incubadas durante 24 o 48h con distintas concentraciones de lovastatina fueron infectadas a una $mdi = 0,5$ ufp/cél. Tras la adsorción, las células fueron lavadas y se añadió medio fresco con lovastatina, dejando proseguir la infección durante 24h, transcurridas las cuales se recogieron los viriones producidos y se titularon. Los resultados mostraron una fuerte reducción de los títulos virales en presencia de lovastatina, que se veía acentuada cuanto mayor era la concentración de lovastatina (Figura 9A). El tratamiento con lovastatina durante 48h mostró también un efecto más severo que el tratamiento de 24h (Figura 9B).

Con la finalidad de averiguar si esta drástica reducción de los títulos virales se debía exclusivamente a la ausencia de colesterol en las células o también a la ausencia de los isoprenoides, se procedió a infectar nuevamente células en presencia de lovastatina complementada con mevalonato, colesterol, FPP o GGPP. Estos compuestos fueron incubados solos o combinados entre ellos junto con la lovastatina. La figura 9, en los paneles C y D, muestra como solamente la complementación con mevalonato fue capaz de restablecer los títulos virales. Ni el colesterol por sí solo, ni los isoprenoides, ni sus combinaciones pudieron recuperar los títulos de virus.

Este resultado indicaría que la integridad de la ruta biosintética del colesterol es necesaria para que el VPPA pueda completar con éxito su ciclo infectivo.

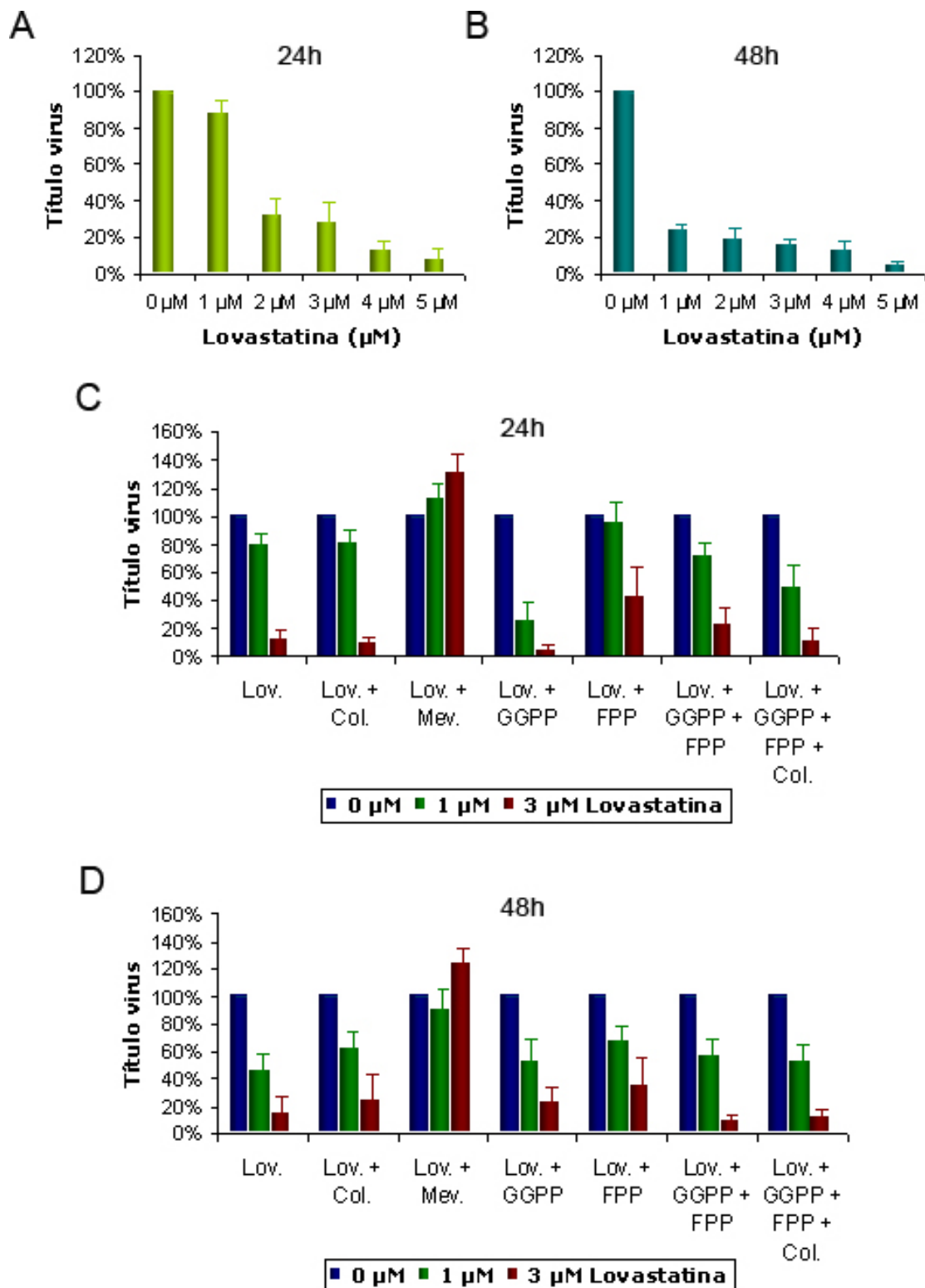


Figura 9. Influencia de la lovastatina en los títulos virales. (A) y (B) La incubación con lovastatina redujo los títulos de virus de un modo dependiente de la dosis tanto a 24h (A) como a 48h (B). La complementación con mevalonato recuperó los títulos virales a 24h (C) y 48h (D). Col: Colesterol (5µg/ml); FPP (5µM); GGPP (5µM); Lov: Lovastatina; Mev: Mevalonato (200µM). Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

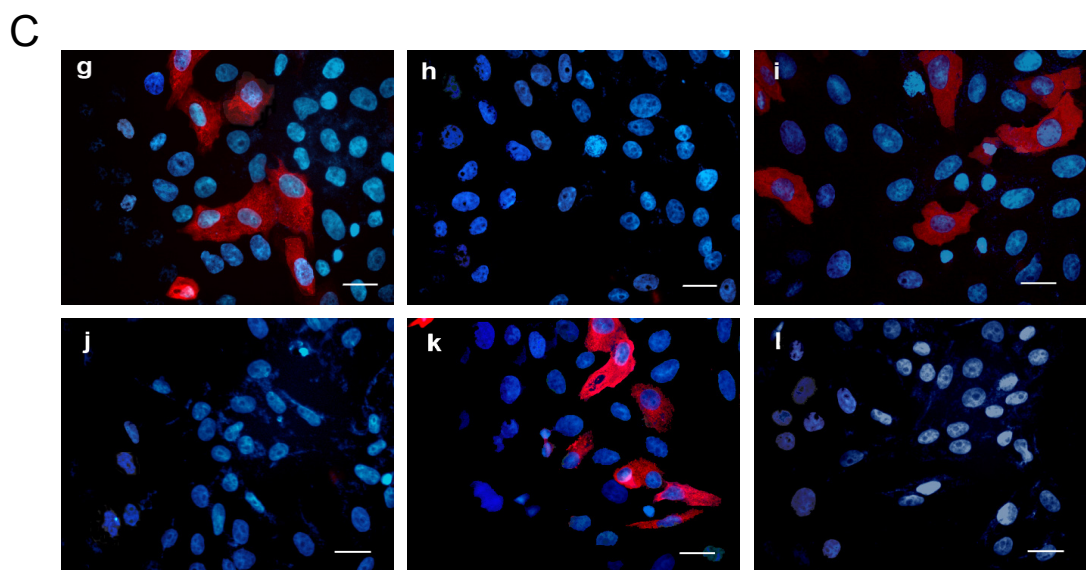
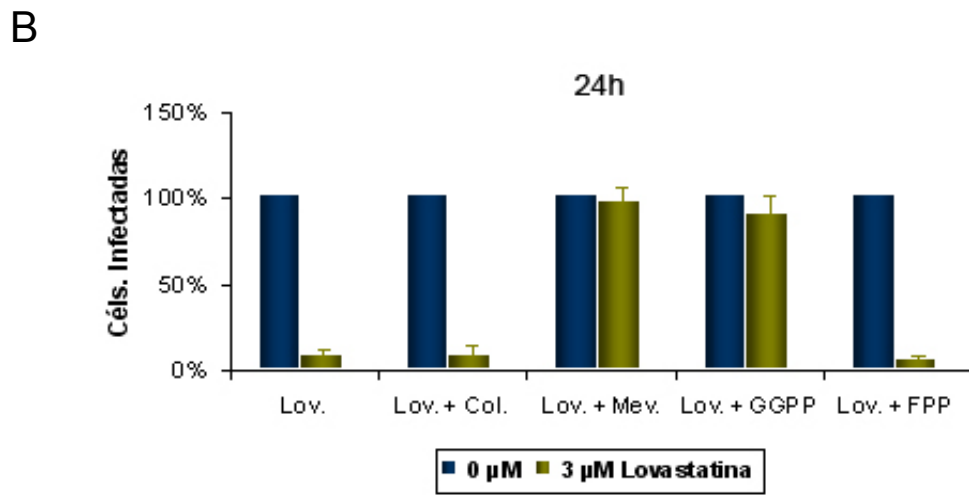
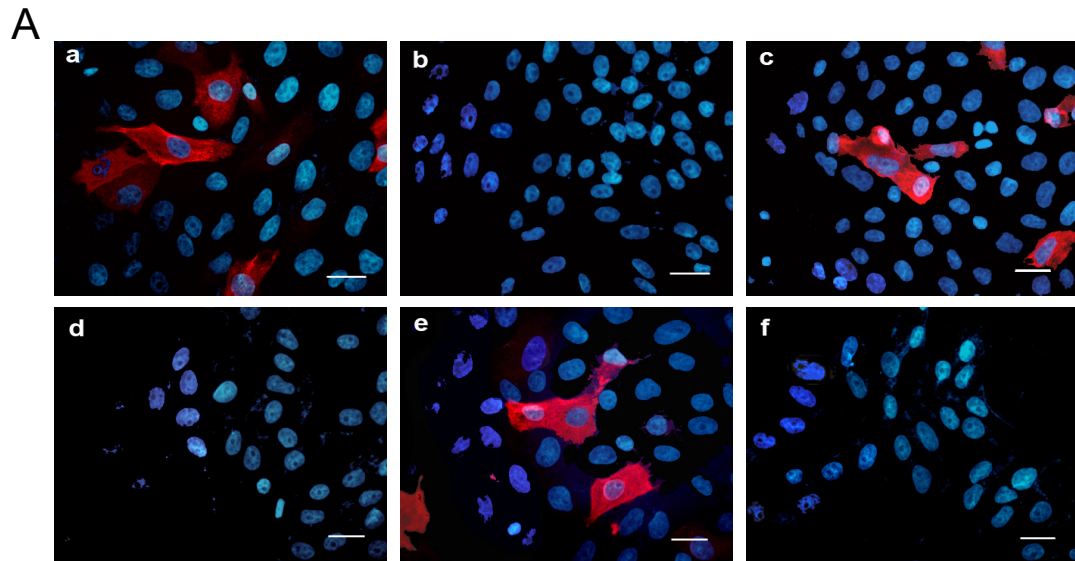
1.1.2. Efecto de la lovastatina en la capacidad infectiva del VPPA

Analizamos también si el VPPA era capaz de empezar su ciclo infectivo en células incubadas con lovastatina y si alguno de los lípidos anteriores podía revertir el efecto producido por la lovastatina. Para ello se incubaron células Vero durante 24 o 48h con lovastatina a solas o con lovastatina complementada con alguno de los cuatro lípidos anteriores, y se infectaron a una mdi de 0,5 ufp/cél. A las 3hpi, las células fueron fijadas y procesadas para estudiar por inmunofluorescencia el número de células que habían podido ser infectadas en cada tratamiento (Figura nº10). Para identificar las células infectadas se utilizó un anticuerpo frente a la proteína viral p30, que es de síntesis temprana. Como era de esperar, el número de células infectadas en presencia de lovastatina disminuyó drásticamente, hasta un 7% cuando la lovastatina se mantuvo en el cultivo durante 24h y por debajo del 4% cuando la droga se mantuvo 48h. Como en el experimento anterior, la presencia del mevalonato revertió la situación, tanto a 24 como a 48h. A diferencia del experimento en el que se valoraban los títulos de virus obtenidos, aquí el GGPP fue capaz de anular el efecto de la lovastatina, aunque no totalmente ni de manera tan eficaz como el mevalonato. En las células incubadas 24h con lovastatina y GGPP el porcentaje de células infectadas con respecto a aquellas células incubadas solamente con lovastatina fue del 90%, mientras que en las incubadas 48h el porcentaje no fue mayor del 70%. Esto podría ser debido a que la presencia de GGPP por sí sola no sería suficiente para permitir la entrada de los viriones.

Estos resultados apuntarían nuevamente a que el VPPA requiere la integridad de la ruta biosintética del colesterol para infectar adecuadamente las células Vero.

1.2. Inhibición de la prenilación de proteínas celulares

La lovastatina priva a las células de todos los componentes de la vía de síntesis del colesterol, incluyendo a los isoprenoides y a otros lípidos que podrían ser necesarios durante el ciclo infectivo del VPPA. Para estudiar el efecto que podía causar la carencia de prenilación en las células infectadas exclusivamente, esto es, sin afectar a la síntesis de los precursores del colesterol, se recurrió al uso de inhibidores específicos de la prenilación: FTI-277, que inhibe la enzima FTasa, impidiendo por tanto la modificación postraduccional de proteínas de la superfamilia Ras por adición de FPP; y el GGTI-286, que inhibe la enzima GGTasa-I, impidiendo la adición de GGPP a



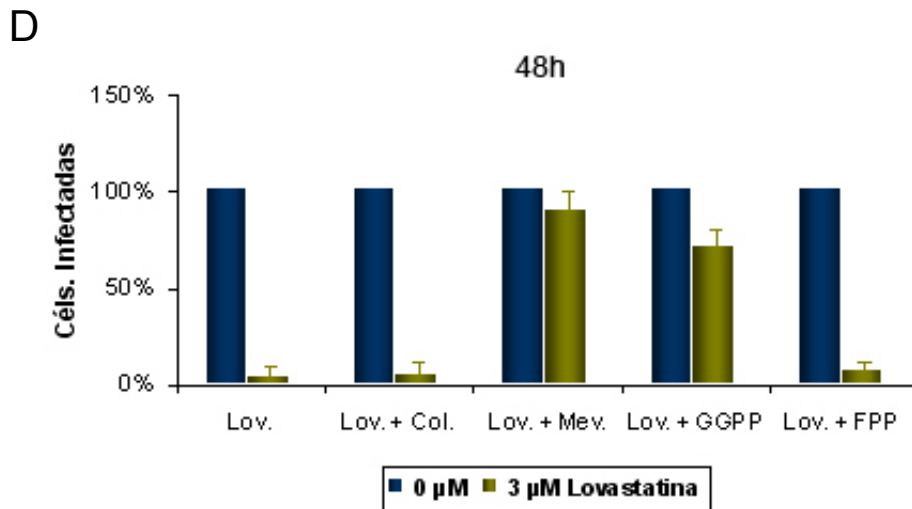


Figura 10. Capacidad infectiva del VPPA en presencia de lovastatina sola o en combinación colesterol, mevalonato, FPP o GGPP. (A, C) Imágenes representativas del número de células infectadas a 3hpi en ausencia de lovastatina (a, g), o en presencia de lovastatina a una concentración 3 μM (b-f, h-l). Las células fueron preincubadas durante 24h (A) o 48h (C) con sólo lovastatina (b, h) o combinada con mevalonato (c, i; 200 μM), colesterol (d, j; 5 $\mu\text{g/ml}$), GGPP (e, k; 5 μM) o FPP (f, l; 5 μM). Las células infectadas fueron marcadas con un anti-p30 seguido de un anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo Alexa Fluor 594 (Rojo). Los ácidos nucleicos (azul) se tiñeron con el agente intercalante de ADN Hoechst 33258. Barra 35 μm . (B, D) Gráficos que muestran los porcentajes de células infectadas en presencia de lovastatina sola o combinada con mevalonato, colesterol, FPP o GGPP, preincubando las células con los citados compuestos 24h (B) o 48h (D). Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. En cada experimento se calculó el porcentaje de células infectadas respecto a las totales en 30 campos diferentes.

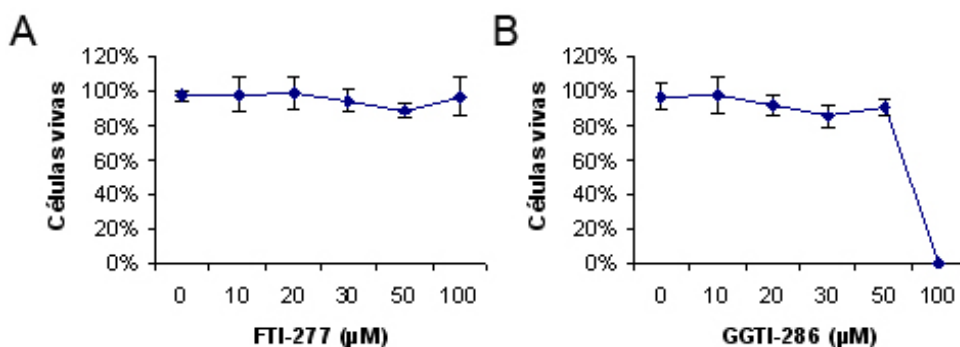


Figura 11. Análisis de la viabilidad celular en presencia de FTI-277 o GGTI-286. Las células fueron incubadas durante 24h en presencia de FTI-277 (A) o GGTI-286 (B) antes de ser contabilizadas con la tinción vital azul de Tripán. Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

diversos miembros de la superfamilia Ras, con excepción de la familia Rab. El uso de estos inhibidores podía, por tanto, dar alguna pista sobre la participación de estas proteínas celulares en la infección por el VPPA. Tras estudiar a qué concentraciones se podían utilizar estas drogas sin resultar tóxicas para las células (Figura 11), se analizaron sus efectos sobre la producción de virus y la infectividad del VPPA.

1.2.1. Efecto de los inhibidores de prenilación en la producción de virus

Células Vero incubadas dos horas antes de la adición del virus a distintas concentraciones de ambas drogas fueron infectadas a una mdi de 0,5 ufp/cél. Tras la adsorción, se retiraron los inóculos y las células fueron lavadas. La infección se dejó transcurrir durante 24h con medio fresco al que se le había añadido la cantidad de inhibidor correspondiente. En la figura 12A se puede observar como ambos inhibidores son capaces de reducir los títulos virales, siendo la reducción más fuerte la producida por el inhibidor de la geranilgeranilación (GGTI-286; a 50 μ M un 2% del título obtenido sin inhibidor). Con objeto de averiguar en qué momento del ciclo infectivo (si durante la entrada del virus o en un paso posterior, una vez comenzada la síntesis de proteínas tempranas) podía ser necesaria la participación de la FTasa y la GGTasa-I, se infectaron células a las que se les habían añadido estos inhibidores en distintos momentos: 2h antes y durante la adsorción del virus, retirando el inóculo tras la adsorción y añadiendo medio fresco sin inhibidor; o bien, 3h después de la adsorción manteniendo el inhibidor ya durante el resto del experimento; otras células, en cambio, fueron infectadas en presencia de los inhibidores durante todo el ciclo infectivo, como en el experimento anterior.

El análisis de la producción de virus mostró que la actividad de la FTasa es importante durante la entrada del VPPA, ya que los títulos de virus sólo disminuyeron cuando el inhibidor de la farnesilación (FTI-277) fue añadido antes de la entrada del virus y no después (Figura 12B). En cambio, la actividad de la GGTasa-I es necesaria en distintas etapas del ciclo replicativo del VPPA, como demuestra el hecho de que los títulos virales disminuyan independientemente de que el inhibidor GGTI-286 sea añadido antes o después de la entrada del virus (Figura 12B). A juzgar por los efectos producidos por ambos inhibidores, serían varias las proteínas preniladas implicadas en las diferentes etapas del ciclo infectivo del VPPA.

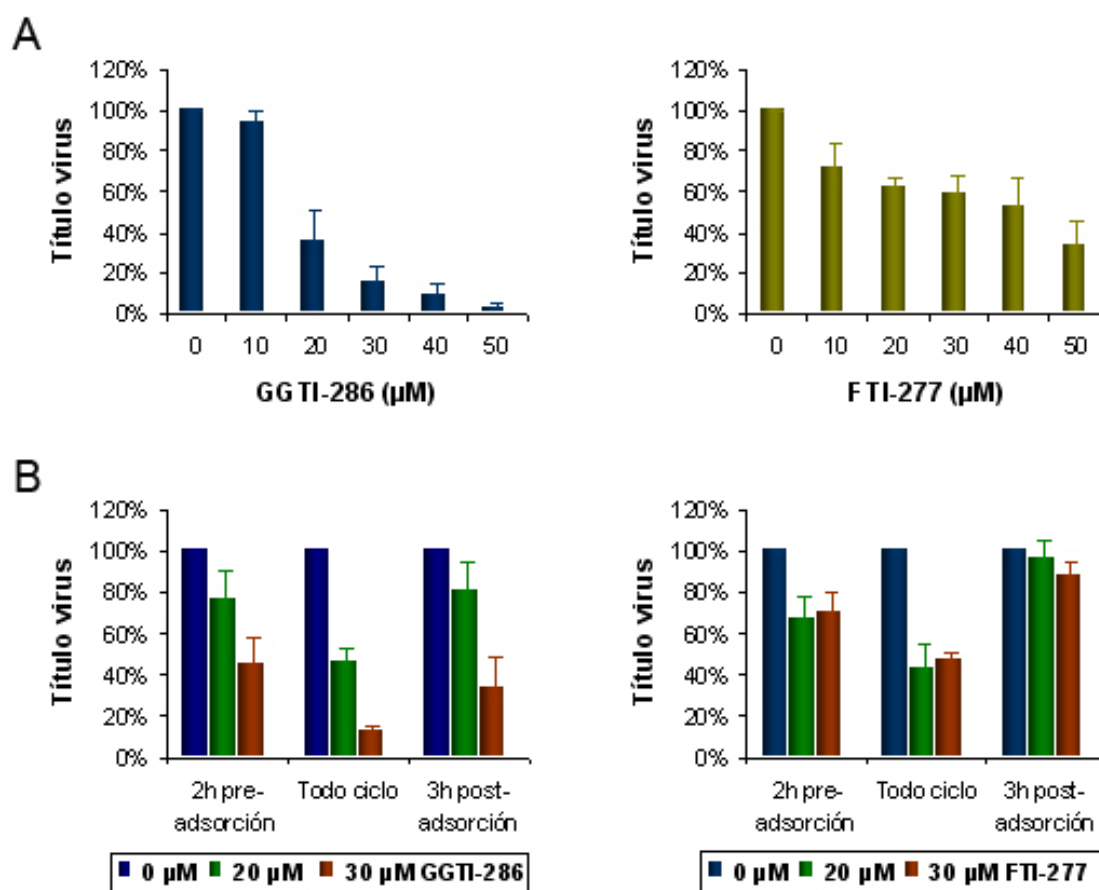


Figura 12. Los inhibidores de prenilación afectan a la producción de virus. (A) El inhibidor GGTI-286 reduce drásticamente los títulos de virus, mientras que el inhibidor FTI-277 los reduce de un modo más moderado. (B) El inhibidor GGTI-286 reduce los títulos virales independientemente del momento en que se añada al cultivo. En cambio, el inhibidor FTI-277 los reduce si es añadido antes de la adsorción. Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

1.2.2. Efecto de los inhibidores de prenilación en la capacidad infectiva del VPPA

El siguiente aspecto que estudiamos fue la capacidad infectiva del VPPA en presencia de estos inhibidores. Para ello, como en el experimento con lovastatina, se realizaron inmunofluorescencias contabilizando las células infectadas a 3hpi marcadas con un anticuerpo anti-p30. Sorprendentemente, la capacidad infectiva del VPPA no se vio afectada por la presencia del inhibidor FTI-277, siendo similar el número de células infectadas tanto en presencia como en ausencia de dicho inhibidor (Figura 13B).

En cambio, en presencia de GGTI-286, el número de células infectadas descendió a niveles inferiores al 20% en la concentración de droga más alta ensayada (Figura 13D).

Los resultados obtenidos con el inhibidor FTI-277 sugieren que la inhibición de la farnesilación durante la entrada del VPPA estaría afectando a un paso

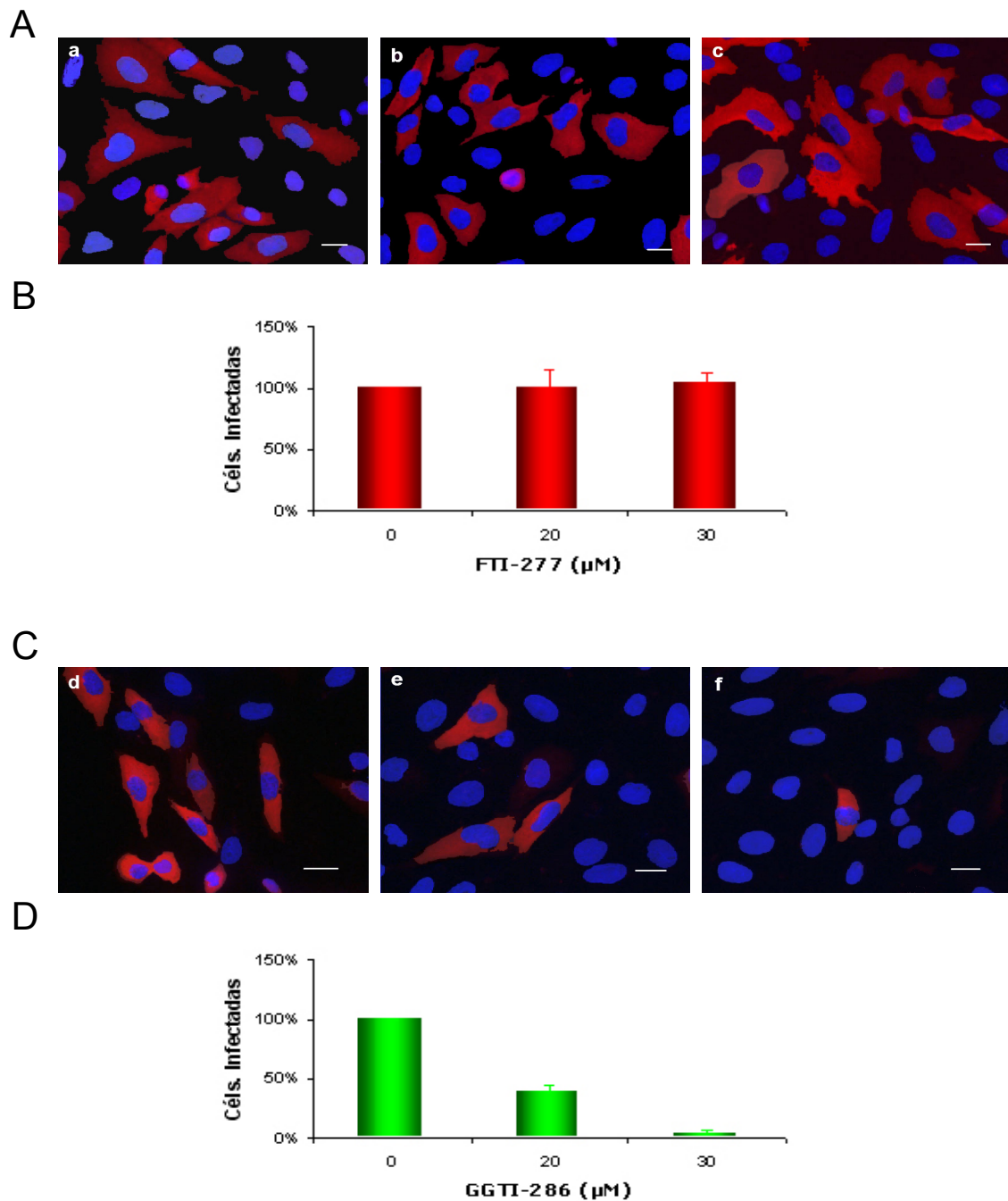


Figura 13. Capacidad infectiva del VPPA en presencia de los inhibidores de prenilación. Se infectaron células Vero ($mdi=0,5$ ufp/cél) en presencia o ausencia del inhibidor FTI-277 o bien del inhibidor GGTI-286 y a 3hpi se procesaron para contabilizar por inmunofluorescencia el número de células infectadas en cada tratamiento. (A, C) Imágenes representativas del número de células infectadas a 3hpi con 0 (a, d), 20 (b, e) o 30 μ M (c, f) de FTI-277 (A) o GGTI-286 (C) Las células infectadas fueron marcadas con un anti-p30 seguido de un anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo Alexa Fluor 594 (Rojo). Los ácidos nucleicos (azul) se tiñeron con el agente intercalante de ADN Hoechst 33258. Barra 20 μ m. (B, D) Gráficos que muestran los porcentajes de células infectadas en presencia de distintas concentraciones de FTI-277 (B) o de GGTI-286 (D). Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. En cada experimento se calculó el porcentaje de células infectadas respecto a las totales en 30 campos diferentes.

posterior a la entrada del virus, puesto que la infectividad del VPPA no se vio mermada en presencia de dicho inhibidor. Por otro lado, los efectos observados al inhibir la geranilgeranilación indican que es necesaria la participación de algunas proteínas que incorporen un grupo geranilgeranilo durante la entrada del VPPA y también en etapas más tardías de la infección, puesto que tanto la infectividad como los títulos virales se vieron reducidos en presencia de GGTI-286 en los distintos tiempos ensayados. No puede descartarse que alguna de las proteínas que incorpore un grupo geranilgeranilo que se active durante la entrada del VPPA afecte alguna etapa posterior, como ocurre en el caso de la farnesilación.

2. PAPEL DE LA FAMILIA DE LAS GTPASAS RHO EN EL CICLO INFECTIVO DEL VPPA

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados con lovastatina y los inhibidores de las preniltransferasas, sugerían la participación de distintos miembros de la superfamilia Ras en varias etapas del ciclo replicativo del VPPA, incluyendo el paso de la entrada del virus, que se había visto afectado por la acción del inhibidor de la geranilgeranilación. Entre los miembros de esta superfamilia, los primeros candidatos a participar en la entrada del virus podrían ser los miembros de la familia Rho, ya que muchos de ellos incorporan un grupo geranilgeranilo, esencial para su actividad. El hecho de que estas GTPasas gobiernen el citoesqueleto y el tráfico de vesículas (Qualmann y Mellor, 2003; Gundersen, *et al.*, 2004; Watanabe, *et al.*, 2005; Bustelo, *et al.*, 2007), las convertía en serias candidatas a participar en la entrada del VPPA, el cual, como ya se ha comentado anteriormente, entra en las células a través de una endocitosis mediada por receptor y utiliza los microtúbulos para transportarse por la célula hasta llegar a las proximidades del núcleo (Carvalho, *et al.*, 1988; de Matos y Carvalho, 1993; Alonso, *et al.*, 2001).

2.1. Efecto de la inhibición de las GTPasas Rho en la producción de virus

Con el fin de examinar la validez de esta hipótesis, se interfirió la actividad de esta familia de proteínas en el transcurso de la infección. Para ello se recurrió a la acción inhibidora de la toxina B de *Clostridium difficile*. Esta toxina es capaz de inhibir a los miembros más conocidos de la familia Rho: RhoA, Rac1 y Cdc42. A la GTPasa RhoA la inactiva glucosilando a la treonina de la posición 37, y a las proteínas Rac1 y Cdc42 en la posición correspondiente (Just, *et al.*, 1995). Esta glucosilación impide a cualquiera de dichas GTPasas interactuar con sus efectores.

La presencia de este inhibidor de las GTPasas Rho produjo en las células Vero la retracción, el redondeo y el aspecto arborizado descritos en la bibliografía (Fiorentini, *et al.*, 1989; Malorni, *et al.*, 1990), aunque a unas concentraciones de toxina bastante más elevadas (25 ng/ml frente a los 0,15 ng/ml descritos en Malorni y colaboradores). Al igual que con las drogas anteriores, se evaluó la viabilidad celular en presencia de este inhibidor a distintas concentraciones (Figura 14), en las que no resultó ser tóxico para las células Vero.

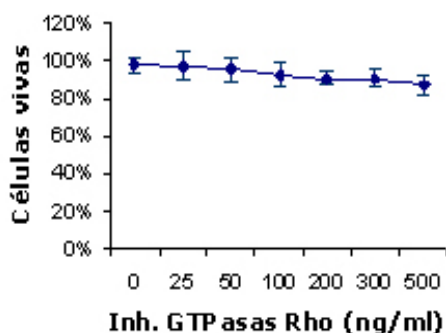


Figura 14. Estudio de la viabilidad celular en presencia del inhibidor de las GTPasas Rho. Las células fueron incubadas durante 24h con el inhibidor de las GTPasas Rho antes de ser contabilizadas con la tinción vital azul de Tripán. Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

En la figura 15A puede apreciarse como la inhibición de las GTPasas Rho, en un cultivo de células infectadas, provoca una reducción cercana al 50% en los títulos virales obtenidos. Se puede observar también como esta reducción es similar en todas las concentraciones ensayadas del inhibidor, sin darse un efecto dependiente de la dosis. Al incubar las células con este inhibidor a distintos tiempos del ciclo infectivo (la misma estrategia utilizada que con los inhibidores FTI-277 y GGTI-286), se descubrió que la reducción del título viral se produce al añadir la droga antes de la adsorción del virus (Figura 15B).

Este resultado apunta a que la participación de las GTPasas Rho durante la entrada del virus es necesaria para el éxito de la infección.

2.2. Implicación de las GTPasas Rho en la acetilación de los microtúbulos durante la entrada del VPPA

Las GTPasas de la familia Rho podrían participar en la entrada del VPPA modulando la estabilidad de los microtúbulos (Best, *et al.*, 1996; Cook, *et al.*, 1998; Daub, *et al.*, 2001; Palazzo, *et al.*, 2001; Fukata, *et al.*, 2002), que el virus explota para llegar hasta la región perinuclear (Alonso, *et al.*, 2001). El VPPA estabiliza los microtúbulos durante los tiempos tardíos de la infección (12hpi), coincidiendo con

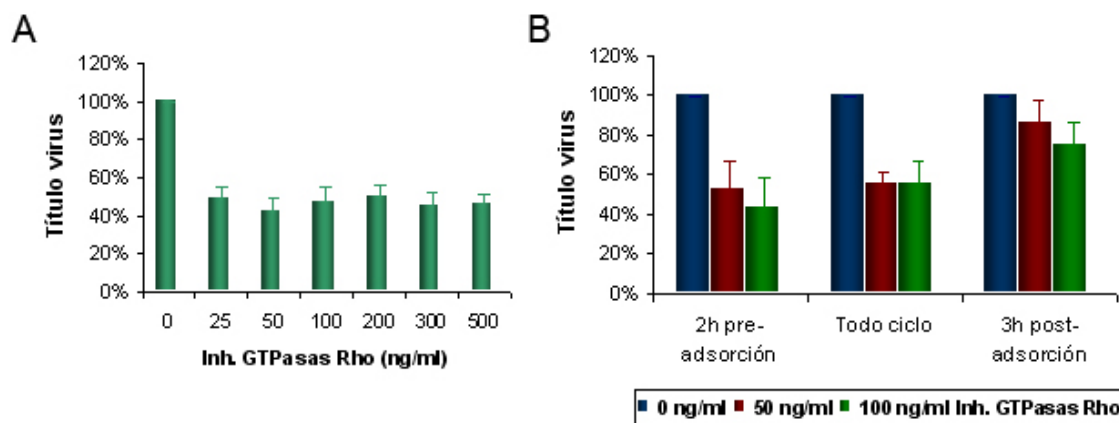


Figura 15. Producción de virus en presencia del inhibidor de las GTPasas Rho. (A) Las células fueron incubadas con el inhibidor de las GTPasas Rho desde 2-4h antes de la infección. Tras la adsorción se lavaron las células y se añadió medio fresco con inhibidor. (B) El inhibidor de las GTPasas Rho fue añadido en distintos momentos del ciclo infeccioso, reduciendo los títulos de virus al añadirse antes de la adsorción. Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

el momento en el que las nuevas partículas de virus formadas comienzan a migrar a la periferia de la célula (Jouvenet, *et al.*, 2004). De la misma manera, el VPPA debería estabilizar los microtúbulos al entrar en las células que infecta, al utilizarlos para transportarse por el citoplasma de la célula.

Para comprobar esta posibilidad, se analizó por WB la cantidad de α -tubulina acetilada a distintos tiempos durante las 3 primeras horas de la infección (Figura 16A). Las bandas obtenidas en el WB fueron densitometradas para obtener unos valores semicuantitativos y poder evaluar el grado de acetilación de la α -tubulina. Los valores de α -tubulina acetilada fueron relativizados con los valores obtenidos de α -tubulina total, determinados también por WB y densitometría. Los resultados obtenidos confirmaron que la entrada del VPPA induce la estabilización de los microtúbulos, detectándose un pico de máxima acetilación (aumento de 4 veces de la cantidad de α -tubulina acetilada) a los 30 minutos post-infección (mpi; Figura 16C). Con el fin de comprobar si este aumento en la acetilación de la α -tubulina era debido a la actividad de las GTPasas Rho, se procedió a su inhibición y posterior infección de las células. Todas las muestras fueron recogidas a los 30mpi, que era el tiempo en el que se había detectado el máximo nivel de acetilación de la α -tubulina. Como se puede apreciar en la figura 16, paneles B y D, la inhibición de las GTPasas Rho impidió el aumento de los niveles de α -tubulina acetilada, hallándose incluso por debajo de los niveles basales.

Este resultado sugiere que las GTPasas Rho deben activarse durante la entrada del VPPA y que esta activación deriva en un incremento de la cantidad de α -tubulina acetilada presente en la célula infectada.

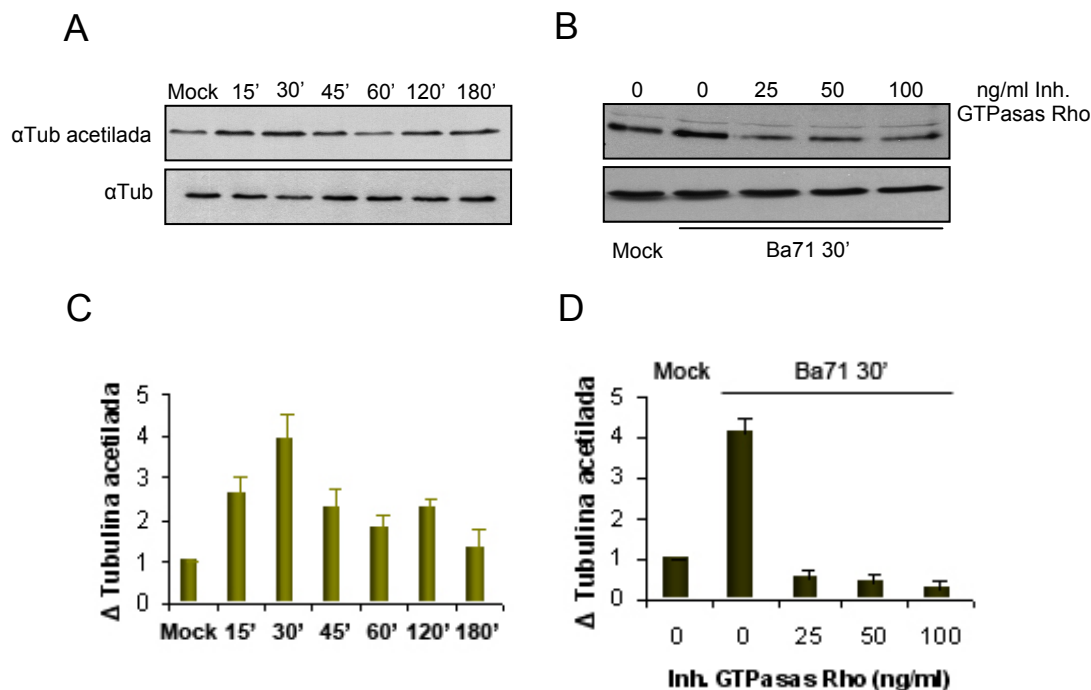


Figura 16. Determinación del grado de acetilación de los microtúbulos durante la entrada del VPPA e implicación de las GTPasas Rho. (A) Detección por WB de tubulina acetilada y total en células Vero infectadas ($mdi=5$ ufp/cél) a distintos tiempos postinfección, en ausencia (A) o presencia del inhibidor de las GTPasas Rho (B). El incremento del nivel de tubulina acetilada se calculó tras densitometrar las bandas obtenidas en A y B (reflejados en C y D, respectivamente), relativizando los valores obtenidos de tubulina acetilada con sus correspondientes niveles de tubulina total. Las células fueron cultivadas sin suero durante 24h antes de la realización del experimento para disminuir los niveles basales de acetilación de la tubulina. Los resultados mostrados corresponden a la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Tub: Tubulina.

2.3. Determinación del grado de activación de las GTPasas Rho durante la entrada del VPPA

Una vez que se hubo comprobado que la actividad de las GTPasas Rho era necesaria durante la entrada del VPPA en las células Vero, se pasó a averiguar cual de ellas podía estar directamente implicada en los procesos estudiados.

Para estudiar el grado de activación de RhoA se utilizó un kit comercial tipo ELISA basado en absorbancia. Las muestras se recogieron a distintos tiempos durante la primera hora de la infección por el VPPA, y al analizarse no se detectó ningún aumento en el grado de activación de RhoA (Figura 17).

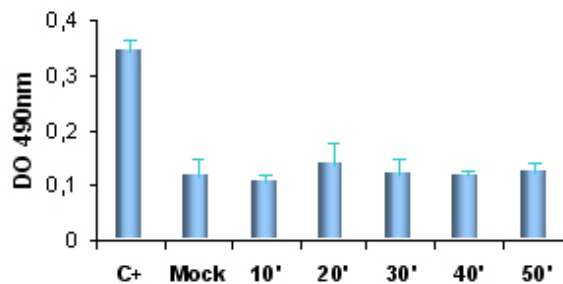


Figura 17. Ensayo de activación de RhoA. Células Vero infectadas a una mdi=5 ufp/cél fueron recogidas a distintos tiempos postinfección y procesadas para cuantificar el grado de activación de RhoA durante la entrada del VPPA. Para ello se utilizó un kit comercial tipo ELISA basado en absorbancia. Las células fueron cultivadas en medio sin suero con el fin de mantener la actividad de las GTPasas Rho en un estado basal. Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. C+: Control positivo. Mock: Células no infectadas. Los tiempos reflejados son minutos postinfección.

El grado de activación de Rac1 y Cdc42 se estudió mediante ensayos de “pull-down”, consistentes en capturar las formas activas de estas dos GTPasas. Para ello, se incubaron extractos de células infectadas con la proteína purificada GST-PBD, expresada en *E. coli*. Tras la incubación, las muestras fueron separadas en geles de acrilamida para ser transferidas después a membranas de nitrocelulosa y detectar por WB Rac1 o Cdc42. Las bandas detectadas así se correspondían únicamente a las formas activas de ambas GTPasas, puesto que la forma inactiva no interacciona con el dominio PBD.

Los incrementos de activación reflejados en los gráficos de la figura 18 muestran que, durante la entrada del VPPA, únicamente aumenta el grado de activación de Rac1, alcanzándose un incremento máximo de activación a los 25 mpi.

Tras estos ensayos pudimos determinar que Rac1 era el miembro de la familia Rho que se activaba durante la entrada del VPPA en las células Vero, cuya activación debía ser necesaria para el éxito de la infección por el virus.

2.4. Efecto de la inhibición de las GTPasas Rho en la síntesis de proteínas virales

La inhibición de las GTPasas de la familia Rho antes de la entrada del VPPA en las células Vero, provocaba una reducción de los títulos virales de casi la mitad. Asimismo, la inhibición de dichas GTPasas antes de la entrada del VPPA, impedía el aumento del grado de acetilación de los microtúbulos que se produce durante los estadios inmediatamente tempranos de la infección por el VPPA. Si la inhibición de las GTPasas Rho estaba afectando a la entrada del VPPA, la cantidad de células que

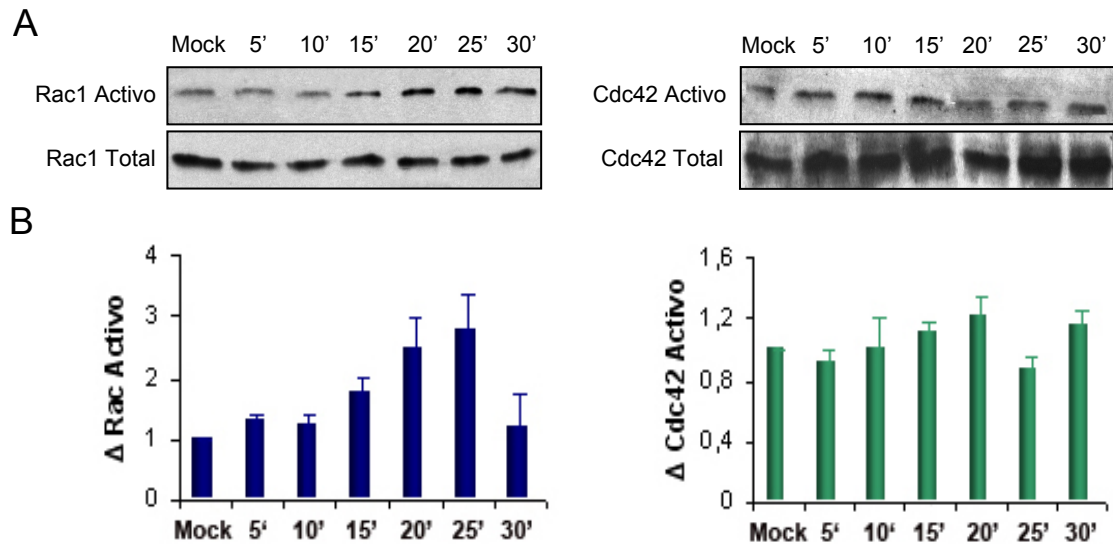


Figura 18. Ensayo de activación de Rac1 y Cdc42. Células Vero infectadas a una $mdi=5$ ufp/cél fueron recogidas a distintos tiempos postinfección y procesadas para cuantificar el grado de activación de Rac1 y Cdc42 durante la entrada del VPPA. Para ello se realizaron ensayos de "pull-down" y WB (A). Las bandas obtenidas correspondientes a las GTPasas activas fueron densitometradas y relativizadas con las totales para calcular los incrementos de activación (B). Las células fueron cultivadas en medio sin suero con el fin de mantener la actividad de las GTPasas Rho en un estado basal. Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. Mock: Células no infectadas. Los tiempos reflejados son minutos postinfección.

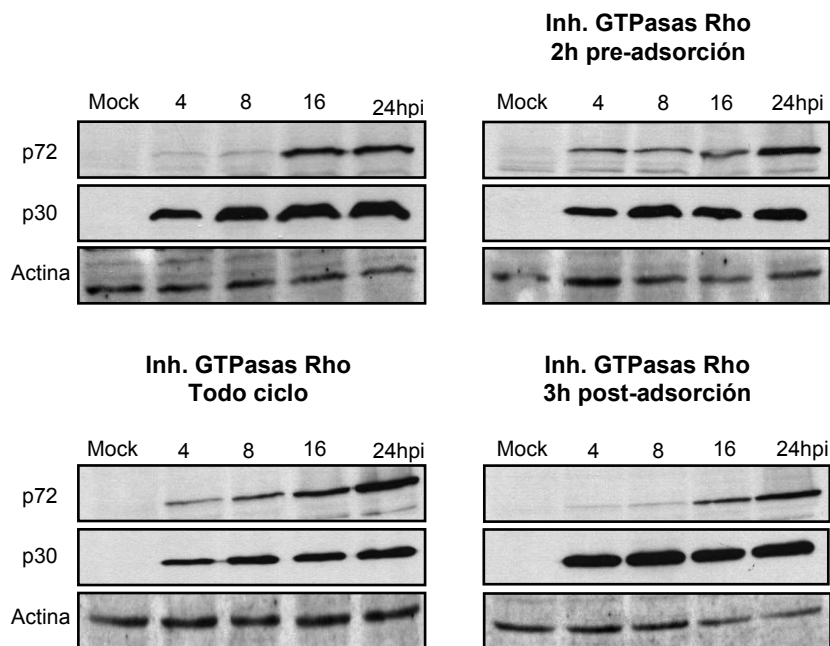


Figura 19. Síntesis de proteínas virales en presencia del inhibidor de las GTPasas Rho. Células Vero infectadas a una $mdi=0,5$ ufp/cél fueron recogidas a distintos tiempos postinfección y procesadas para determinar por WB los niveles de síntesis de proteínas virales en presencia del inhibidor de las GTPasas Rho (100 ng/ml). El inhibidor fue añadido antes de la adsorción del virus, después de la adsorción, o bien se mantuvo presente durante todo el ciclo infeccioso. Mock: Células no infectadas. La detección de actina se utilizó como control interno de carga de las muestras.

podrían infectarse en cultivo sería menor y, por tanto, sería esperable que la síntesis de proteínas virales fuera también menor.

Para comprobar este hecho, se infectaron células Vero en presencia del inhibidor de las GTPasas Rho a distintos tiempos, como en los experimentos descritos anteriormente. Se analizó por WB la síntesis de proteínas tempranas (p30) y tardías (p72) del VPPA, encontrándose que la inhibición de las GTPasas Rho, independientemente del momento en el que se iniciase, no afectaba a la síntesis de proteínas virales (Figura 19). Este resultado indicaría que la entrada del VPPA en las células y, por tanto, el establecimiento de la infección, no debían verse afectados por la inhibición de las GTPasas Rho.

2.5. Efecto de la inhibición de las GTPasas Rho en la capacidad infectiva del VPPA

Con objeto de comprobar si la infectividad del VPPA en las células Vero se veía afectada al inhibir las GTPasas Rho, se procedió a comparar el número de células que eran capaces de infectarse en cultivo en presencia o ausencia del inhibidor de dichas GTPasas. Se realizaron inmunofluorescencias a 3hpi, detectando las células infectadas con un anticuerpo anti-p30.

En consonancia con los resultados obtenidos en el experimento anterior, la inhibición de las GTPasas Rho no afectó a la capacidad infectiva del VPPA, siendo capaz de infectar un número similar de células tanto si las GTPasas Rho eran inhibidas como si no (Figura 20).

Estos hallazgos restaban protagonismo a las GTPasas Rho, en concreto a Rac1, en el proceso de la entrada del VPPA, indicando más bien que su temprana activación sería necesaria para alguna etapa posterior.

2.6. Efecto de interferir la actividad de Rac1 en la internalización de partículas virales

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos anteriormente, diseñamos un experimento para interferir de forma específica la actividad de Rac1. Para ello utilizamos una serie de plásmidos que expresaban en fusión a GFP las formas nativa (WT), dominante negativa (17N) y permanentemente activa (Q61L) de Rac1 (Kraynov, *et al.*, 2000). Con el plásmido que expresaba Rac1-17N se podía interferir de manera específica la actividad de Rac1 sin afectar al resto de GTPasas Rho. Así se podría comprobar, sin usar un inhibidor general de las GTPasas Rho, que realmente el VPPA

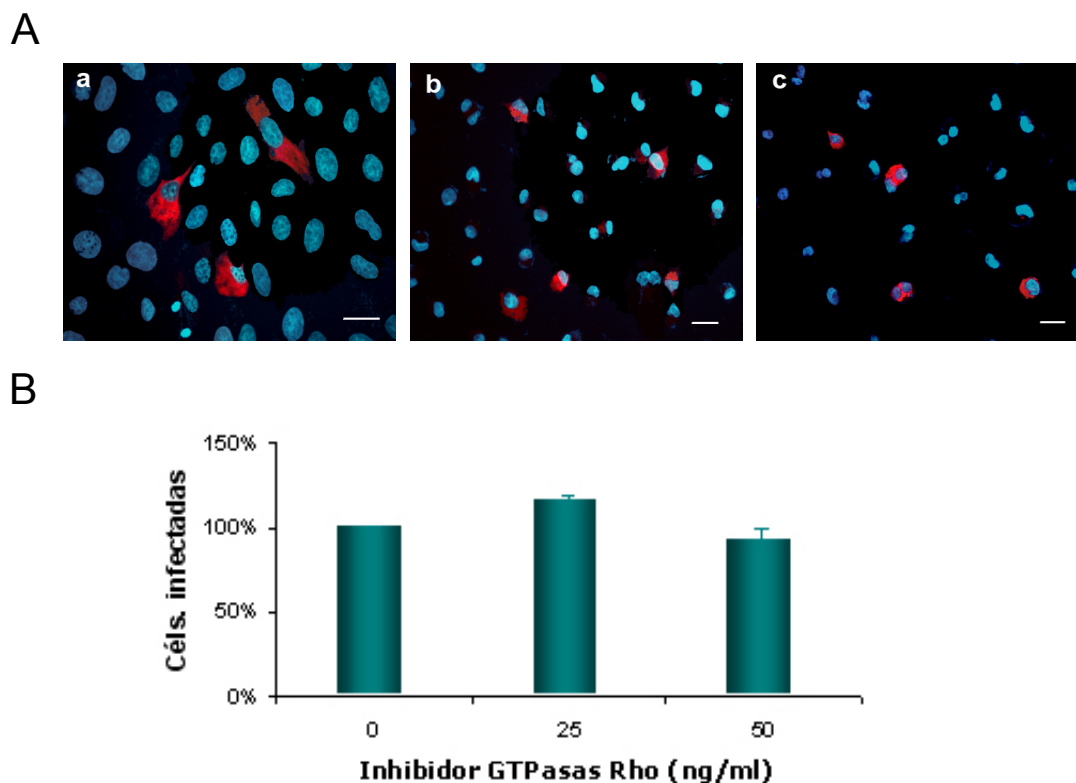


Figura 20. Capacidad infectiva del VPPA en presencia del inhibidor de las GTPasas Rho. Se infectaron células Vero en presencia o ausencia del inhibidor de las GTPasas Rho ($mdi=0,5$ ufp/cél) y a 3hpi se procesaron para contabilizar por inmunofluorescencia el número de células infectadas en cada tratamiento. (A) Imágenes representativas del número de células infectadas a 3hpi con 0 (a), 25 (b) o 50ng/ml (c) de inhibidor. Las células infectadas fueron marcadas con un anti-p30 seguido de un anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo Alexa Fluor 594 (Rojo). Los ácidos nucleicos (azul) se tiñeron con el agente intercalante de ADN Hoechst 33258. Barra 35 μ m. (B) Gráfico que muestra los porcentajes de células infectadas en presencia de distintas concentraciones del inhibidor de las GTPasas Rho. Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. En cada experimento se calculó el porcentaje de células infectadas respecto a las totales en 30 campos diferentes.

podía entrar en las células Vero y llegar hasta su lugar de replicación en la célula sin requerir la actividad de Rac1. Para ello, se infectaron células Vero transfectadas con estos plásmidos y se dejó transcurrir la infección durante 1h. Luego las células fueron fijadas y procesadas para ser analizadas mediante inmunofluorescencia. Las partículas de virus fueron marcadas con un anticuerpo frente a la proteína mayoritaria de la cápsida, la p72. La adquisición de imágenes de las inmunofluorescencias fue realizada con un microscopio confocal. Se tomaron imágenes de 30 células transfectadas con cada plásmido, tomando fotografías de todos los planos en los que se detectaba el citoplasma celular (marcado en verde por la GFP) y también de todos los planos en los que aparecía el núcleo de la célula. En ambos casos se podían visualizar las mismas partículas víricas, que siempre aparecían en un estrecho rango de todos los que eran fotografiados.

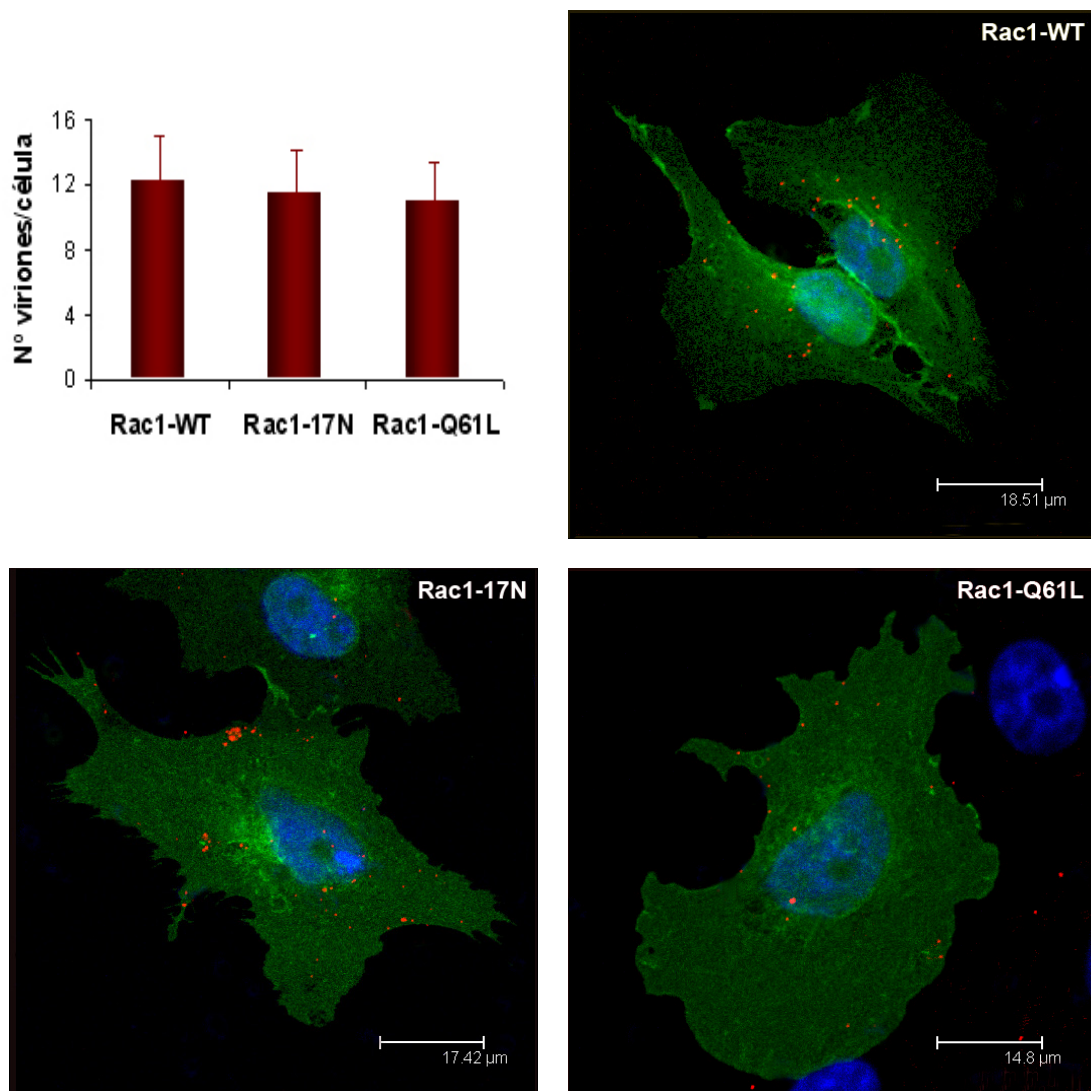


Figura 21. Comparación del número de partículas virales internalizadas en células que expresan de manera transitoria la forma natural, la constitutivamente activa o inactiva de Rac1. Se transfirieron transitoriamente células Vero con plásmidos que expresaban en fusión a GFP las variantes WT, 17N y Q61L de Rac1. Las células fueron infectadas durante 1h con virus semipurificado a una $mdi=20$ ufp/cél y se procesaron para ser estudiadas por inmunofluorescencia con un microscopio confocal espectral. Las partículas de virus fueron marcadas con un anti-p72 combinado con un anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor 594 (Rojo). Los ácidos nucleicos (azul) se tiñeron con el agente intercalante de ADN Hoechst 33258. Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Para poder contabilizar el total de partículas virales en cada célula se hacía la proyección máxima de todos los planos fotografiados.

Como era de esperar, no se hallaron diferencias en el número de viriones internalizados entre las células transfectadas con los distintos plásmidos. Las células transfectadas con el plásmido Rac1-17N no fueron infectadas por menos viriones que las transfectadas con el plásmido Rac1-WT, ni las transfectadas con el plásmido Rac1-Q61L se vieron infectadas por más (Figura 21). En este experimento se pudo comprobar

además que las partículas víricas podían alcanzar las proximidades del núcleo aunque se interfiriera la actividad de Rac1.

2.7. Efecto de la inhibición de las GTPasas Rho en el estado del citoesqueleto en los tiempos tardíos de la infección por el VPPA

Los resultados anteriores muestran que para que el VPPA complete con éxito su ciclo infectivo, es necesaria la participación de las GTPasas Rho, en concreto Rac1, durante el paso temprano de la entrada del virus en las células. Los resultados anteriores muestran también que la inhibición de las GTPasas Rho, o el hecho de interferir la actividad de Rac1, no afecta a la capacidad infectiva del VPPA. El hecho de que no se vean afectadas por la inhibición de las GTPasas Rho la entrada del VPPA y la síntesis de proteínas virales, pero sí la cantidad de progenie vírica generada en la infección, sugiere que la activación de Rac1 podría favorecer algún paso posterior a la entrada del virus. Teniendo en cuenta esto, y que una de las funciones principales de las GTPasas Rho es regular el citoesqueleto, decidimos estudiar, por microscopía confocal, el estado del citoesqueleto en los tiempos tardíos de la infección, con la finalidad de hallar algún defecto que pudiera explicar la disminución de progenie vírica obtenida al inhibir las GTPasas Rho.

2.7.1. Estudio del citoesqueleto de actina

El primer elemento del citoesqueleto sometido a estudio fueron los microfilamentos de actina. Como se puede ver en la figura 22, a 16hpi, las células Vero mostraban importantes cambios en el aspecto del citoesqueleto de actina respecto a las células sin infectar. Las células sin infectar presentaban fibras de estrés, con escaso marcaje de actina en la periferia celular (Figura 22A). Por el contrario, las células infectadas no presentaban fibras de estrés y la periferia de la célula mostraba una tinción más fuerte de actina, con la presencia de prolongaciones (Figura 22B). La desorganización de fibras de actina había sido descrita en la bibliografía (Carvalho, *et al.*, 1988; Jouvenet, *et al.*, 2006). Por otro lado, la inhibición de las GTPasas Rho *per se*, modificaba ostensiblemente la distribución del citoesqueleto de actina. Las células tratadas con el inhibidor y no infectadas mostraban una fuerte retracción del citoplasma, adoptando un aspecto arboriforme con largas prolongaciones de actina (Figura 22C; Fiorentini, *et al.*, 1989; Malorni, *et al.*, 1990). En cambio, las células tratadas con

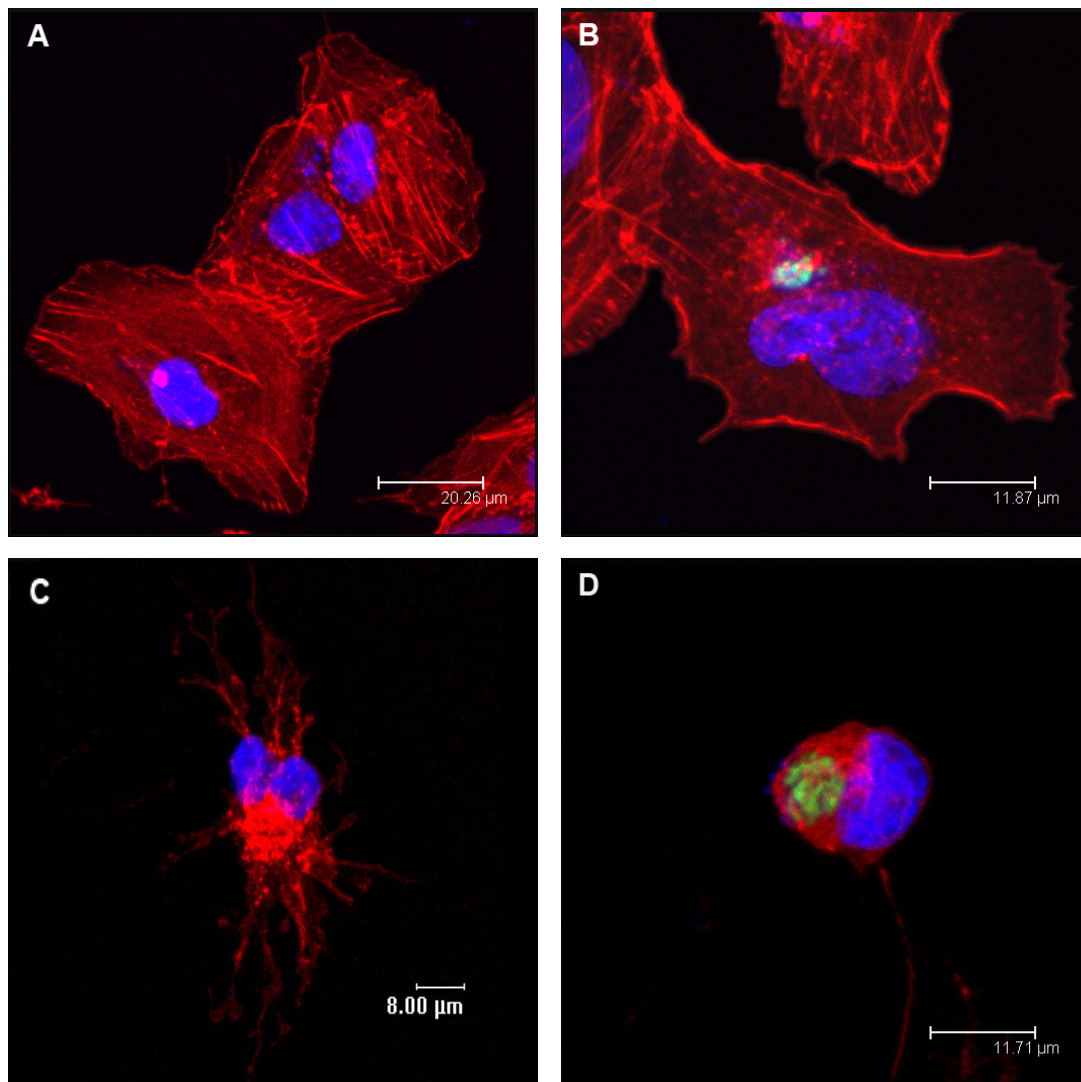


Figura 22. La infección por el VPPA modifica la distribución de los microfilamentos de actina tanto en ausencia como en presencia del inhibidor de las GTPasas Rho. Células Vero incubadas en ausencia (A y B) o presencia (C y D) del inhibidor de las GTPasas Rho (50ng/ml), fueron infectadas (B y D) con una mdi=0,5ufp/cél. El inhibidor se añadió antes de la adsorción y se mantuvo durante toda la infección. A las 16hpi se procesaron las células para ser estudiadas por inmunofluorescencia con un microscopio confocal. Para el marcaje de la actina (rojo) se utilizó Texas Red Faloidina. El virus utilizado fue Ba71-54GFP, que permite la visualización de la factoría viral (verde) al expresar la proteína p54 en fusión a GFP. Para teñir los ácidos nucleicos (azul) se usó el agente intercalante de ADN Hoechst 33258.

inhibidor e infectadas sufrieron la misma retracción que las no infectadas, pero sin mostrar el aspecto arboriforme (Figura 22D).

Los cambios observados en el citoesqueleto de actina en las células infectadas con respecto de las no infectadas sugieren que el VPPA ejerce algún tipo de control o influencia sobre este componente del citoesqueleto. Este control o influencia debería ser, además, independiente de la acción de las GTPasas Rho, puesto que su inhibición no impide al virus seguir ejerciendo dicha influencia.

2.7.2. Estudio de los filamentos intermedios de vimentina

Los filamentos intermedios de vimentina se reorganizan durante la infección del VPPA, distribuyéndose alrededor de la factoría viral (Carvalho, *et al.*, 1988; Heath, *et al.*, 2001; Figura 23B). Al inhibir las GTPasas Rho, la vimentina se reagrupó como consecuencia de la retracción celular, apareciendo como un acúmulo denso y sin formar ramificaciones. Cuando se infectaron las células, la inhibición de las GTPasas no afectó a la relación de las factorías virales y la vimentina, que siguieron mostrándose rodeadas por los filamentos de vimentina (Figura 23D).

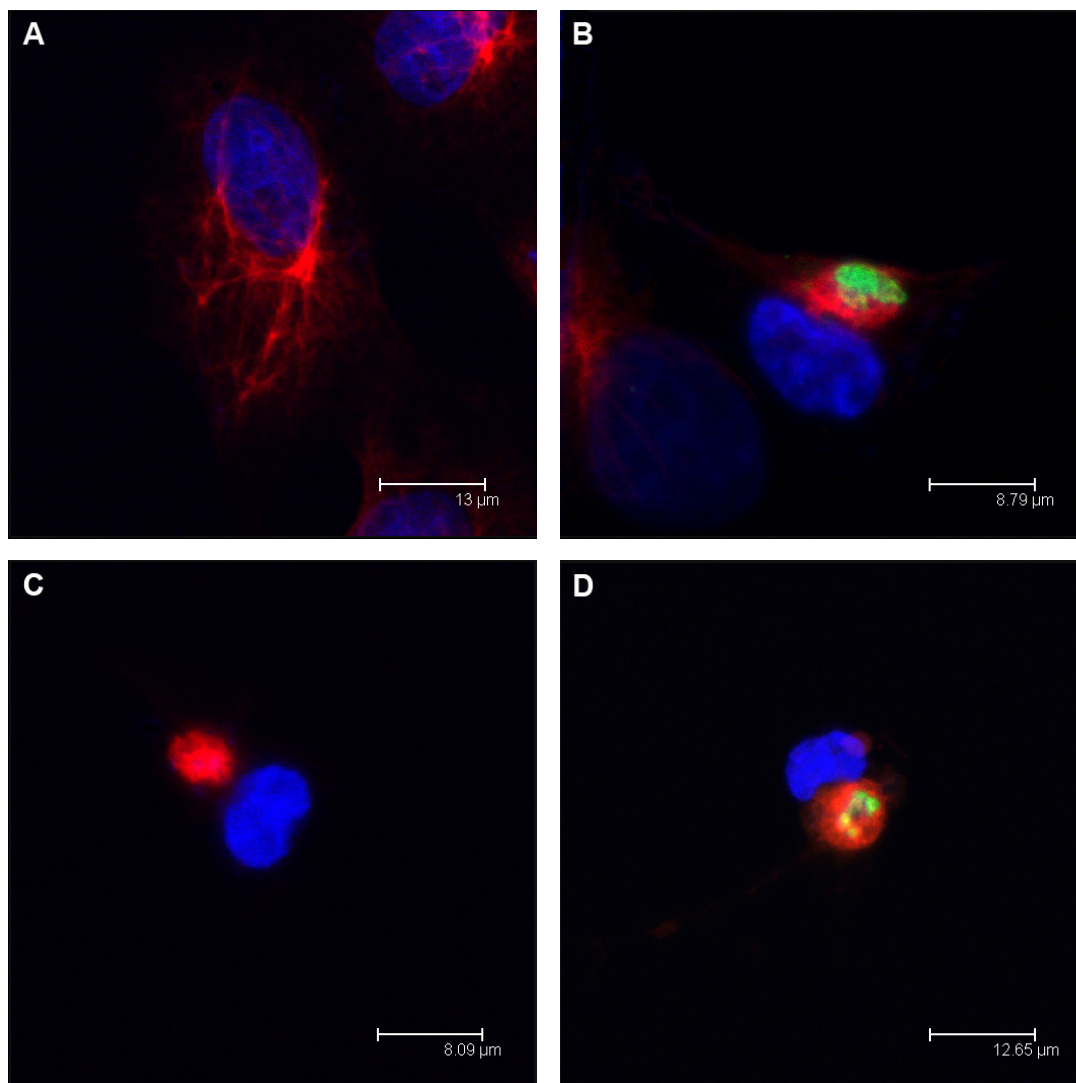


Figura 23. La inhibición de las GTPasas Rho no modifica la distribución alrededor de la factoría viral de los filamentos intermedios de vimentina. Células Vero incubadas en ausencia (A y B) o presencia (C y D) del inhibidor de las GTPasas Rho (50ng/ml), fueron infectadas (B y D) con una mdi=0,5ufp/cél. El inhibidor se añadió antes de la adsorción y se mantuvo durante toda la infección. A las 16hpi se procesaron las células para ser estudiadas por inmunofluorescencia con un microscopio confocal. Para el marcaje de la vimentina (rojo) se utilizó un anticuerpo comercial marcado con CY3. Las infecciones se realizaron con el virus Ba71-54GFP, que permite la visualización de la factoría viral (verde) al expresar la proteína p54 en fusión a GFP. Para teñir los ácidos nucleicos (azul) se usó el agente intercalante de ADN Hoechst 33258.

2.7.3. Estudio del citoesqueleto de tubulina

La infección de las células Vero por el VPPA provocó la desorganización de los microtúbulos y una disminución de su número (Figura 24A), en consonancia con lo descrito en la bibliografía (Carvalho, *et al.*, 1988; Jouvenet y Wileman, 2005). La inhibición de las GTPasas Rho produjo en los microtúbulos un efecto similar al producido en los filamentos intermedios, apareciendo fuertemente condensados pero formando alguna ramificación ocasional. Este aspecto condensado se mantuvo también en las células infectadas, sin que pudieran apreciarse diferencias en la organización de los microtúbulos (Figura 24B).

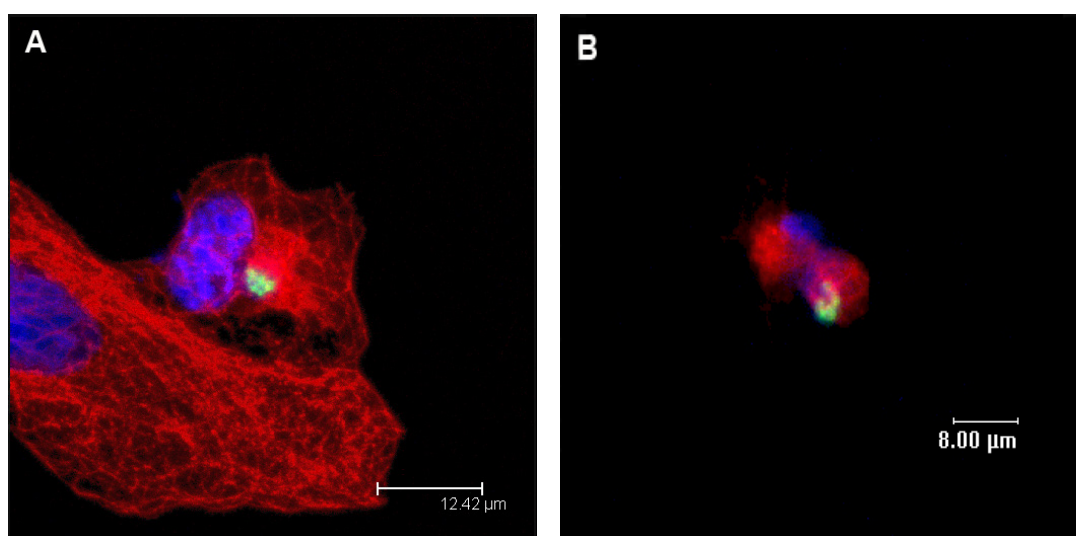


Figura 24. La infección por el VPPA modifica la distribución de los microtúbulos en ausencia pero no en presencia del inhibidor de las GTPasas Rho. Células Vero incubadas en ausencia (A) o presencia (B) del inhibidor de las GTPasas Rho (50ng/ml), fueron infectadas (A y B) con una $mdi=0,5ufp/cél.$ El inhibidor se añadió antes de la adsorción y se mantuvo durante toda la infección. A las 16hpi se procesaron las células para ser estudiadas por inmunofluorescencia con un microscopio confocal. Para el marcaje de la α -tubulina (rojo) se utilizó un anticuerpo comercial reconocido por un anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 594. Las infecciones se realizaron con el virus Ba71-54GFP, que permite la visualización de la factoría viral (verde) al expresar la proteína p54 en fusión a GFP. Para teñir los ácidos nucleicos (azul) se usó el agente intercalante de ADN Hoechst 33258.

Al estudiar solamente los microtúbulos acetilados, se pudo observar que tanto en las células infectadas como en las no infectadas la mayoría se concentraban en la región perinuclear correspondiente al MTOC. Sin embargo, en las células infectadas aparecían en mayor cantidad y rodeando por completo a las factorías virales, sin formar apenas ninguna ramificación, a diferencia de lo que ocurre en las células no infectadas (Figura 25A; Jouvenet, *et al.*, 2004). En las células en que se había inhibido la actividad de las GTPasas Rho, los microtúbulos acetilados también se agruparon y condensaron,

aunque aparecieron más ramificaciones que en las células cultivadas sin el inhibidor de las GTPasas Rho. Cuando las células incubadas con el inhibidor fueron infectadas, las ramificaciones desaparecieron y las factorías aparecieron igualmente rodeadas por microtúbulos acetilados (Figura 25B).

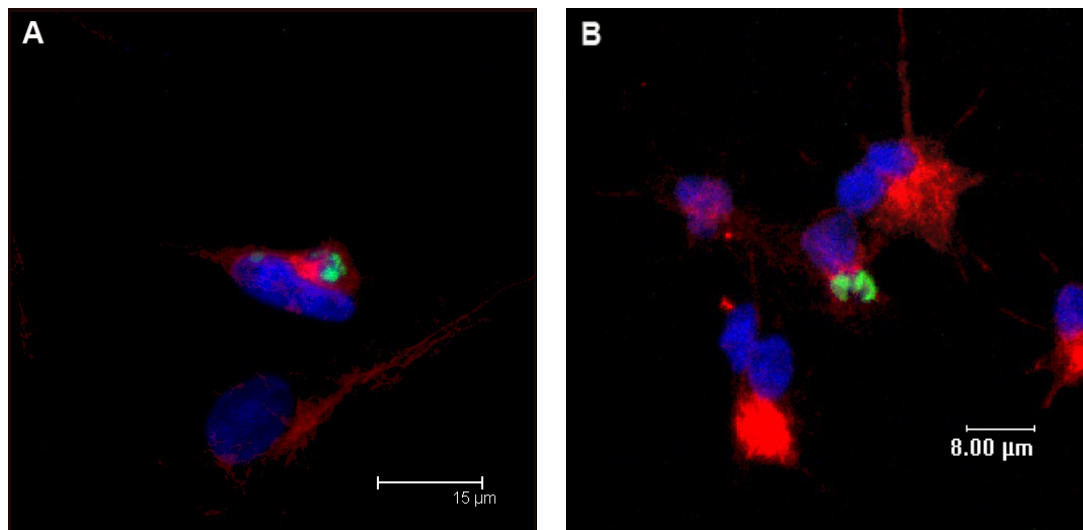


Figura 25. La infección por el VPPA modifica la distribución de los microtúbulos acetilados en ausencia pero no en presencia del inhibidor de las GTPasas Rho. Células Vero incubadas en ausencia (A) o presencia (B) del inhibidor de las GTPasas Rho (50ng/ml), fueron infectadas (A y B) con una mdi=0,5ufp/cél. El inhibidor se añadió antes de la adsorción y se mantuvo durante toda la infección. A las 16hpi se procesaron las células para ser estudiadas por inmunofluorescencia con un microscopio confocal. Para el marcaje de la α -tubulina (rojo) se utilizó un anticuerpo comercial reconocido por un anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 594. El virus utilizado fue Ba71-54GFP, que permite la visualización de la factoría viral (verde) al expresar la proteína p54 en fusión a GFP. Para teñir los ácidos nucleicos (azul) se usó el agente intercalante de ADN Hoechst 33258.

2.7.4. Estudio del aparato de Golgi

Una vez comparada la organización del citoesqueleto en células infectadas en presencia o ausencia del inhibidor de las GTPasas Rho, quisimos estudiar la distribución del aparato de Golgi. En células sin infectar e incubadas en ausencia del inhibidor de las GTPasas Rho, el marcaje del aparato de Golgi apareció de manera homogénea por todo el citoplasma (Figura 26A). Este patrón de marcaje del Golgi no varió en las células infectadas ni tampoco en las células incubadas con el inhibidor de las GTPasas Rho, tanto en las infectadas como en las no infectadas (Figura 26B, C y D).

Al estudiar la relación entre el citoesqueleto y la infección por el VPPA, hay que destacar el control que parece ejercer el VPPA sobre los microfilamentos de actina,

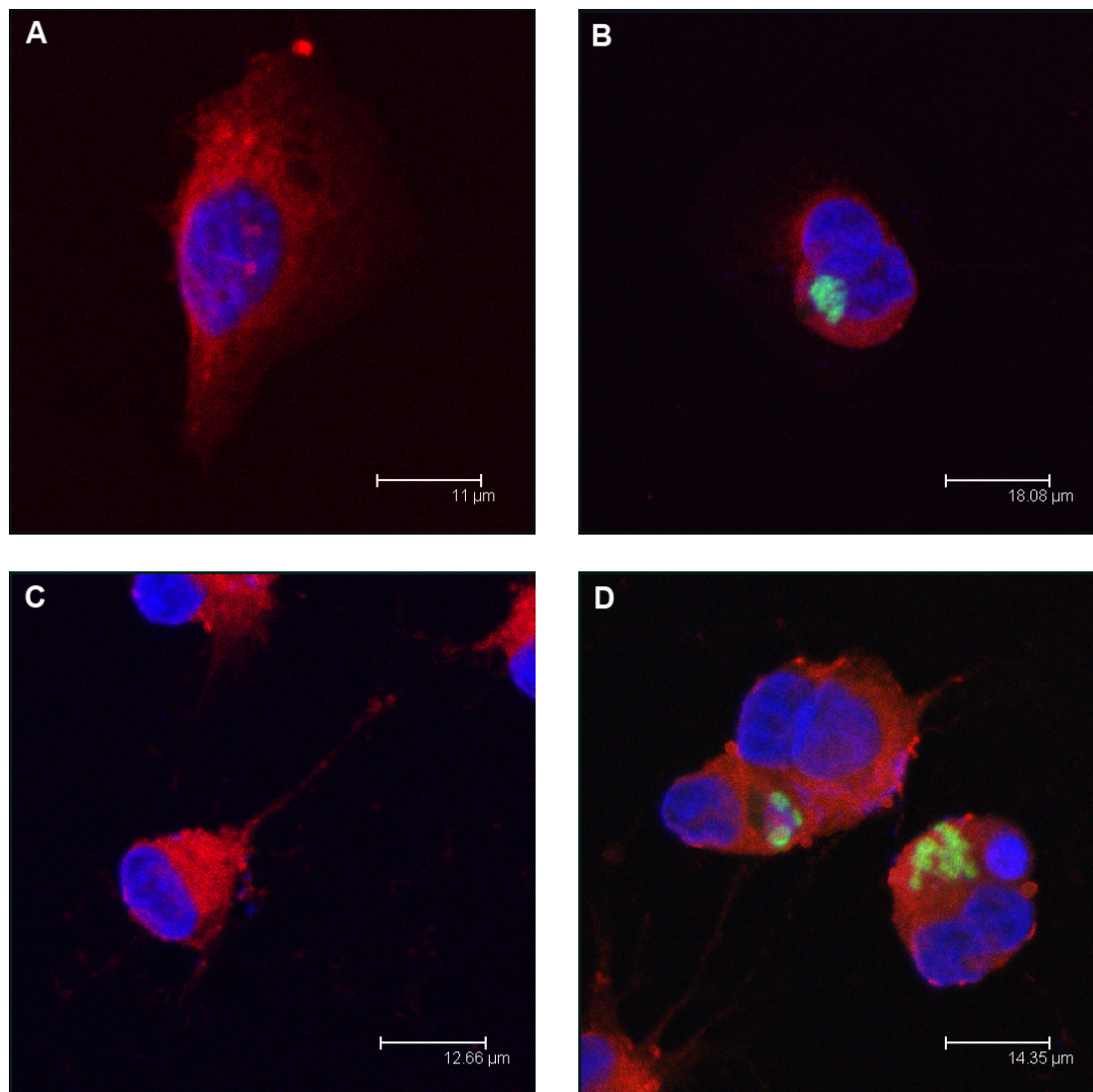


Figura 26. La infección por el VPPA no modifica la distribución del aparato de Golgi tanto en ausencia como en presencia del inhibidor de las GTPasas Rho. Células Vero incubadas en ausencia (A y B) o presencia (C y D) del inhibidor de las GTPasas Rho (50ng/ml), fueron infectadas (B y D) con una mdi=0,5ufp/cél. El inhibidor se añadió antes de la adsorción y se mantuvo durante toda la infección. A las 16hpi se procesaron las células para ser estudiadas por inmunofluorescencia con un microscopio confocal. Para el marcaje del Golgi (rojo) se utilizó Bodipy-TR. El virus utilizado fue Ba71-54GFP, que permite la visualización de la factoría viral (verde) al expresar la proteína p54 en fusión a GFP. Para teñir los ácidos nucleicos (azul) se usó el agente intercalante de ADN Hoechst 33258.

capaz de obviar la inhibición de las GTPasas Rho. A pesar de esto, la inhibición de las GTPasas Rho no pareció provocar diferencias importantes en la organización del citoesqueleto en células infectadas con respecto a células infectadas en ausencia del inhibidor de las GTPasas Rho. Sin embargo, fueron halladas con relativa frecuencia, y en presencia del inhibidor de las GTPasas Rho, factorías virales que no presentaban el aspecto habitual, esto es, denso y compacto, sino otro más laxo. En las figuras 22D y 26D pueden observarse ese tipo de factorías aberrantes.

El hallazgo de ese tipo de factorías sugería que la inhibición de las GTPasas Rho podía afectar a la constitución de la factoría, pudiendo quedar afectada también la morfogénesis de los viriones. Esto último explicaría la reducción de los títulos virales al infectar células Vero en presencia del inhibidor de las GTPasas Rho.

2.8. Efecto de la inhibición de las GTPasas Rho en la constitución de la factoría viral y la morfogénesis de los viriones

Con objeto de confirmar la hipótesis de que las GTPasas Rho, o más en concreto, que la activación de Rac1 durante la entrada del VPPA en las células Vero, fuera necesaria para la adecuada constitución de la factoría viral y la correcta morfogénesis de los nuevos viriones generados, se procedió a estudiar, por microscopía electrónica de transmisión, las factorías virales de células infectadas en presencia o ausencia del inhibidor de las GTPasas Rho.

En la figura 27, paneles C y D, puede observarse como, en presencia del inhibidor de las GTPasas Rho, se acumulaban en la factoría viral numerosos precursores de membrana que no terminaban de plegarse adoptando la forma icosaédrica característica de la partícula viral. Asimismo, se generaba un menor número de viriones, tanto maduros como inmaduros, en comparación con las factorías de células infectadas en ausencia del inhibidor de las GTPasas Rho. En las factorías virales de las células incubadas con el inhibidor aparece una menor cantidad de ribosomas que en las factorías virales de las células no incubadas con el inhibidor (Figura 27D y B). En este tipo de factorías los ribosomas aparecen fuertemente asociados a partículas virales en proceso de maduración, y también libres en la factoría (Carvalho, *et al.*, 1988). En la figura 27C se puede apreciar, además, como la presencia del inhibidor no impide la redistribución de las mitocondrias alrededor de la factoría viral.

Durante la migración de los viriones de la factoría viral a la membrana plasmática, la mayor parte de partículas víricas que son capaces de alcanzar la membrana plasmática son viriones maduros que albergan en su interior un nucleoide electrodenso característico. Sin embargo, ocasionalmente se detectan partículas virales inmaduras que han alcanzado la membrana plasmática. Estas partículas carecen del nucleoide electrodenso característico de los viriones maduros y se consideran defectivas (Brookes, *et al.*, 1996). En presencia del inhibidor de las GTPasas Rho, la cantidad de viriones defectivos capaces de alcanzar la periferia celular se vio aumentada considerablemente, llegando a constituir aproximadamente el 50% del total de las

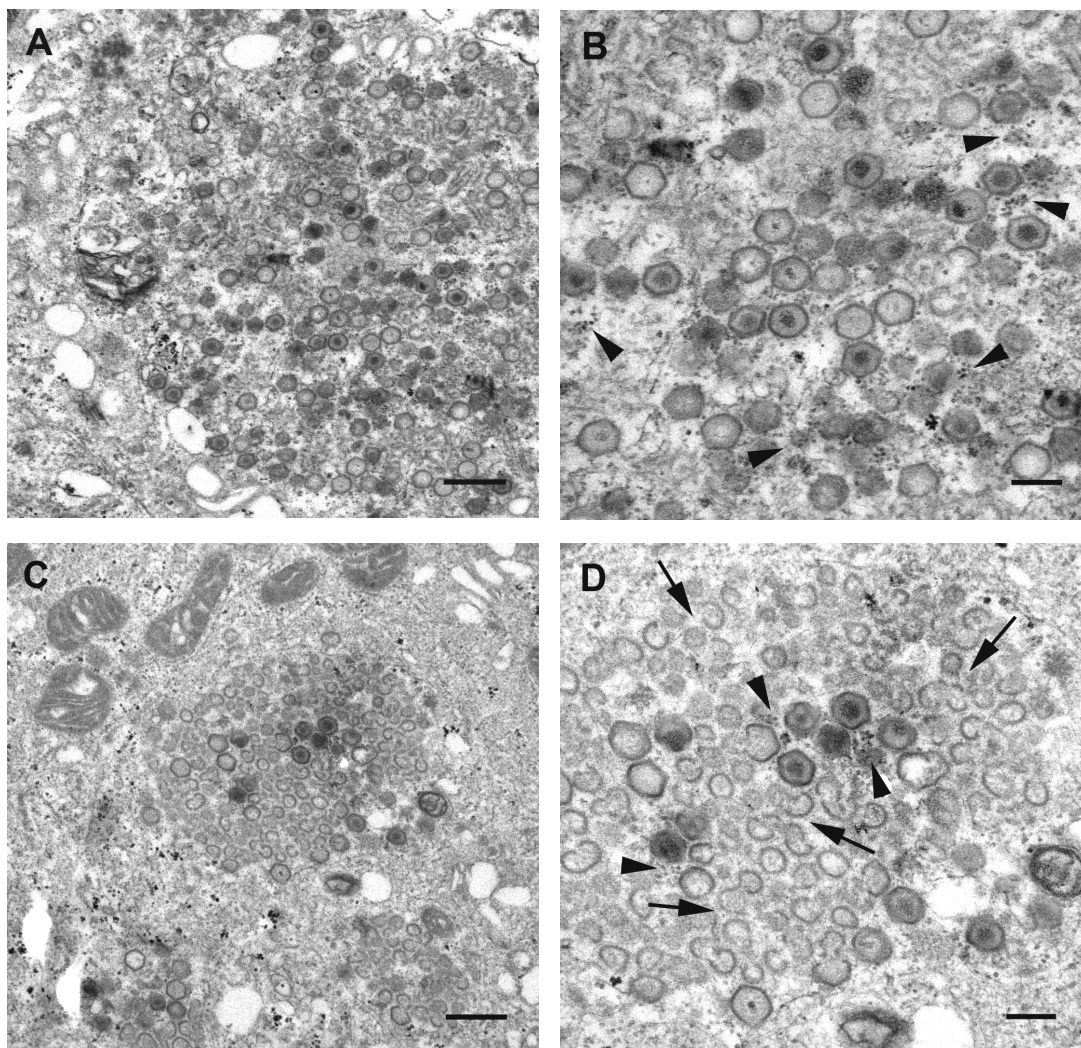


Figura 27. Morfogénesis de los viriones del VPPA en presencia del inhibidor de las GTPasas Rho. Se infectaron células Vero ($mdi=0,5$ ufp/cél) en ausencia (A,B) o presencia (C, D) del inhibidor de las GTPasas Rho. A 16hpi se procesaron las células para ser estudiadas por microscopía electrónica de transmisión. B y D (barra $0,2\mu m$) son fotografías de más aumento de las factorías virales de A y C (barra $0,5\mu m$), respectivamente. Flechas: Precursores de membrana. Puntas de flecha: Ribosomas.

partículas víricas que alcanzaban la membrana plasmática (Figura 28B). Esta observación, permite suponer, además, que el transporte a través de los microtúbulos de las partículas virales, desde la factoría viral a la membrana plasmática, no se ve afectado por la inhibición de las GTPasas Rho.

La inhibición de las GTPasas Rho tuvo como consecuencia la acumulación de las partículas virales en la membrana plasmática, sin completar el proceso de exocitosis. Esto puede ser debido a la ausencia de las prolongaciones de actina tipo filopodio, que son características del proceso de exocitosis del VPPA y que pueden

observarse, en cambio, en células infectadas en ausencia del inhibidor (Carvalho, *et al.*, 1988; Jouvenet, *et al.*, 2006). Este hecho sugiere que la familia de las GTPasas Rho podría desempeñar un papel destacado en la generación de estas prolongaciones de actina.

La destacada acumulación de precursores de membrana irregularmente plegados en las factorías virales, junto con el menor número de partículas virales generadas, y la aparición en la periferia celular de multitud de viriones inmaduros en células infectadas incubadas con el inhibidor de las GTPasas Rho, apunta a que estas GTPasas, o más en concreto Rac1, están implicadas en la constitución de la factoría viral y la morfogénesis de los viriones.

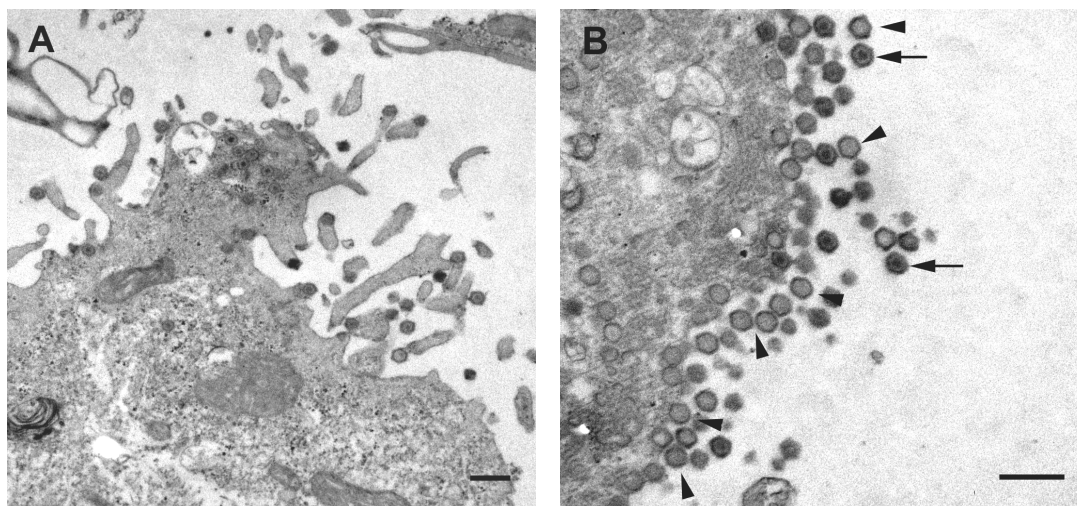


Figura 28. Exocitosis de viriones en presencia del inhibidor de las GTPasas Rho. Se infectaron células Vero ($mdi=0,5$ ufp/cél) en ausencia (A) o presencia (B) del inhibidor de las GTPasas Rho. A 16hpi se procesaron las células para ser estudiadas por microscopía electrónica de transmisión. Flechas: Viriones maduros. Puntas de flecha: Viriones inmaduros o defectivos. Barra: 5 μ m.

3. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE ACTIVACIÓN DE RAP1 DURANTE LA ENTRADA DEL VPPA

Los experimentos realizados con las estatinas y los inhibidores de la prenilación sugerían la participación de uno o varios miembros de la superfamilia Ras en la entrada del VPPA en las células Vero. Dichos experimentos sugerían también que los posibles miembros implicados debían incorporar un grupo geranilgeranilo. Descartada la familia Rho, había que buscar otro candidato. Un posible candidato podía ser Rap1, perteneciente a la familia Ras. Rap1 está implicado en distintos procesos

celulares, uno de los cuales podría ser el tráfico de vesículas, puesto que se ha hallado a Rap1 asociado a endosomas tardíos (Pizon, *et al.*, 1994).

Se procedió entonces a determinar si Rap1 se activaba durante la entrada del VPPA. Para estudiar el grado de activación de Rap1 se recurrió a la técnica de “pull-down” utilizada ya para Rac1 y Cdc42. Para capturar la forma activada de Rap1 se utilizó una proteína de fusión consistente en la proteína GST y el dominio de unión de RalGDS a Rap1. Los ensayos de “pull-down” realizados mostraron que Rap1 sufre una fuerte activación durante la entrada del VPPA, casi el doble que la sufrida por Rac1, alcanzando un pico máximo a los 20 mpi (Figura 29).

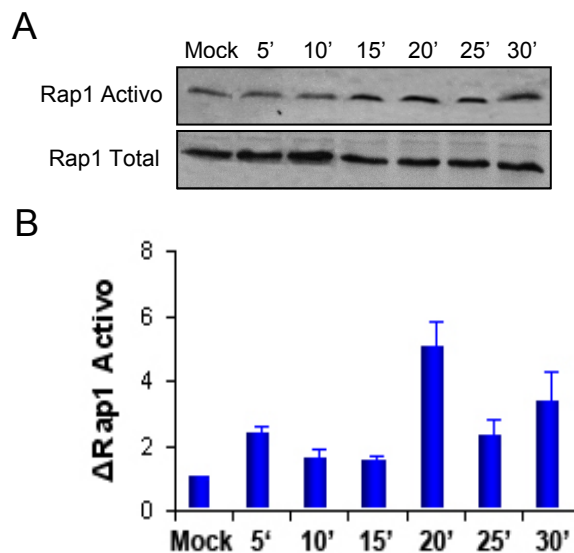


Figura 29. Ensayo de activación de Rap1. Células Vero infectadas a una $mdi=60$ ufp/cél fueron recogidas a distintos tiempos postinfección y procesadas para cuantificar el grado de activación de Rap1 durante la entrada del VPPA. Para ello se realizaron ensayos de “pull-down” y WB (A). Las bandas obtenidas correspondientes a Rap1 activo fueron densitometradas y relativizadas con las totales para calcular los incrementos de activación (B). Las células fueron cultivadas en medio sin suero con el fin de mantener la actividad de las GTPasa Rap1 en un estado basal. Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. Mock: Células no infectadas. Los tiempos reflejados son minutos postinfección.

4. PAPEL DE LA FAMILIA DE LA PI3K EN EL CICLO INFECTIVO DEL VPPA

4.1. Efecto de la inhibición de la PI3K en la producción de virus

La familia de la PI3K está implicada en procesos como la regulación del citoesqueleto y el tráfico de vesículas (Wymann y Pirola, 1998; Hawkins, *et al.*, 2006), además de ser capaz de activar a Rac1 (Han, *et al.*, 1998). Con el fin de evaluar si esta familia de kinasas participaba en el ciclo infectivo del VPPA, utilizamos la droga

wortmannina, que es un potente y selectivo inhibidor específico de la PI3K (Wymann, *et al.*, 1996). Tras testar su grado de toxicidad en las células Vero (Figura 30A), estudiamos el efecto que tenía en los niveles de progenie vírica. Como se puede observar en la figura 30B, la presencia de wortmannina en un cultivo de células infectadas reduce los títulos de virus obtenidos de una manera dependiente de la dosis. Cuando la droga fue añadida antes o después de la adsorción del VPPA no produjo el mismo efecto, produciendo la reducción de los títulos de virus al ser añadida antes de la adsorción del virus (Figura 30C). Este resultado sugiere que la activación de la PI3K es necesaria durante la entrada del VPPA en las células Vero para el éxito de su ciclo infectivo.

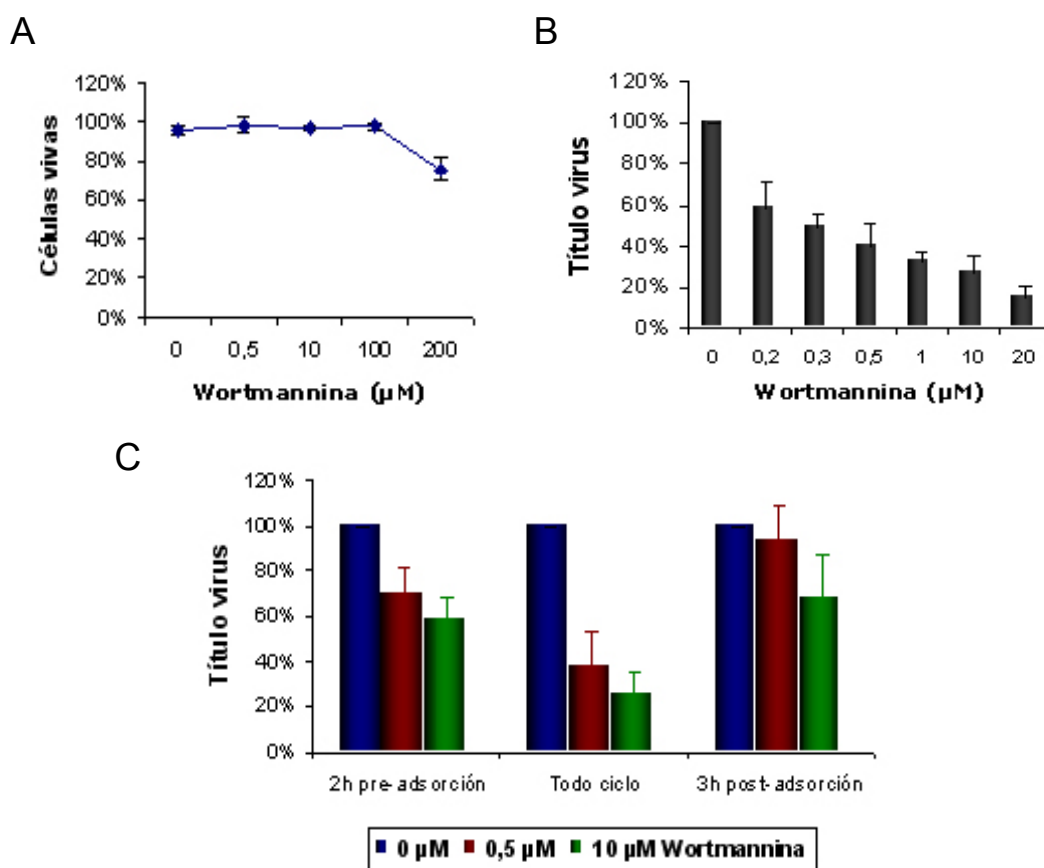


Figura 30. El inhibidor de la PI3K afecta a la producción de virus. (A) Estudio de la viabilidad celular en presencia de wortmannina. Las células fueron incubadas durante 24h con wortmannina antes de ser contabilizadas con la tinción vital azul de Tripán. (B) Se infectaron células Vero ($\text{mdi}=0,5 \text{ ufp/cél}$) preincubadas 2h con wortmannina a distintas concentraciones, manteniéndose la droga durante toda la infección. A las 24hpi se recogieron los viriones producidos y se titularon. (C) Se infectaron células Vero ($\text{mdi}=0,5 \text{ ufp/cél}$) en presencia de wortmannina a distintos tiempos. A las 24hpi se recogieron los viriones producidos y se titularon. Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

4.2. Efecto de la inhibición de la PI3K en la capacidad infectiva del VPPA

Si el efecto producido por la wortmannina en los títulos de virus era debido a un defecto en la entrada en las células del VPPA, tenía que traducirse en un menor número de células infectadas en un cultivo en presencia del inhibidor de la PI3K. Para averiguar si esta suposición era acertada, se infectaron células Vero incubadas con wortmannina y a las 3hpi fueron fijadas para ser analizadas por IFI (Figura 31). El número de células infectadas en presencia del inhibidor fue menor en más de un 50% que en un cultivo sin wortmannina, demostrando que esta droga reduce la capacidad infectiva del VPPA, posiblemente inhibiendo el paso de la entrada en las células.

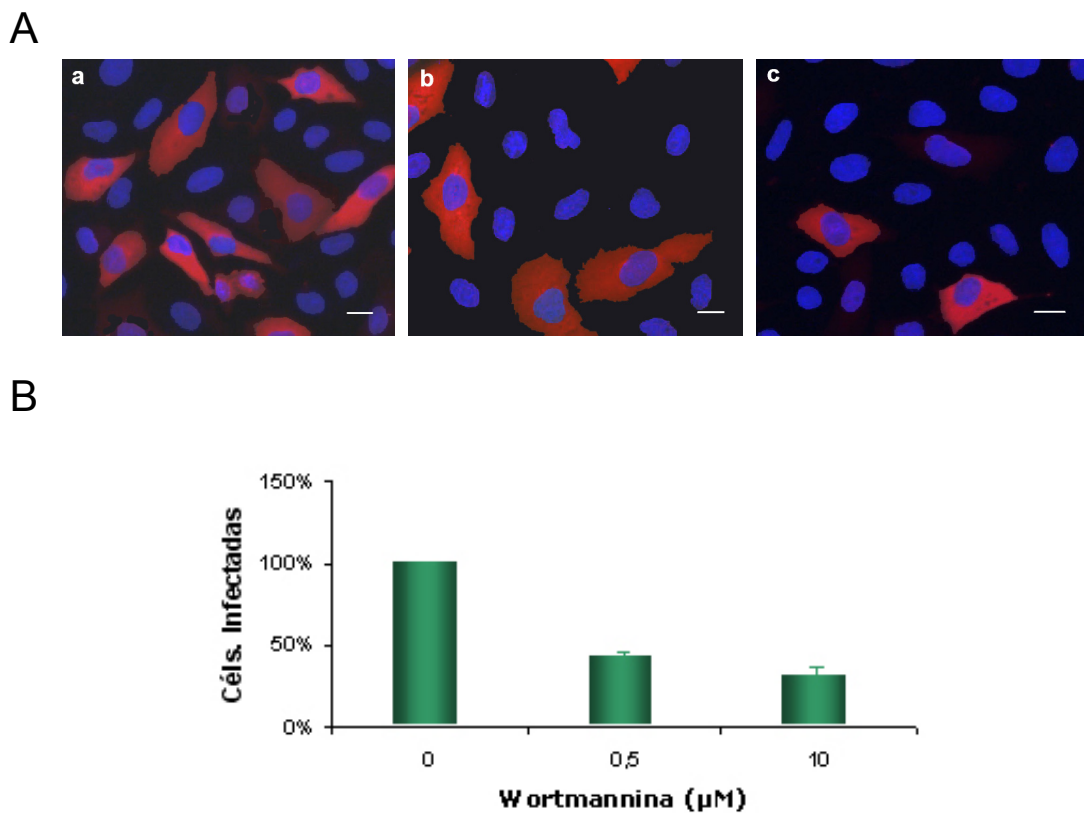


Figura 31. Capacidad infectiva del VPPA en presencia del inhibidor de la PI3K. Se infectaron células Vero en presencia o ausencia del inhibidor de la PI3K ($\text{mdi}=0,5$ ufp/cél) y a 3hpi se procesaron para contabilizar por inmunofluorescencia el número de células infectadas en cada tratamiento. (A) Imágenes representativas del número de células infectadas a 3hpi con 0 (a), 0,5 (b) o 10 μM (c) de Wortmannina. Las células infectadas fueron marcadas con un anti-p30 seguido de un anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo Alexa Fluor 594 (Rojo). Los ácidos nucleicos (azul) se tiñeron con el agente intercalante de ADN Hoechst 33258. Barra 20 μm . (B) Gráfico que muestra los porcentajes de células infectadas en presencia de distintas concentraciones del inhibidor de la PI3K. Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. En cada experimento se calculó el porcentaje de células infectadas respecto a las totales en 30 campos diferentes.

4.3. Efecto de la inhibición de la PI3K en la síntesis de proteínas virales

Si en presencia del inhibidor de la PI3K se infectaban menos células en cultivo, tenía que haber también una menor síntesis de proteínas virales. Con el fin de comprobar esta conjetura, se recogieron muestras de células infectadas en presencia o ausencia de wortmannina a distintos tiempos. En la figura 32 puede comprobarse cómo la síntesis de proteínas virales solamente es menor cuando el inhibidor es añadido antes de la adsorción.

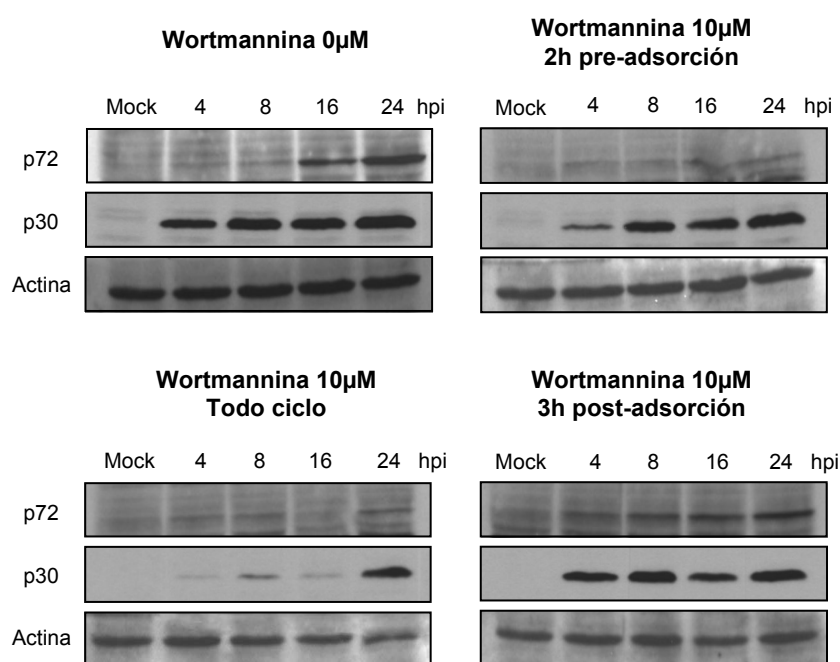


Figura 32. Síntesis de proteínas virales en presencia del inhibidor de la PI3K. Células Vero infectadas a una mdi=0,5 ufp/cél fueron recogidas a distintos tiempos postinfección y procesadas para determinar por WB los niveles de síntesis de proteínas virales en presencia del inhibidor de la PI3K. El inhibidor fue añadido antes de la adsorción del virus, después de la adsorción, o bien se mantuvo presente durante todo el ciclo infeccioso. Mock: Células no infectadas. La detección de actina se utilizó como control interno de carga de las muestras.

5. PAPEL DE LA FAMILIA DE LA PKC EN EL CICLO INFECTIVO DEL VPPA

5.1. Efecto de la inhibición de la PKC en la producción de virus

La familia de la PKC está implicada en la reorganización del citoesqueleto de actina, la transducción de señales y la endocitosis (Mellor y Parker, 1998; Toker, 1998; Becker y Hannun, 2003, 2004; Larsson, 2006), y puede ser activada por la PI3K (Toker y Cantley, 1997; Chou, *et al.*, 1998; Le Good, *et al.*, 1998). Con la finalidad de examinar si la participación de la PKC es necesaria para el éxito de la infección del

VPPA en las células Vero, se recurrió a su inhibición mediante calfofostina C. La calfofostina C pertenece al grupo de las perilenequinonas producidas por hongos patógenos de plantas (Bruns, *et al.*, 1991). Muchas de estas perilenequinonas requieren la presencia de luz para ser activadas, y la calfofostina C no es una excepción. Otra característica de esta droga es su capacidad de provocar apoptosis en distintas líneas celulares, y el grado de activación depende tanto de la concentración de la droga como del tiempo de exposición a la luz (Dubauskas, *et al.*, 1998; Mayne y Murray, 1998). Debido a esta característica, estudiamos en primer lugar en qué condiciones se podía trabajar con esta droga sin inducir apoptosis en las células Vero. A 10 y 25nM y con 3h de exposición a la luz, tras 24h de incubación, la calfofostina C no produjo apoptosis, aunque sí a 50nM. La inducción de apoptosis se cuantificó midiendo la absorbancia de una reacción colorimétrica producida por la activación de caspasa 3 (Figura 33).

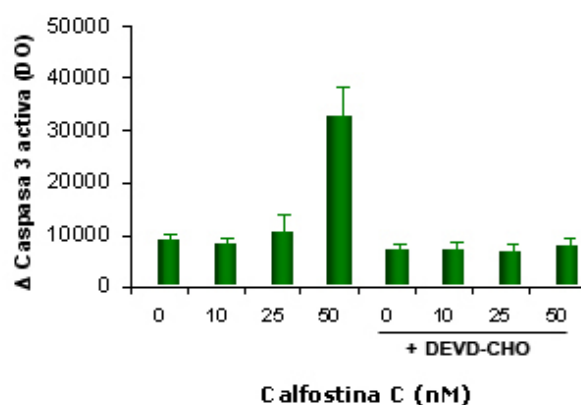


Figura 33. Estudio de la inducción de apoptosis en células Vero incubadas con calfofostina C. Se incubaron células Vero con distintas cantidades de calfofostina C durante 24h, manteniéndolas las tres primeras horas en presencia de luz. Al procesar las muestras para el ensayo, se incubaron en ausencia o presencia de un inhibidor específico de la caspasa 3 (DEVD-CHO). Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Las infecciones con el VPPA en presencia de calfofostina C a diferentes tiempos no pudieron realizarse como con las drogas anteriores. Tras los lavados después de la adsorción del VPPA, no podía volver a administrarse calfofostina C, ya que eso habría disparado la apoptosis debido a la segunda exposición de luz a la que se habrían visto sometidas las células (Dubauskas, *et al.*, 1998). Debido a esto, las infecciones de virus se realizaron solamente en dos condiciones de droga: incubación con calfofostina C antes o después de la adsorción. La incubación siempre fue de 3h con luz. Como puede verse en la figura 34, los títulos de virus solamente disminuyeron incubando con la

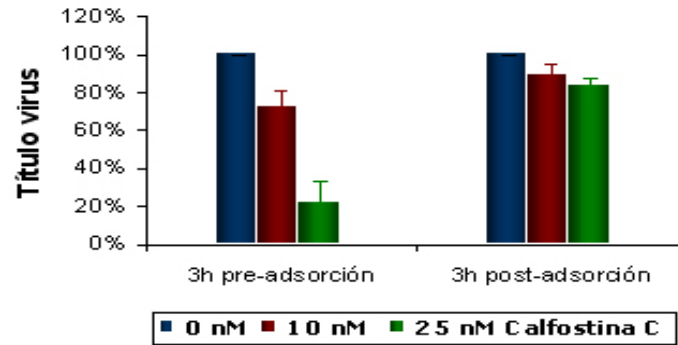
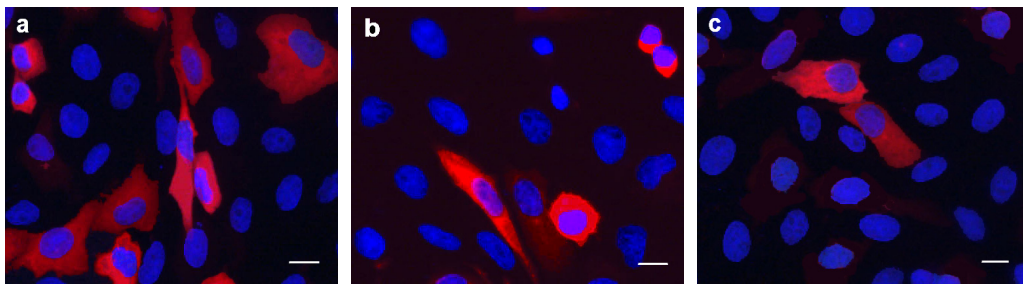


Figura 34. El inhibidor de la PKC afecta a la producción de virus. Se infectaron células Vero ($mdi=0,5ufp/cél$) en presencia de calfofostina C antes de y durante la adsorción, o bien 3h después de la misma. A las 24hpi se recogieron los viriones producidos y se titularon. Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

A



B

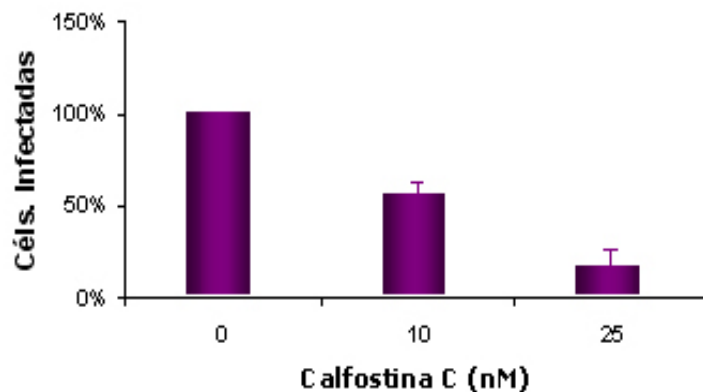


Figura 35. Capacidad infectiva del VPPA en presencia del inhibidor de la PKC. Se infectaron células Vero en presencia o ausencia del inhibidor de la PKC ($mdi=0,5 ufp/cél$) y a 3hpi se procesaron para contabilizar por inmunofluorescencia el número de células infectadas en cada tratamiento. (A) Imágenes representativas del número de células infectadas a 3hpi con 0 (a), 10 (b) o 25nM (c) de Calfofostina C. Las células infectadas fueron marcadas con un anti-p30 seguido de un anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo Alexa Fluor 594 (Rojo). Los ácidos nucleicos (azul) se tiñeron con el agente intercalante de ADN Hoechst 33258. Barra $20\mu m$. (B) Gráfica que muestra los porcentajes de células infectadas en presencia de distintas concentraciones del inhibidor de la PKC. Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. En cada experimento se calculó el porcentaje de células infectadas respecto a las totales en 30 campos diferentes.

droga antes de la adsorción del virus. Este resultado indica que sería necesaria la actividad de la PKC durante la entrada del VPPA para el éxito del ciclo infeccioso.

5.2. Efecto de la inhibición de la PKC en la capacidad infectiva del VPPA

Se hicieron inmunofluorescencias a 3hpi de células infectadas incubadas antes de la adsorción del virus con el inhibidor de la PKC. Como en el caso del inhibidor de la PI3K, la presencia del inhibidor de la PKC antes de la adsorción del VPPA redujo la cantidad de células infectadas en el cultivo (Figura 35). Esto apuntaría a que la PKC estaría mediando la entrada del VPPA en las células Vero.

5.3. Efecto de la inhibición de la PKC en la síntesis de proteínas virales

Al igual que con la PI3K, la inhibición de la PKC debería disminuir los niveles de síntesis de proteínas virales, posiblemente por reducir la eficiencia de la entrada del VPPA en las células Vero. Efectivamente, al estudiar los niveles de síntesis de proteínas víricas a lo largo de la infección, se observó un retraso en la acumulación tanto de proteínas tempranas como tardías (Figura 36). Este resultado refuerza la idea de que la PKC participaría en la entrada del VPPA en las células Vero.

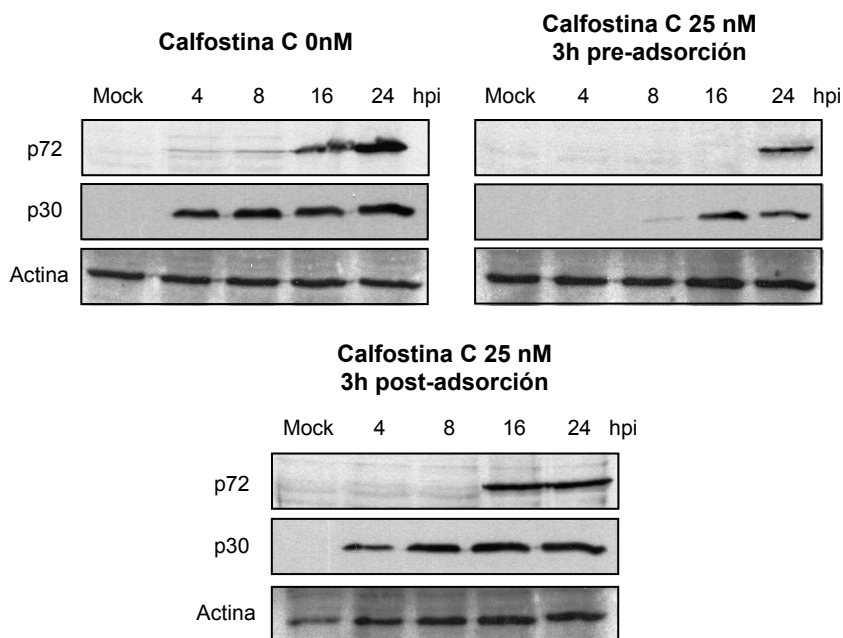


Figura 36. Síntesis de proteínas virales en presencia del inhibidor de la PKC. Células Vero infectadas a una mdi=0,5 ufp/cél fueron recogidas a distintos tiempos postinfección y procesadas para determinar por WB los niveles de síntesis de proteínas virales en presencia del inhibidor de la PKC. El inhibidor fue añadido, o bien antes de la adsorción del virus, o bien después de la misma. Mock: Células no infectadas. La detección de actina se utilizó como control interno de carga de las muestras.

6. PAPEL DE LA FAMILIA DE LAS ERK/MAPK EN EL CICLO INFECTIVO DEL VPPA

6.1. Efecto de la inhibición de las ERK/MAPK en la producción de virus

Las ERK/MAPK tienen la capacidad de regular el citoesqueleto y también la endocitosis mediada por receptor (Di Fiore y De Camilli, 2001; McPherson, *et al.*, 2001; Yoon y Seger, 2006), y pueden ser activadas por la acción de la PI3K, la PKC y Rac1 (Figura 6). Como ya se ha mostrado anteriormente, el VPPA requiere la actividad de las tres proteínas anteriores en distintas etapas de su ciclo infectivo. Puesto que las tres pueden activar a las ERK/MAPK, quisimos averiguar si también estas estarían implicadas en el ciclo infectivo del VPPA. Para abordar este estudio, se utilizó la droga U-0126, que inhibe a MEK1/2 (Favata, *et al.*, 1998), que fosforila y activa ERK1/2 (Figura 6). Tras probar la toxicidad de la droga en las células Vero (Figura 37A), se procedió a estudiar su efecto en la producción de virus. En la figura 37B puede observarse que, desde la mínima concentración ensayada, la inhibición de las ERK/MAPK reduce los títulos de virus. Esta reducción de los títulos virales se da de una manera dependiente de la dosis. Cuando la droga fue añadida antes de la adsorción (Figura 37C), los títulos de virus sólo se redujeron con la concentración más alta de inhibidor (50 μ M), aunque de manera más moderada. Cuando la droga fue añadida 3h después de la adsorción, los títulos de virus se redujeron con las dos concentraciones de droga ensayadas, aunque a 50 μ M la reducción tampoco fue tan pronunciada como cuando la droga se mantuvo durante todo el ciclo infectivo.

Estos resultados apuntarían a que la actividad de las ERK/MAPK podría ser necesaria en varias etapas del ciclo infectivo, incluyendo la entrada y algún momento de la replicación. Aunque no queda del todo claro el efecto del inhibidor en la entrada del VPPA, puesto que solamente se ve un efecto adverso en la producción de virus con la concentración más alta del inhibidor.

6.2. Efecto de la inhibición de las ERK/MAPK en la capacidad infectiva del VPPA

Para comprobar si las ERK/MAPK afectaban a la entrada del virus en las células, se infectaron células en presencia o ausencia del inhibidor de MEK y se contabilizó por inmunofluorescencia el número de células infectadas en cada caso, a 3hpi. La presencia del inhibidor no redujo el número de células infectadas en el cultivo (Figura 38). Este resultado señalaba que las ERK/MAPK no estarían implicadas en el proceso de la entrada del VPPA en las células Vero, aunque no resolvía la cuestión de si

estas kinasas se activarían durante la entrada del virus y si esta activación sería necesaria para algún paso posterior del ciclo infeccioso.

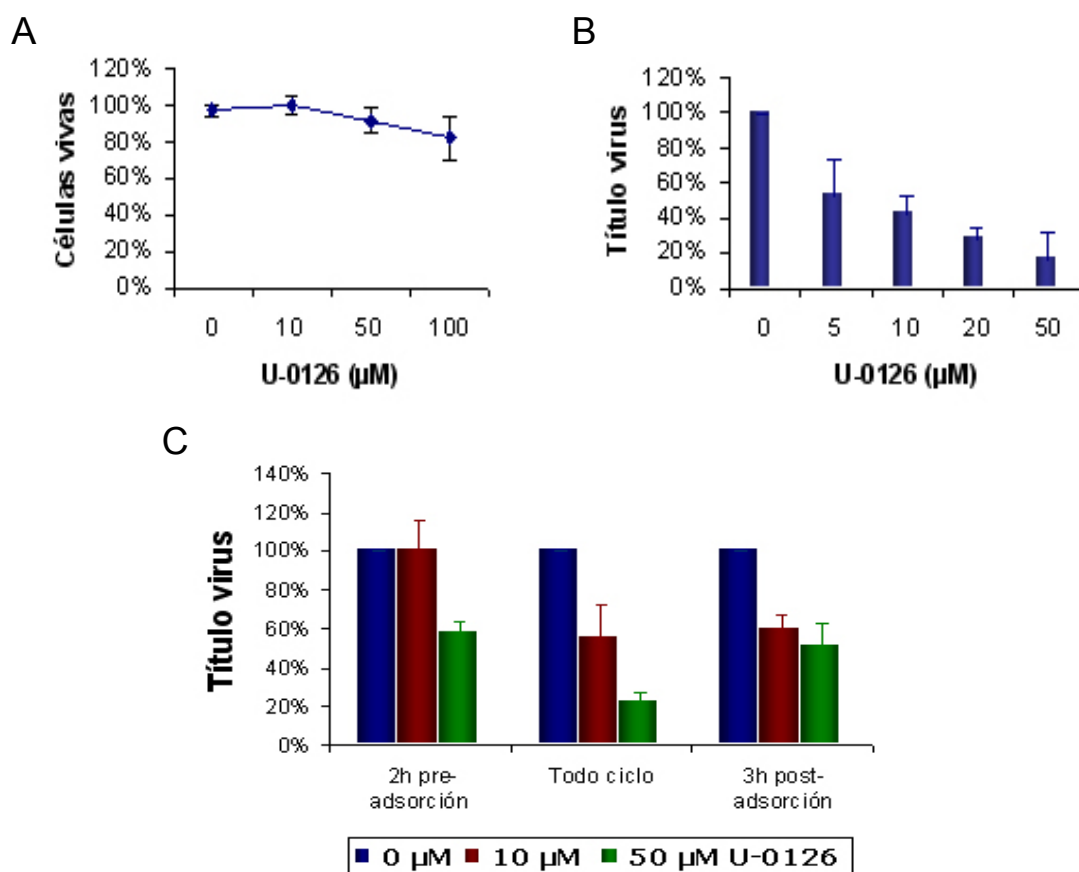


Figura 37. El inhibidor de las ERK/MAPK afecta a la producción de virus. (A) Estudio de la viabilidad celular en presencia de U-0126. Las células fueron incubadas durante 24h con U-0126 antes de ser contabilizadas con la tinción vital azul de Tripán. (B) Se infectaron células Vero ($\text{mdi}=0,5$ ufp/cél) preincubadas 2h con U-0126 a distintas concentraciones, manteniéndose la droga durante toda la infección. A las 24hpi se recogieron los viriones producidos y se titularon. (C) Se infectaron células Vero ($\text{mdi}=0,5$ ufp/cél) en presencia de U-0126 a distintos tiempos. A las 24hpi se recogieron los viriones producidos y se titularon. Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

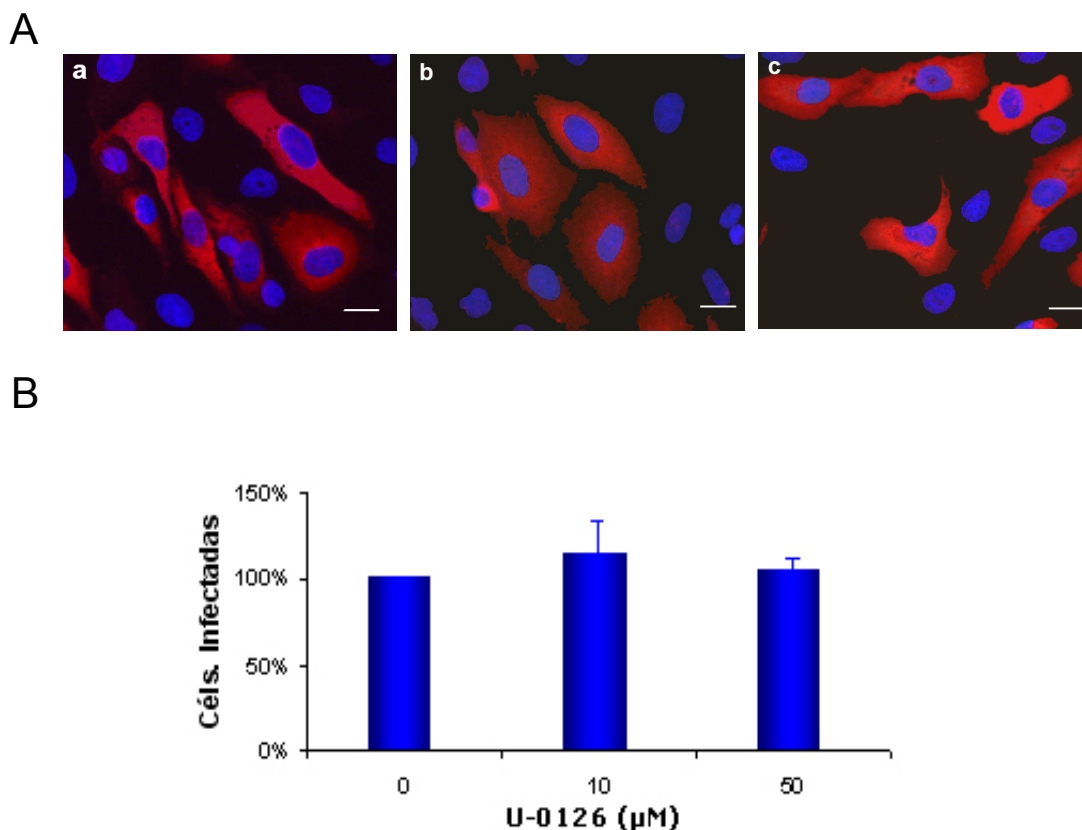


Figura 38. Capacidad infectiva del VPPA en presencia del inhibidor de MEK. Se infectaron células Vero en presencia o ausencia del inhibidor de MEK ($mdi=0,5$ ufp/cél) y a 3hpi se procesaron para contabilizar por inmunofluorescencia el número de células infectadas en cada tratamiento. (A) Imágenes representativas del número de células infectadas a 3hpi con 0 (a), 10 (b) o 50μM (c) de U-0126. Las células infectadas fueron marcadas con un anti-p30 seguido de un anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo Alexa Fluor 594 (Rojo). Los ácidos nucleicos (azul) se tiñeron con el agente intercalante de ADN Hoechst 33258. Barra 20μm. (B) Gráfica que muestra los porcentajes de células infectadas en presencia de distintas concentraciones del inhibidor de MEK. Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. En cada experimento se calculó el porcentaje de células infectadas respecto a las totales en 30 campos diferentes.

6.3. Efecto de la inhibición de las ERK/MAPK en la síntesis de proteínas virales

El estudio de la síntesis de proteínas del VPPA no ayudaría a resolver la cuestión de la necesidad o no de la activación de las ERK/MAPK durante la entrada del VPPA en las células Vero, pero podía indicar si la reducción de los títulos virales por la inhibición de MEK se debía a un defecto en la síntesis de proteínas del virus. La infección de células incubadas en diferentes momentos con el inhibidor de MEK arrojó niveles similares de expresión de proteínas virales (Figura 39). Esto indicaría que el defecto observado en la producción de virus en presencia del inhibidor no tendría que ver con un defecto en la expresión de proteínas virales, al menos de la mayoritaria de la cápsida (p72) y la p30. Esto, junto con el experimento de la infectividad del virus,

podría indicar que la reducción de los títulos virales podría ser debida a un defecto en la morfogénesis de los viriones, como sucede con la inhibición de Rac1.

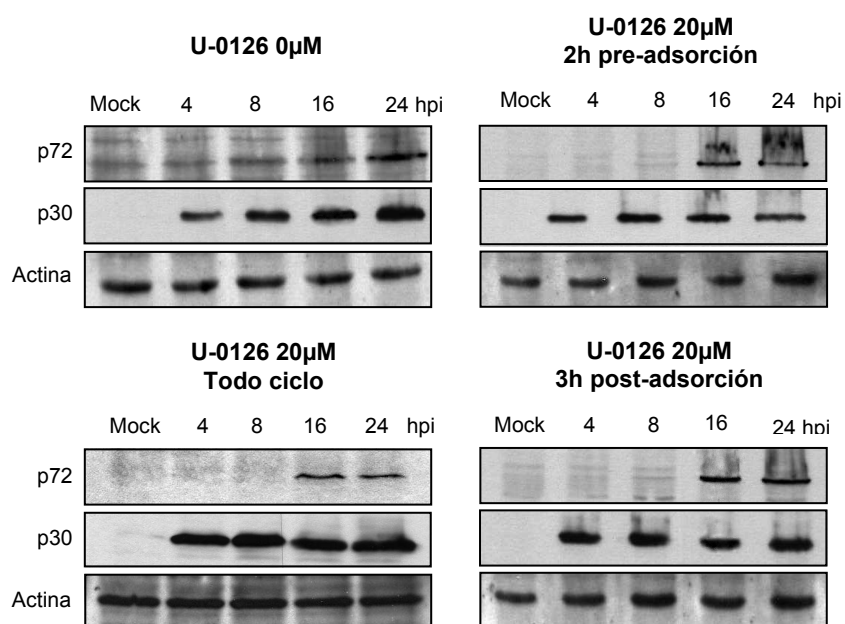


Figura 39. Síntesis de proteínas virales en presencia del inhibidor de las ERK/MAPK. Células Vero infectadas a una mdi=0,5 ufp/cél fueron recogidas a distintos tiempos postinfección y procesadas para determinar por WB los niveles de síntesis de proteínas virales en presencia del inhibidor de las ERK/MAPK. El inhibidor fue añadido antes de la adsorción del virus, después de la adsorción, o bien se mantuvo presente durante todo el ciclo infeccioso. Mock: Células no infectadas. La detección de actina se utilizó como control interno de carga de las muestras.

Discusión

1. Efecto de la lovastatina y los inhibidores de prenilación en el ciclo infectivo del VPPA

Las estatinas, como inhibidores de la síntesis del colesterol, fueron las primeras drogas en usarse para el tratamiento de la hipercolesterolemia (Corsini, *et al.*, 1995). Su uso en clínica permitió descubrir su efecto beneficioso en el tratamiento de la aterosclerosis, debido a su capacidad de inhibir procesos inflamatorios (Guijarro, *et al.*, 1998; Arnaud, *et al.*, 2005), y de la infección por virus como el VIH (del Real, *et al.*, 2004; Giguere y Tremblay, 2004; Nabatov, *et al.*, 2007), CMV (Potena, *et al.*, 2004), VHC (Ye, J., *et al.*, 2003; Ikeda y Kato, 2007), virus de la polio (Liu, S., *et al.*, 2006), virus Sendai (Saladino, *et al.*, 2003) y el VRS (Gower y Graham, 2001). La mayoría de los múltiples beneficios conseguidos por el tratamiento con estas drogas no parecen tener relación, sin embargo, con la reducción del colesterol, sino con la de los isoprenoides FPP y GGPP (Figura 2). Estos metabolitos intermedios de la ruta biosintética del colesterol participan en la modificación postraduccional de una gran variedad de proteínas celulares, entre las que las que destacan varios miembros de la superfamilia Ras (Maurer-Stroh, *et al.*, 2003).

El caso del VIH ilustra perfectamente el hecho de que el efecto de las estatinas pueda depender, en mayor medida, de la depleción de los isoprenoides, y no de la del colesterol. Las estatinas reducen la infectividad del VIH a través de varios mecanismos diferentes. Uno de ellos consiste en impedir la prenilación de la GTPasa monomérica RhoA, cuya activación es necesaria para la entrada en las células de las partículas infecciosas (del Real, *et al.*, 2004). Esta inhibición de la endocitosis del VIH es contrarrestada cuando se complementa la incubación con lovastatina con mevalonato o GGPP, pero no con colesterol ni FPP. Esto permite la prenilación (geranilgeranilación) de RhoA y el restablecimiento de su actividad. Igualmente, el tratamiento de las células con un inhibidor específico de la GGTasa-I reduce la infectividad del VIH.

En los resultados de esta tesis hemos podido observar como, al infectar con el VPPA células Vero incubadas con lovastatina, se vio severamente disminuida la capacidad infectiva del virus y, de forma similar al caso del VIH, tanto la adición de mevalonato como de GGPP fueron capaces de revertir el efecto de la lovastatina. La incubación con lovastatina, en consecuencia, afectó a la producción de virus. A diferencia del caso anterior, solamente la coincubación con mevalonato pudo mantener intactos, o incluso superar, los títulos de virus obtenidos en las infecciones control en ausencia de lovastatina. La producción de virus no se mantuvo en los niveles habituales cuando se complementó la lovastatina con colesterol, FPP o GGPP, ni cuando fue

complementada con distintas combinaciones de dichos compuestos. Esto indicaría que la presencia de GGPP en las células bastaría para conservar intacta la capacidad infectiva del VPPA, aunque sería insuficiente para mantener la producción de virus. Para ello, el VPPA requiere, o bien la integridad de la ruta biosintética del colesterol, o bien algún otro de los intermediarios de la cadena que no hemos incorporado a nuestro estudio.

Una manera de respetar la integridad de la cadena de síntesis del colesterol y estudiar la posible implicación de los isoprenoides en el ciclo infectivo del VPPA, es recurrir al uso de inhibidores de las preniltransferasas. La inhibición de la farnesilación no afectó en absoluto a la capacidad infectiva del VPPA, infectándose un número similar de células tanto en presencia como en ausencia del inhibidor utilizado. En cambio, al cuantificar la progenie vírica obtenida, se observó que la presencia del inhibidor de la farnesilación durante la entrada del VPPA en las células Vero provocaba una disminución de la progenie viral. La presencia de dicho inhibidor una vez que ya había comenzado el ciclo infectivo (3hpi), no afectó a la producción de virus. Este hecho apuntaría a que, durante la entrada del virus, se activarían una o varias proteínas que requerirían la incorporación de un grupo farnesilo para su actividad, y que la participación de estas proteínas sería necesaria para el correcto desarrollo del ciclo infectivo del VPPA, no siendo precisas, en cambio, para el mismo proceso de entrada del virus. Entre los sustratos de la enzima FTasa podemos encontrar muchos miembros de la superfamilia Ras, como H-Ras, K-Ras, N-Ras, Ras2, Rap2, RhoB (el cual también puede ser geranilgeranilado), RhoD, RhoE, Rheb, TC10 y TC21, filamentos intermedios nucleares (lámina A y B), la enzima fosfodiesterasa α de GMP_c, varias subunidades γ de proteínas G heterotriméricas y proteínas de choque térmico homólogas a DnaJ (hsp40), entre otras (Maurer-Stroh, *et al.*, 2003).

El otro inhibidor de prenilación utilizado en nuestro estudio afecta a la enzima GGTasa-I, por lo que la familia de las GTPasas Rab, preniladas por la enzima GGTasa-II, quedaron fuera del estudio. La capacidad infectiva del VPPA se vio reducida en presencia de dicho inhibidor, así como la producción de virus. Hay que destacar el hecho de que este inhibidor fue capaz de reducir los títulos virales tanto si era añadido antes como después de la adsorción (3hpi). Estos datos indicarían que el VPPA requeriría la participación durante varias etapas de su ciclo infectivo de proteínas que incorporasen el geranilgeranilo, incluyendo el paso de la entrada en las células. Entre las proteínas capaces de ser preniladas por la enzima GGTasa-I se hallan distintas GTPasas de la superfamilia Ras, como Rac1, Rac2, RalA, Rap1, RhoA, RhoB (el cual también es farnesilado), RhoC y Cdc42, algunas subunidades γ de proteínas G

y la enzima fosfodiesterasa β de GMPc, entre otras (Maurer-Stroh, *et al.*, 2003).

Podría darse el caso de que las preniltransferasas celulares pudieran tener como sustratos proteínas del VPPA, como sucede con el antígeno grande del virus de la hepatitis D (Glenn, *et al.*, 1992; Lai, 1995). El VPPA codifica su propia preniltransferasa (ORF B318L; Alejo, *et al.*, 1997; Alejo, *et al.*, 1999), la cual sintetiza principalmente GGPP. Esta preniltransferasa del virus es expresada en las etapas tardías de la infección y se encuentra asociada a las membranas de las factorías virales. Debido a su localización, es probable que su función sea la de generar grupos geranilgeranilo que serán incorporados a proteínas que jueguen algún papel en la replicación del virus, tanto virales como celulares. En este sentido, la preniltransferasa viral podría estar generando un exceso de GGPP en la factoría viral para que fuera incorporado por la enzima GGTasa-I a proteínas virales o celulares que participasen en la morfogénesis de los viriones. Al añadir el inhibidor de la GGTasa-I tras la entrada del VPPA en las células, podríamos estar afectando entonces a la morfogénesis de los viriones. La necesidad de GGPP durante la entrada del virus (observada tanto con el uso de lovastatina como del inhibidor de la GGTasa-I) podría ser entonces para permitir el funcionamiento de proteínas celulares que facilitasen la entrada del virus, mientras que la presencia de GGPP en los tiempos tardíos sería necesaria para la actividad de proteínas que condujesen a una correcta morfogénesis viral.

La GTPasa Ras, que precisa incorporar un grupo farnesilo para su actividad, es una buena candidata a ser activada durante la entrada del virus. Esta proteína regula vías de señalización celulares que controlan procesos como la expresión de genes y la proliferación celular (Repasky, *et al.*, 2004). La activación de Ras durante la entrada del VPPA podría ser importante para poner en marcha una serie de factores celulares que favorecerían de algún modo la replicación del VPPA.

Al igual que prácticamente todos los virus, el VPPA explota el citoesqueleto celular durante su entrada en las células (Dohner, *et al.*, 2005; Dohner y Sodeik, 2005; Radtke, *et al.*, 2006). En concreto, el VPPA utiliza el transporte microtubular asociado a la dineína para alcanzar las proximidades del núcleo y comenzar su replicación (Alonso, *et al.*, 2001). Durante su transporte por el citoplasma de la célula, el virus viaja dentro de una vesícula endocítica (Valdeira y Geraldés, 1985; Alcamí, *et al.*, 1989). Las GTPasas de la familia Rho son una familia de proteínas que desempeñan multitud de tareas en las células, entre las que se hallan el control del citoesqueleto y el tráfico de vesículas. Estas proteínas requieren para su activación de la incorporación de un grupo geranilgeranilo. Como hemos visto, la carencia de GGPP por el efecto de la lovastatina

o la inhibición de la enzima GGTasa-I, reducen la infectividad del VPPA en las células Vero. Esto podría deberse a la posible anulación de la actividad de las GTPasas Rho y, en consecuencia, a un incorrecto funcionamiento del citoesqueleto, con lo que el VPPA no podría llegar a la región perinuclear y comenzar su replicación.

2. Papel de las GTPasas Rho en el ciclo infectivo del VPPA

Esta familia de GTPasas monoméricas, perteneciente a la superfamilia Ras, regula multitud de procesos celulares y controlan diferentes aspectos de la maquinaria celular, entre los que podemos destacar la regulación del citoesqueleto y el tráfico de vesículas (Etienne-Manneville y Hall, 2002; Qualmann y Mellor, 2003). Así pues, RhoA es capaz de estabilizar y promover la orientación de los microtúbulos (Cook, *et al.*, 1998; Palazzo, *et al.*, 2001), y Rac1 y Cdc42 son capaces de interaccionar con los microtúbulos y promover la polimerización de los mismos (Best, *et al.*, 1996; Daub, *et al.*, 2001; Fukata, *et al.*, 2002). Estas tres GTPasas están implicadas, además, en los fenómenos de la fagocitosis, la pinocitosis y la endocitosis, tanto la dependiente como la independiente de clatrina (Qualmann y Mellor, 2003). Estas tres proteínas no son los únicos miembros de la familia Rho que participan en los procesos endocíticos, puesto que RhoD ha sido asociado al tráfico de los endosomas tempranos (Randazzo, 2003) y RhoB vinculado a los endosomas tardíos (Ridley, 2001). Debido a todas estas razones, las GTPasas de la familia Rho son proteínas candidatas a participar en la entrada del VPPA, el cual, como se comentado anteriormente, entra en las células que infecta a través de una endocitosis mediada por receptor y utiliza el transporte microtubular asociado a la dineína (Valdeira y Geraldés, 1985; Alcamí, *et al.*, 1989; Alonso, *et al.*, 2001).

La inhibición de las GTPasas Rho durante la entrada del VPPA redujo la producción de virus a la mitad, hecho que no sucedió al inhibirlas una vez que el virus ya había empezado su ciclo replicativo. Este hecho nos llevó a pensar que la actividad de las GTPasas Rho sería necesaria para la entrada del VPPA en las células Vero. Con ese fin, estudiamos el estado de los microtúbulos durante la entrada del VPPA y el posible papel de las GTPasas Rho en el mismo.

Una manera de conocer el estado de los microtúbulos es estudiando su grado de acetilación, el cual es una medida del nivel de estabilidad y funcionalidad de los mismos (Piperno, *et al.*, 1987). A los 30mpi, el nivel de acetilación de los microtúbulos alcanzó un pico máximo cuatro veces mayor que el nivel basal. El grado de acetilación de los microtúbulos se mantuvo por encima del nivel basal incluso 3h después del inicio de la infección. Por el contrario, la inhibición de las GTPasas Rho

redujo considerablemente el grado de acetilación de los microtúbulos durante la entrada del virus, quedando por debajo incluso del nivel basal. Este resultado apoyaba fuertemente la hipótesis de que las GTPasas Rho modularan el estado de los microtúbulos durante la entrada del VPPA, favoreciendo el paso de la entrada del virus en las células. Si esto era así, la inhibición de estas GTPasas debía comprometer seriamente la infectividad del VPPA.

Al examinar la capacidad infectiva del virus en presencia del inhibidor de dichas GTPasas, descubrimos que no se veía afectada en absoluto. Este hecho resultó ser muy llamativo puesto que la producción de virus y la estabilidad de los microtúbulos se vieron afectadas al estar inhibidas las GTPasas Rho durante la entrada del VPPA. El conjunto de estos hallazgos, en apariencia contradictorios, era totalmente contrario a lo que acontece en otros modelos virales. En el caso del VIH, la activación de RhoA permite la fusión de su envuelta con la membrana plasmática, liberándose el core del virus en el citoplasma de la célula (del Real, *et al.*, 2004). Los adenovirus requieren también la participación de las GTPasas Rho para su entrada en las células, en concreto de Rac1 y Cdc42, puesto que en células que expresan de manera transitoria mutantes dominantes negativos de cualquiera de las dos GTPasas se resiente la internalización de partículas adenovirales (Li, *et al.*, 1998a). La entrada del VMI del VV requiere también de la activación de Rac1 (Locker, *et al.*, 2000), no así en cambio el VEE. Durante la entrada del VHH-8, se activan las GTPasas RhoA y Rac1 (Naranatt, *et al.*, 2005). La entrada del VHH-8 provoca también un incremento del grado de acetilación de los microtúbulos, el cual parece estar mediado por la activación de RhoA. La inhibición de las GTPasas Rho, mediante un inhibidor específico, conlleva una disminución de la acetilación de la tubulina, además de reducir el transporte del genoma viral al núcleo celular. Esta reducción de la tubulina acetilada, por el contrario, no impidió el transporte de las partículas de VPPA hasta la periferia nuclear y el establecimiento de la infección. Aunque la inhibición de las GTPasas Rho disminuyó el nivel de tubulina acetilada en las células, no la hizo desaparecer totalmente, por lo que los pocos microtúbulos que permanezcan estables en dichas condiciones en las células infectadas deben ser suficientemente funcionales como para permitir el transporte de los viriones a través del citoplasma celular. Una situación parecida se da cuando la despolimerización de los microtúbulos con nocodazol no evita totalmente el transporte de viriones desde la factoría viral hasta la membrana plasmática, al no despolimerizarse el 100% de los microtúbulos (Jouvenet, *et al.*, 2004). En cambio, en células no infectadas la despolimerización de los microtúbulos es total. Los microtúbulos resistentes están fuertemente acetilados, y los viriones aparecen asociados preferentemente a este tipo de

microtúbulos. Parece, por tanto, que la infección por el VPPA confiere cierta resistencia a la despolimerización de los microtúbulos, induciendo la estabilización (acetilación) selectiva de aquellos microtúbulos que están siendo utilizados por partículas víricas para su transporte.

Durante la entrada del VPPA, podrían activarse otras vías de señalización, además de las dependientes de las GTPasas Rho, que pudieran también regular el estado de los microtúbulos. Esto podría permitir que, aunque se inhibieran las GTPasas Rho, quedase una cantidad suficiente de microtúbulos acetilados que el VPPA pudiera utilizar para transportarse por el citoplasma celular. Estas vías alternativas podrían ser dependientes de la activación de las kinasas PKA y p38/MAPK (Feijoo, *et al.*, 2005; Kashina y Rodionov, 2005; Jia, *et al.*, 2006), como ocurre en el caso de los adenovirus, cuyo transporte al núcleo parece estar dirigido por la acción de estas kinasas celulares (Suomalainen, *et al.*, 2001).

De las tres GTPasas Rho más conocidas, Rac1 fue la única que vio incrementado su grado de activación durante la entrada en las células del VPPA. A diferencia de los ejemplos enumerados anteriormente, esta activación no parece ir ligada, en cambio, a la internalización de los viriones en las células ni a la regulación de los microtúbulos. La expresión transitoria en células Vero de un mutante dominante negativo, un mutante constitutivamente activo o la forma nativa de Rac1 en fusión a GFP, permitió comprobar que eran capaces de penetrar en células expresando cualquiera de las tres formas de Rac1 el mismo número de partículas virales. Además, permitió comprobar también, que las partículas de virus podían llegar hasta las proximidades del núcleo aun estando interferida la actividad de Rac1.

Habiendo comprobado que la disminución de los títulos de virus que se producía tras la inhibición de las GTPasas Rho, en concreto de Rac1, durante la entrada del VPPA en las células Vero, nada tenía que ver con una reducción de la infectividad del virus, las causas tenían que hallarse en etapas más tardías de la infección. La inhibición de las GTPasas Rho provoca grandes cambios morfológicos en las células, debidos, sobre todo, a la profunda reorganización o desorganización de las estructuras del citoesqueleto (Fiorentini, *et al.*, 1989; Malorni, *et al.*, 1990; Grossmann, *et al.*, 2000). Estudiamos entonces el estado del citoesqueleto en los tiempos tardíos de la infección. En general, no se hallaron grandes diferencias en células infectadas en ausencia del inhibidor de las GTPasas Rho respecto a células infectadas en presencia de dicho inhibidor, ya que la infección del VPPA *per se* produce una retracción celular de características similares a la provocada por el inhibidor de las GTPasas Rho. En cuanto al estado del citoesqueleto en células no infectadas y en células infectadas, en ausencia

del inhibidor, se hallaron las diferencias ya descritas en la literatura (Carvalho, *et al.*, 1988; Heath, *et al.*, 2001; Jouvenet y Wileman, 2005; Stefanovic, *et al.*, 2005; Jouvenet, *et al.*, 2006). En presencia del inhibidor, la factoría viral quedó igualmente englobada en un acúmulo de vimentina y tubulina, sin poder distinguirse los filamentos microtubulares. Los microtúbulos acetilados se concentraron también, principalmente, alrededor de la factoría viral. Los cambios más significativos se observaron en los microfilamentos de actina. La inhibición de las GTPasas Rho provoca una retracción de las células, adoptando un aspecto arborizado, con múltiples ramificaciones de actina (Fiorentini, *et al.*, 1989; Malorni, *et al.*, 1990), mientras que, la infección de esas mismas células con el VPPA provoca la desaparición de esas ramificaciones de actina. La infección por el VPPA en ausencia del inhibidor de las GTPasas Rho, produce cambios en la organización de la actina. Este hecho podría llevar a pensar que el VPPA podría ejercer algún tipo de control sobre las GTPasas Rho, pero la observación de cambios en la actina en células infectadas en presencia del inhibidor obliga a desechar tal idea. El VPPA debe ser capaz de regular la distribución de los microfilamentos de actina a través de otro mecanismo, sin recurrir a la acción de las GTPasas de la familia Rho. La explicación a este fenómeno podría hallarse en el propio virus, el cual codifica en su genoma dos proteínas homólogas a la actina (Ferreira, 1996). Estas dos proteínas del virus podrían tener la capacidad de regular la distribución de la actina celular, sin necesitar para ello la participación de las proteínas Rho.

En células infectadas incubadas con el inhibidor de las GTPasas Rho, se observaron con cierta frecuencia factorías virales que no presentaban su forma característica, esto es, densa y compacta, sino una forma más laxa y dispersa en el citoplasma celular (Figuras 22D y 26D). Esto nos llevó a pensar que quizá la inhibición de las GTPasas Rho tuviera algún efecto adverso en la constitución de la factoría viral y, quizá también, en la morfogénesis de los viriones. La observación de las factorías virales por microscopía electrónica aclaró la cuestión. En presencia del inhibidor de las GTPasas Rho, se acumularon en las factorías virales grandes cantidades de precursores de membrana. Esta acumulación puede deberse a la incapacidad de formarse partículas virales completas, ya que, comparando el aspecto de estas factorías con otras formadas en ausencia de inhibidor, se apreció una menor cantidad de partículas virales generadas, tanto maduras como inmaduras. Al observar el aspecto de los viriones que alcanzaban la membrana plasmática se descubrió que muchos de ellos eran defectivos, que no contenían el nucleoide electrodenso característico de los viriones maduros. Tampoco se observaron en las células infectadas, en presencia del inhibidor, las prolongaciones tipo filopodio características generadas por los viriones en la membrana plasmática

(Carvalho, *et al.*, 1988; Jouvenet, *et al.*, 2006). Esto sugiere la participación de las GTPasas Rho en la generación de estas proyecciones.

La deficiente morfogénesis de los viriones en presencia del inhibidor de las GTPasas Rho, no podía ser atribuida a una carencia de energía en las factorías que impidiese los procesos que conducen a una correcta morfogénesis de los viriones, ya que se siguió observando la relocalización de las mitocondrias alrededor de las factorías. Sí se observó, en cambio, una gran carencia de ribosomas, comparando con factorías generadas en ausencia del inhibidor. El desarrollo de la infección en presencia del inhibidor no disminuyó en absoluto la síntesis de proteínas virales. Esto permitió descartar que el defecto en la morfogénesis pudiera ser debido a una síntesis menor de proteínas virales. El problema podría estar en que no fueran sintetizadas en el lugar adecuado. Esto sería catastrófico en el caso de las proteínas estructurales de la partícula viral, que no podrían interactuar con las membranas procedentes del RE y formar así los nuevos viriones. Esta posibilidad parece poco factible, puesto que hemos comprobado que la proteína estructural p54, responsable del transporte a la factoría viral de precursores de membrana derivados del RE (Rodríguez, J. M., *et al.*, 2004), mantiene su localización específica en la factoría viral en presencia del inhibidor de las GTPasas Rho. Así pues, es probable que el resto de proteínas estructurales del virus no pierdan tampoco su localización subcelular específica, ya que la factoría viral sigue quedando encajonada en una estructura de vimentina, hecho que seguramente no permita la libre difusión de estructuras o elementos virales de la factoría hacia el resto del citoplasma (Heath, *et al.*, 2001). En células infectadas en ausencia del inhibidor, los ribosomas se ven principalmente asociados a viriones en proceso de maduración (Carvalho, *et al.*, 1988), y no a precursores de membrana, por lo que, la menor cantidad de ribosomas en las factorías en presencia del inhibidor, sea debida, simplemente, a la menor formación de viriones.

Durante la infección de células Vero por el VPPA aumenta la expresión de chaperonas, como la hsp27, la hsp60 y la hsp70 en etapas tardías, prohibitina y proteínas del metabolismo redox, como la Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD) o la tiorredoxina (Rojo, *et al.*, 1998; Alfonso, *et al.*, 2004; Netherton, C. L., *et al.*, 2004). Las chaperonas tienen como funciones principales asistir en el plegamiento correcto y la maduración de las nuevas proteínas sintetizadas en las células, así como proteger del daño producido en situaciones de estrés celular (Macario y Conway de Macario, 2007). En otros modelos víricos también ha sido observada la expresión de distintas chaperonas y su actividad ha demostrado ser importante para el desarrollo del ciclo infectivo de distintos virus como el VHS, CMV, paramixovirus, adenovirus,

papilomavirus, reovirus y el virus de la gripe, entre otros (Collins y Hightower, 1982; Nevins, 1982; Santomena y Colberg-Poley, 1990; Hogue y Nayak, 1992; Kobayashi, *et al.*, 1994; Leone, *et al.*, 1996; Florin, *et al.*, 2004). Las prohibitinas participan en distintos procesos celulares como el ensamblaje de la cadena respiratoria mitocondrial y la inhibición de la apoptosis (Nijtmans, *et al.*, 2000; Coates, *et al.*, 2001; Fusaro, *et al.*, 2002). La tiorredoxina y la Mn-SOD cumplen un papel antioxidante y ayudan a mantener la homeostasis redox en las células (Johnson, F. y Giulivi, 2005; Michelet, *et al.*, 2006; Oktyabrsky y Smirnova, 2007). La expresión de estas proteínas y su participación en distintos procesos del ciclo infectivo de varios virus ha sido descrita en el virus del síndrome del moteado blanco de la gamba (Clavero-Salas, *et al.*, 2007), virus del sarampión (Wang, *et al.*, 2003), virus de Epstein-Barr (Dalpke, *et al.*, 2003), virus de la encefalitis japonesa (Liao, *et al.*, 2002), virus linfotrópico humano de células T tipo I (HTLV-I; (Sasada, *et al.*, 2002), bacteriófago T7 (Johnson, D. E. y Richardson, 2003), VHC (Abdalla, *et al.*, 2005) y virus de la gripe (Styblo, *et al.*, 2007).

Existen ejemplos en la literatura que muestran que la activación de Rac1 puede llevar a la expresión de chaperonas y proteínas del metabolismo redox (Xu, *et al.*, 2000; Fujiwara, *et al.*, 2006). La no activación de Rac1 durante la entrada del VPPA en las células, podría tener como consecuencia que no se indujera la expresión de ciertas proteínas celulares necesarias para la correcta morfogénesis de los viriones, como la hsp70, la tiorredoxina o la Mn-SOD. Las chaperonas celulares podrían facilitar el correcto plegamiento de las proteínas virales y su ensamblaje para la formación de las partículas virales. El correcto ensamblaje de las cápsidas y la maduración de los viriones precisan de un ambiente reductor en el citoplasma de la célula (Cobbold, *et al.*, 2007). La sobreexpresión de las citadas proteínas celulares, junto con las proteínas virales pQP383R (similar a las proteínas NifS de bacterias y levaduras del metabolismo redox; Dixon, L. K., *et al.*, 1994; Yáñez, *et al.*, 1995), pB119L (similar a la proteína ERV1 de *S. cerevisiae*, implicada en la fosforilación oxidativa; Yáñez, *et al.*, 1995) y pA238L (capaz de regular la expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico ;iNOS; Granja, *et al.*, 2006b), podría servir para mantener el ambiente reductor necesario para la correcta morfogénesis viral. Esto podría ser especialmente importante al infectar el VPPA su célula diana en el hospedador porcino, el macrófago. Las células fagocíticas poseen enzimas especiales con capacidad para generar una gran cantidad de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, con las que hacen frente a los patógenos (Gwinn y Vallyathan, 2006). La manipulación, por parte del VPPA, del metabolismo redox, con la batería de proteínas citada, podría ser de vital importancia para la generación de partículas virales maduras y completar con éxito su ciclo replicativo en los macrófagos.

La implicación de las GTPasas Rho en la morfogénesis vírica ha sido demostrada para el VRS (Gower, *et al.*, 2001; Gower, *et al.*, 2005) y el VV (Valderrama, *et al.*, 2006). La GTPasa RhoA es activada a tiempos tardíos durante la infección del VRS. Su inactivación mediante la exoenzima C3 de *C. botulinum*, o la inhibición de su efector, la kinasa Rho (ROCK), mediante un inhibidor específico, no afectó a la capacidad infectiva del virus, ni a la producción de virus, ni a la síntesis de proteínas virales, pero sí afectó a la formación de sincitios y la fusión célula-célula. La inhibición de RhoA provocó un cambio en la morfología de la progenie vírica, pasando de tener los viriones su forma filamentosa característica a una forma esférica. A diferencia de lo observado en el VPPA, el cambio en la morfología de los viriones del VRS no tuvo ningún efecto en la infectividad de los mismos. En el caso del VV, la participación de la GTPasa RhoA produce el efecto contrario al observado en el VRS y el VPPA. La actividad de RhoA durante el ciclo infectivo del VV inhibe la motilidad celular, lo cual perjudica la diseminación del virus, y provoca graves fallos en la morfogénesis de la progenie viral. Para evitar los efectos de la activación de RhoA, el VV cuenta con la proteína pF11L, que interacciona con e inhibe a RhoA.

3. Activación de Rap1

Rap1 es una GTPasa monomérica de la familia Ras que precisa la incorporación de un grupo geranilgeranilo para su actividad (Bos, *et al.*, 2001; Stork, 2003; Bos, 2005). Esta modificación postraducciona permite la asociación de Rap1 con membranas intracelulares, principalmente en la membrana plasmática, la región perinuclear y vesículas endocíticas y exocíticas. Rap1 puede ser activado por múltiples señales extracelulares, canalizadas a través de muy variados receptores celulares como RTK, GPCR, receptores de citoquinas y moléculas de adhesión celular. Esta activación puede estar mediada por segundos mensajeros como el AMPc, el Ca^{2+} y el DAG. No es de extrañar entonces que Rap1 pueda estar implicado en multitud de procesos celulares como diferenciación celular, secreción, adhesión celular mediada por integrinas y proliferación celular. Para regular todas estas funciones celulares, Rap1 cuenta con múltiples efectores, entre los que se encuentran la PLC ϵ , la PI3K, B-Raf, p38/MAPK y Rac1. Recientemente, se ha descrito la interacción entre Rap1 e IQGAP1 en la periferia celular (Jeong, *et al.*, 2007). IQGAP1 es una proteína asociada al citoesqueleto capaz de interaccionar también con Rac1 (Fukata, *et al.*, 2002; Briggs y Sacks, 2003). La interacción de Rap1 con IQGAP1 podría otorgar a Rap1 un papel en la regulación del estado de los microtúbulos.

El uso de un inhibidor de la geranilgeranilación había demostrado que para la entrada del VPPA era necesaria la participación de una o varias proteínas que incorporasen un grupo geranilgeranilo para ejercer sus actividades. La entrada del virus se da por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor, posiblemente a través de vesículas recubiertas de clatrina (Valdeira y Geraldés, 1985; Alcamí, *et al.*, 1989). Rap1 podría ser una molécula implicada en la entrada del VPPA en las células Vero puesto que precisa ser geranilgeranilada para su activación, y se encuentra asociada a vesículas endocíticas (Pizon, *et al.*, 1994). Al estudiar su grado de activación durante la entrada del VPPA, se observó que Rap1 sufría una fuerte activación, alcanzando un pico máximo a los 20mpi.

La activación de Rap1 podía ser el estímulo que condujera a la activación de Rac1 durante la entrada del VPPA en las células Vero. Se ha descrito que esta activación estaría mediada por la interacción de Rap1 con dos GEFs de Rac1, Vav2 y Tiam1 (Maillet, *et al.*, 2003; Arthur, *et al.*, 2004). Si la activación de Rap1 solamente condujera a la activación de Rac1, entonces Rap1 no tendría ningún papel en la entrada del VPPA, pero sí en la morfogénesis de la progenie viral. Harían falta más experimentos para dilucidar la posible activación Rac1 por la activación de Rap1, y la posible implicación de este último en el proceso de la entrada del VPPA en las células Vero.

4. Papel de las familias de kinasas PI3K, PKC y ERK/MAPK en el ciclo infeccioso del VPPA

Estas tres familias de kinasas regulan importantes procesos celulares como la supervivencia y la proliferación celular, y tienen la capacidad de regular el estado del citoesqueleto y el tráfico de vesículas (Mellor y Parker, 1998; Toker, 1998; Wymann y Pirola, 1998; Di Fiore y De Camilli, 2001; McPherson, *et al.*, 2001; Becker y Hannun, 2003, 2004; Hawkins, *et al.*, 2006; Larsson, 2006; Yoon y Seger, 2006). Por ello, eran proteínas candidatas a participar en el ciclo infeccioso del VPPA, especialmente en la etapa de la entrada del virus en las células.

Los resultados obtenidos al inhibir la actividad de las familias de la PI3K y la PKC mostraron que ambas familias de proteínas deben participar en la entrada del VPPA en las células Vero, puesto que la infectividad del virus se ve reducida en presencia de inhibidores específicos de ambas vías de señalización. La síntesis de proteínas virales también se vio afectada al añadir los inhibidores antes de la adsorción del virus, ya que, si se infectaba un menor número de células, tenía que haber una menor síntesis total de proteínas virales en el cultivo. Al analizar los títulos de virus

obtenidos en presencia de dichas drogas a distintos tiempos de la infección, se pudo comprobar que eran menores cuando se añadían antes de la adsorción del virus a las células. A un menor número de células infectadas en cultivo, tenía que obtenerse una progenie vírica menor.

La participación de las familias de la PI3K y la PKC ha sido descrita en la entrada de varios virus. Por ejemplo, los adenovirus requieren la activación de la PI3K para consumar su endocitosis en las células (Li, *et al.*, 1998b), mientras que el VV requiere la activación de la PKC (Locker, *et al.*, 2000; de Magalhaes, *et al.*, 2001). El HHV-8 requiere la activación de la PI3K para su entrada en las células y la activación de la PKC ζ en un paso inmediatamente posterior a la entrada (Naranatt, *et al.*, 2003). La PKC β II es necesaria para la endocitosis del virus de la gripe (Sieczkarski, *et al.*, 2003). El VRS activa varias isoformas de la PKC en distintas etapas de su ciclo infeccioso. Durante su entrada en las células resulta activada la isoforma atípica PKC ζ , en etapas más tardías resultan activadas las isoformas PKC β I, δ , ϵ y μ . La estimulación de estas isoformas de la PKC resulta en una activación bifásica de las ERK/MAPK, una durante la entrada del VRS y la otra en etapas más tardías de la infección (Monick, *et al.*, 2001).

El uso de un inhibidor de las ERK/MAPK arrojó resultados distintos. La infectividad del virus y la síntesis de proteínas virales no se vieron reducidas en presencia del inhibidor, independientemente del momento de la infección en el que fuera añadido. En cambio, los títulos de virus obtenidos sí se vieron afectados, sobre todo al mantener el inhibidor durante todo el ciclo infeccioso o al añadirlo a las 3hpi. En cuanto a si la presencia del inhibidor durante la entrada del virus resulta perjudicial para el desarrollo del ciclo infeccioso del VPPA, parece ser dependiente de la concentración de la droga ensayada. De hecho una concentración baja de inhibidor (10 μ M) no reduce la producción de virus, y sí, en cambio, una concentración alta (50 μ M). Podría ser que, a bajas concentraciones, al retirarse el inhibidor del medio, las células sean capaces de eliminar rápidamente el inhibidor que han incorporado, minimizando así los efectos adversos que pudiera ejercer en la replicación del virus. Si el inhibidor solamente fuera perjudicial para el virus una vez comenzada su replicación, utilizar una concentración alta de inhibidor antes de la adsorción viral, podría provocar que el remanente de inhibidor que las células no hubieran sido capaces de eliminar para entonces, pudiera afectar a la replicación del virus, lo cual quedaría reflejado en unos títulos de virus menores. El hecho de que la producción de virus sea menor al mantener el inhibidor durante todo el ciclo infeccioso, que cuando se añade a las 3hpi, apoya la hipótesis de que las ERK/MAPK participen de alguna manera durante la entrada del virus. Así pues, que la producción de virus no se vea afectada cuando el inhibidor es añadido a 10 μ M antes

de la adsorción y es retirado tras la misma, puede ser debido a la rápida eliminación de este por las células.

La participación de las ERK/MAPK ha sido descrita en el ciclo infectivo de una gran cantidad de modelos víricos distintos. La anulación de su actividad tiene distintas consecuencias, según el modelo del que se trate. En el virus de la enfermedad de Borna, por ejemplo, la inhibición de las ERK/MAPK reduce la diseminación de los viriones (Planz, *et al.*, 2001), mientras que en el caso del virus Visna perjudica su replicación (Barber, *et al.*, 2002). La inhibición de las ERK/MAPK durante la replicación del VIH no afecta a la producción de virus, pero sí a la infectividad de los nuevos viriones generados. Esto podría ser debido a que las ERK/MAPK fosforilan a las proteínas víricas Rev, Tat y Nef, entre otras (Yang y Gabuzda, 1999). La entrada en las células del VHH-8 inicia la transducción de distintas señales bioquímicas, entre las que se encuentran la de las ERK/MAPK. La activación de estas kinasas no es necesaria para la entrada del virus, pero sí para la expresión de distintos genes, tanto virales como celulares, necesarios para la replicación del virus (Naranatt, *et al.*, 2003; Sharma-Walia, *et al.*, 2005). En muchos modelos víricos se ha observado una activación bifásica de la familia de las ERK/MAPK: la primera durante la entrada de los virus y la segunda en etapas más tardías de la infección, normalmente cuando ha empezado la replicación de sus genomas o la síntesis de proteínas virales. Anular la actividad de estas kinasas tiene como consecuencia la reducción de la síntesis de proteínas virales y/o de la producción de virus. Ejemplos de una activación bifásica de la ERK/MAPK los encontramos en el virus de Coxsackie B3 (Luo, *et al.*, 2002), virus de la gripe (Pleschka, *et al.*, 2001), el VRS (Monick, *et al.*, 2001) y el VV (de Magalhaes, *et al.*, 2001; Andrade, *et al.*, 2004).

El modelo del VPPA podría ajustarse a una activación bifásica de la cascada de las ERK/MAPK: la primera activación se daría durante la entrada del virus, permitiendo la expresión de genes celulares y quizá también de genes virales; la segunda se daría una vez que hubiera empezado la replicación del genoma viral y la síntesis de proteínas tardías, regulando la expresión de genes y/o distintos procesos celulares que permitieran la morfogénesis de los viriones.

5. Modelo de la entrada del VPPA en las células Vero

Los experimentos realizados con lovastatina y el inhibidor de la geranilgeranilación, revelaron que la entrada del VPPA en las células Vero debe ser mediada por proteínas que requieren la incorporación de un grupo geranilgeranilo para su actividad. Existen multitud de proteínas celulares capaces de ser geranilgeraniladas, como distintos miembros de las familias Ras y Rho y varias subunidades γ de las

proteínas G heterotriméricas. Descartada la participación de las GTPasas RhoA, Rac1 y Cdc42 mediante el uso de un inhibidor específico, la responsabilidad de mediar la entrada del VPPA debe recaer sobre otras proteínas (Figura 40).

En un apartado anterior se ha discutido el posible papel que podría tener Rap1 en la entrada del VPPA, debido a su posible implicación en el tráfico de vesículas. Aunque podría ser también que Rap1 no participara en la entrada del VPPA. En consecuencia, la entrada del virus podría estar mediada por proteínas como RhoB o las GTPasas heterotriméricas. RhoB podría ser un buen candidato al estar presente tanto en la membrana plasmática como en los endosomas (Adamson, *et al.*, 1992; Robertson, *et al.*, 1995). No obstante, su posible implicación en la entrada del VPPA podría no estar tan clara puesto que puede ser tanto farnesilado como geranilgeranilado. Además, parece que su presencia en los endosomas se daría cuando incorporase un grupo geranilgeranilo (Lebowitz, *et al.*, 1995), lo cual aumenta las probabilidades de su participación en la entrada del VPPA.

La participación de las proteínas G heterotriméricas parece probable también. Estas proteínas suelen encontrarse en la membrana plasmática asociadas a RTK o a GPCR. La unión de un ligando a estos receptores estimula la activación de estas GTPasas, que a su vez estimulan la actividad de distintas enzimas que se hallan también en la membrana plasmática como la adenilato ciclasa (AC; responsable de la generación de AMPc), la PLC β o la PI3K (Morris y Malbon, 1999). El AMPc activa la PKA y también puede mediar la activación de Rap1, de una manera dependiente o independiente de la PKA (Bos, *et al.*, 2001). La acción de la PLC β genera DAG y provoca la liberación de Ca²⁺ de los reservorios intracelulares. Tanto el DAG como el Ca²⁺ pueden activar a Rap1 y la PKC (Mellor y Parker, 1998; Bos, *et al.*, 2001). La activación de las GTPasas heterotriméricas puede conducir también a la activación de Ras (Landry, *et al.*, 2006), el cual precisa ser farnesilado para ser activado. El uso de un inhibidor de la farnesilación indicó que, durante la entrada del VPPA, deben activarse una o varias proteínas farnesiladas y que su activación es necesaria para la producción de virus. La activación de Ras, a su vez, podría llevar a la activación de, Rac1 y también de las ERK/MAPK (Scita, *et al.*, 2000; Repasky, *et al.*, 2004). La activación de estas últimas también podría darse a través de la PKC (Cai, *et al.*, 1997; Schonwasser, *et al.*, 1998). Por último, la activación de Rac1 podría ser debida tanto a la acción de la PI3K como de Rap1 (Han, *et al.*, 1998; Maillet, *et al.*, 2003; Arthur, *et al.*, 2004).

Como ya ha sido detallado anteriormente, el VPPA utiliza el transporte mediado por microtúbulos y, posiblemente, la endocitosis mediada por clatrina durante

su entrada en las células Vero (Valdeira y Gerald, 1985; Alcamí, *et al.*, 1989; Alonso, *et al.*, 2001). Las proteínas G heterotriméricas han sido vinculadas con la regulación del estado de los microtúbulos y la endocitosis mediada por clatrina (Roychowdhury y Rasenick, 1997; Roychowdhury, *et al.*, 1999; Popova y Rasenick, 2004), lo que refuerza la hipótesis de que puedan regular la entrada del VPPA. La participación de la clatrina podría estar regulada también por otras proteínas, como la PI3K y la PKC (Xiang, *et al.*, 2001; Wheeler y Domin, 2006), las cuales son necesarias para la entrada del virus.

Así pues, durante la entrada del VPPA, serían estimulados uno o varios receptores de la superficie celular, lo cual pondría en marcha multitud de cascadas de señalización que conducirían, por una parte, a la entrada del VPPA (PI3K, PKC, proteínas geranilgeraniladas), y, por otra, a la creación de unas condiciones favorables para la replicación del virus (Rac1, ERK/MAPK, proteínas farnesiladas).

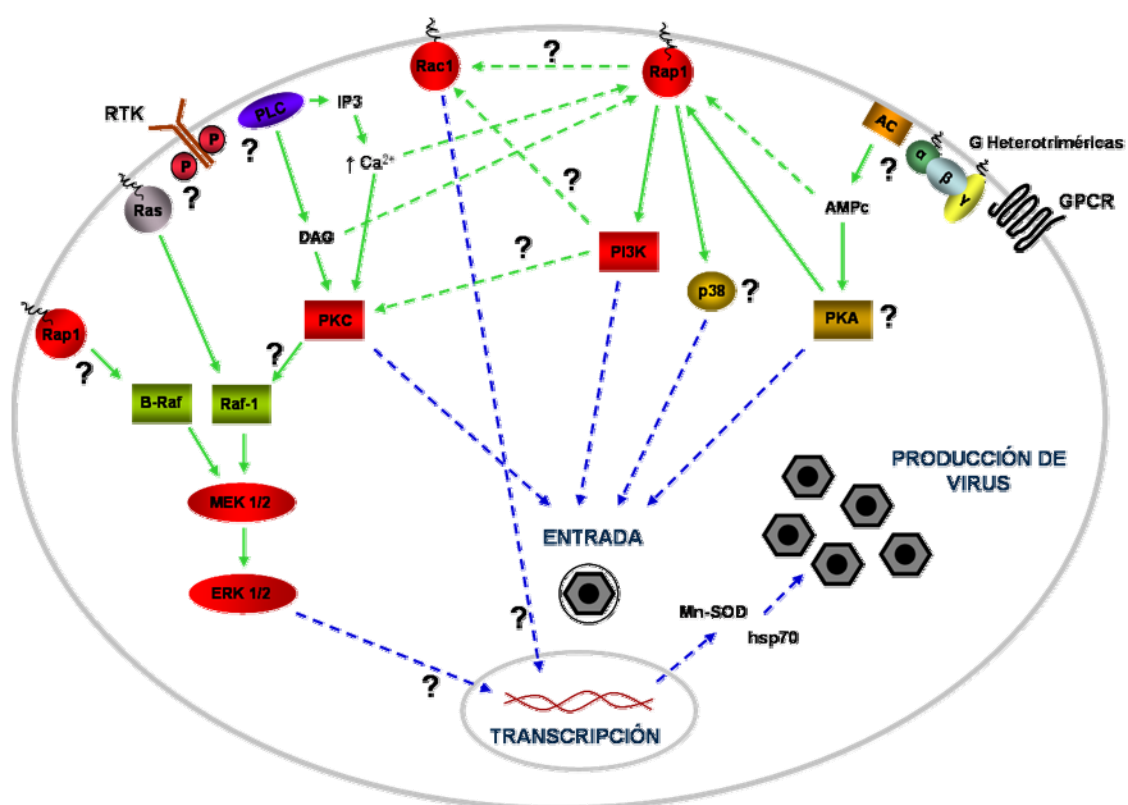


Figura 40. Modelo de las vías de señalización intracelulares implicadas en el ciclo infeccioso del VPPA. En rojo se muestran las proteínas que se ha demostrado en el presente trabajo su participación en diferentes momentos del ciclo infeccioso. Los interrogantes señalan las posibles vías de activación de las proteínas mostradas en rojo y la posible participación de otras proteínas celulares. Las flechas continuas señalan interacciones directas y las discontinuas interacciones indirectas a través de efectores intermedios.

Conclusiones

1. El VPPA requiere la integridad de la ruta biosintética del colesterol para el correcto desarrollo de su ciclo infectivo.
2. El VPPA requiere la participación de proteínas modificadas postraduccionalmente con un grupo farnesilo durante su entrada, y de proteínas modificadas postraduccionalmente con un grupo geranylgeranilo en distintas etapas de su ciclo infectivo, incluida la entrada del virus, para el éxito de su replicación.
3. El VPPA no requiere la participación de las GTPasas Rho para su entrada en las células Vero.
4. Las GTPasas Rho favorecen la estabilización de los microtúbulos durante la entrada del VPPA, pero dicha estabilización no resulta esencial para la entrada del mismo.
5. Rac1 es la GTPasa de la familia Rho que se activa durante la entrada del VPPA., pero esta temprana activación sólo resultará esencial en estadios posteriores de la infección.
6. La inhibición de las GTPasas Rho durante las primeras fases de la infección por el VPPA perjudica la morfogénesis de los viriones y, por tanto, reduce los títulos de virus sin alterar, en cambio, la síntesis de proteínas virales.
7. El VPPA ejerce un control sobre los microfilamentos de actina sin recurrir a las GTPasas Rho. La inhibición de estas GTPasas no afecta a la distribución habitual que presentan los microtúbulos y los filamentos intermedios durante el ciclo infectivo del VPPA.
8. Las GTPasas Rho pueden ser las responsables de la formación de los filopodios durante la exocitosis del VPPA.
9. La GTPasa Rap1, activada por la acción de proteínas como las GTPasas heterotriméricas capaces de incorporar un grupo geranylgeranilo, se activa durante la entrada del VPPA en las células Vero.
10. La participación de las familias de la PI3K y de la PKC es necesaria para la entrada del VPPA en las células Vero, y la de la familia de las ERK/MAPK en etapas más tardías del ciclo infectivo.

Bibliografía



A

- Abdalla, M. Y., Ahmad, I. M., Spitz, D. R., Schmidt, W. N. and Britigan, B. E.** (2005). Hepatitis C virus-core and non structural proteins lead to different effects on cellular antioxidant defenses. *J Med Virol* 76:489-497.
- Adamson, P., Paterson, H. F. and Hall, A.** (1992). Intracellular localization of the P21rho proteins. *J Cell Biol* 119:617-627.
- Afonso, C. L., Alcaraz, C., Brun, A., Sussman, M. D., Onisk, D. V., Escribano, J. M. and Rock, D. L.** (1992). Characterization of p30, a highly antigenic membrane and secreted protein of African swine fever virus. *Virology* 189:368-373.
- Afonso, C. L., Neilan, J. G., Kutish, G. F. and Rock, D. L.** (1996). An African swine fever virus Bc1-2 homolog, 5-HL, suppresses apoptotic cell death. *J Virol* 70:4858-4863.
- Afonso, C. L., Piccone, M. E., Zaffuto, K. M., Neilan, J., Kutish, G. F., Lu, Z., Balinsky, C. A., Gibb, T. R., Bean, T. J., Zsak, L. and Rock, D. L.** (2004). African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes affect host interferon response. *J Virol* 78:1858-1864.
- Alcamí, A., Angulo, A., López-Otín, C., Muñoz, M., Freije, J. M., Carrascosa, A. L. and Viñuela, E.** (1992). Amino acid sequence and structural properties of protein p12, an African swine fever virus attachment protein. *J Virol* 66:3860-3868.
- Alcamí, A., Angulo, A. and Viñuela, E.** (1993). Mapping and sequence of the gene encoding the African swine fever virion protein of M(r) 11500. *J Gen Virol* 74 (Pt 11):2317-2324.
- Alcamí, A., Carrascosa, A. L. and Viñuela, E.** (1989). The entry of African swine fever virus into Vero cells. *Virology* 171:68-75.
- Alejo, A., Andrés, G. and Salas, M. L.** (2003). African Swine Fever virus proteinase is essential for core maturation and infectivity. *J Virol* 77:5571-5577.
- Alejo, A., Andrés, G., Viñuela, E. and Salas, M. L.** (1999). The African swine fever virus prenyltransferase is an integral membrane trans-geranylgeranyl-diphosphate synthase. *J Biol Chem* 274:18033-18039.
- Alejo, A., Yáñez, R. J., Rodríguez, J. M., Viñuela, E. and Salas, M. L.** (1997). African swine fever virus trans-prenyltransferase. *J Biol Chem* 272:9417-9423.
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. and Hemmings, B. A.** (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo J* 15:6541-6551.
- Alessi, D. R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F. B., Morrice, N., Norman, D. G., Gaffney, P., Reese, C. B., MacDougall, C. N., Harbison, D., Ashworth, A. and Bownes, M.** (1997a). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol* 7:776-789.
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B. and Cohen, P.** (1997b). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balph. *Curr Biol* 7:261-269.

- Alfonso, P., Rivera, J., Hernáez, B., Alonso, C. and Escribano, J. M.** (2004). Identification of cellular proteins modified in response to African swine fever virus infection by proteomics. *Proteomics* 4:2037-2046.
- Almazán, F., Rodríguez, J. M., Andrés, G., Pérez, R., Viñuela, E. and Rodríguez, J. F.** (1992). Transcriptional analysis of multigene family 110 of African swine fever virus. *J Virol* 66:6655-6667.
- Almazán, F., Rodríguez, J. M., Angulo, A., Viñuela, E. and Rodríguez, J. F.** (1993). Transcriptional mapping of a late gene coding for the p12 attachment protein of African swine fever virus. *J Virol* 67:553-556.
- Alonso, C., Miskin, J., Hernáez, B., Fernández-Zapatero, P., Soto, L., Cantó, C., Rodríguez-Crespo, I., Dixon, L. and Escribano, J. M.** (2001). African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. *J Virol* 75:9819-9827.
- Andrade, A. A., Silva, P. N., Pereira, A. C., De Sousa, L. P., Ferreira, P. C., Gazzinelli, R. T., Kroon, E. G., Ropert, C. and Bonjardim, C. A.** (2004). The vaccinia virus-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is required for virus multiplication. *Biochem J* 381:437-446.
- Andrés, G., Alejo, A., Salas, J. and Salas, M. L.** (2002). African swine fever virus polyproteins pp220 and pp62 assemble into the core shell. *J Virol* 76:12473-12482.
- Andrés, G., Alejo, A., Simón-Mateo, C. and Salas, M. L.** (2001a). African swine fever virus protease, a new viral member of the SUMO-1-specific protease family. *J Biol Chem* 276:780-787.
- Andrés, G., García-Escudero, R., Simón-Mateo, C. and Viñuela, E.** (1998). African swine fever virus is enveloped by a two-membraned collapsed cisterna derived from the endoplasmic reticulum. *J Virol* 72:8988-9001.
- Andrés, G., García-Escudero, R., Viñuela, E., Salas, M. L. and Rodríguez, J. M.** (2001b). African swine fever virus structural protein pE120R is essential for virus transport from assembly sites to plasma membrane but not for infectivity. *J Virol* 75:6758-6768.
- Andrés, G., Simón-Mateo, C. and Viñuela, E.** (1997). Assembly of African swine fever virus: role of polyprotein pp220. *J Virol* 71:2331-2341.
- Angulo, A., Viñuela, E. and Alcamí, A.** (1993). Inhibition of African swine fever virus binding and infectivity by purified recombinant virus attachment protein p12. *J Virol* 67:5463-5471.
- Arnaud, C., Veillard, N. R. and Mach, F.** (2005). Cholesterol-independent effects of statins in inflammation, immunomodulation and atherosclerosis. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 5:127-134.
- Arthur, W. T., Quilliam, L. A. and Cooper, J. A.** (2004). Rap1 promotes cell spreading by localizing Rac guanine nucleotide exchange factors. *J Cell Biol* 167:111-122.
- Awayda, M. S.** (2000). Specific and nonspecific effects of protein kinase C on the epithelial Na (+) channel. *J Gen Physiol* 115:559-570.

B

- Bakkali, L., Guillou, R., Gonzague, M. and Cruciere, C.** (1994). A rapid and sensitive chemiluminescence dot-immunobinding assay for screening hybridoma supernatants. *J Immunol Methods* 170:177-184.
- Barber, S. A., Bruett, L., Douglass, B. R., Herbst, D. S., Zink, M. C. and Clements, J. E.** (2002). Visna virus-induced activation of MAPK is required for virus replication and correlates with virus-induced neuropathology. *J Virol* 76:817-828.
- Baylis, S. A., Banham, A. H., Vydelingum, S., Dixon, L. K. and Smith, G. L.** (1993). African swine fever virus encodes a serine protein kinase which is packaged into virions. *J Virol* 67:4549-4556.
- Becker, K. P. and Hannun, Y. A.** (2003). cPKC-dependent sequestration of membrane-recycling components in a subset of recycling endosomes. *J Biol Chem* 278:52747-52754.
- Becker, K. P. and Hannun, Y. A.** (2004). Isoenzyme-specific translocation of protein kinase C (PKC)betaII and not PKCbetaI to a juxtannuclear subset of recycling endosomes: involvement of phospholipase D. *J Biol Chem* 279:28251-28256.
- Benn, J. and Schneider, R. J.** (1994). Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10350-10354.
- Bernardes, C., Antonio, A., Pedroso de Lima, M. C. and Valdeira, M. L.** (1998). Cholesterol affects African swine fever virus infection. *Biochim Biophys Acta* 1393:19-25.
- Bernards, A. and Settleman, J.** (2004). GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol* 14:377-385.
- Best, A., Ahmed, S., Kozma, R. and Lim, L.** (1996). The Ras-related GTPase Rac1 binds tubulin. *J Biol Chem* 271:3756-3762.
- Bhattacharyya, S., Puri, S., Miledi, R. and Panicker, M. M.** (2002). Internalization and recycling of 5-HT_{2A} receptors activated by serotonin and protein kinase C-mediated mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14470-14475.
- Bifulco, M., Laezza, C., Aloj, S. M. and Garbi, C.** (1993). Mevalonate controls cytoskeleton organization and cell morphology in thyroid epithelial cells. *J Cell Physiol* 155:340-348.
- Blasco, R., López-Otín, C., Muñoz, M., Bockamp, E. O., Simón-Mateo, C. and Viñuela, E.** (1990). Sequence and evolutionary relationships of African swine fever virus thymidine kinase. *Virology* 178:301-304.
- Bogoyevitch, M. A. and Court, N. W.** (2004). Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cell Signal* 16:1345-1354.
- Boinas, F. S., Hutchings, G. H., Dixon, L. K. and Wilkinson, P. J.** (2004). Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *J Gen Virol* 85:2177-2187.

- Bokoch, G. M., Vlahos, C. J., Wang, Y., Knaus, U. G. and Traynor-Kaplan, A. E.** (1996). Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem J* 315 (Pt 3):775-779.
- Borca, M. V., Irusta, P., Carrillo, C., Afonso, C. L., Burrage, T. and Rock, D. L.** (1994). African swine fever virus structural protein p72 contains a conformational neutralizing epitope. *Virology* 201:413-418.
- Borca, M. V., Irusta, P. M., Kutish, G. F., Carillo, C., Afonso, C. L., Burrage, A. T., Neilan, J. G. and Rock, D. L.** (1996). A structural DNA binding protein of African swine fever virus with similarity to bacterial histone-like proteins. *Arch Virol* 141:301-313.
- Bos, J. L.** (2005). Linking Rap to cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 17:123-128.
- Bos, J. L., de Bruyn, K., Enserink, J., Kuiperij, B., Rangarajan, S., Rehmann, H., Riedl, J., de Rooij, J., van Mansfeld, F. and Zwartkruis, F.** (2003). The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion. *Biochem Soc Trans* 31:83-86.
- Bos, J. L., de Rooij, J. and Reedquist, K. A.** (2001). Rap1 signalling: adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:369-377.
- Boursnell, M., Shaw, K., Yáñez, R. J., Viñuela, E. and Dixon, L.** (1991). The sequences of the ribonucleotide reductase genes from African swine fever virus show considerable homology with those of the orthopoxvirus, vaccinia virus. *Virology* 184:411-416.
- Briggs, M. W. and Sacks, D. B.** (2003). IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep* 4:571-574.
- Brookes, S. M., Dixon, L. K. and Parkhouse, R. M.** (1996). Assembly of African Swine fever virus: quantitative ultrastructural analysis in vitro and in vivo. *Virology* 224:84-92.
- Bruder, J. T. and Kovesdi, I.** (1997). Adenovirus infection stimulates the Raf/MAPK signaling pathway and induces interleukin-8 expression. *J Virol* 71:398-404.
- Brun, A., Rivas, C., Esteban, M., Escribano, J. M. and Alonso, C.** (1996). African swine fever virus gene A179L, a viral homologue of bcl-2, protects cells from programmed cell death. *Virology* 225:227-230.
- Brun, A., Rodríguez, F., Escribano, J. M. and Alonso, C.** (1998). Functionality and cell anchorage dependence of the African swine fever virus gene A179L, a viral bcl-2 homolog, in insect cells. *J Virol* 72:10227-10233.
- Bruns, R. F., Miller, F. D., Merriman, R. L., Howbert, J. J., Heath, W. F., Kobayashi, E., Takahashi, I., Tamaoki, T. and Nakano, H.** (1991). Inhibition of protein kinase C by calphostin C is light-dependent. *Biochem Biophys Res Commun* 176:288-293.
- BurrIDGE, K. and Wennerberg, K.** (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell* 116:167-179.
- Bustelo, X. R., Sauzeau, V. and Berenjano, I. M.** (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* 29:356-370.

C

- Cai, H., Smola, U., Wixler, V., Eisenmann-Tappe, I., Díaz-Meco, M. T., Moscat, J., Rapp, U. and Cooper, G. M.** (1997). Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Mol Cell Biol* 17:732-741.
- Camacho, A. and Viñuela, E.** (1991). Protein p22 of African swine fever virus: an early structural protein that is incorporated into the membrane of infected cells. *Virology* 181:251-257.
- Caron, E.** (2003). Cellular functions of the Rap1 GTP-binding protein: a pattern emerges. *J Cell Sci* 116:435-440.
- Caron, E., Self, A. J. and Hall, A.** (2000). The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin α M β 2 by LPS and other inflammatory mediators. *Curr Biol* 10:974-978.
- Carrasco, L., de Lara, F. C., Martín de las Mulas, J., Gómez-Villamandos, J. C., Pérez, J., Wilkinson, P. J. and Sierra, M. A.** (1996). Apoptosis in lymph nodes in acute African swine fever. *J Comp Pathol* 115:415-428.
- Carrascosa, A. L., Bustos, M. J., Nogal, M. L., González de Buitrago, G. and Revilla, Y.** (2002). Apoptosis induced in an early step of African swine fever virus entry into vero cells does not require virus replication. *Virology* 294:372-382.
- Carrascosa, A. L., del Val, M., Santaren, J. F. and Viñuela, E.** (1985). Purification and properties of African swine fever virus. *J Virol* 54:337-344.
- Carrascosa, A. L., Sastre, I. and Viñuela, E.** (1991). African swine fever virus attachment protein. *J Virol* 65:2283-2289.
- Carrascosa, J. L., González, P., Carrascosa, A. L., García-Barreno, B., Enjuanes, L. and Viñuela, E.** (1986). Localization of structural proteins in African swine fever virus particles by immunoelectron microscopy. *J Virol* 58:377-384.
- Carvalho, Z. G., De Matos, A. P. and Rodrigues-Pousada, C.** (1988). Association of African swine fever virus with the cytoskeleton. *Virus Res* 11:175-192.
- Clavero-Salas, A., Sotelo-Mundo, R. R., Gollas-Galvan, T., Hernández-López, J., Peregrino-Uriarte, A. B., Muhlia-Almazán, A. and Yepiz-Plascencia, G.** (2007). Transcriptome analysis of gills from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* infected with White Spot Syndrome Virus. *Fish Shellfish Immunol* 23:459-472.
- Coates, P. J., Nenutil, R., McGregor, A., Picksley, S. M., Crouch, D. H., Hall, P. A. and Wright, E. G.** (2001). Mammalian prohibitin proteins respond to mitochondrial stress and decrease during cellular senescence. *Exp Cell Res* 265:262-273.
- Cobbold, C., Whittle, J. T. and Wileman, T.** (1996). Involvement of the endoplasmic reticulum in the assembly and envelopment of African swine fever virus. *J Virol* 70:8382-8390.
- Cobbold, C. and Wileman, T.** (1998). The major structural protein of African swine fever virus, p73, is packaged into large structures, indicative of viral capsid or matrix precursors, on the endoplasmic reticulum. *J Virol* 72:5215-5223.

- Cobbold, C., Windsor, M., Parsley, J., Baldwin, B. and Wileman, T.** (2007). Reduced redox potential of the cytosol is important for African swine fever virus capsid assembly and maturation. *J Gen Virol* 88:77-85.
- Cobbold, C., Windsor, M. and Wileman, T.** (2001). A virally encoded chaperone specialized for folding of the major capsid protein of African swine fever virus. *J Virol* 75:7221-7229.
- Colicelli, J.** (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* 2004:RE13.
- Collins, P. L. and Hightower, L. E.** (1982). Newcastle disease virus stimulates the cellular accumulation of stress (heat shock) mRNAs and proteins. *J Virol* 44:703-707.
- Cook, T. A., Nagasaki, T. and Gundersen, G. G.** (1998). Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid. *J Cell Biol* 141:175-185.
- Corsini, A., Maggi, F. M. and Catapano, A. L.** (1995). Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase. *Pharmacol Res* 31:9-27.
- Costa, J. V.** (1990). African Swine Fever, p. 247-270. *In* Darai, G. (ed.), *Molecular Biology of Iridoviruses*, Boston.
- Cote, J. F., Motoyama, A. B., Bush, J. A. and Vuori, K.** (2005). A novel and evolutionarily conserved PtdIns(3,4,5)P₃-binding domain is necessary for DOCK180 signalling. *Nat Cell Biol* 7:797-807.
- Cox, A. D. and Der, C. J.** (2002). Ras family signaling: therapeutic targeting. *Cancer Biol Ther* 1:599-606.
- Cudmore, S., Cossart, P., Griffiths, G. and Way, M.** (1995). Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature* 378:636-638.
- Chacón, M. R., Almazán, F., Nogal, M. L., Viñuela, E. and Rodríguez, J. F.** (1995). The African swine fever virus IAP homolog is a late structural polypeptide. *Virology* 214:670-674.
- Chang, F., Steelman, L. S., Shelton, J. G., Lee, J. T., Navolanic, P. M., Blalock, W. L., Franklin, R. and McCubrey, J. A.** (2003). Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol* 22:469-480.
- Charlton, C. A. and Volkman, L. E.** (1993). Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces actin cable formation. *Virology* 197:245-254.
- Chen, W., Monick, M. M., Carter, A. B. and Hunninghake, G. W.** (2000). Activation of ERK2 by respiratory syncytial virus in A549 cells is linked to the production of interleukin 8. *Exp Lung Res* 26:13-26.
- Chou, M. M., Hou, W., Johnson, J., Graham, L. K., Lee, M. H., Chen, C. S., Newton, A. C., Schaffhausen, B. S. and Toker, A.** (1998). Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol* 8:1069-1077.
- Chuderland, D. and Seger, R.** (2005). Protein-protein interactions in the regulation of the extracellular signal-regulated kinase. *Mol Biotechnol* 29:57-74.

Chung, C. S., Huang, C. Y. and Chang, W. (2005). Vaccinia virus penetration requires cholesterol and results in specific viral envelope proteins associated with lipid rafts. *J Virol* 79:1623-1634.

D

Dalpe, A. H., Thomssen, R. and Ritter, K. (2003). Oxidative injury to endothelial cells due to Epstein-Barr virus-induced autoantibodies against manganese superoxide dismutase. *J Med Virol* 71:408-416.

Dangoria, N. S., Breau, W. C., Anderson, H. A., Cishek, D. M. and Norkin, L. C. (1996). Extracellular simian virus 40 induces an ERK/MAP kinase-independent signalling pathway that activates primary response genes and promotes virus entry. *J Gen Virol* 77 (Pt 9):2173-2182.

Daub, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Sobel, A. and Hall, A. (2001). Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J Biol Chem* 276:1677-1680.

Dauty, E. and Verkman, A. S. (2005). Actin cytoskeleton as the principal determinant of size-dependent DNA mobility in cytoplasm: a new barrier for non-viral gene delivery. *J Biol Chem* 280:7823-7828.

de Magalhaes, J. C., Andrade, A. A., Silva, P. N., Sousa, L. P., Ropert, C., Ferreira, P. C., Kroon, E. G., Gazzinelli, R. T. and Bonjardim, C. A. (2001). A mitogenic signal triggered at an early stage of vaccinia virus infection: implication of MEK/ERK and protein kinase A in virus multiplication. *J Biol Chem* 276:38353-38360.

de Matos, A. P. and Carvalho, Z. G. (1993). African swine fever virus interaction with microtubules. *Biol Cell* 78:229-234.

de Soultrait, V. R., Caumont, A., Durrens, P., Calmels, C., Parissi, V., ReCordón, P., Bon, E., Desjobert, C., Tarrago-Litvak, L. and Fournier, M. (2002). HIV-1 integrase interacts with yeast microtubule-associated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1575:40-48.

DeFea, K. A., Zalevsky, J., Thoma, M. S., Dery, O., Mullins, R. D. and Bunnett, N. W. (2000). beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* 148:1267-1281.

del Real, G., Jiménez-Baranda, S., Mira, E., Lacalle, R. A., Lucas, P., Gómez-Mouton, C., Alegret, M., Peña, J. M., Rodríguez-Zapata, M., Álvarez-Mon, M., Martínez, A. C. and Mañes, S. (2004). Statins inhibit HIV-1 infection by down-regulating Rho activity. *J Exp Med* 200:541-547.

Di Fiore, P. P. and De Camilli, P. (2001). Endocytosis and signaling. an inseparable partnership. *Cell* 106:1-4.

Diefenbach, R. J., Miranda-Saksena, M., Diefenbach, E., Holland, D. J., Boadle, R. A., Armati, P. J. and Cunningham, A. L. (2002). Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain. *J Virol* 76:3282-3291.

Dixon, L. K., Abrams, C. C., Bowick, G., Goatley, L. C., Kay-Jackson, P. C., Chapman, D., Liverani, E., Nix, R., Silk, R. and Zhang, F. (2004). African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems. *Vet Immunol Immunopathol* 100:117-134.

Dixon, L. K., Escribano, J.M., Martins, C., Rock, D.L., Salas, M.L. and Wilkinson, P.J. (2005). Asfarviridae, p. 135-143. *In* CM Fauquet, M.M., J Maniloff, U Desselberger and LA Ball (ed.), *Virus Taxonomy*, VIIIth Report of the ICTV. Elsevier/Academic Press, London.

Dixon, L. K., Twigg, S. R., Baylis, S. A., Vydelingum, S., Bristow, C., Hammond, J. M. and Smith, G. L. (1994). Nucleotide sequence of a 55 kbp region from the right end of the genome of a pathogenic African swine fever virus isolate (Malawi LIL20/1). *J Gen Virol* 75 (Pt 7):1655-1684.

Dohner, K., Nagel, C. H. and Sodeik, B. (2005). Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins. *Trends Microbiol* 13:320-327.

Dohner, K. and Sodeik, B. (2005). The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 285:67-108.

Douglas, M. W., Diefenbach, R. J., Homa, F. L., Miranda-Saksena, M., Rixon, F. J., Vittone, V., Byth, K. and Cunningham, A. L. (2004). Herpes simplex virus type 1 capsid protein VP26 interacts with dynein light chains RP3 and Tctex1 and plays a role in retrograde cellular transport. *J Biol Chem* 279:28522-28530.

Dovas, A. and Couchman, J. R. (2005). RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J* 390:1-9.

Doxsey, S. J., Brodsky, F. M., Blank, G. S. and Helenius, A. (1987). Inhibition of endocytosis by anti-clathrin antibodies. *Cell* 50:453-463.

Dubauskas, Z., Beck, T. P., Chmura, S. J., Kovar, D. A., Kadkhodaian, M. M., Shrivastav, M., Chung, T., Stadler, W. M. and Rinker-Schaeffer, C. W. (1998). Activated calphostin C cytotoxicity is independent of p53 status and in vivo metastatic potential. *Clin Cancer Res* 4:2391-2398.

E

Enjuanes, L., Carrascosa, A. L., Moreno, M. A. and Viñuela, E. (1976). Titration of African swine fever (ASF) virus. *J Gen Virol* 32:471-477.

Epifano, C., Krijnse-Locker, J., Salas, M. L., Rodríguez, J. M. and Salas, J. (2006a). The African swine fever virus nonstructural protein pB602L is required for formation of the icosahedral capsid of the virus particle. *J Virol* 80:12260-12270.

Epifano, C., Krijnse-Locker, J., Salas, M. L., Salas, J. and Rodríguez, J. M. (2006b). Generation of filamentous instead of icosahedral particles by repression of African swine fever virus structural protein pB438L. *J Virol* 80:11456-11466.

Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629-635.

Eulalio, A., Nunes-Correia, I., Carvalho, A. L., Faro, C., Citovsky, V., Simoes, S. and Pedroso de Lima, M. C. (2004). Two African swine fever virus proteins derived from a common precursor exhibit different nucleocytoplasmic transport activities. *J Virol* 78:9731-9739.

Eulalio, A., Nunes-Correia, I., Salas, J., Salas, M. L., Simoes, S. and Pedroso de Lima, M. C. (2007). African swine fever virus p37 structural protein is localized in nuclear foci containing the viral DNA at early post-infection times. *Virus Res.*

F

Faix, J. and Grosse, R. (2006). Staying in shape with formins. *Dev Cell* 10:693-706.

Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherle, P. A. and Trzaskos, J. M. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273:18623-18632.

Feijoo, C., Campbell, D. G., Jakes, R., Goedert, M. and Cuenda, A. (2005). Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38delta at Thr50 promotes microtubule assembly. *J Cell Sci* 118:397-408.

Ferreira, C. (1996). Expression of ubiquitin, actin, and actin-like genes in African swine fever virus infected cells. *Virus Res* 44:11-21.

Fiorentini, C., Arancia, G., Paradisi, S., Donelli, G., Giuliano, M., Piemonte, F. and Mastrantonio, P. (1989). Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on cytoskeleton organization in HEp-2 cells: a comparative morphological study. *Toxicon* 27:1209-1218.

Florin, L., Becker, K. A., Sapp, C., Lambert, C., Sirma, H., Muller, M., Streeck, R. E. and Sapp, M. (2004). Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70. *J Virol* 78:5546-5553.

Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C. and Toker, A. (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275:665-668.

Fujiwara, M., Umemura, K., Kawasaki, T. and Shimamoto, K. (2006). Proteomics of Rac GTPase signaling reveals its predominant role in elicitor-induced defense response of cultured rice cells. *Plant Physiol* 140:734-745.

Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Pérez, F. and Kaibuchi, K. (2002). Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* 109:873-885.

Fusaro, G., Wang, S. and Chellappan, S. (2002). Differential regulation of Rb family proteins and prohibitin during camptothecin-induced apoptosis. *Oncogene* 21:4539-4548.

G

- Galindo, I., Almazán, F., Bustos, M. J., Viñuela, E. and Carrascosa, A. L.** (2000a). African swine fever virus EP153R open reading frame encodes a glycoprotein involved in the hemadsorption of infected cells. *Virology* 266:340-351.
- Galindo, I., Viñuela, E. and Carrascosa, A. L.** (1997). Protein cell receptors mediate the saturable interaction of African swine fever virus attachment protein p12 with the surface of permissive cells. *Virus Res* 49:193-204.
- Galindo, I., Viñuela, E. and Carrascosa, A. L.** (2000b). Characterization of the african swine fever virus protein p49: a new late structural polypeptide. *J Gen Virol* 81:59-65.
- García-Beato, R., Freije, J. M., López-Otín, C., Blasco, R., Viñuela, E. and Salas, M. L.** (1992a). A gene homologous to topoisomerase II in African swine fever virus. *Virology* 188:938-947.
- García-Beato, R., Salas, M. L., Viñuela, E. and Salas, J.** (1992b). Role of the host cell nucleus in the replication of African swine fever virus DNA. *Virology* 188:637-649.
- García-Bernal, D., Wright, N., Sotillo-Mallo, E., Nombela-Arrieta, C., Stein, J. V., Bustelo, X. R. and Teixidó, J.** (2005). Vav1 and Rac control chemokine-promoted T lymphocyte adhesion mediated by the integrin alpha4beta1. *Mol Biol Cell* 16:3223-3235.
- García-Escudero, R., Andrés, G., Almazán, F. and Viñuela, E.** (1998). Inducible gene expression from African swine fever virus recombinants: analysis of the major capsid protein p72. *J Virol* 72:3185-3195.
- García-Escudero, R., García-Díaz, M., Salas, M. L., Blanco, L. and Salas, J.** (2003). DNA polymerase X of African swine fever virus: insertion fidelity on gapped DNA substrates and AP lyase activity support a role in base excision repair of viral DNA. *J Mol Biol* 326:1403-1412.
- García-Mata, R., Bebok, Z., Sorscher, E. J. and Sztul, E. S.** (1999). Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol* 146:1239-1254.
- Geadá, M. M., Galindo, I., Lorenzo, M. M., Perdiguero, B. and Blasco, R.** (2001). Movements of vaccinia virus intracellular enveloped virions with GFP tagged to the F13L envelope protein. *J Gen Virol* 82:2747-2760.
- Geraldes, A. and Valdeira, M. L.** (1985). Effect of chloroquine on African swine fever virus infection. *J Gen Virol* 66 (Pt 5):1145-1148.
- Ghosh, S., May, M. J. and Kopp, E. B.** (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16:225-260.
- Giguere, J. F. and Tremblay, M. J.** (2004). Statin compounds reduce human immunodeficiency virus type 1 replication by preventing the interaction between virion-associated host intercellular adhesion molecule 1 and its natural cell surface ligand LFA-1. *J Virol* 78:12062-12065.
- Glenn, J. S., Watson, J. A., Havel, C. M. and White, J. M.** (1992). Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. *Science* 256:1331-1333.

Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425-430.

Gómez-Puertas, P., Rodríguez, F., Oviedo, J. M., Brun, A., Alonso, C. and Escribano, J. M. (1998). The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology* 243:461-471.

Gómez-Villamandos, J. C., Carrasco, L., Bautista, M. J., Sierra, M. A., Quezada, M., Hervás, J., Chacón Mde, L., Ruiz-Villamor, E., Salguero, F. J., Sánchez-Cordón, P. J., Romanini, S., Núñez, A., Mekonen, T., Méndez, A. and Jover, A. (2003). African swine fever and classical swine fever: a review of the pathogenesis. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 110:165-169.

Gómez-Villamandos, J. C., Hervás, J., Méndez, A., Carrasco, L., Martín de las Mulas, J., Villeda, C. J., Wilkinson, P. J. and Sierra, M. A. (1995). Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells. *J Gen Virol* 76 (Pt 9):2399-2405.

González, A., Talavera, A., Almendral, J. M. and Viñuela, E. (1986). Hairpin loop structure of African swine fever virus DNA. *Nucleic Acids Res* 14:6835-6844.

Gower, T. L. and Graham, B. S. (2001). Antiviral activity of lovastatin against respiratory syncytial virus in vivo and in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1231-1237.

Gower, T. L., Pastey, M. K., Peeples, M. E., Collins, P. L., McCurdy, L. H., Hart, T. K., Guth, A., Johnson, T. R. and Graham, B. S. (2005). RhoA signaling is required for respiratory syncytial virus-induced syncytium formation and filamentous virion morphology. *J Virol* 79:5326-5336.

Gower, T. L., Peeples, M. E., Collins, P. L. and Graham, B. S. (2001). RhoA is activated during respiratory syncytial virus infection. *Virology* 283:188-196.

Granja, A. G., Nogal, M. L., Hurtado, C., Del Águila, C., Carrascosa, A. L., Salas, M. L., Fresno, M. and Revilla, Y. (2006a). The viral protein A238L inhibits TNF- α expression through a CBP/p300 transcriptional coactivators pathway. *J Immunol* 176:451-462.

Granja, A. G., Nogal, M. L., Hurtado, C., Salas, J., Salas, M. L., Carrascosa, A. L. and Revilla, Y. (2004). Modulation of p53 cellular function and cell death by African swine fever virus. *J Virol* 78:7165-7174.

Granja, A. G., Sabina, P., Salas, M. L., Fresno, M. and Revilla, Y. (2006b). Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by viral A238L-mediated inhibition of p65/RelA acetylation and p300 transactivation. *J Virol* 80:10487-10496.

Grossmann, E. M., Longo, W. E., Kaminski, D. L., Smith, G. S., Murphy, C. E., Durham, R. L., Shapiro, M. J., Norman, J. G. and Mazuski, J. E. (2000). Clostridium difficile toxin: cytoskeletal changes and lactate dehydrogenase release in hepatocytes. *J Surg Res* 88:165-172.

Grundy, S. M. (1988). HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 319:24-33.

Guijarro, C., Blanco-Colio, L. M., Ortego, M., Alonso, C., Ortiz, A., Plaza, J. J., Díaz, C., Hernández, G. and Egido, J. (1998). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res* 83:490-500.

Gundersen, G. G., Gomes, E. R. and Wen, Y. (2004). Cortical control of microtubule stability and polarization. *Curr Opin Cell Biol* 16:106-112.

Gwinn, M. R. and Vallyathan, V. (2006). Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 9:27-39.

H

Hammonds-Odie, L. P., Jackson, T. R., Profit, A. A., Blader, I. J., Turck, C. W., Prestwich, G. D. and Theibert, A. B. (1996). Identification and cloning of centaurin-alpha. A novel phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding protein from rat brain. *J Biol Chem* 271:18859-18868.

Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R. D., Krishna, U. M., Falck, J. R., White, M. A. and Broek, D. (1998). Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* 279:558-560.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580.

Hawkins, P. T., Anderson, K. E., Davidson, K. and Stephens, L. R. (2006). Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 34:647-662.

Hayashi, J., Aoki, H., Kajino, K., Moriyama, M., Arakawa, Y. and Hino, O. (2000). Hepatitis C virus core protein activates the MAPK/ERK cascade synergistically with tumor promoter TPA, but not with epidermal growth factor or transforming growth factor alpha. *Hepatology* 32:958-961.

Heath, C. M., Windsor, M. and Wileman, T. (2001). Aggresomes resemble sites specialized for virus assembly. *J Cell Biol* 153:449-455.

Hernández, B., Díaz-Gil, G., García-Gallo, M., Ignacio Quetglas, J., Rodríguez-Crespo, I., Dixon, L., Escribano, J. M. and Alonso, C. (2004a). The African swine fever virus dynein-binding protein p54 induces infected cell apoptosis. *FEBS Lett* 569:224-228.

Hernández, B., Escribano, J. M. and Alonso, C. (2004b). Switching on and off the cell death cascade: African swine fever virus apoptosis regulation. *Prog Mol Subcell Biol* 36:57-69.

Hernández, B., Escribano, J. M. and Alonso, C. (2006). Visualization of the African swine fever virus infection in living cells by incorporation into the virus particle of green fluorescent protein-p54 membrane protein chimera. *Virology* 350:1-14.

Herrero-Martínez, E., Roberts, K. L., Hollinshead, M. and Smith, G. L. (2005). Vaccinia virus intracellular enveloped virions move to the cell periphery on microtubules in the absence of the A36R protein. *J Gen Virol* 86:2961-2968.

Herrmann, C., Horn, G., Spaargaren, M. and Wittinghofer, A. (1996). Differential interaction of the ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A, and R-Ras with the putative effector molecules Raf kinase and Ral-guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 271:6794-6800.

Hindley, A. and Kolch, W. (2002). Extracellular signal regulated kinase (ERK)/mitogen activated protein kinase (MAPK)-independent functions of Raf kinases. *J Cell Sci* 115:1575-1581.

Hoefen, R. J. and Berk, B. C. (2006). The multifunctional GIT family of proteins. *J Cell Sci* 119:1469-1475.

Hogue, B. G. and Nayak, D. P. (1992). Synthesis and processing of the influenza virus neuraminidase, a type II transmembrane glycoprotein. *Virology* 188:510-517.

Hook, P. and Vallee, R. B. (2006). The dynein family at a glance. *J Cell Sci* 119:4369-4371.

Hurtado, C., Granja, A. G., Bustos, M. J., Nogal, M. L., González de Buitrago, G., de Yébenes, V. G., Salas, M. L., Revilla, Y. and Carrascosa, A. L. (2004). The C-type lectin homologue gene (EP153R) of African swine fever virus inhibits apoptosis both in virus infection and in heterologous expression. *Virology* 326:160-170.

I

Ikeda, M. and Kato, N. (2007). Life Style-Related Diseases of the Digestive System: Cell Culture System for the Screening of Anti-HCV Reagents: Suppression of HCV Replication by Statins and Synergistic Action With Interferon. *J Pharmacol Sci*.

Ishibe, S., Joly, D., Liu, Z. X. and Cantley, L. G. (2004). Paxillin serves as an ERK-regulated scaffold for coordinating FAK and Rac activation in epithelial morphogenesis. *Mol Cell* 16:257-267.

Ishibe, S., Joly, D., Zhu, X. and Cantley, L. G. (2003). Phosphorylation-dependent paxillin-ERK association mediates hepatocyte growth factor-stimulated epithelial morphogenesis. *Mol Cell* 12:1275-1285.

Iyer, L. M., Balaji, S., Koonin, E. V. and Aravind, L. (2006). Evolutionary genomics of nucleo-cytoplasmic large DNA viruses. *Virus Res* 117:156-184.

J

Jacob, Y., Badrane, H., Ceccaldi, P. E. and Tordo, N. (2000). Cytoplasmic dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein. *J Virol* 74:10217-10222.

Jayanthi, L. D., Samuvel, D. J. and Ramamoorthy, S. (2004). Regulated internalization and phosphorylation of the native norepinephrine transporter in response to phorbol esters. Evidence for localization in lipid rafts and lipid raft-mediated internalization. *J Biol Chem* 279:19315-19326.

Jeong, H. W., Li, Z., Brown, M. D. and Sacks, D. B. (2007). IQGAP1 binds Rap1 and modulates its activity. *J Biol Chem* 282:20752-20762.

Jia, Z., Vadnais, J., Lu, M. L., Noel, J. and Nabi, I. R. (2006). Rho/ROCK-dependent pseudopodial protrusion and cellular blebbing are regulated by p38 MAPK in tumour cells exhibiting autocrine c-Met activation. *Biol Cell* 98:337-351.

Johnson, D. E. and Richardson, C. C. (2003). A covalent linkage between the gene 5 DNA polymerase of bacteriophage T7 and Escherichia coli thioredoxin, the processivity factor: fate of thioredoxin during DNA synthesis. *J Biol Chem* 278:23762-23772.

Johnson, F. and Giulivi, C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med* 26:340-352.

Johnston, J. A., Ward, C. L. and Kopito, R. R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 143:1883-1898.

Jouvenet, N., Monaghan, P., Way, M. and Wileman, T. (2004). Transport of African swine fever virus from assembly sites to the plasma membrane is dependent on microtubules and conventional kinesin. *J Virol* 78:7990-8001.

Jouvenet, N. and Wileman, T. (2005). African swine fever virus infection disrupts centrosome assembly and function. *J Gen Virol* 86:589-594.

Jouvenet, N., Windsor, M., Rietdorf, J., Hawes, P., Monaghan, P., Way, M. and Wileman, T. (2006). African swine fever virus induces filopodia-like projections at the plasma membrane. *Cell Microbiol* 8:1803-1811.

Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Eichel-Streiber, C., Mann, M. and Aktories, K. (1995). Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B. *Nature* 375:500-503.

K

Kashina, A. and Rodionov, V. (2005). Intracellular organelle transport: few motors, many signals. *Trends Cell Biol* 15:396-398.

Kelkar, S. A., Pfister, K. K., Crystal, R. G. and Leopold, P. L. (2004). Cytoplasmic dynein mediates adenovirus binding to microtubules, p. 10122-10132, *J Virol*, vol. 78.

Kim, S. and Coulombe, P. A. (2007). Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev* 21:1581-1597.

Kim, W., Tang, Y., Okada, Y., Torrey, T. A., Chattopadhyay, S. K., Pfeleiderer, M., Falkner, F. G., Dorner, F., Choi, W., Hirokawa, N. and Morse, H. C., 3rd. (1998). Binding of murine leukemia virus Gag polyproteins to KIF4, a microtubule-based motor protein. *J Virol* 72:6898-6901.

Kleiboeker, S. B. (2002). Swine fever: classical swine fever and African swine fever. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 18:431-451.

Klippel, A., Kavanaugh, W. M., Pot, D. and Williams, L. T. (1997). A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol Cell Biol* 17:338-344.

Knipe, D. M., Howley, P.M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B., and Straus, S. E. (2007). *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

Kobayashi, K., Ohgitani, E., Tanaka, Y., Kita, M. and Imanishi, J. (1994). Herpes simplex virus-induced expression of 70 kDa heat shock protein (HSP70) requires early protein synthesis but not viral DNA replication. *Microbiol Immunol* 38:321-325.

Koch, G., Benz, C., Schmidt, G., Olenik, C. and Aktories, K. (1997). Role of Rho protein in lovastatin-induced breakdown of actin cytoskeleton. *J Pharmacol Exp Ther* 283:901-909.

Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2:289-305.

Kraynov, V. S., Chamberlain, C., Bokoch, G. M., Schwartz, M. A., Slabaugh, S. and Hahn, K. M. (2000). Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science* 290:333-337.

Krendel, M. and Mooseker, M. S. (2005). Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)* 20:239-251.

Krugmann, S., Anderson, K. E., Ridley, S. H., Risso, N., McGregor, A., Coadwell, J., Davidson, K., Eguinoa, A., Ellson, C. D., Lipp, P., Manifava, M., Ktistakis, N., Painter, G., Thuring, J. W., Cooper, M. A., Lim, Z. Y., Holmes, A. B., Dove, S. K., Michell, R. H., Grewal, A., Nazarian, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Stephens, L. R. and Hawkins, P. T. (2002). Identification of ARAP3, a novel PI3K effector regulating both Arf and Rho GTPases, by selective capture on phosphoinositide affinity matrices. *Mol Cell* 9:95-108.

Kuznar, J., Salas, M. L. and Viñuela, E. (1980). DNA-dependent RNA polymerase in African swine fever virus. *Virology* 101:169-175.

L

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lai, M. M. (1995). The molecular biology of hepatitis delta virus. *Annu Rev Biochem* 64:259-286.

Lakadamyali, M., Rust, M. J., Babcock, H. P. and Zhuang, X. (2003). Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9280-9285.

Landry, Y., Niederhoffer, N., Sick, E. and Gies, J. P. (2006). Heptahelical and other G-protein-coupled receptors (GPCRs) signaling. *Curr Med Chem* 13:51-63.

Lanier, L. M. and Volkman, L. E. (1998). Actin binding and nucleation by Autographa californica M nucleopolyhedrovirus. *Virology* 243:167-177.

Larsson, C. (2006). Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal* 18:276-284.

- Le Good, J. A., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P. and Parker, P. J.** (1998). Protein kinase C isoforms controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 281:2042-2045.
- Le, T. L., Joseph, S. R., Yap, A. S. and Stow, J. L.** (2002). Protein kinase C regulates endocytosis and recycling of E-cadherin. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C489-499.
- Lebowitz, P. F., Davide, J. P. and Prendergast, G. C.** (1995). Evidence that farnesyltransferase inhibitors suppress Ras transformation by interfering with Rho activity. *Mol Cell Biol* 15:6613-6622.
- Leevers, S. J., Vanhaesebroeck, B. and Waterfield, M. D.** (1999). Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol* 11:219-225.
- Leitao, A., Cartaxeiro, C., Coelho, R., Cruz, B., Parkhouse, R. M., Portugal, F., Vigarito, J. D. and Martins, C. L.** (2001). The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. *J Gen Virol* 82:513-523.
- Leone, G., Coffey, M. C., Gilmore, R., Duncan, R., Maybaum, L. and Lee, P. W.** (1996). C-terminal trimerization, but not N-terminal trimerization, of the reovirus cell attachment protein is a posttranslational and Hsp70/ATP-dependent process. *J Biol Chem* 271:8466-8471.
- Lewis, T. S., Hunt, J. B., Aveline, L. D., Jonscher, K. R., Louie, D. F., Yeh, J. M., Nahreini, T. S., Resing, K. A. and Ahn, N. G.** (2000). Identification of novel MAP kinase pathway signaling targets by functional proteomics and mass spectrometry. *Mol Cell* 6:1343-1354.
- Lewis, T. S., Shapiro, P. S. and Ahn, N. G.** (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74:49-139.
- Li, E., Stupack, D., Bokoch, G. M. and Nemerow, G. R.** (1998a). Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases. *J Virol* 72:8806-8812.
- Li, E., Stupack, D., Klemke, R., Cheresch, D. A. and Nemerow, G. R.** (1998b). Adenovirus endocytosis via $\alpha(v)$ integrins requires phosphoinositide-3-OH kinase. *J Virol* 72:2055-2061.
- Liao, S. L., Raung, S. L. and Chen, C. J.** (2002). Japanese encephalitis virus stimulates superoxide dismutase activity in rat glial cultures. *Neurosci Lett* 324:133-136.
- Lindmo, K. and Stenmark, H.** (2006). Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *J Cell Sci* 119:605-614.
- Liu, B. P. and Burridge, K.** (2000). Vav2 activates Rac1, Cdc42, and RhoA downstream from growth factor receptors but not β 1 integrins. *Mol Cell Biol* 20:7160-7169.
- Liu, S., Rodríguez, A. V. and Tosteson, M. T.** (2006). Role of simvastatin and methyl- β -cyclodextrin [corrected] on inhibition of poliovirus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 347:51-59.
- Locker, J. K., Kuehn, A., Schleich, S., Rutter, G., Hohenberg, H., Wepf, R. and Griffiths, G.** (2000). Entry of the two infectious forms of vaccinia virus at the plasma membrane is signaling-dependent for the IMV but not the EEV. *Mol Biol Cell* 11:2497-2511.

Loder, M. K. and Melikian, H. E. (2003). The dopamine transporter constitutively internalizes and recycles in a protein kinase C-regulated manner in stably transfected PC12 cell lines. *J Biol Chem* 278:22168-22174.

López-Otín, C., Freije, J. M., Parra, F., Méndez, E. and Viñuela, E. (1990). Mapping and sequence of the gene coding for protein p72, the major capsid protein of African swine fever virus. *Virology* 175:477-484.

Luby-Phelps, K. (2000). Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int Rev Cytol* 192:189-221.

Luo, H., Yanagawa, B., Zhang, J., Luo, Z., Zhang, M., Esfandiarei, M., Carthy, C., Wilson, J. E., Yang, D. and McManus, B. M. (2002). Coxsackievirus B3 replication is reduced by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *J Virol* 76:3365-3373.

Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115:455-465.

Luttrell, L. M., Roudabush, F. L., Choy, E. W., Miller, W. E., Field, M. E., Pierce, K. L. and Lefkowitz, R. J. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2449-2454.

M

Ma, A. D., Metjian, A., Bagrodia, S., Taylor, S. and Abrams, C. S. (1998). Cytoskeletal reorganization by G protein-coupled receptors is dependent on phosphoinositide 3-kinase gamma, a Rac guanosine exchange factor, and Rac. *Mol Cell Biol* 18:4744-4751.

Macario, A. J. and Conway de Macario, E. (2007). Molecular chaperones: multiple functions, pathologies, and potential applications. *Front Biosci* 12:2588-2600.

Maillet, M., Robert, S. J., Cacquevel, M., Gastineau, M., Vivien, D., Bertoglio, J., Zugaza, J. L., Fischmeister, R. and Lezoualc'h, F. (2003). Crosstalk between Rap1 and Rac regulates secretion of sAPPalpha. *Nat Cell Biol* 5:633-639.

Malorni, W., Fiorentini, C., Paradisi, S., Giuliano, M., Mastrantonio, P. and Donelli, G. (1990). Surface blebbing and cytoskeletal changes induced in vitro by toxin B from *Clostridium difficile*: an immunochemical and ultrastructural study. *Exp Mol Pathol* 52:340-356.

Marsh, M. and Bron, R. (1997). SFV infection in CHO cells: cell-type specific restrictions to productive virus entry at the cell surface. *J Cell Sci* 110 (Pt 1):95-103.

Marsh, M. and Helenius, A. (1980). Adsorptive endocytosis of Semliki Forest virus. *J Mol Biol* 142:439-454.

Martínez-Moreno, M., Navarro-Lérida, I., Roncal, F., Albar, J. P., Alonso, C., Gavilanes, F. and Rodríguez-Crespo, I. (2003). Recognition of novel viral sequences that associate with the dynein light chain LC8 identified through a pepscan technique. *FEBS Lett* 544:262-267.

- Martínez-Pomares, L., Simón-Mateo, C., López-Otín, C. and Viñuela, E.** (1997). Characterization of the African swine fever virus structural protein p14.5: a DNA binding protein. *Virology* 229:201-211.
- Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A. and Simons, K.** (1981). Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J Cell Biol* 91:601-613.
- Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A. and Simons, K.** (1982). Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. *J Mol Biol* 156:609-631.
- Maurer-Stroh, S., Washietl, S. and Eisenhaber, F.** (2003). Protein prenyltransferases. *Genome Biol* 4:212.
- Mayne, G. C. and Murray, A. W.** (1998). Evidence that protein kinase Cepsilon mediates phorbol ester inhibition of calphostin C- and tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in U937 histiocytic lymphoma cells. *J Biol Chem* 273:24115-24121.
- McCullough, K. C., Basta, S., Knotig, S., Gerber, H., Schaffner, R., Kim, Y. B., Saalmuller, A. and Summerfield, A.** (1999). Intermediate stages in monocyte-macrophage differentiation modulate phenotype and susceptibility to virus infection. *Immunology* 98:203-212.
- McDonald, D., Vodicka, M. A., Lucero, G., Svitkina, T. M., Borisy, G. G., Emerman, M. and Hope, T. J.** (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol* 159:441-452.
- McPherson, P. S., Kay, B. K. and Hussain, N. K.** (2001). Signaling on the endocytic pathway. *Traffic* 2:375-384.
- Meier, O., Boucke, K., Hammer, S. V., Keller, S., Stidwill, R. P., Hemmi, S. and Greber, U. F.** (2002). Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol* 158:1119-1131.
- Mellor, H. and Parker, P. J.** (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* 332 (Pt 2):281-292.
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V., Keryer, E., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Issakidis-Bourguet, E. and Lemaire, S. D.** (2006). Thioredoxins, glutaredoxins, and glutathionylation: new crosstalks to explore. *Photosynth Res* 89:225-245.
- Miskin, J. E., Abrams, C. C. and Dixon, L. K.** (2000). African swine fever virus protein A238L interacts with the cellular phosphatase calcineurin via a binding domain similar to that of NFAT. *J Virol* 74:9412-9420.
- Miskin, J. E., Abrams, C. C., Goatley, L. C. and Dixon, L. K.** (1998). A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin. *Science* 281:562-565.
- Mochizuki, N., Yamashita, S., Kurokawa, K., Ohba, Y., Nagai, T., Miyawaki, A. and Matsuda, M.** (2001). Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 411:1065-1068.
- Monick, M., Staber, J., Thomas, K. and Hunninghake, G.** (2001). Respiratory syncytial virus infection results in activation of multiple protein kinase C isoforms leading to activation of mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* 166:2681-2687.

Morris, A. J. and Malbon, C. C. (1999). Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* 79:1373-1430.

Moss, B. (2001). Poxviridae: the viruses and their replication., p. 2849–2883. *In* Fields BN, K.D., Howley PM, Chanock RM, Hirsch MS, Melnick JL, Monath TP, Roizman B. (ed.), *Fields Virology.*, 4th ed. Lippincott-Raven Press, Philadelphia.

Mueller, S., Cao, X., Welker, R. and Wimmer, E. (2002). Interaction of the poliovirus receptor CD155 with the dynein light chain Tctex-1 and its implication for poliovirus pathogenesis. *J Biol Chem* 277:7897-7904.

Muñoz, M., Freije, J. M., Salas, M. L., Viñuela, E. and López-Otín, C. (1993). Structure and expression in *E. coli* of the gene coding for protein p10 of African swine fever virus. *Arch Virol* 130:93-107.

N

Nabatov, A. A., Pollakis, G., Linnemann, T., Paxton, W. A. and de Baar, M. P. (2007). Statins disrupt CCR5 and RANTES expression levels in CD4+ T lymphocytes in vitro and preferentially decrease infection of R5 versus X4 HIV-1. *PLoS ONE* 2:e470.

Nakamura, T. Y., Coetzee, W. A., Vega-Saenz De Miera, E., Artman, M. and Rudy, B. (1997). Modulation of Kv4 channels, key components of rat ventricular transient outward K+ current, by PKC. *Am J Physiol* 273:H1775-1786.

Naranatt, P. P., Akula, S. M., Zien, C. A., Krishnan, H. H. and Chandran, B. (2003). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces the phosphatidylinositol 3-kinase-PKC-zeta-MEK-ERK signaling pathway in target cells early during infection: implications for infectivity. *J Virol* 77:1524-1539.

Naranatt, P. P., Krishnan, H. H., Smith, M. S. and Chandran, B. (2005). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus modulates microtubule dynamics via RhoA-GTP-diaphanous 2 signaling and utilizes the dynein motors to deliver its DNA to the nucleus. *J Virol* 79:1191-1206.

Neilan, J. G., Borca, M. V., Lu, Z., Kutish, G. F., Kleiboeker, S. B., Carrillo, C., Zsak, L. and Rock, D. L. (1999). An African swine fever virus ORF with similarity to C-type lectins is non-essential for growth in swine macrophages in vitro and for virus virulence in domestic swine. *J Gen Virol* 80 (Pt 10):2693-2697.

Neilan, J. G., Lu, Z., Afonso, C. L., Kutish, G. F., Sussman, M. D. and Rock, D. L. (1993). An African swine fever virus gene with similarity to the proto-oncogene bcl-2 and the Epstein-Barr virus gene BHRF1. *J Virol* 67:4391-4394.

Neilan, J. G., Lu, Z., Kutish, G. F., Zsak, L., Burrage, T. G., Borca, M. V., Carrillo, C. and Rock, D. L. (1997a). A BIR motif containing gene of African swine fever virus, 4CL, is nonessential for growth in vitro and viral virulence. *Virology* 230:252-264.

Neilan, J. G., Lu, Z., Kutish, G. F., Zsak, L., Lewis, T. L. and Rock, D. L. (1997b). A conserved African swine fever virus IkappaB homolog, 5EL, is nonessential for growth in vitro and virulence in domestic swine. *Virology* 235:377-385.

Netherton, C., Rouiller, I. and Wileman, T. (2004). The subcellular distribution of multigene family 110 proteins of African swine fever virus is determined by differences in C-terminal KDEL endoplasmic reticulum retention motifs. *J Virol* 78:3710-3721.

Netherton, C. L., Parsley, J. C. and Wileman, T. (2004). African swine fever virus inhibits induction of the stress-induced proapoptotic transcription factor CHOP/GADD153. *J Virol* 78:10825-10828.

Nevins, J. R. (1982). Induction of the synthesis of a 70,000 dalton mammalian heat shock protein by the adenovirus E1A gene product. *Cell* 29:913-919.

Newsome, T. P., Scaplehorn, N. and Way, M. (2004). SRC mediates a switch from microtubule- to actin-based motility of vaccinia virus. *Science* 306:124-129.

Nijtmans, L. G., de Jong, L., Artal Sanz, M., Coates, P. J., Berden, J. A., Back, J. W., Muijsers, A. O., van der Spek, H. and Grivell, L. A. (2000). Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *Embo J* 19:2444-2451.

Nogal, M. L., González de Buitrago, G., Rodríguez, C., Cubelos, B., Carrascosa, A. L., Salas, M. L. and Revilla, Y. (2001). African swine fever virus IAP homologue inhibits caspase activation and promotes cell survival in mammalian cells. *J Virol* 75:2535-2543.

Norkin, L. C. (1999). Simian virus 40 infection via MHC class I molecules and caveolae. *Immunol Rev* 168:13-22.

O

Ohka, S., Matsuda, N., Tohyama, K., Oda, T., Morikawa, M., Kuge, S. and Nomoto, A. (2004). Receptor (CD155)-dependent endocytosis of poliovirus and retrograde axonal transport of the endosome. *J Virol* 78:7186-7198.

Oktyabrsky, O. N. and Smirnova, G. V. (2007). Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry (Mosc)* 72:132-145.

Oliveros, M., Yáñez, R. J., Salas, M. L., Salas, J., Viñuela, E. and Blanco, L. (1997). Characterization of an African swine fever virus 20-kDa DNA polymerase involved in DNA repair. *J Biol Chem* 272:30899-30910.

Oura, C. A., Powell, P. P. and Parkhouse, R. M. (1998). African swine fever: a disease characterized by apoptosis. *J Gen Virol* 79 (Pt 6):1427-1438.

P

Palazzo, A. F., Cook, T. A., Alberts, A. S. and Gundersen, G. G. (2001). mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol* 3:723-729.

- Payne, E., Bowles, M. R., Don, A., Hancock, J. F. and McMillan, N. A.** (2001). Human papillomavirus type 6b virus-like particles are able to activate the Ras-MAP kinase pathway and induce cell proliferation. *J Virol* 75:4150-4157.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J. and Helenius, A.** (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* 3:473-483.
- Pelkmans, L., Puntener, D. and Helenius, A.** (2002). Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* 296:535-539.
- Peña, L., Yáñez, R. J., Revilla, Y., Viñuela, E. and Salas, M. L.** (1993). African swine fever virus guanylyltransferase. *Virology* 193:319-328.
- Perlson, E., Hanz, S., Ben-Yaakov, K., Segal-Ruder, Y., Seger, R. and Fainzilber, M.** (2005). Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron* 45:715-726.
- Petit, C., Giron, M. L., Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Real, E., Jacob, Y., Tordo, N., De The, H. and Saib, A.** (2003). Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8. *J Cell Sci* 116:3433-3442.
- Pfister, K. K., Fisher, E. M., Gibbons, I. R., Hays, T. S., Holzbaur, E. L., McIntosh, J. R., Porter, M. E., Schroer, T. A., Vaughan, K. T., Witman, G. B., King, S. M. and Vallee, R. B.** (2005). Cytoplasmic dynein nomenclature. *J Cell Biol* 171:411-413.
- Piperno, G., LeDizet, M. and Chang, X. J.** (1987). Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J Cell Biol* 104:289-302.
- Pizon, V., Desjardins, M., Bucci, C., Parton, R. G. and Zerial, M.** (1994). Association of Rap1a and Rap1b proteins with late endocytic/phagocytic compartments and Rap2a with the Golgi complex. *J Cell Sci* 107 (Pt 6):1661-1670.
- Planz, O., Pleschka, S. and Ludwig, S.** (2001). MEK-specific inhibitor U0126 blocks spread of Borna disease virus in cultured cells. *J Virol* 75:4871-4877.
- Pleschka, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Hobom, G., Planz, O., Rapp, U. R. and Ludwig, S.** (2001). Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol* 3:301-305.
- Ploubidou, A., Moreau, V., Ashman, K., Reckmann, I., González, C. and Way, M.** (2000). Vaccinia virus infection disrupts microtubule organization and centrosome function. *Embo J* 19:3932-3944.
- Plowright, W., Parker, J. and Peirce, M. A.** (1969). African swine fever virus in ticks (*Ornithodoros moubata*, murray) collected from animal burrows in Tanzania. *Nature* 221:1071-1073.
- Pollard, T. D. and Borisy, G. G.** (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112:453-465.
- Popova, J. S. and Rasenick, M. M.** (2004). Clathrin-mediated endocytosis of m3 muscarinic receptors. Roles for Gbetagamma and tubulin. *J Biol Chem* 279:30410-30418.
- Potena, L., Frascaroli, G., Grigioni, F., Lazzarotto, T., Magnani, G., Tomasi, L., Coccolo, F., Gabrielli, L., Magelli, C., Landini, M. P. and Branzi, A.** (2004). Hydroxymethyl-glutaryl

coenzyme a reductase inhibition limits cytomegalovirus infection in human endothelial cells. *Circulation* 109:532-536.

Powell, P. P., Dixon, L. K. and Parkhouse, R. M. (1996). An IkappaB homolog encoded by African swine fever virus provides a novel mechanism for downregulation of proinflammatory cytokine responses in host macrophages. *J Virol* 70:8527-8533.

Prados, F. J., Viñuela, E. and Alcamí, A. (1993). Sequence and characterization of the major early phosphoprotein p32 of African swine fever virus. *J Virol* 67:2475-2485.

Q

Qualmann, B. and Mellor, H. (2003). Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases. *Biochem J* 371:233-241.

R

Radtke, K., Dohner, K. and Sodeik, B. (2006). Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol* 8:387-400.

Rameh, L. E. and Cantley, L. C. (1999). The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* 274:8347-8350.

Ramiro-Ibáñez, F., Ortega, A., Brun, A., Escribano, J. M. and Alonso, C. (1996). Apoptosis: a mechanism of cell killing and lymphoid organ impairment during acute African swine fever virus infection. *J Gen Virol* 77 (Pt 9):2209-2219.

Randazzo, P. A. (2003). RhoD, Src, and hDia2C in endosome motility. *Dev Cell* 4:287-288.

Raux, H., Flamand, A. and Blondel, D. (2000). Interaction of the rabies virus P protein with the LC8 dynein light chain. *J Virol* 74:10212-10216.

Raymond, J. R. (1991). Protein kinase C induces phosphorylation and desensitization of the human 5-HT1A receptor. *J Biol Chem* 266:14747-14753.

Repasky, G. A., Chenette, E. J. and Der, C. J. (2004). Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol* 14:639-647.

Reszka, A. A., Seger, R., Diltz, C. D., Krebs, E. G. and Fischer, E. H. (1995). Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8881-8885.

Revilla, Y., Callejo, M., Rodríguez, J. M., Culebras, E., Nogal, M. L., Salas, M. L., Viñuela, E. and Fresno, M. (1998). Inhibition of nuclear factor kappaB activation by a virus-encoded IkappaB-like protein. *J Biol Chem* 273:5405-5411.

- Revilla, Y., Cebrián, A., Baixeras, E., Martínez, C., Viñuela, E. and Salas, M. L.** (1997). Inhibition of apoptosis by the African swine fever virus Bcl-2 homologue: role of the BH1 domain. *Virology* 228:400-404.
- Ridley, A. J.** (2001). Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic* 2:303-310.
- Rietdorf, J., Ploubidou, A., Reckmann, I., Holmstrom, A., Frischknecht, F., Zettl, M., Zimmermann, T. and Way, M.** (2001). Kinesin-dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus. *Nat Cell Biol* 3:992-1000.
- Rivera, J., Abrams, C., Hernández, B., Alcázar, A., Escribano, J. M., Dixon, L. and Alonso, C.** (2007). The MyD116 African swine fever virus homologue interacts with the catalytic subunit of protein phosphatase 1 and activates its phosphatase activity. *J Virol* 81:2923-2929.
- Robertson, D., Paterson, H. F., Adamson, P., Hall, A. and Monaghan, P.** (1995). Ultrastructural localization of ras-related proteins using epitope-tagged plasmids. *J Histochem Cytochem* 43:471-480.
- Rodríguez, F., Alcaraz, C., Eiras, A., Yáñez, R. J., Rodríguez, J. M., Alonso, C., Rodríguez, J. F. and Escribano, J. M.** (1994). Characterization and molecular basis of heterogeneity of the African swine fever virus envelope protein p54. *J Virol* 68:7244-7252.
- Rodríguez, F., Ley, V., Gómez-Puertas, P., García, R., Rodríguez, J. F. and Escribano, J. M.** (1996). The structural protein p54 is essential for African swine fever virus viability. *Virus Res* 40:161-167.
- Rodríguez, J. M., Almazán, F., Viñuela, E. and Rodríguez, J. F.** (1992a). Genetic manipulation of African swine fever virus: construction of recombinant viruses expressing the beta-galactosidase gene. *Virology* 188:67-76.
- Rodríguez, J. M., García-Escudero, R., Salas, M. L. and Andrés, G.** (2004). African Swine Fever Virus Structural Protein p54 Is Essential for the Recruitment of Envelope Precursors to Assembly Sites. *J Virol* 78:4299-1313.
- Rodríguez, J. M., Salas, M. L. and Viñuela, E.** (1992b). Genes homologous to ubiquitin-conjugating proteins and eukaryotic transcription factor SII in African swine fever virus. *Virology* 186:40-52.
- Rodríguez, J. M., Salas, M. L. and Viñuela, E.** (1996). Intermediate class of mRNAs in African swine fever virus. *J Virol* 70:8584-8589.
- Rodríguez, J. M., Yáñez, R. J., Almazán, F., Viñuela, E. and Rodríguez, J. F.** (1993a). African swine fever virus encodes a CD2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected cells. *J Virol* 67:5312-5320.
- Rodríguez, J. M., Yáñez, R. J., Rodríguez, J. F., Viñuela, E. and Salas, M. L.** (1993b). The DNA polymerase-encoding gene of African swine fever virus: sequence and transcriptional analysis. *Gene* 136:103-110.
- Rojo, G., Chamorro, M., Salas, M. L., Viñuela, E., Cuezva, J. M. and Salas, J.** (1998). Migration of mitochondria to viral assembly sites in African swine fever virus-infected cells. *J Virol* 72:7583-7588.
- Rojo, G., García-Beato, R., Viñuela, E., Salas, M. L. and Salas, J.** (1999). Replication of African swine fever virus DNA in infected cells. *Virology* 257:524-536.

Roth, M. G. (1999). Snapshots of ARF1: implications for mechanisms of activation and inactivation. *Cell* 97:149-152.

Rouiller, I., Brookes, S. M., Hyatt, A. D., Windsor, M. and Wileman, T. (1998). African swine fever virus is wrapped by the endoplasmic reticulum. *J Virol* 72:2373-2387.

Roychowdhury, S., Panda, D., Wilson, L. and Rasenick, M. M. (1999). G protein alpha subunits activate tubulin GTPase and modulate microtubule polymerization dynamics. *J Biol Chem* 274:13485-13490.

Roychowdhury, S. and Rasenick, M. M. (1997). G protein beta1gamma2 subunits promote microtubule assembly. *J Biol Chem* 272:31576-31581.

Rubinfeld, H. and Seger, R. (2005). The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol* 31:151-174.

S

Saladino, R., Ciambecchini, U., Nencioni, L. and Palamara, A. T. (2003). Recent advances in the chemistry of parainfluenza-1 (Sendai) virus inhibitors. *Med Res Rev* 23:427-455.

Salas, J., Salas, M. L. and Viñuela, E. (1988). Effect of inhibitors of the host cell RNA polymerase II on African swine fever virus multiplication. *Virology* 164:280-283.

Salas, M. L., Rey-Campos, J., Almendral, J. M., Talavera, A. and Viñuela, E. (1986). Transcription and translation maps of African swine fever virus. *Virology* 152:228-240.

Salas, M. L., Salas, J. and Viñuela, E. (1988). Phosphorylation of African swine fever virus proteins in vitro and in vivo. *Biochimie* 70:627-635.

Salguero, F. J., Sánchez-Cordón, P. J., Sierra, M. A., Jover, A., Núñez, A. and Gómez-Villamandos, J. C. (2004). Apoptosis of thymocytes in experimental African Swine Fever virus infection. *Histol Histopathol* 19:77-84.

Sánchez-Torres, C., Gómez-Puertas, P., Gómez-del-Moral, M., Alonso, F., Escribano, J. M., Ezquerro, A. and Domínguez, J. (2003). Expression of porcine CD163 on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to African swine fever infection. *Arch Virol* 148:2307-2323.

Sanderson, C. M., Hollinshead, M. and Smith, G. L. (2000). The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles. *J Gen Virol* 81:47-58.

Santomenna, L. D. and Colberg-Poley, A. M. (1990). Induction of cellular hsp70 expression by human cytomegalovirus. *J Virol* 64:2033-2040.

Sasada, T., Nakamura, H., Masutani, H., Ueda, S., Sono, H., Takabayashi, A. and Yodoi, J. (2002). Thioredoxin-mediated redox control of human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) gene expression. *Mol Immunol* 38:723-732.

- Scita, G., Tenca, P., Frittoli, E., Tocchetti, A., Innocenti, M., Giardina, G. and Di Fiore, P. P.** (2000). Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. *Embo J* 19:2393-2398.
- Schaeffer, H. J., Catling, A. D., Eblen, S. T., Collier, L. S., Krauss, A. and Weber, M. J.** (1998). MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* 281:1668-1671.
- Schlessinger, J. and Bar-Sagi, D.** (1994). Activation of Ras and other signaling pathways by receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59:173-179.
- Schmidt, A., Caron, E. and Hall, A.** (2001). Lipopolysaccharide-induced activation of beta2-integrin function in macrophages requires Irak kinase activity, p38 mitogen- activated protein kinase, and the Rap1 GTPase. *Mol Cell Biol* 21:438-448.
- Schmidt, A. and Hall, A.** (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16:1587-1609.
- Schmidt, R. A., Glomset, J. A., Wight, T. N., Habenicht, A. J. and Ross, R.** (1982). A study of the Influence of mevalonic acid and its metabolites on the morphology of swiss 3T3 cells. *J Cell Biol* 95:144-153.
- Schonwasser, D. C., Marais, R. M., Marshall, C. J. and Parker, P. J.** (1998). Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cell Biol* 18:790-798.
- Schwamborn, J. C. and Puschel, A. W.** (2004). The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci* 7:923-929.
- Seabra, M. C. and Wasmeier, C.** (2004). Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 16:451-457.
- Sharma-Walia, N., Krishnan, H. H., Naranatt, P. P., Zeng, L., Smith, M. S. and Chandran, B.** (2005). ERK1/2 and MEK1/2 induced by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) early during infection of target cells are essential for expression of viral genes and for establishment of infection. *J Virol* 79:10308-10329.
- Sheetz, M. P., Sable, J. E. and Dobereiner, H. G.** (2006). Continuous membrane-cytoskeleton adhesion requires continuous accommodation to lipid and cytoskeleton dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35:417-434.
- Shenoy, S. K. and Lefkowitz, R. J.** (2003). Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* 375:503-515.
- Sieczkarski, S. B., Brown, H. A. and Whittaker, G. R.** (2003). Role of protein kinase C betaII in influenza virus entry via late endosomes. *J Virol* 77:460-469.
- Sieczkarski, S. B. and Whittaker, G. R.** (2005). Viral entry. *Curr Top Microbiol Immunol* 285:1-23.
- Simón-Mateo, C., Andrés, G., Almazán, F. and Viñuela, E.** (1997). Proteolytic processing in African swine fever virus: evidence for a new structural polyprotein, pp62. *J Virol* 71:5799-5804.

- Simón-Mateo, C., Andrés, G. and Viñuela, E.** (1993). Polyprotein processing in African swine fever virus: a novel gene expression strategy for a DNA virus. *Embo J* 12:2977-2987.
- Simón-Mateo, C., Freije, J. M., Andrés, G., López-Otín, C. and Viñuela, E.** (1995). Mapping and sequence of the gene encoding protein p17, a major African swine fever virus structural protein. *Virology* 206:1140-1144.
- Smith, A. E. and Helenius, A.** (2004). How viruses enter animal cells. *Science* 304:237-242.
- Sodeik, B.** (2000). Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol* 8:465-472.
- Stefanovic, S., Windsor, M., Nagata, K. I., Inagaki, M. and Wileman, T.** (2005). Vimentin rearrangement during African swine fever virus infection involves retrograde transport along microtubules and phosphorylation of vimentin by calcium calmodulin kinase II. *J Virol* 79:11766-11775.
- Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G. F., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J. and Hawkins, P. T.** (1998). Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279:710-714.
- Stokoe, D., Stephens, L. R., Copeland, T., Gaffney, P. R., Reese, C. B., Painter, G. F., Holmes, A. B., McCormick, F. and Hawkins, P. T.** (1997). Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 277:567-570.
- Stork, P. J.** (2003). Does Rap1 deserve a bad Rap? *Trends Biochem Sci* 28:267-275.
- Studier, F. W.** (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* 219:37-44.
- Styblo, M., Walton, F. S., Harmon, A. W., Sheridan, P. A. and Beck, M. A.** (2007). Activation of superoxide dismutase in selenium-deficient mice infected with influenza virus. *J Trace Elem Med Biol* 21:52-62.
- Suikkanen, S., Aaltonen, T., Nevalainen, M., Valilehto, O., Lindholm, L., Vuento, M. and Vihinen-Ranta, M.** (2003). Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic toward the nucleus. *J Virol* 77:10270-10279.
- Suomalainen, M., Nakano, M. Y., Boucke, K., Keller, S. and Greber, U. F.** (2001). Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus. *Embo J* 20:1310-1319.
- Sussman, M. D., Lu, Z., Kutish, G. F., Afonso, C. A. and Rock, D. L.** (1993). The identification of an African swine fever gene with conserved helicase motifs and a striking homology to herpes virus origin binding protein, UL9. *Nucleic Acids Res* 21:2254.

T

Teis, D., Wunderlich, W. and Huber, L. A. (2002). Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Dev Cell* 3:803-814.

Thomson, G. R. (1985). The epidemiology of African swine fever: the role of free-living hosts in Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 52:201-209.

Thomson, G. R., Gainaru, M. D. and Van Dellen, A. F. (1980). Experimental infection of warthos (*Phacochoerus aethiopicus*) with African swine fever virus. *Onderstepoort J Vet Res* 47:19-22.

Tohgo, A., Choy, E. W., Gesty-Palmer, D., Pierce, K. L., Laporte, S., Oakley, R. H., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. and Luttrell, L. M. (2003). The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem* 278:6258-6267.

Toker, A. (1998). Signaling through protein kinase C. *Front Biosci* 3:D1134-1147.

Toker, A. (2000). Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Mol Pharmacol* 57:652-658.

Toker, A. and Cantley, L. C. (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387:673-676.

Tulman, E. R. and Rock, D. L. (2001). Novel virulence and host range genes of African swine fever virus. *Curr Opin Microbiol* 4:456-461.

U

Uhlik, M. T., Abell, A. N., Cuevas, B. D., Nakamura, K. and Johnson, G. L. (2004). Wiring diagrams of MAPK regulation by MEKK1, 2, and 3. *Biochem Cell Biol* 82:658-663.

Upla, P., Marjomaki, V., Kankaanpaa, P., Ivaska, J., Hyypia, T., Van Der Goot, F. G. and Heino, J. (2004). Clustering induces a lateral redistribution of alpha 2 beta 1 integrin from membrane rafts to caveolae and subsequent protein kinase C-dependent internalization. *Mol Biol Cell* 15:625-636.

V

Valdeira, M. L., Bernardes, C., Cruz, B. and Geraldés, A. (1998). Entry of African swine fever virus into Vero cells and uncoating. *Vet Microbiol* 60:131-140.

Valdeira, M. L. and Geraldes, A. (1985). Morphological study on the entry of African swine fever virus into cells. *Biol Cell* 55:35-40.

Valderrama, F., Cordeiro, J. V., Schleich, S., Frischknecht, F. and Way, M. (2006). Vaccinia virus-induced cell motility requires F11L-mediated inhibition of RhoA signaling. *Science* 311:377-381.

Vale, R. D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112:467-480.

Vallee, R. B., Williams, J. C., Varma, D. and Barnhart, L. E. (2004). Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol* 58:189-200.

van Loo, N. D., Fortunati, E., Ehlert, E., Rabelink, M., Grosveld, F. and Scholte, B. J. (2001). Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *J Virol* 75:961-970.

Verkman, A. S. (2002). Solute and macromolecule diffusion in cellular aqueous compartments. *Trends Biochem Sci* 27:27-33.

Vetter, I. R. and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294:1299-1304.

Vojtek, A. B. and Cooper, J. A. (1995). Rho family members: activators of MAP kinase cascades. *Cell* 82:527-529.

Vossler, M. R., Yao, H., York, R. D., Pan, M. G., Rim, C. S. and Stork, P. J. (1997). cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* 89:73-82.

W

Wang, M., Howell, J. M., Libbey, J. E., Tainer, J. A. and Fujinami, R. S. (2003). Manganese superoxide dismutase induction during measles virus infection. *J Med Virol* 70:470-474.

Ward, B. M. (2005). Visualization and characterization of the intracellular movement of vaccinia virus intracellular mature virions. *J Virol* 79:4755-4763.

Ward, B. M. and Moss, B. (2001). Vaccinia virus intracellular movement is associated with microtubules and independent of actin tails. *J Virol* 75:11651-11663.

Ward, B. M. and Moss, B. (2004). Vaccinia virus A36R membrane protein provides a direct link between intracellular enveloped virions and the microtubule motor kinesin. *J Virol* 78:2486-2493.

Watanabe, T., Noritake, J. and Kaibuchi, K. (2005). Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol* 15:76-83.

Waterman-Storer, C. M., Worthylake, R. A., Liu, B. P., Burridge, K. and Salmon, E. D. (1999). Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat Cell Biol* 1:45-50.

Webb, B. L., Hirst, S. J. and Giembycz, M. A. (2000). Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. *Br J Pharmacol* 130:1433-1452.

Wheeler, M. and Domin, J. (2006). The N-terminus of phosphoinositide 3-kinase-C2beta regulates lipid kinase activity and binding to clathrin. *J Cell Physiol* 206:586-593.

Wilkinson, P. J., Wardley, R. C. and Williams, S. M. (1981). African swine fever virus (Malta/78) in pigs. *J Comp Pathol* 91:277-284.

Winder, S. J. and Ayscough, K. R. (2005). Actin-binding proteins. *J Cell Sci* 118:651-654.

Woscholski, R. and Parker, P. J. (1997). Inositol lipid 5-phosphatases--traffic signals and signal traffic. *Trends Biochem Sci* 22:427-431.

Wymann, M. P., Bulgarelli-Leva, G., Zvelebil, M. J., Pirola, L., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D. and Panayotou, G. (1996). Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol* 16:1722-1733.

Wymann, M. P. and Pirola, L. (1998). Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1436:127-150.

X

Xiang, B., Yu, G. H., Guo, J., Chen, L., Hu, W., Pei, G. and Ma, L. (2001). Heterologous activation of protein kinase C stimulates phosphorylation of delta-opioid receptor at serine 344, resulting in beta-arrestin- and clathrin-mediated receptor internalization. *J Biol Chem* 276:4709-4716.

Xu, Q., Schett, G., Li, C., Hu, Y. and Wick, G. (2000). Mechanical stress-induced heat shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by Rac and Ras small G proteins but not mitogen-activated protein kinases. *Circ Res* 86:1122-1128.

Y

Yáñez, R. J., Bournsnel, M., Nogal, M. L., Yuste, L. and Viñuela, E. (1993a). African swine fever virus encodes two genes which share significant homology with the two largest subunits of DNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 21:2423-2427.

Yáñez, R. J., Rodríguez, J. M., Nogal, M. L., Yuste, L., Enríquez, C., Rodríguez, J. F. and Viñuela, E. (1995). Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. *Virology* 208:249-278.

Yáñez, R. J., Rodríguez, J. M., Rodríguez, J. F., Salas, M. L. and Viñuela, E. (1993b). African swine fever virus thymidylate kinase gene: sequence and transcriptional mapping. *J Gen Virol* 74 (Pt 8):1633-1638.

Yáñez, R. J. and Viñuela, E. (1993). African swine fever virus encodes a DNA ligase. *Virology* 193:531-536.

Yang, X. and Gabuzda, D. (1999). Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by the ERK mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol* 73:3460-3466.

Yazdani, U. and Terman, J. R. (2006). The semaphorins. *Genome Biol* 7:211.

Ye, G. J., Vaughan, K. T., Vallee, R. B. and Roizman, B. (2000). The herpes simplex virus 1 U(L)34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membrane. *J Virol* 74:1355-1363.

Ye, J., Wang, C., Sumpter, R., Jr., Brown, M. S., Goldstein, J. L. and Gale, M., Jr. (2003). Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15865-15870.

Yildiz, A. and Selvin, P. R. (2005). Kinesin: walking, crawling or sliding along? *Trends Cell Biol* 15:112-120.

Yoon, S. and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24:21-44.

Z

Zheng, Y., Bagrodia, S. and Cerione, R. A. (1994). Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *J Biol Chem* 269:18727-18730.

Zsak, L., Lu, Z., Kutish, G. F., Neilan, J. G. and Rock, D. L. (1996). An African swine fever virus virulence-associated gene NL-S with similarity to the herpes simplex virus ICP34.5 gene. *J Virol* 70:8865-8871.

