



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Efecto de la infección del citomegalovirus sobre receptores SLAM en macrófagos murinos

Angela María Zarama Ortiz

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



TESIS DOCTORAL

**EFFECTO DE LA INFECCIÓN DEL CITOMEGALOVIRUS SOBRE
RECEPTORES SLAM EN MACRÓFAGOS MURINOS**

Angela María Zarama Ortiz

Universidad de Barcelona
2014



Facultad de medicina
Programa de doctorado de Biomedicina

EFFECTO DE LA INFECCIÓN DEL CITOMEGALOVIRUS SOBRE RECEPTORES SLAM EN MACRÓFAGOS MURINOS

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Ana Angulo Aguado en el Departamento de Biología Celular, Inmunología y Neurociencias/Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer.

Angela María Zarama Ortiz

Dr. Ana Angulo Aguado

Memoria presentada por Angela María Zarama Ortiz para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona

Barcelona, Julio de 2014

A mi familia
A Alejandro

ÍNDICE



ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	9
I.1	EL CITOMEGALOVIRUS HUMANO (HCMV).....	9
I.1.1	Características generales y patogenia.....	9
I.1.2	Estructura del virión y genoma.....	10
I.1.3	Ciclo de replicación del HCMV.....	14
I.2	EL CITOMEGALOVIRUS MURINO (MCMV) COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL HCMV.....	16
I.3	RESPUESTA INMUNITARIA A LA INFECCIÓN POR EL CITOMEGALOVIRUS Y MECANISMOS DE INMUNOEVASIÓN.....	19
I.3.1	Inmunidad innata.....	20
I.3.1.1	Respuesta mediada por las células NK a la infección por el MCMV y mecanismos de inmunoevasión asociados.....	20
I.3.2	Inmunidad adaptativa.....	23
I.3.2.1	Respuesta de los linfocitos T frente a la infección por el CMV y mecanismos de inmunoevasión asociados.....	24
I.4	RECEPTORES DE SUPERFICIE DE LA FAMILIA SLAM.....	27
I.4.1	Localización genómica.....	28
I.4.2	Estructura y ligandos.....	28
I.4.3	Función de los miembros de la familia SLAM.....	29
I.4.4	CD48 (SLAMF2).....	31
I.4.5	CD244 (2B4).....	32
II.	HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	37
III.	OBJETIVOS.....	41
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
IV.1	MATERIALES.....	45
IV.1.1	Células.....	45
IV.1.2	Virus.....	45
IV.1.3	Cepa de Escherichia coli.....	46
IV.1.4	Oligonucleótidos.....	47
IV.1.5	Enzimas.....	47
IV.1.6	Plásmidos.....	47
IV.1.7	Medios bacterianos.....	48
IV.1.8	Medios de cultivo celular.....	49
IV.1.9	Marcadores de peso molecular.....	49
IV.1.10	Anticuerpos.....	49
IV.1.11	Soluciones.....	50

INDICE

IV.1.12	Materiales especiales, kits y equipamiento	52
IV.2	METODOLOGÍA	53
IV.2.1	Cultivos celulares	53
IV.2.1.1	Mantenimiento de los cultivos celulares.....	53
IV.2.1.2	Infecciones virales	53
IV.2.1.3	Generación de stocks virales	54
IV.2.1.4	Titulación vírica	54
IV.2.1.5	Cinéticas de replicación viral.....	55
IV.2.1.6	Tratamiento del cultivo de macrófagos con diferentes inhibidores.....	55
IV.2.1.7	Ensayos de degranulación de las células NK en co-cultivo con macrófagos peritoneales murinos.....	56
IV.2.2	Purificación de células NK.....	56
IV.2.3	Transfección celular mediante electroporación	57
IV.2.4	Inmunofenotipado y análisis por citometría de flujo	58
IV.2.5	Inmunocitoquímica.....	58
IV.2.6	Inactivación viral mediante tratamiento con luz ultravioleta	59
IV.2.7	Producción de anticuerpos monoclonales anti-m154.....	59
IV.2.7.1	Inmunización de animales	60
IV.2.7.2	Fusión celular	60
IV.2.7.3	Selección de los hibridomas de interes por ELISA	61
IV.2.7.4	Subclonaje y cultivo de los hibridomas	62
IV.2.8	Técnicas moleculares del ADN	62
IV.2.8.1	Minipreps	62
IV.2.8.2	Midipreps	63
IV.2.8.3	Cuantificación del ADN.....	63
IV.2.8.4	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	63
IV.2.8.5	Extracción de ARN	64
IV.2.8.6	Transcripción reversa-PCR (RT-PCR).....	64
IV.2.8.7	Secuenciación del ADN.....	65
IV.2.8.8	Electroforesis de ADN en geles de agarosa	65
IV.2.8.9	Restricciones del ADN	65
IV.2.8.10	Ligación del ADN	65
IV.2.9	Biología molecular de proteínas.....	65
IV.2.9.1	Extracción y cuantificación de proteínas a partir de células en cultivo.....	66
IV.2.9.2	Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida	66
IV.2.9.3	Inmunodetección de proteínas por Western blot.....	67
IV.2.10	Experimentos con animales	67
IV.2.10.1	Ratones e infecciones	67

INDICE

IV.2.10.2	Extracción de los macrófagos peritoneales murinos.....	68
IV.2.10.3	Obtención de células dendríticas a partir de precursores de médula ósea	69
IV.2.10.4	Determinación de títulos virales a partir de órganos de ratones infectados	69
IV.2.11	Análisis de la secuencia aminoacídica de m154	70
IV.2.12	Análisis estadísticos.....	70
V.	RESULTADOS.....	75
V.1	MODULACIÓN DE LOS RECEPTORES SLAM POR EL MCMV EN MACRÓFAGOS PERITONEALES	75
V.1.1	Análisis de la expresión de los receptores SLAM en la superficie de los macrófagos peritoneales murinos	75
V.1.2	El MCMV reduce la expresión de los receptores SLAM en la superficie del macrófago.....	75
V.1.3	La modulación de los receptores SLAM se correlaciona con el nivel de infección por el MCMV	77
V.1.4	El MCMV inactivado por luz ultravioleta (UV) pierde la capacidad de modular los receptores SLAM en los macrófagos	78
V.1.5	El MCMV reduce la expresión de los receptores SLAM en la superficie de las células dendríticas murinas	80
V.2	DETERMINACIÓN DE REGIONES GENÓMICAS DEL MCMV QUE CONTIENEN GENES CAPACES DE REGULAR LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES SLAM EN MACRÓFAGOS PERITONEALES	81
V.2.1	Mutantes del MCMV con deleciones en regiones no esenciales del genoma	81
V.2.2	Análisis de la expresión de receptores SLAM en macrófagos infectados por mutantes de deleción del MCMV	82
V.3	IDENTIFICACIÓN DEL GEN DEL MCMV QUE MODULA EL RECEPTOR SLAM CD48 EN MACRÓFAGOS PERITONEALES.....	86
V.3.1	Mapeo detallado e identificación de <i>m154</i> , el gen del MCMV que interfiere con CD48.....	86
V.3.2	<i>m154</i> no afecta de modo general a la expresión en superficie de receptores anclados a la membrana por GPI	91
V.4	CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA m154 DEL MCMV	92
V.4.1	Análisis de la secuencia aminoacídica de m154	92
V.4.2	Generación de un anticuerpo monoclonal dirigido contra m154	93
V.4.3	Detección de m154 durante la infección viral	94
V.4.4	Localización de m154 en células infectadas por el MCMV	95
V.4.5	<i>m154</i> expresada aisladamente no reduce la expresión de CD48.....	96
V.4.6	<i>m154</i> expresada ectópicamente en el contexto de la infección viral disminuye la expresión de CD48	97

INDICE

V.5	MECANISMO DE ACCIÓN DE m154.....	98
V.5.1	m154 no está implicada en la replicación viral <i>in vitro</i>	98
V.5.2	m154 no altera CD48 a nivel transcripcional	100
V.5.3	CD48 es degradado por m154	100
V.5.4	m154 degrada CD48 por la vía del proteosoma y del lisosoma	101
V.5.5	m154 contribuye a disminuir la susceptibilidad de los macrófagos infectados por el MCMV al ataque de las células NK	103
V.5.6	La disminución de la citotoxicidad de las células NK sobre los macrófagos infectados mediada por m154 implica el reconocimiento de CD48 por CD244 ..	105
V.6	PAPEL DE m154 DURANTE LA INFECCIÓN <i>IN VIVO</i> DEL MCMV	106
V.6.1	La ausencia de m154 disminuye la aparición de los signos de la enfermedad producida por el MCMV durante la infección del ratón	106
V.6.2	m154 no altera la naturaleza de las poblaciones celulares presentes en la cavidad peritoneal tras la infección viral <i>in vivo</i>	107
V.6.3	Los MCMV defectivos en <i>m154</i> están atenuados durante la infección <i>in vivo</i>	107
V.6.4	m154 promueve el crecimiento del MCMV <i>in vivo</i> mediante la evasión de la respuesta de las células NK	109
VI.	DISCUSIÓN	115
VII.	CONCLUSIONES	129
VIII.	ABREVIACIONES.....	133
IX.	BIBLIOGRAFIA.....	139
X.	ANEXOS.....	154
X.1	ANEXO 1. ANÁLISIS DE m154 EN DIFERENTES CEPAS DEL MCMV.....	154
X.2	ANEXO 2. ANÁLISIS DE LA COLA CITOPASMÁTICA DE m154.....	155
X.1	ANEXO 3. PUBLICACIÓN.	156

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1 EL CITOMEGALOVIRUS HUMANO (HCMV)

I.1.1 Características generales y patogenia

El citomegalovirus (CMV) es un patógeno ubicuo que pertenece a la familia *Herpesviridae*. Esta extensa familia de virus se encuentra ampliamente diseminada en la naturaleza y presenta gran capacidad de infectar a los vertebrados, desde peces hasta mamíferos. La familia *Herpesviridae* está dividida en tres subfamilias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, y *Gammaherpesvirinae*. Se encuentran patógenos humanos en todas ellas: los virus Herpes simplex 1 y 2 y Varicela-zóster son herpesvirus α , el CMV humano (HCMV) y los herpesvirus humanos 6 y 7 son herpesvirus β y el virus del Epstein-Barr junto con el virus del sarcoma de Kaposi son herpesvirus γ (Philip *et al.*, 2013). Dentro de esta familia de virus todos los miembros comparten algunas propiedades biológicas, tales como el limitado tropismo celular, un ciclo de replicación nuclear relativamente lento y un agrandamiento característico de las células infectadas (Pellet and Roizman, 2007). Por otra parte, los herpesvirus expresan una gran cantidad de enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos nucleicos, la síntesis del ADN y el procesamiento de proteínas (Philip *et al.*, 2013).

El HCMV, también denominado herpesvirus humano 5, es el miembro representativo de la subfamilia de los herpesvirus β . Presenta una alta seroprevalencia en la población mundial, siendo portadores entre el 40 y el 90% de los adultos. Sin embargo, esta prevalencia varía considerablemente de acuerdo a las circunstancias socio-económicas o la región geográfica en la que se encuentran los individuos (Cannon *et al.*, 2010). La importancia del HCMV ha incrementado en las últimas tres décadas debido al aumento de trasplantes de órganos y el uso de terapias inmunosupresoras post-trasplantes, así como de casos de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

La transmisión del HCMV ocurre por contacto directo con secreciones corporales infectadas tales como la sangre, la saliva, la orina, el semen y las secreciones cervicales. Adicionalmente, este virus es el único herpesvirus humano transmitido de la madre al hijo a través de la placenta (Boeckh and Geballe, 2011). La infección primaria de un paciente inmunocompetente es generalmente asintomática, pudiendo presentar signos clínicos como mononucleosis con fiebre persistente, mialgias y adenopatías cervicales (Krmptotic *et al.*, 2003). Tras la resolución de la infección aguda, el virus es capaz de establecer latencia en determinados tipos celulares por largos periodos de tiempo. Esta característica le permite al virus reactivarse intermitentemente, conllevando la liberación y transmisión de partículas infecciosas a nuevos huéspedes. La

INTRODUCCIÓN

reactivación viral bajo condiciones de inmunosupresión o inmunodeficiencia, presentes en pacientes sometidos a trasplantes de órganos, con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o recién nacidos, es un factor importante para el desarrollo de patologías severas que pueden llevar incluso a la muerte del individuo (Britt, 2008). De esta manera, los pacientes receptores de trasplantes de órganos infectados por el HCMV, presentan una mayor susceptibilidad al desarrollo de complicaciones severas como neumonía, hepatitis, enteritis, encefalitis y retinitis, pudiendo terminar con la disfunción total del órgano trasplantado (Krmptotic *et al.*, 2003). Por otra parte, en pacientes con SIDA se ha encontrado que la infección por el HCMV cursa principalmente con manifestaciones clínicas como retinitis, esofagitis y colitis. Adicionalmente, la transmisión placentaria del HCMV durante el embarazo puede conducir al desarrollo de lesiones neurológicas y es considerada la principal causa viral de desórdenes congénitos (Fowler and Boppana, 2006).

Actualmente no existe una terapia totalmente efectiva frente a la infección por el HCMV. La infección y el control de la replicación viral se tratan mayoritariamente con agentes antivirales como el ganciclovir (Cytovene), el valganciclovir (Valcyte), el foscarnet (Foscavir) o el cidofovir (Vistide). Sin embargo, estos fármacos no son del todo eficaces y en tratamientos prolongados, se ha detectado la aparición de cepas con resistencias a estos antivirales, así como de efectos secundarios tóxicos en el paciente (Lurain and Chou, 2010). Debido a ello, su uso se limita a pacientes de alto riesgo para el desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, hasta el momento no se ha podido desarrollar una vacuna para la prevención de la infección por el CMV. Diferentes estudios se han enfocado en la obtención de una vacuna basada principalmente en la incorporación de proteínas de la envuelta vírica, con objeto de inducir la formación de anticuerpos neutralizantes o de estimular la inmunidad celular en pacientes tratados (Schleiss, 2008). No obstante, la vacuna más eficiente desarrollada hasta el momento solamente es capaz de otorgar una protección del 50% en mujeres jóvenes con alto riesgo de infección por el CMV (Pass *et al.*, 2009). La eficacia de las vacunas preventivas es aún menor en pacientes sometidos a trasplantes de órganos (Schleiss, 2008).

I.1.2 Estructura del virión y genoma

La estructura general de la partícula del HCMV se representa en la figura 1. Esta presenta un diámetro aproximado de 200nm, conteniendo una nucleocápside icosaédrica de 125nm que recubre el genoma de ADN altamente empaquetado de forma lineal. La nucleocápside, a su vez, está incorporada dentro de un tegumento o matriz que consta de al menos unas 27 proteínas codificadas por el virus. Esta nucleocápside y el tegumento se encuentran envueltos por una bicapa lipídica o envoltura, la cual procede de compartimentos intracelulares de la célula

INTRODUCCIÓN

infectada. Además de proteínas celulares, la bicapa lipídica contiene aproximadamente unas 20 glicoproteínas codificadas por el virus (Gibson, 2008).

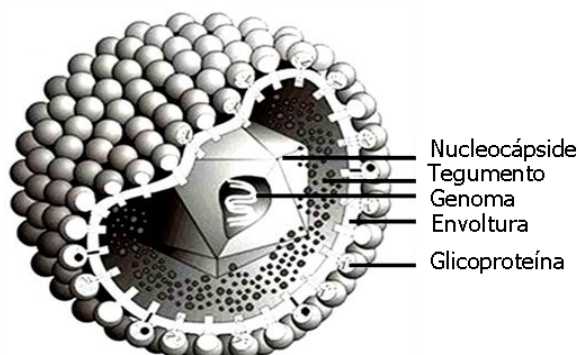


Figura 1. Estructura de la partícula viral del HCMV

Se muestra el ADN bicatenario del virus contenido dentro de una cápside icosaédrica o nucleocápside. Rodeando la nucleocápside se indica la matriz proteica o tegumento que a su vez se recubre por una envoltura que contiene glicoproteínas virales. Adaptada de Tomtishen, 2013.

El HCMV tiene el genoma más grande entre los miembros de la familia *Herpesviridae*, con cerca de 230-240Kbp. Su genoma consiste en un ADN lineal de doble cadena formado por dos fragmentos unidos covalentemente: un fragmento largo (UL) y un fragmento corto (US) (Figura 2). Cada uno de estos segmentos está flanqueado por repeticiones invertidas que se denominan según su posición en el interior del genoma como repeticiones internas cortas (IRS) ó repeticiones internas largas (IRL), o bien según su posición en el extremo como repeticiones terminales largas (TRL) o repeticiones terminales cortas (TRS) (Davison *et al.*, 2013).

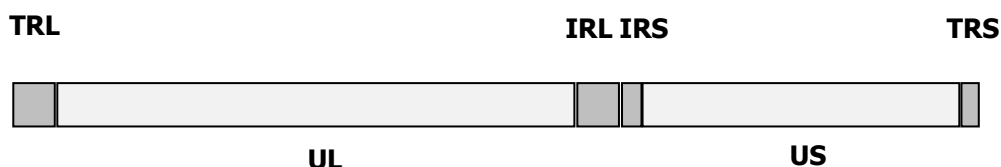


Figura 2. Estructura del genoma del HCMV

Se muestran los dos fragmentos únicos del genoma del citomegalovirus humano, denominados UL y US. Estas regiones están flanqueadas por repeticiones invertidas que se denominan TRL o IRL en la región UL y TRS o IRS en la región US.

El HCMV codifica aproximadamente 200 pautas abiertas de lectura, las cuales han sido numeradas en orden correlativo usando los prefijos TRL, UL, IRL, IRS, US o TRS, según la posición en el genoma donde se encuentran (Dolan *et al.*, 2004). En la figura 3 se muestra un esquema de las diferentes pautas de lectura abierta predichas en el primer HCMV secuenciado, correspondiente a la cepa AD169 adaptada a crecer en cultivo de tejidos (Chee *et al.*, 1990). Hay que destacar la complejidad del genoma viral debido, entre otros motivos, a que contiene pautas de lectura abiertas solapantes entre sí y genes que se expresan en las dos orientaciones del genoma. Además, se ha descrito la presencia de múltiples procesos de *splicing*, así como de 14

INTRODUCCIÓN

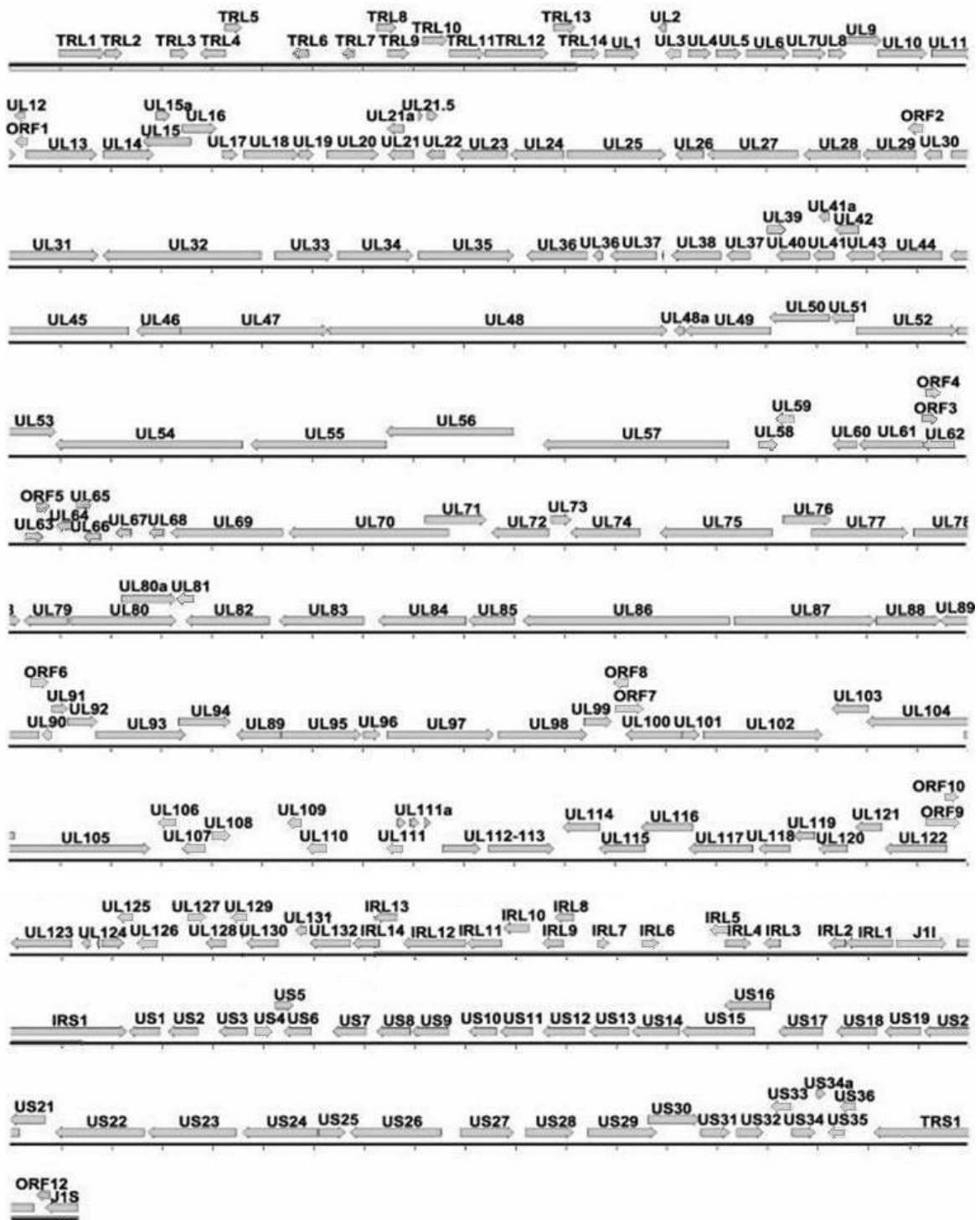


Figura 3. Mapa del genoma de la cepa AD169 del HCMV

Se muestra la distribución de las pautas de lectura abiertas de la cepa AD169 del HCMV. Cada flecha ilustra una pauta de lectura abierta, indicándose la orientación en la que se expresa y el nombre asignado en la parte superior. Se muestra la orientación en la que se expresa cada una de ellas. Cada división horizontal representa 1 kb del genoma viral. Adaptada de Murphy *et al.*, 2003.

INTRODUCCIÓN

microARNs codificados en el genoma del HCMV (Fannin-Rider *et al.*, 2008). El hecho de que gran parte de las pautas abiertas de lectura se hayan predicho mediante programas bioinformáticos, conlleva a que esta anotación sufra constantes modificaciones a medida que se obtienen datos adicionales de expresión génica o que se profundiza en el estudio de determinados productos génicos (Davison and Bhella, 2007). Por otra parte, entre las diferentes cepas del HCMV secuenciadas se ha observado que existen variaciones significativas a nivel de su secuencia (Dolan *et al.*, 2004). En particular y debido a la gran cantidad de pases a los que se han sometido las cepas adaptadas a crecer en cultivo de tejidos, estas suelen tener deleciones o reordenamientos en su genoma. Así por ejemplo, las cepas adaptadas a cultivo de tejidos como AD169 y Towne, han perdido una región de su genoma de aproximadamente 15 Kb y 12 Kb respectivamente, presente en cambio en el fragmento UL de los aislados clínicos (Cha *et al.*, 1996).

Por otra parte, los citomegalovirus presentan en su genoma conjuntos de genes relacionados entre sí generados posiblemente por duplicación génica o divergencia, que componen un número de diferentes familias multigénicas (Davison *et al.*, 2003). En concreto, el HCMV presenta 16 familias multigénicas comprendidas por un número de pautas de lectura abiertas variable y localizadas a lo largo del genoma (Chee *et al.*, 1999; Davison *et al.*, 2013). Por ejemplo, mientras que la familia multigénica US2 en el HCMV se encuentra conformada por solamente dos miembros dispuestos de manera contigua en el genoma viral (US2 y US3), la familia multigénica US22 comprende trece miembros distribuidos en distintas regiones en el genoma.

Hasta la fecha solamente se conoce la función de alrededor del 35% de las proteínas codificadas por el citomegalovirus. Mediante estudios basados en el análisis de mutantes virales con deleciones en cada una de las potenciales pautas de lectura abiertas a lo largo del genoma viral, se ha determinado que únicamente alrededor de 50 genes son esenciales para la replicación del virus o para el empaquetamiento del virión en cultivo de tejidos (Dunn *et al.*, 2003b). Estos genes, como son los que codifican la ADN polimerasa o las proteínas del virión gB (UL55) y gH (UL75), están en su mayoría altamente conservados entre los diferentes miembros de la familia de los herpesvirus y tienden a ubicarse en la parte central de la región UL. En el resto del genoma viral, es decir, en las secuencias situadas más hacia los extremos, se encuentran los genes dispensables para la replicación del HCMV en células infectadas *in vitro*, los cuales probablemente codifican para proteínas que desempeñan un papel importante en procesos de interacción con el huésped, particularmente en la modulación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa (Davison and Bhella, 2007). Estos genes son mayoritariamente específicos de la subfamilia de los betaherpesvirus, o bien, propios del CMV humano, no existiendo en CMVs que infectan otras especies (McGeoch *et al.*, 2006).

I.1.3 Ciclo de replicación del HCMV

El HCMV es capaz de crecer y extenderse en un amplio rango de células en el individuo afectado, como por ejemplo en células epiteliales, endoteliales, musculares, fibroblastos, macrófagos, neuronas o hepatocitos (Sacher *et al.*, 2012). *In vitro*, mientras que las cepas adaptadas a crecer en el laboratorio presentan un tropismo celular más restringido, los HCMV aislados de pacientes infectados son capaces de infectar un mayor número de tipos celulares, como fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, macrófagos o células dendríticas (DCs) (Sinzger *et al.*, 2008).

El ciclo de replicación del HCMV es muy lento; entre las 16 y las 24 horas post-infección (hpi) empieza la síntesis de ADN viral en el núcleo, sin embargo, no se producen partículas virales hasta las 72 hpi (Mocarski *et al.*, 2013). En la figura 4 se representan los principales eventos que tienen lugar durante el ciclo de replicación del HCMV.

En primer lugar, ocurre la interacción de la partícula viral con la membrana celular a través de la unión de glicoproteínas virales como gB (UL55), gM (UL100) y gN (UL73) con moléculas de heparán sulfato de la superficie celular. La unión entre estas moléculas es de carácter débil y viene seguida por una interacción más estable entre proteínas del virus y receptores celulares de entrada, lo cual activa una serie de cascadas de transducción celular (Isaacson *et al.*, 2008). En la mayoría de tipos celulares permisivos a la infección por el CMV, como por ejemplo los fibroblastos, la entrada del virus a la célula sucede a través de glicoproteínas de la envoltura viral, como gH (UL75), gL (UL115) o gO (UL74). En la célula huésped, varias moléculas han sido propuestas como responsables de la adhesión y acceso del virus al citoplasma celular, entre ellas, algunas integrinas (como $\alpha\beta3$, $\alpha2\beta1$, $\alpha6\beta1$) o el receptor epidérmico de factores de crecimiento (EGFR) (Feire and Compton, 2013).

A continuación, se produce la fusión de la membrana celular con la envoltura de la partícula viral, permitiendo la liberación de la cápside y las proteínas del tegumento directamente al citoplasma celular (Mocarski *et al.*, 2013). En células epiteliales y endoteliales, se ha descrito la existencia de un mecanismo de entrada viral dependiente de pH, en el cual intervienen los genes virales *UL128*, *UL103*, *UL131A*, además de glicoproteínas del CMV como gH o gL, posibilitando la entrada de la partícula viral al interior celular mediante endocitosis (Ryckman *et al.*, 2008).

INTRODUCCIÓN

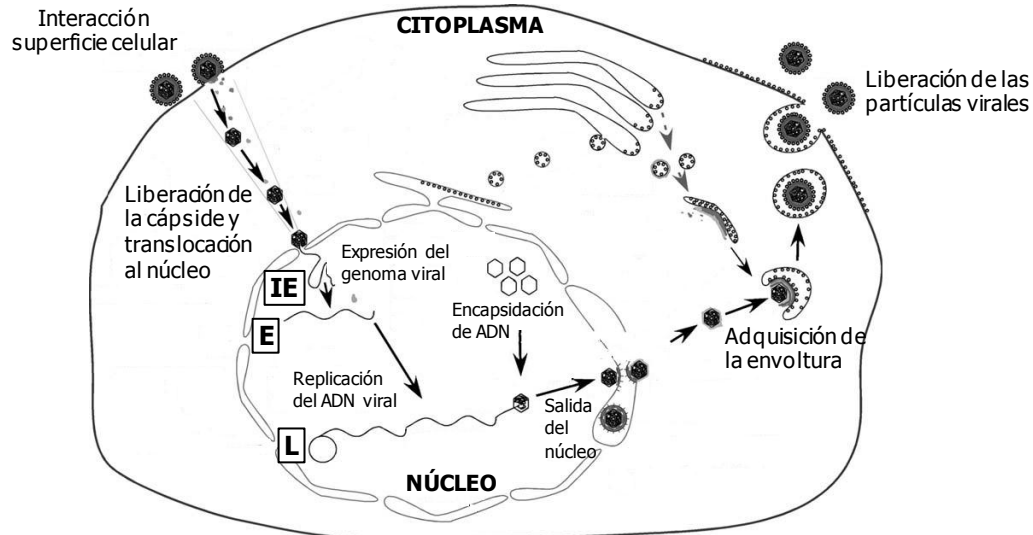


Figura 4. Ciclo de replicación del HCMV

Se muestran las etapas más importantes del ciclo lítico del HCMV en la célula infectada. Tras el reconocimiento del virión por receptores específicos presentes en la membrana celular, la cápside se internaliza en el citoplasma, viajando a través de la red de microtúbulos hasta el núcleo. A través de los poros de la membrana nuclear, el material genético del virus entra dentro del núcleo celular, expresándose los genes del HCMV siguiendo una cascada temporal: en primer lugar los genes inmediatamente tempranos (IE), luego los tempranos (E) y, una vez ha ocurrido la replicación del ADN viral, los genes tardíos (L). Posteriormente, la cápside es empaquetada dentro del núcleo y a continuación sale al citoplasma donde adquiere la envoltura final. Finalmente, las partículas son liberadas al espacio extracelular. Figura adaptada de Mocarski *et al.*, 2007.

Una vez en el citoplasma celular, se produce el traslado de la cápside del HCMV a los poros del núcleo por medio de los microtúbulos, mediante la intervención de diversas proteínas del tegumento como pUL48 o pUL47 y diferentes elementos del citoesqueleto celular que aún no se han definido (Kalejta, 2008; Tomtishen, 2013). Posteriormente, a través de los poros de la membrana nuclear tiene lugar la entrada del genoma viral al interior del núcleo, donde el ADN lineal del HCMV se circulariza en forma de episoma. A continuación transcurre la expresión del genoma viral, el cual se transcribe a manera de cascada temporal. De esta manera, los primeros genes en expresarse son los genes inmediatamente tempranos (IE), seguidamente de los genes tempranos (E) y finalmente se produce la transcripción de los genes tardíos (L) (Kalejta, 2008). Los genes IE se expresan inmediatamente tras la entrada del virus, no dependen de la síntesis de *novio* de proteínas virales y funcionan preferentemente en la regulación transcripcional de genes, tanto virales como celulares, optimizando la célula para la expresión del resto de genoma viral (Stinski and Meier, 2007). Además, estos productos génicos, junto con proteínas virales liberadas en la célula con la entrada del virión (por ejemplo UL82 o UL83), llevan a cabo una serie de funciones adicionales, como bloquear las defensas celulares intrínsecas, inducir el arresto del ciclo y la muerte celular (UL123), bloquear la apoptosis (mediado por UL36 y UL37) o evitar la expresión de MHC clase I en superficie para bloquear la presentación antigénica (ejercida por US3) (Paulus and Nevels, 2009).

INTRODUCCIÓN

Tras la transcripción de los genes IE, ocurre la transcripción de los genes tempranos, cuya expresión está regulada por proteínas inmediatamente tempranas del virus y por proteínas celulares. Gran parte de estos productos tempranos desempeñan funciones en la replicación del ADN viral, como es el caso de la ADN polimerasa viral UL54 o el factor de procesamiento del ADN UL44. Otras proteínas tempranas intervienen además en diferentes procesos de la maduración de la cápside viral o en la alteración del ambiente celular, haciéndolo idóneo para la replicación del virus (White and Spector, 2007). Por otra parte, algunas de las proteínas virales que se expresan tempranamente se encuentran implicadas en la modulación de la respuesta inmunitaria del huésped a la infección, siendo el caso por ejemplo de US2, el cual participa junto con US3 en la retención de moléculas MHC de clase I en el retículo endoplasmático (Jones and Sun, 1997) o US28, un receptor de quimiocinas que favorece la estimulación de la migración celular para promover la diseminación del virus en el organismo infectado (White and Spector, 2007).

Una vez transcritas las proteínas tempranas, comienza la replicación del genoma viral mediante un mecanismo de círculo rodante. Este proceso permite la generación de un ADN concatémico, el cual es cortado a unidades genómicas sencillas durante el empaquetamiento del material genético viral (Anders *et al.*, 2007).

Finalmente, los últimos genes en expresarse son los genes tardíos. Entre ellos se encuentran los que codifican mayoritariamente para proteínas estructurales necesarias para el ensamblaje de las partículas virales (p. ej. la proteína del tegumento UL99) y para la maduración del virión y la exocitosis de las partículas infecciosas (p. ej. UL80 y UL56) (Mocarski *et al.*, 2013). Una vez ocurre la síntesis de las proteínas necesarias, el ADN viral es encapsidado en el núcleo y las nucleocápsides son liberadas al citoplasma celular a través de la membrana nuclear. En su paso por la membrana nuclear, la partícula viral adquiere una primera envuelta proveniente de la membrana nuclear interna, la cual se pierde al pasar posteriormente por la membrana nuclear externa (Mettenleiter *et al.*, 2006). La envoltura celular definitiva se obtiene al atravesar una serie de compartimentos formados por precursores de los endosomas y del aparato de golgi. Finalmente las partículas virales envueltas salen al espacio extracelular mediante una serie de procesos asociados con el tráfico de vesículas de exocitosis (Cepeda *et al.*, 2010), llegando con ello a las células adyacentes.

I.2 EL CITOMEGALOVIRUS MURINO (MCMV) COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL HCMV

Una de las limitaciones en los estudios experimentales con el citomegalovirus humano es su alta especificidad de especie, debido a que el HCMV solo infecta seres humanos. Esta especificidad se debe a que la evolución del virus ha ido ligada a la especiación de los mamíferos, dando lugar a

INTRODUCCIÓN

cepas virales perfectamente adaptadas a sus huéspedes e incapaces de infectar otros organismos (McGeoch *et al.*, 2006). Por este motivo, el estudio de la infección por el HCMV se lleva a cabo principalmente mediante la utilización de ensayos *in vitro* y de modelos animales infectados con sus correspondientes CMVs. Entre los modelos animales que más se han empleado se encuentran el citomegalovirus del macaco (RhCMV), el del ratón (MCMV), el de la rata (RCMV), el del cerdo (PCMV) o el de la cobaya (GPCMV). El RhCMV se ha usado habitualmente en las últimas etapas de los ensayos pre-clínicos para el desarrollo de nuevos antivirales, debido a su gran homología con el ser humano (Powers and Früh, 2008), mientras que el GPCMV se ha empleado como modelo para el estudio de la infección en el útero, debido a que el GPCMV es el único CMV capaz de atravesar la placenta y causar infección de forma similar a lo ocurrido en el caso del HCMV (Schleiss, 2006).

Sin embargo, el MCMV es el modelo más utilizado para estudiar diferentes aspectos del CMV humano. En primer lugar, comparte un amplio rango de características biológicas en cuanto a la organización genómica, regulación transcripcional, patogénesis y latencia/reactivación con el HCMV (Krmptotic *et al.*, 2003). Además, el modelo murino de infección por el MCMV presenta importantes ventajas frente al uso de otros animales, principalmente por la existencia de numerosos reactivos apropiados para usarse en el ratón, la disponibilidad de una gran variedad de cepas murinas totalmente caracterizadas, así como el hecho de que el ratón sea un animal de tamaño pequeño que puede ser fácilmente manipulable (Vidal *et al.*, 2013). Estas cuestiones junto con el hecho de que el MCMV es el citomegalovirus mejor caracterizado de todas las especies animales, hacen del modelo murino un modelo idóneo para estudiar en el laboratorio la infección por el CMV en un contexto *in vivo*.

En cuanto al genoma del MCMV, pese a no presentar con el HCMV una completa homología a nivel de su secuencia primaria, se ha observado que codifica un número significativo de proteínas con funciones similares al HCMV. Cabe destacar que el MCMV y el HCMV comparten cerca de 80 ORFs homólogos en la parte central de su genoma (Rawlinson *et al.*, 1996).

El primer genoma del MCMV secuenciado por Rawlinson y colaboradores en 1996, se basó en la cepa Smith, una cepa aislada en 1954 por Margaret Smith, a partir de las glándulas salivares de un ratón de laboratorio infectado con citomegalovirus (Smith, 1954). El genoma del MCMV consiste en una doble cadena lineal de aproximadamente 230 Kb, que codifica para aproximadamente 180 pautas de lectura abierta (Rawlinson *et al.*, 1996). Debido a que posteriormente se han identificado experimentalmente nuevas pautas de lectura abierta (Loewendorf *et al.*, 2004; Redwood *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2006), la secuencia genómica del MCMV ha sufrido cambios respecto de su anotación inicial. En la figura 5 se muestra una representación de las diferentes pautas de lectura abierta codificadas por el genoma del MCMV.

INTRODUCCIÓN

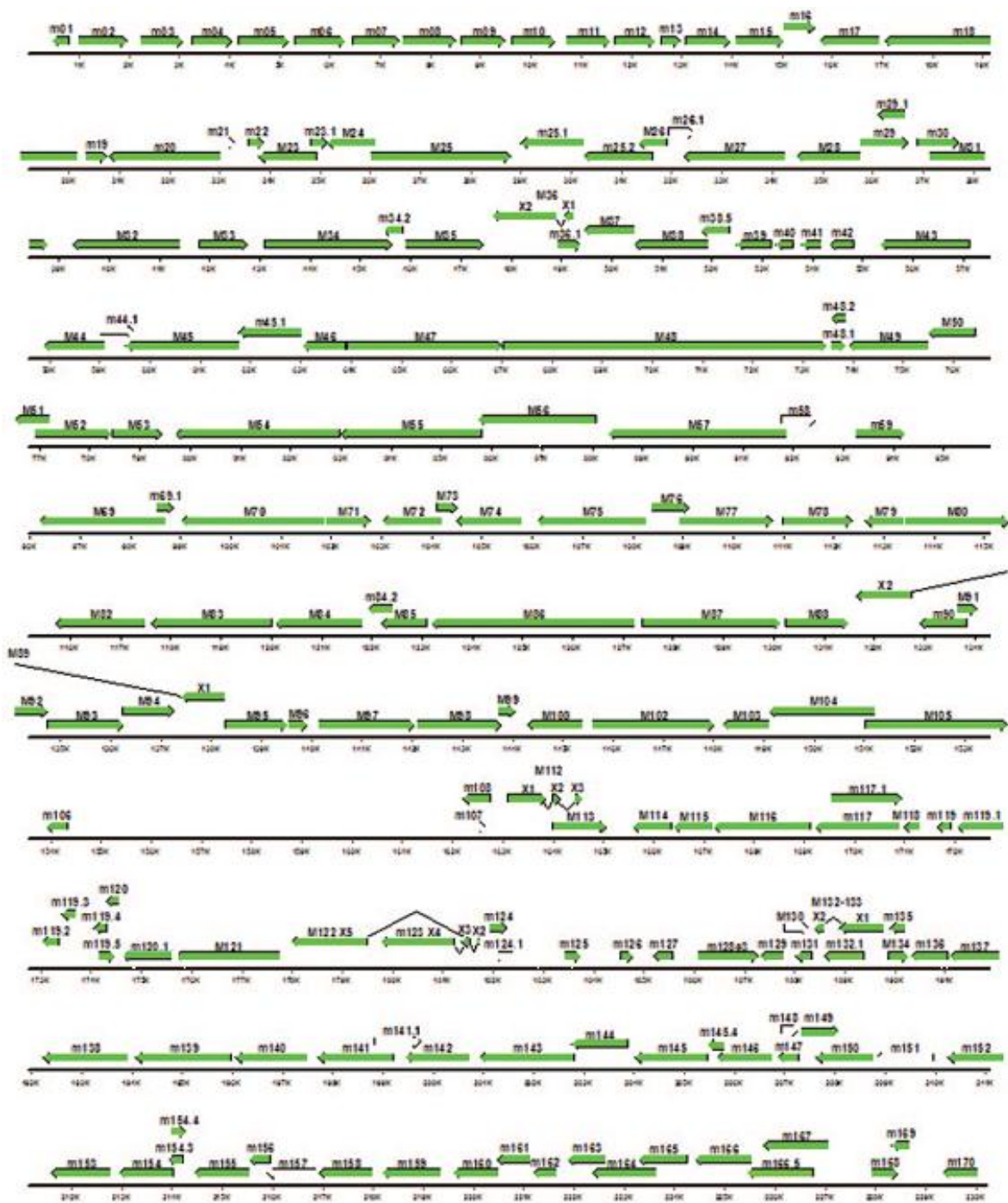


Figura 5. Mapa del genoma de la cepa Smith del MCMV. Se muestra la distribución de las diferentes pautas de lectura abierta presentes en el genoma del MCMV (cepa Smith). Cada flecha representa una pauta de lectura abierta, indicándose la orientación en la que se expresa y el nombre asignado en la parte superior. Adaptado de Tang *et al.*, 2006

INTRODUCCIÓN

Se nombran consecutivamente de izquierda a derecha, identificándose con letra en mayúscula (prefijo M) aquellas que poseen homología con el HCMV y con letra en minúscula (prefijo m) aquellas que no la presentan. Cabe señalar que de manera similar al genoma del citomegalovirus humano, el genoma del MCMV es altamente complejo, debido a que contiene pautas de lectura abierta que se transcriben en las dos orientaciones del genoma viral y muchos genes que son solapantes entre sí.

El genoma del citomegalovirus murino también contiene un número de familias multigénicas (Rawlinson *et al.*, 1996; Redwood *et al.*, 2013). En concreto, el MCMV dispone de seis: la familia de genes m02, que posee quince miembros localizados de manera consecutiva en el genoma (m02-m16); la familia M25, que presenta dos miembros (M25, M35); la familia M33, comprendida por M33 y M78; la familia M23, que abarca doce miembros (M23, M24, m25.1, m25.2, M36, M43, m128, m139, m140, m141, m142, m143); la familia M82, que presenta los miembros M82 y M83 y finalmente, la familia m145 que comprende once miembros distribuidos en dos regiones del genoma (m17, m145, m146, m150-m155, m157, m158) (Rawlinson *et al.*, 1996). Cuatro de estas familias, la familia M25, la familia M33, la familia M23 y la familia M82 presentan homología en el citomegalovirus humano. Una característica interesante de la familia multigénica m145 es que ocho de los once miembros que la conforman adoptan un plegamiento tipo MHC clase I (Smith *et al.*, 2002). En general, los miembros pertenecientes a esta familia no se encuentran conservados entre los diferentes CMVs, sin embargo, se ha descrito que algunos de estos miembros presentan homología con el CMV de rata a nivel de secuencia y posición en el genoma, siendo éstos los genes r145, r150, r151, r152, r155 y r157 (Vink *et al.*, 2000).

I.3 RESPUESTA INMUNITARIA A LA INFECCIÓN POR EL CITOMEGALOVIRUS Y MECANISMOS DE INMUNOEVASIÓN

El HCMV provoca una amplia y robusta respuesta inmunitaria que comienza con mecanismos innatos, tales como la producción de interferones tras la interacción del virus con la célula o la inducción de células asesinas naturales (NK). Estos a su vez promueven una eficiente respuesta inmunitaria adaptativa, incluyendo la producción de anticuerpos y la generación de las respuestas mediadas por las células T CD4+ y CD8+ (Jackson *et al.*, 2011). Con objeto de permanecer de por vida en el huésped, el HCMV expresa múltiples productos génicos, que a través de diversas estrategias, interfieren con la inmunidad innata y adaptativa del huésped (Halenius and Hengel, 2014; Jackson *et al.*, 2011; Miller-Kittrell and Sparer, 2009). En esta sección se revisan brevemente los principales mecanismos de inmunoevasión que utilizan el HCMV y el MCMV, centrándose particularmente en los desarrollados para manipular las respuestas mediadas por las células T y NK.

I.3.1 Inmunidad innata

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa contra los microorganismos patógenos, siendo su respuesta inmediata pero no específica y careciendo de memoria inmunológica. Esta inmunidad incluye la producción de interferones, la activación de células presentadoras de antígeno profesionales, así como el reclutamiento y la activación de las células NK. La unión y entrada del HCMV dentro de las células estimulan diversas vías de señalización que conducen a la activación de NF- κ B y del factor 3 regulador de interferón (IRF3), regulando en definitiva la producción de interferones y de citocinas proinflamatorias (Isaacson *et al.*, 2008). Por otra parte, esta respuesta celular innata, en los estadios iniciales de la infección viral también se encuentra mediada por la señalización a través del receptor 2 tipo *Toll* (TLR2), el cual es capaz de reconocer las glicoproteínas gB (UL55) y gH (UL75) presentes en la envoltura viral (Boehme *et al.*, 2006).

I.3.1.1 Respuesta mediada por las células NK a la infección por el CMV y mecanismos de inmunoevasión asociados

Las evidencias de que las células NK juegan un papel en el control de las infecciones por el HCMV se basan principalmente en las infecciones recurrentes graves que sufren los individuos con deficiencias en las células NK (Jawahar *et al.*, 1996; Velardi, 2012). En el modelo murino de infección por MCMV, se ha demostrado directamente que tanto los animales en los que se han eliminado las células NK (Bukowski *et al.*, 1984) como los que presentan deficiencia en estas células (Lee *et al.*, 2001) exhiben una mayor susceptibilidad a la infección viral. Además, la transferencia adoptiva de células NK a ratones que carecen de estas células otorga protección a éstos frente a la infección por el MCMV (Bukowski *et al.*, 1985). Por otro lado, se conoce que ciertas cepas de ratones contienen receptores de células NK capaces de conferir resistencia a la infección por MCMV (Pyzik *et al.*, 2011). Finalmente, la presencia tanto en el HCMV como en el MCMV de múltiples genes dirigidos a interferir con la activación de las células NK, como se verá a continuación, evidencian el importante papel de estas células en la respuesta a la infección por CMV (Miletić *et al.*, 2013).

Además de ser reguladas por una gran variedad de citocinas generadas por diferentes células del sistema inmune, la activación de las células NK depende de un repertorio de receptores específicos expresados en su superficie, los cuales, tras la interacción con sus ligandos, modulan su capacidad citotóxica, proliferación y/o producción de IFN- γ . El mecanismo por el cual las células NK reconocen específicamente las células diana fue por mucho tiempo un misterio. En 1981, Klas Kärre hizo una importante contribución con la teoría *missing self* basada en la observación de que las células NK poseen capacidad para matar a células diana que carecen de moléculas de MHC clase I propias, protegiendo por otra parte a las células autólogas sanas que

INTRODUCCIÓN

presentan niveles de expresión normales de MHC clase I en su superficie (Kärre, 2002; Ljunggren and Kärre, 1990). La actividad de las células NK depende del equilibrio entre las señales procedentes de los receptores de tipo activador y los receptores de tipo inhibidor presentes en su superficie. Debido a que los receptores inhibidores interaccionan con moléculas MHC clase I expresadas en la superficie de las células diana, los niveles reducidos de moléculas MHC clase I en las células infectadas por el CMV habrían de conducir a la disminución de señales inhibitoras, convirtiendo a las células infectadas por el virus en susceptibles a la citotoxicidad mediada por las células NK (Ravetch and Lanier, 2000). Sin embargo, para evitar esta situación, el citomegalovirus a lo largo de la evolución con su huésped, ha desarrollado mecanismos que le proporcionan protección frente al reconocimiento de las células NK, o bien incrementando la señalización a través de receptores inhibidores o bien suprimiendo las señales de activación (Wilkinson *et al.*, 2008). De este modo, se ha descrito que tanto el HCMV como el MCMV codifican múltiples genes destinados a aumentar la expresión en superficie de ligandos celulares para receptores inhibidores, a expresar productos propios reconocidos directamente por estos receptores inhibidores, o a disminuir en superficie la densidad de ligandos celulares para receptores activadores.

A día de hoy se conoce que el HCMV emplea dos mecanismos para proveer señales inhibitoras. Por una parte, emplea la vía de HLA-E a fin de mermar la respuesta de las células NK a través del receptor inhibidor heterodimérico CD94/NKG2D. Utilizando la proteína viral UL40, la cual contiene un péptido monomérico que se une a HLA-E, incrementa la expresión de esta molécula en la superficie celular (Tomasec *et al.*, 2000). Por otro lado, HCMV expresa una proteína viral homóloga a MHC clase I, UL18 (Beck and Barrell, 1988). UL18 es transportado a la superficie celular donde se une al receptor inhibidor LILRB1 (LIR-1) de las células NK, con una mayor afinidad que a las moléculas MHC clase I, suprimiendo la activación de las células NK LILRB1+ (Prod'homme *et al.*, 2007).

Con objeto de prevenir las señales de activación de las células NK, se ha descrito que el HCMV codifica al menos siete genes. Mientras que la proteína del tegumento UL83 disocia el complejo de la proteína adaptadora CD3 ζ y el receptor activador NKp30 (Arnon *et al.*, 2005), la retención intracelular de CD155 y CD112 por UL141 previene la activación de las células NK por la vía de los receptores activadores CD226 y CD96 (Prod'homme *et al.*, 2010; Tomasec *et al.*, 2005). Respecto a las cinco proteínas virales restantes, se ha descrito que interfieren con la activación de las células NK mediada por NKG2D. NKG2D, uno de los receptores activadores más importantes expresados en todas las células NK humanas, puede interaccionar con al menos ocho ligandos, todos ellos inducidos por estrés y también tras la infección por el HCMV: MICA, MICB, y las 6 proteínas ULBBP, ULBP1-ULBP6 (Eagle *et al.*, 2006). En este contexto, se conoce que UL16 se une a ULBP1, ULBP2 y ULBP6, así como a MICB (Eagle *et al.*, 2009), reteniéndolos a nivel

INTRODUCCIÓN

intracelular a fin de inhibir su expresión en la superficie celular (Rölle *et al.*, 2003). La expresión de MICB también es controlada por un microARN codificado por el HCMV, miR-UL112, el cual reduce la traducción de esta molécula (Stern-Ginossar *et al.*, 2007). Por otra parte, utilizando también la vía de retención intracelular, en el *cis*-Golgi, UL142 interviene en la disminución en superficie de MICA y ULBP3 en las células infectadas (Ashiru *et al.*, 2009). Finalmente, se ha documentado recientemente que US18 y US20 conducen a la degradación lisosomal de MICA (Fielding *et al.*, 2014). En la tabla 1, se muestran las principales proteínas del HCMV descritas hasta la fecha con capacidad de modular la respuesta de las células NK, así como sus mecanismos de acción.

Molécula HCMV	Mecanismo sobre células NK humanas	Referencia
UL40	Codifica un péptido señal que estabiliza HLA-E	(Tomasec <i>et al.</i> , 2000)
UL18	Homólogo a MHC clase I. Activación del receptor inhibidor LIR-1	(Yang and Bjorkman, 2008)
UL83	Inhibición de Nkp30	(Arnon <i>et al.</i> , 2005)
UL141	Retención intracelular de los ligandos CD155 y CD112 de los receptores activadores CD226 y CD96	(Prod'homme <i>et al.</i> , 2010)
UL16	Retención intracelular de los ligandos MICB, ULBP1, ULBP2 y ULBP6 del receptor activador NKG2D	(Dunn <i>et al.</i> , 2003a)
miR-UL112-1	Disminución de la traducción de MICB	(Stern-Ginossar <i>et al.</i> , 2007)
UL142	Retención intracelular de los ligandos MICA y ULBP3 del receptor activador NKG2D	(Bennett <i>et al.</i> , 2010)
US18	Degradación lisosomal de MICA	(Fielding <i>et al.</i> , 2014)
US20	Degradación lisosomal de MICA	(Fielding <i>et al.</i> , 2014)

Tabla 1. Proteínas del HCMV que modulan la respuesta de las células NK

Por otro lado, en el MCMV se han descrito cuatro miembros de la familia m145 (m138, m145, m152 y m155) capaces de interferir con la expresión de ligandos del receptor activador NKG2D. Este receptor, en el ratón, interacciona con siete ligandos, tres de la familia H60, MULT-1 y tres de la familia RAE-1. Mientras que m145 dirige a MULT-1 a la vía secretora, m152 afecta a la familia de ligandos RAE-1 retenidos en el retículo endoplasmático y m155 provoca la degradación proteosomal de H60 (Hasan *et al.*, 2005; Krmpotic *et al.*, 2005; Lodoen *et al.*, 2003). Además, el receptor Fc viral (*fcr-1*) codificado por el gen *m138*, ha mostrado inducir la endocitosis de las moléculas de H60 en superficie y conducir a estas moléculas así como a MULT-1 a su degradación lisosomal en las células infectadas (Lenac *et al.*, 2006). De hecho, se ha

INTRODUCCIÓN

observado que los mutantes virales que carecen de los genes individuales *m138*, *m145*, *m152* y *m155* en su genoma adquieren una sensibilidad incrementada al control *in vivo* de las células NK mostrando una significativa atenuación en el ratón infectado (Lenac *et al.*, 2008). Por otra parte, la proteína m157 del MCMV se une a Ly49I, uno de los receptores inhibidores de las células NK que se expresa en la cepa de ratones 129/J (Arase *et al.*, 2002). Adicionalmente, al igual que el HCMV, el MCMV escapa de la lisis mediada por las células NK usando un producto homólogo de las moléculas de MHC clase I, el m144. Pese a que el mecanismo de acción, así como el ligando al que se une m144 no se conocen a la fecha, se ha observado que la delección del gen *m144* del genoma viral proporciona un incremento de la virulencia del virus resultante a través de una disminución en el reconocimiento mediado por las células NK (Kubota *et al.*, 1999). En la tabla 2, se muestran las principales moléculas del MCMV implicadas en la interferencia con las células NK, así como sus mecanismos de acción.

Molécula MCMV	Mecanismo sobre células NK murinas	Referencia
m145	Dirige a MULT-1 a la vía secretora	(Krmptotic <i>et al.</i> , 2005)
m152	Retención intracelular de RAE-1	(Lodoen <i>et al.</i> , 2003)
m155	Degradación proteosomal de H60	(Hasan <i>et al.</i> , 2005)
m138	Degradación lisosomal de H60 y MULT-1	(Lenac <i>et al.</i> , 2006)
m157	Unión al receptor inhibidor Ly49I	(Arase <i>et al.</i> , 2002)
m144	Homólogo de MHC clase I	(Kubota <i>et al.</i> , 1999)

Tabla 2. Proteínas del MCMV que modulan la respuesta de las células NK

I.3.2 Inmunidad adaptativa

En la infección primaria por el CMV las células T CD4+ comienzan a aparecer a los siete días tras la detección del ADN viral en sangre periférica, éstas son seguidas de los anticuerpos específicos contra el virus y finalmente de las células T CD8+ específicas. Tanto los anticuerpos neutralizantes como los linfocitos T citotóxicos son importantes para controlar y restringir la replicación viral en las infecciones por este virus (Mach *et al.*, 2013). Ambas respuestas son dependientes de las células T CD4+ cooperadoras. La participación de los linfocitos T CD4+ durante la respuesta primaria frente al CMV asegura el establecimiento de la población de memoria.

I.3.2.1 Respuesta de los linfocitos T frente a la infección por el CMV y mecanismos de inmunoevasión asociados

Las evidencias más claras de que las células T CD4+ contribuyen al control de la infección primaria provienen de ratones infectados con el MCMV donde la eliminación de estas células resulta en una incidencia incrementada a infecciones por MCMV recurrentes (Polic *et al.*, 1998). En individuos sanos seropositivos, se ha estimado que alrededor del 9.1% de la población de células T memoria CD4+ circulantes es específica para el HCMV (Sylwester *et al.*, 2005). Un análisis de la especificidad de las respuestas mediadas por las células T CD4+ mostró el reconocimiento de una gran variedad de antígenos, siendo los más frecuentes los dirigidos contra la glicoproteína gB.

La destrucción de las células infectadas por parte de los linfocitos T CD8+ es el principal mecanismo de control de las infecciones virales. En el caso del CMV, el papel esencial de las células T CD8+ se documentó originalmente usando modelos del MCMV, en los que la eliminación de estas células conlleva unos niveles incrementados de reactivación y diseminación de la infección viral y la transferencia adoptiva de linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos para el virus confiere protección frente a la infección (Mutter *et al.*, 1988; Reddehase *et al.*, 1985). Adicionalmente, la eliminación selectiva de diferentes poblaciones en ratones mostró que las células T CD8+ son el componente más importante en el control inmunitario del MCMV (Polic *et al.*, 1998). Diferentes evidencias clínicas, procedentes preferentemente de pacientes transplantados, confirman también en humanos el papel crucial de los linfocitos T CD8+ en el control del HCMV (Reusser *et al.*, 1991). Se conoce que la proporción de células T CD8+ dirigida a la respuesta anti-HCMV es extraordinariamente amplia. Se ha estimado que alrededor del 10% de las células TCD8+ en sangre periférica de portadores de virus sanos y más del 40% de las células T CD8+ en la sangre periférica de individuos mayores pueden llegar a ser específicas para antígenos de HCMV (Khan *et al.*, 2004; Sylwester *et al.*, 2005). La respuesta de las células T CD8+ específicas del HCMV es considerablemente diversa, con un reconocimiento de un gran número de productos virales, incluyendo antígenos expresados en diferentes estadios de la replicación viral (inmediatamente tempranos, tempranos y tardíos) y pertenecientes a proteínas virales de diferentes grupos funcionales, como componentes del virión (pp28 [UL98], pp150 [UL32], gH [UL75], gB [UL55]), proteínas reguladoras transcripcionales o involucradas en la replicación del DNA viral (IE1 [UL123], IE2 [UL122], pp50 [UL44]) o proteínas inmunomoduladoras (US2, US3, US6, US11, UL18) (Elkington *et al.*, 2003; Manley *et al.*, 2004; Sylwester *et al.*, 2005). Los antígenos más inmunodominantes hacia los que la respuesta TCD8+ específica del HCMV van dirigidos incluyen UL123 (IE1), UL122 (IE2), y UL83 (pp65).

El HCMV ha desarrollado una serie de vías para minimizar su reconocimiento por las células T CD8+ y CD4+. Entre ellas, la expresión de productos virales como US2, US3, US6, US10 y US11

INTRODUCCIÓN

da lugar a una reducción de moléculas de MHC clase I en la superficie de las células infectadas comprometiendo la presentación antigénica. Mientras que US2, US10 y US11, proteínas que se expresan a tiempos tempranos ó tardíos durante la infección viral, conducen a la translocación de las moléculas MHC clase I al citoplasma celular para su degradación a través del proteosoma (Machold *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2010), US3, una proteína inmediatamente temprana, retiene estas moléculas en el retículo endoplasmático, impidiendo su salida al aparato de golgi (Ahn *et al.*, 1996). US6 en cambio, se expresa a tiempos tardíos en el ciclo viral e interfiere con el transportador asociado al procesamiento de antígenos (TAP), cuya función principal es la carga de péptidos de manera dependiente de ATP (Hengel *et al.*, 1997). El HCMV codifica también miR-US4-1, un microARN que inhibe la aminopeptidasa del retículo endoplasmático ERAP1 provocando el bloqueo de la presentación antigénica, lo que resulta en una disminución de la citotoxicidad de linfocitos T dirigidos contra células infectadas por el HCMV. Además, la expresión de la proteína del tegumento UL83 en la célula infectada inhibe la generación de células T específicas para epítomos de la proteína UL123 (IE1) (Gilbert *et al.*, 1996). Es de hacer notar que HCMV también altera la expresión en superficie de las moléculas MHC clase II, constituyendo además un mecanismo de defensa viral frente la respuesta inmunitaria ejercida por células T CD4+. Como ejemplo de ello, mientras que US2 y US3 modulan la expresión de moléculas MHC clase II en las células presentadoras de antígeno, o bien degradando HLA-DR α y DM α (Tomazin *et al.*, 1999) o bien bloqueando el ensamblaje de una de ellas, HLA-DR (Hegde *et al.*, 2002), UL111A reduce la expresión de estas moléculas por un mecanismo aún no descrito, inhibiendo la producción de citocinas proinflamatorias (Jenkins *et al.*, 2008). Por otra parte, se conoce que el HCMV es capaz de reducir la expresión en superficie de los ligandos de ciertas moléculas co-activadoras en las células infectadas, tales como CD40, CD80 o CD86, aunque los productos virales causantes de estas alteraciones se desconocen (Andrews *et al.*, 2001; Davison *et al.*, 2013; Mathys *et al.*, 2003; Mintern *et al.*, 2006; Raftery *et al.*, 2001). En la tabla 3, se muestran los principales productos codificados por el HCMV para modular el procesamiento y presentación antigénica.

Al igual que el HCMV, entre las diversas estrategias desarrolladas para mermar el control de las células T, el MCMV perturba la expresión de MHC clase I en la célula infectada codificando tres proteínas. Mientras que el producto viral m04 es capaz de unirse a las moléculas de MHC clase I en el retículo endoplasmático, dificultando su salida hacia la superficie celular, la proteína m152 retiene estas moléculas en el compartimento intermedio RE-golgi (ERGIC) (Hengel *et al.*, 1999; Ziegler *et al.*, 1997). Como consecuencia, el MCMV deletado en m152, posee una menor virulencia in vivo siendo su fenotipo atenuado dependiente en cierta medida de células T CD8+ (Hengel *et al.*, 1999). Además, la proteína m06 se une a las moléculas de MHC clase I y las conduce al lisosoma para su degradación (Reusch *et al.*, 1999). Por otra parte, el MCMV también es capaz de alterar la expresión en superficie de ligandos de moléculas co-señalizadoras en la

INTRODUCCIÓN

célula infectada. Se ha documentado que los productos virales m138, m147.5 y m155 causan una drástica disminución en la superficie de las células infectadas de los ligandos de las moléculas coestimuladoras CD80 (Mintern *et al.*, 2006), CD86 (Loewendorf *et al.*, 2004) y CD40 (Loewendorf *et al.*, 2011), respectivamente. Además, el MCMV incrementa los niveles en superficie del ligando del co-inhibidor PDL-1 (Benedict *et al.*, 2008). Por último, también se conoce que durante la infección por el MCMV las moléculas de MHC clase II son reducidas rápidamente de la superficie del macrófago infectado y aunque no se han identificado las productos virales implicados, la inducción de IL10 por parte del virus contribuye a ocasionar estos efectos (Redpath *et al.*, 1999).

Molécula HCMV	Mecanismo de acción	Referencia
	Modulación de MHC clase I	
US2	Degradación proteosomal de moléculas MHC clase I	(Machold <i>et al.</i> , 1997)
US10	Degradación proteosomal de moléculas MHC clase I	(Park <i>et al.</i> , 2010)
US11	Degradación proteosomal de moléculas MHC clase I	(Machold <i>et al.</i> , 1997)
US3	Retención intracelular de moléculas MHC clase I	(Ahn <i>et al.</i> , 1996)
US6	Bloqueo de la translocación de péptidos en el RE	(Hengel <i>et al.</i> , 1997)
miR-US4-1	Bloqueo en la generación de péptidos virales antigénicos	(Kim <i>et al.</i> , 2011)
UL83	Bloqueo en la generación de péptidos virales antigénicos	(Gilbert <i>et al.</i> , 1996)
	Modulación de MHC clase II	
US2	Degradación de HLA-DR α y HLA-DM α	(Tomazin <i>et al.</i> , 1999)
US3	Inhibición del ensamblaje de HLA-DR	(Hegde <i>et al.</i> , 2002)
UL111A	Disminución de moléculas MHC clase II en la superficie celular	(Jenkins <i>et al.</i> , 2008)
Molécula MCMV	Mecanismo de acción	Referencia
	Modulación de MHC clase I	
m04	Retención de moléculas MHC clase I en el RE	(Hengel <i>et al.</i> , 1999)
m152	Retención de moléculas MHC clase I en ERGIC	(Ziegler <i>et al.</i> , 1997)
m06	Degradación lisosomal de moléculas MHC clase I	(Reusch <i>et al.</i> , 1999)
	Modulación de moléculas coestimuladoras	
m138	Reducción de CD80 de la superficie celular (dirigiendo CD80 a la vía secretora)	(Mintern <i>et al.</i> , 2006)
m147.5	Reducción de CD86 de la superficie celular	(Loewendorf <i>et al.</i> , 2004)
m155	Reducción de CD40 de la superficie celular	(Loewendorf <i>et al.</i> , 2011)

Tabla 3. Productos del HCMV y del MCMV que modulan el procesamiento y la presentación antigénica

INTRODUCCIÓN

Aparte de los mecanismos de inmunoevasión descritos, el citomegalovirus ha desarrollado numerosas estrategias destinadas a interferir con otros aspectos de la respuesta inmunológica, como por ejemplo bloqueando la cascada del complemento, mitigando los efectos de la activación por interferón, evadiendo el reconocimiento por anticuerpos, interrumpiendo las vías de señalización de las citocinas y quimiocinas, o inhibiendo la apoptosis (Miller-Kittrell and Sparer, 2009). Las proteínas virales involucradas en estos procesos incluyen, tanto homólogos celulares, p. ej. homólogos de receptores Fc, de citocinas o de sus receptores, de quimiocinas o de sus receptores (Engel and Angulo, 2012), como proteínas sin ningún tipo de similitud significativa con proteínas celulares conocidas. Los mecanismos redundantes, empleados tanto por HCMV como por MCMV para contrarrestar los diferentes procesos inmunológicos, enfatizan la importancia de estas respuestas en el control viral.

I.4 RECEPTORES DE SUPERFICIE DE LA FAMILIA SLAM

Los miembros de la familia *signalling lymphocyte activation molecule* (SLAM) constituyen un grupo de receptores de superficie de la superfamilia de las Igs, expresados diferencialmente en las células hematopoyéticas (Veillette, 2010). La familia SLAM comprende nueve miembros: CD150 (SLAMF1), CD48 (SLAMF2), CD229 (SLAMF3, Ly9), CD244 (SLAMF4, 2B4), CD84 (SLAMF5), CD352 (SLAMF6, NTB-A y Ly108 en ratón), CD319 (SLAMF7, CRACC, CS1), CD353 (SLAMF8, BLAME) y CD84-H1 (SLAMF9, SF2001) (Calpe *et al.*, 2008; Engel *et al.*, 2003). En la tabla 4 se muestra la expresión de estas moléculas en diferentes tipos celulares.

Receptor	Expresión
CD150 (SLAMF1)	T, B, DCs, plaquetas, HSC
CD48 (SLAMF2)	B, T, monocitos, MΦs, NK, DCs, pDC, granulocitos
CD229 (SLAMF3, Ly9)	B, T, pDC, MΦs
CD244 (SLAMF4, 2B4)	NK, T CD8+, Tγδ, monocitos, MPP, basófilos, eosinófilos, mastocitos
CD84 (SLAMF5)	B, T, mastocitos, plaquetas, DCs, pDC monocitos, granulocitos, MΦs, MPP
CD352 (SLAMF6, NTB-A y Ly108 en ratón)	B, T, NK, neutrófilos, pDC
CD319 (SLAMF7, CRACC, CS1)	B, T, NK, DC, pDC
CD353 (SLAMF8, BLAME)	B, DCs, MΦs
CD84-HI (SLAMF9, SF2001)	B, T, MΦs, DCs

Tabla 4. Miembros de la familia de receptores SLAM

Se indican los miembros de la familia SLAM, así como las células donde cada uno de ellos se expresa. B=células B, T=células T, DC=células dendríticas, NK=células asesinas naturales, pDC=células dendríticas plasmacitoides, MΦs=macrófaos, MPP=progenitores hematopoyéticos multipotentes. Calpe *et al.*, 2008 y Engel *et al.*, 2003.

I.4.1 Localización genómica

La mayoría de los miembros de la familia SLAM son codificados dentro del locus SLAM, un segmento genómico de aproximadamente 400-500 kilobases (Kb) presente en el cromosoma 1q23 en humanos y en el cromosoma 1H3 en ratones (Engel *et al.*, 2003). Sin embargo, dos de ellos, las moléculas CD353 y CD84-H1, son codificados por genes localizados fuera de estos locus, en una región cercana al locus SLAM (Cannons *et al.*, 2011). La distribución genómica de los receptores SLAM se muestra en la figura 6. En esta figura se puede apreciar que aunque los genes de estos receptores se sitúan en sentidos opuestos, su organización genómica es muy similar en humanos y ratones.

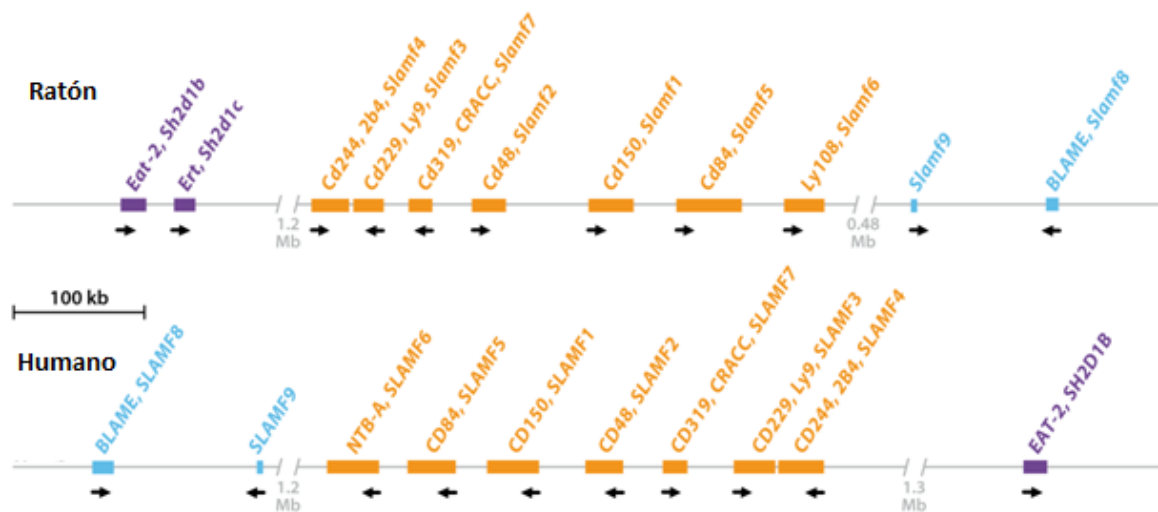


Figura 6. Organización genómica de los miembros de la familia SLAM

Se muestra un esquema de la distribución en el genoma de los genes que codifican para los nueve miembros de la familia SLAM y para algunas de sus proteínas adaptadoras en humanos y en ratones. Se indica la región correspondiente a una parte del cromosoma 1q23 en humanos y del cromosoma 1H3 en ratones. La escala de 100Kb del genoma en ambas especies se representa en la figura por una barra horizontal. Adaptada de Cannons *et al.*, 2011.

I.4.2 Estructura y ligandos

La familia de receptores SLAM son glicoproteínas de superficie, caracterizadas por presentar en su región extracelular N-terminal un dominio variable (V-Ig) que carece de puentes disulfuro y un dominio constante (C2-Ig) que contiene dos puentes disulfuro conservados. La única excepción es CD229, el cual posee dos secuencias en tándem de V-Ig y C2-Ig (Cannons *et al.*, 2011) (figura 7). Una de las características de los miembros de la familia SLAM, es que estas moléculas interactúan con miembros de la misma familia a través de su dominio V-Ig amino-terminal. Mientras que siete de los nueve miembros presentan interacciones homofílicas entre ellos, CD48 se une heterofílicamente a CD244 (Engel *et al.*, 2003). Seis de los nueve miembros de receptores SLAM (CD244, CD229, CD319, CD150, CD84 y CD352) presentan en su dominio citoplasmático,

INTRODUCCIÓN

una o más copias de motivos de *immunoreceptor tyrosine-based switch motif* (ITSM). La fosforilación de los ITSM proporciona un papel muy importante en las señales de activación o inhibición, debido a que permite el reclutamiento de adaptadores altamente específicos como la proteína asociada a SLAM (SAP) y los transcritos EWS/FLI1 del sarcoma de Ewing (EAT-2A ó EAT-2B) (Engel *et al.*, 2003; Veillette, 2010). Así pues, la integración de proteínas adaptadoras en la señalización de los receptores SLAM, determina la respuesta de muchas funciones efectoras que dependen del tipo celular y de su estadio de activación (Detre *et al.*, 2010).

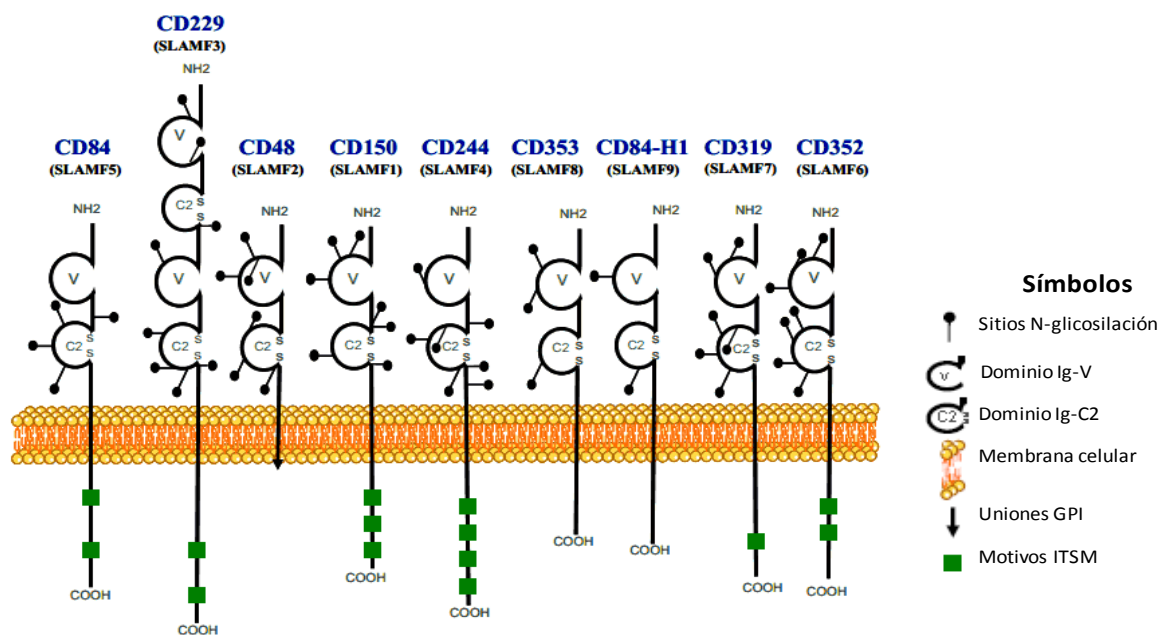


Figura 7. Representación de la estructura de los miembros de la familia de receptores SLAM

Se muestra un esquema de la estructura de cada uno de los nueve miembros de la familia SLAM. Tomada de Sintet *et al.*, 2011.

I.4.3 Función de los miembros de la familia SLAM

Los receptores de la familia SLAM desempeñan un papel importante en la inmunidad innata y adaptativa. Entre otras actividades, los miembros de esta familia regulan la adhesión celular, la producción de citocinas y la citotoxicidad de células T CD8+ y células NK (Calpe *et al.*, 2008). Por otra parte, estos receptores modulan la activación de las células B e intervienen en la regulación de la muerte de los neutrófilos y macrófagos, así como en la agregación de las células plaquetarias (Cannons *et al.*, 2011). De manera general, se ha descrito que la interacción homofílica o heterofílica entre los miembros de la familia SLAM en células T y células APC o en células NK y células diana, facilita el reclutamiento de moléculas señalizadoras como proteínas SRC quinasas, que permiten la activación celular mediante sinapsis inmunológicas (Ma *et al.*, 2007). En la tabla 5 se muestran los efectos de la estimulación de los miembros de la familia SLAM, en diferentes tipos celulares.

INTRODUCCIÓN

El papel de los receptores SLAM en la inmunidad antiviral ha sido documentado en el síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP), una enfermedad caracterizada por inmunodeficiencia y la extrema sensibilidad a la infección por el virus del Epstein-Barr (EBV). En este caso, las funciones de señalización de los receptores SLAM son defectuosas debido a mutaciones en el gen que codifica para SAP (Engel *et al.*, 2003; Morra *et al.*, 2001a). Por otra parte, algunos miembros de la familia SLAM también pueden funcionar como receptores de entrada para ciertos virus o bacterias. Como ejemplo de ello, CD150 permite el acceso del virus del sarampión al interior celular, facilitando su diseminación y favoreciendo la inmunosupresión inducida por el virus (Tatsuo *et al.*, 2001). Además, se ha descrito que CD48 funciona como receptor para la lectina FimH presente en los pili de un subtipo de enterobacterias (Baorto *et al.*, 1997) y que, en respuesta a la infección por el EBV, CD48 es altamente expresado en la superficie de los linfocitos B permitiendo su tráfico viral (Thorley-Lawson *et al.*, 1982).

Receptor	Efecto de la estimulación del receptor
CD150	T: ↑ IFN-γ, ↑ IL-4 DC: ↑ IL-8, ↑ IL-12 MΦs: ↑ IL-6, ↑ IL-12, secreción TNF-α
CD48	T: ↑ IL-2, ↑ proliferación B, NK, DC: regula proliferación y activación
CD229	T: ↓ INF-γ, ↑ IL-2, ↑ IL-4 y proliferación células T
CD244	NK y T CD8: ↑ citotoxicidad, ↑ INF-γ Eo: ↑ muerte celular, ↑ citocinas, ↑ peroxidasas
CD84	T: ↑ proliferación, ↑ INF-γ, ↑ adhesión células T y B Plaquetas: ↑ estabilidad agregados
CD352 (Ly108 en ratón)	NK: ↑ citotoxicidad, ↑ INF-γ, ↑ IL-8, secreción TNF-α T CD8+: ↑ citotoxicidad, ↑ INF-γ T CD4+: Polarización respuesta a TH1 Neutrófilos: ↑ muerte celular, ↑ producción citocinas
CD319	NK: ↑ citotoxicidad, ↑ muerte celular B: ↑ proliferación
CD84-HI	ND
CD353	ND

Tabla 5. Efectos de la estimulación de los receptores SLAM

Se indica el efecto de la estimulación de cada uno de los receptores SLAM, en diferentes tipos celulares. B=células B, T=células T, DC= células dendríticas, MΦs= macrófagos, NK=células asesinas naturales, Eo=eosinófilos, CD8=células T CD8+, IFN=interferón, IL=interleucina, ND=no determinado, ↑=aumento, ↓=disminución. Sintés *et al.*, 2011.

I.4.4 CD48 (SLAMF2)

El receptor CD48 es una proteína de 40-45 KDa que existe también de forma soluble. Fue descubierto en 1982 como un antígeno de diferenciación inducido por ciertos virus sobre linfoblastos B humanos transformados (Thorley-Lawson *et al.*, 1982). Pese a que existen algunos polimorfismos alélicos para CD48 entre diferentes cepas de ratones, no se han observado consecuencias funcionales de esta variabilidad (González-Cabrero *et al.*, 1999). En la figura 8 se puede apreciar la estructura de CD48. Como se ha mencionado, al igual que otros receptores SLAM, CD48 combina un dominio V-Ig con un dominio C2-Ig, presentando además residuos de cisteína conservados que forman puentes disulfuro (Boles *et al.*, 2001). A diferencia de los otros receptores SLAM, CD48 carece de un dominio transmembrana, anclándose a la superficie celular por medio de enlaces GPI. Así pues, el dominio C-terminal del polipéptido se une covalentemente a etanolamina, la cual se encuentra ligada a un oligosacárido conteniendo manosa y glucosamina. Este oligosacárido puede unirse a la cabeza del inositol del GPI en la membrana, permitiendo que las moléculas GPI se agrupen entre los dominios de la membrana enriquecidos en colesterol, fosfolípidos saturados y proteínas (balsa lipídica). Esta estructura le confiere a CD48 una gran movilidad, permitiéndole así agruparse eficientemente con microdominios asociados a complejos de proteínas señalizadoras. Así pues, pese a que CD48 carece de un dominio citoplasmático, este receptor desencadena una potente cascada de señalización que es comparable con la de otras moléculas inmunoregulatoras (Shin and Abraham, 2001).

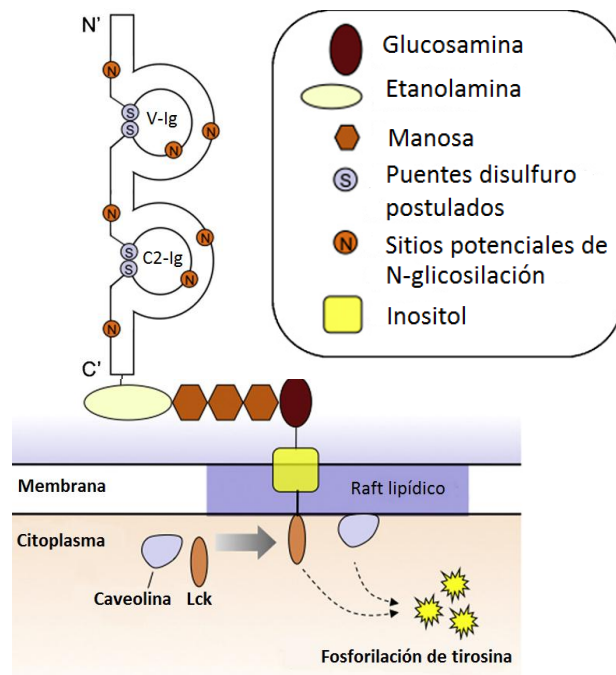


Figura 8. Estructura de CD48

Se representa la estructura de CD48 y su unión a la membrana celular. El dominio C-terminal del receptor se ancla a la membrana a través de moléculas de etanolamina unidas a azúcares. A través de la unión del oligosacárido al grupo inositol del fosfatidilinositol se integra dentro de la membrana plasmática. La unión de CD48 estimulado a Lck, permite la señalización a través de la fosforilación de las moléculas de tirosina. Adaptada de Elishmereni and Levi-Schaffer, 2011.

Además de las funciones más relevantes de CD48 en diferentes tipos celulares, descritas en la tabla 5, se ha demostrado que la activación de CD48 en los neutrófilos proporciona unos niveles de calcio incrementados en el citoplasma celular (Horejsí *et al.*, 1998; Stulnig, 1997). Por otra parte, los niveles de IL-2 son alterados cuando ocurren modificaciones en la señalización por CD48. Se ha descrito que el bloqueo de CD48 por anticuerpos específicos paraliza la síntesis de IL-2, así como el reordenamiento del citoesqueleto y del receptor de las células T (Kato *et al.*, 1992; Stulnig, 1997). Asimismo, la secreción de IL-2 se encuentra alterada en ratones deficientes en CD48, observándose que estos animales presentan una disminuida capacidad proliferativa de las células T tras su estimulación, sugiriendo que CD48 desempeña además un papel importante en la señalización a través del TCR (González-Cabrero *et al.*, 1999). Por otra parte, CD48 se encuentra involucrado en el desarrollo de alergias, observándose que tras la estimulación de ésta molécula, hay un incremento en la secreción de IL-8 (Elishmereni and Levi-Schaffer, 2011).

I.4.5 CD244 (2B4)

El receptor CD244, una proteína de aproximadamente 41 KDa de masa molecular, fue identificado inicialmente como un receptor de células NK, activador y mediador de la muerte celular en ausencia de moléculas MHC (Garni-Wagner *et al.*, 1993). Como se ha mencionado anteriormente, al igual que otros receptores SLAM, CD244 presenta un dominio V-Ig y un dominio C2-Ig, caracterizándose además por presentar ocho sitios potenciales de N-glicosilación (Calpe *et al.*, 2008). En humanos, ratones y ratas, se ha demostrado que CD244 funciona como un receptor ligando de CD48 (Brown *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003; Messmer *et al.*, 2006), observándose mediante análisis de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NRM), que CD244 posee características estructurales únicas que son importantes en el reconocimiento por CD48 (Ames *et al.*, 2005). Aunque no hay una clara evidencia de las diferencias funcionales de las dos isoformas de CD244 encontradas en humanos, hCD244-A y hCD244-B, las cuales presentan variaciones en una pequeña porción de su dominio extracelular (Kumaresan and Mathew, 2000), podrían presentar distinta afinidad de unión con CD48 (Calpe *et al.*, 2008). En ratones sin embargo, las isoformas de CD244 se han caracterizado en mayor detalle. En este caso la molécula presenta dos isoformas de su dominio citoplasmático, CD244-L (forma larga) y CD244-S (forma corta), difiriendo entre ellas en la cantidad de motivos ITSM, cuatro en CD244-L y únicamente un motivo en el caso de CD244-S (Kubin *et al.*, 1999; Schatzle *et al.*, 1999). En CD244-L se ha descrito que cuatro de los siete sitios de fosforilación de tirosinas, se encuentran embebidos dentro de ITSMs, permitiendo reclutar además de SAP y EAT-2, moléculas señalizadoras adicionales (Chen *et al.*, 2004; Morra *et al.*, 2001b; Parolini *et al.*, 2000; Tangye and Phillips, 2000). En este sentido, CD244 también puede unirse mediante la vía del dominio di-cisteína (CxC), a la proteína LAT localizada en la región transmembrana (Bottino *et al.*, 2000).

INTRODUCCIÓN

Además, en el caso específico de CD244 humano, es capaz de unirse al adaptador 3BP2 que señala a través de la vía Vav-1 (Saborit-Villarroya *et al.*, 2005).

Las funciones de CD244 en diferentes tipos celulares se indican de manera general en la tabla 5. CD244 es un receptor activador muy importante en la regulación de las células NK maduras y las células T CD8+, debido a que promueve la citotoxicidad celular y el aumento de la liberación de citocinas proinflamatorias (Assarsson *et al.*, 2005). Además, a través de la interacción con su ligando CD48, CD244 induce la polarización y el aumento de gránulos citolíticos en la zona de contacto entre la célula NK y la célula diana (Bryceson *et al.*, 2005). Por otra parte, CD244 puede funcionar en ciertos casos como una molécula inhibidora. Se ha descrito que en ausencia de SAP funcional, como ocurre en el caso de las células NK inmaduras de pacientes con XLP, CD244 puede asociarse con fosfatasa inhibidoras como SHP-2 y SHP-1 (Vaidya and Mathew, 2006). Así pues, la naturaleza dual de CD244 podría regularse dinámicamente por la densidad de su ligando CD48 presente en la superficie celular, por los niveles de expresión de CD244 en la membrana, o por la disponibilidad del adaptador SAP en la propia célula (Chlewicki *et al.*, 2008).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El citomegalovirus (CMV) ha desarrollado una amplia variedad de tácticas para escapar de la respuesta inmunitaria del huésped y garantizar su supervivencia. El hecho de que en la actualidad una gran parte de su material genético carezca de una asignación funcional sugiere que el CMV alberga inmunoevasinas aún por descubrir dirigidas frente a nuevas dianas inmunológicas. Debido a que los receptores de la familia SLAM son importantes en la inmunidad innata y adaptativa, la hipótesis planteada en este trabajo es que el virus codifica proteínas capaces de interferir con la expresión de estas moléculas en la superficie de la célula infectada, comprometiendo de este modo la vigilancia mediada por células del sistema inmune clave durante la infección.

Para abordar esta hipótesis se ha utilizado el CMV murino, estudiándose la alteración producida por el virus sobre los receptores SLAM en la superficie de una célula presentadora de antígeno, el macrófago infectado, y se ha profundizado en el análisis de la modulación del receptor SLAM CD48, identificando y caracterizando el producto viral responsable de ello.

OBJETIVOS



III. OBJETIVOS

Los objetivos concretos planteados en este trabajo fueron los siguientes:

1. Estudiar la alteración de los receptores de la familia SLAM presentes en los macrófagos peritoneales murinos durante el curso de la infección por el MCMV.
2. Determinar las regiones genómicas virales que codifican productos con capacidad para regular la expresión de estos receptores SLAM en la superficie celular.
3. Identificar el gen del MCMV que interfiere específicamente con la expresión de uno de los miembros de la familia SLAM, el receptor CD48.
4. Caracterizar la proteína viral responsable de la disminución de CD48 en la superficie de los macrófagos infectados.
5. Determinar *in vitro* e *in vivo* las consecuencias funcionales de la modulación de CD48 por dicha proteína viral.

MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 MATERIALES

IV.1.1 Células

Para el desarrollo de este trabajo se han usado las siguientes líneas:

- **NS-1:** células de mieloma de ratón (ATCC: TIB-18).
- **300.19:** células pre-B de ratón (cedidas por el Dr. Pablo Engel, Universidad de Barcelona).
- **MEF:** fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados (Tournier *et al.*, 2000).
- **MEF-p53:** fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados con el protooncogen p53 (cedidas por el Dr. Jay Nelson, Portland, USA).

IV.1.2 Virus

A continuación se detallan los virus que se han utilizado a lo largo de este trabajo:

- **MCMV parentales:**
 - **MCMV *wild type* (wt MCMV):** MCMV reconstituido a partir del BAC, MW97.01, basado en el MCMV cepa Smith (ATCC VR-1399). Descrito en Wagner *et al.* (1999).
 - **MCMV-GFP:** MCMV derivado de MW97.01 que contiene el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP). Descrito en Mathys *et al.* (2003).
- **Mutantes de delección de MCMV:** En este trabajo se han utilizado los siguientes mutantes de delección del MCMV:

MATERIALES Y MÉTODOS

Mutante de delección	ORF delecionado(s)	Referencia	Cedido por
MCMV-GFPΔm1-m17	m01-m17	NP	Dr. M. Messerle
MCMV-GFPΔm18-m23.1	m18-m23.1	NP	Dr. M. Messerle
MCMV-GFPΔM24-m25.2	M24-m25.2	NP	Dr. M. Messerle
MCMV-GFPΔM28-M31	M28-M31	NP	Dr. M. Messerle
MCMV-GFPΔm29-M31	m29-M31	NP	Dr. M. Messerle
MCMV-GFPΔM33	M33	NP	Dr. M. Messerle
MCMV-GFPΔM35-M37	M35-M37	NP	Dr. M. Messerle
MCMV-GFPΔm39-m40	m39-m40	NP	Dr. M. Messerle
MCMV-GFPΔm42-M43	m42-M43	NP	Dr. M. Messerle
MCMV-GFPΔM45	M45	NP	Dr. M. Messerle
MCMV-GFPΔm106-m108	m106-m108	NP	Dr. M. Messerle
MCMV-GFPΔM116	M116	NP	Dr. M. Messerle
MCMV-GFPΔm117-m120	m117-m120	NP	Dr. M. Messerle
MCMV-GFPΔM121	M121	NP	Dr. M. Messerle
MCMV-GFPΔm128-m138	m128-m138	NP	Dr. M. Messerle
MCMV-GFPΔm139-m141	m139-m141	NP	Dr. M. Messerle
MCMV-GFPΔm144-m148	m144-m148	Loewendorf <i>et al.</i> , 2004	Dr. S. Jonjic
MCMV-GFPΔm144-m158	m144-m158	Loewendorf <i>et al.</i> , 2004	Dr. M. Messerle
MCMV-GFPΔm149-m153	m149-m153	Loewendorf <i>et al.</i> , 2004	Dr. S. Jonjic
MCMV-GFPΔm154-m157	m154-m157	Loewendorf <i>et al.</i> , 2004	Dr. S. Jonjic
MCMV-GFPΔm159-m170	m159-m170	NP	Dr. M. Messerle
MCMV-GFPΔm153-m154	m153-m154	Hasan <i>et al.</i> , 2005	Dr. S. Jonjic
MCMV-GFPΔm155-m157	m155-m157	Hasan <i>et al.</i> , 2005	Dr. M. Messerle
MCMVΔm154	m154 completo (aa 1-368) incluye delecciones ORFs m154.3 y m154.4	Generado específicamente para este estudio	Dr. S. Jonjic
MCMVΔm154int	m154 (aa 148-368) conserva los ORFs m154.3 y m154.4	Generado específicamente para este estudio	Dr. S. Jonjic
MCMVm154Ectop	m154 completo delecionado de su posición natural y re-introducido ectópicamente entre el gen <i>ie2</i> y el gen <i>m129</i>	Generado específicamente para este estudio	Dr. M. Messerle

NP: no publicado

IV.1.3 Cepa de *Escherichia coli*

La cepa de *E. coli* utilizada en este trabajo para el clonaje de *m154* dentro de un vector de expresión eucariota fue la cepa DH5α.

IV.1.4 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo para la amplificación de productos por PCR, clonajes o secuenciación de los plásmidos generados, se detallan a continuación:

Oligonucleótido	Secuencia
m154For	5´CTTGGATCCATGCGGGCGATGTTACGG 3´
m154Rev	5´CTCGGATCCCACATAAGACTCGTCATA 3´
m154BglIIFor	5´CCAAGATCTTTGGGTCGTTTAGAGCTT 3´
m154PstIRev	5´CTCCTGCAGTCACACATAAGACTCGTC 3´
mCD48For	5´ATGTGCTTCATAAACAGGG 3´
mCD48Rev	5´TTGTCAGGTTAACAGGATCCTGTG 3´
BA-1	5´TATCCTGACCCTGAAGTACC 3´
BA-2	5´TCATCTTTTCACGGTTGGCC 3´

IV.1.5 Enzimas

Las enzimas utilizadas a lo largo de diferentes procesos de esta tesis han sido:

- Endonucleasas: proceden de las casas comerciales New England Biolabs y Takara.
- Otras enzimas: T4 ADN ligasa (Takara, 2011A), Taq ADN polimerasa (Promega, M1861), RNAsa A (Sigma, R4875), DNAsa I libre de RNAsa (Promega, M6101), retrotranscriptasa SuperScriptIIIIRT (Invitrogen, 18080-051), RNAsa H (Invitrogen, 18021-014), RNAsa OUT (Invitrogen, 18080-051).

IV.1.6 Plásmidos

- **pGEMT:** Vector comercial diseñado para el clonaje de productos de PCR. Es un vector abierto con residuos T en los extremos 3'. Presenta resistencia a ampicilina (Promega, A3600).
- **pGEMT-m154BglII PstI:** Plásmido que contiene la secuencia de m154 (sin su péptido señal y con *linkers* BglII y PstI en sus extremos 5' y 3', respectivamente) del MCMV. Para su obtención se ha usado el siguiente inserto y vector:
 - **Inserto:** Generado por PCR usando como molde ADN del wt MCMV y los oligonucleótidos m154BglIIFor y m154PstIRev. Estos oligonucleótidos amplifican

MATERIALES Y MÉTODOS

la secuencia correspondiente a m154 a partir del péptido señal (aa 24) incluyendo el codón de terminación y añade secuencias dianas de restricción de las enzimas *Bgl*II y *Pst*I en sus extremos 5' y 3', respectivamente. El producto generado de 1065pb, se clonó en el pGEMT comercial.

- **Vector:** pGEMT comercial abierto y desfosforilado.
- **pDisplay:** Vector de expresión comercial que contiene una secuencia que codifica para el epitopo de la hemaglutinina A (HA). Presenta resistencia a ampicilina y neomicina (Invitrogen, V660-20).
- **pDisplay-m154:** En este trabajo se ha nombrado como **HA-m154**. Es un vector de expresión que contiene el epitopo de HA fusionado al extremo N-terminal de la proteína m154 careciendo de su péptido señal propio (figura 9). Para su obtención se ha usado el siguiente inserto y vector:
 - **Inserto:** Producto de la digestión del pGEMT-m154 *Bgl*II *Pst*I con las enzimas de restricción *Bgl*II y *Pst*I. Este producto de 1053pb se clonó en pDisplay.
 - **Vector:** Producto de la digestión del vector pDisplay con las enzimas de restricción *Bgl*II y *Pst*I y desfosforilado.

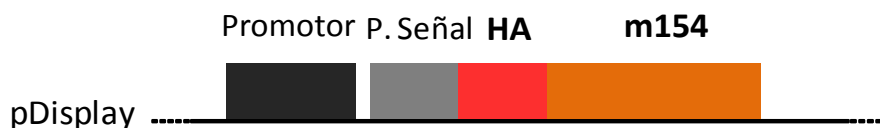


Figura 9. Esquema de la construcción HA-m154

Se muestra el esquema de la construcción generada tras el clonaje de m154 en el vector de expresión eucariota pDisplay. Contiene el promotor T7 y el péptido señal presente en el vector pDisplay (recuadro en color negro y gris, respectivamente), seguido de la secuencia del epitopo HA (indicada en color rojo) fusionada al extremo N-terminal de m154 (recuadro en color anaranjado) sin su propio péptido señal.

IV.1.7 Medios bacterianos

El medio de cultivo y los antibióticos utilizados para los cultivos bacterianos se indican a continuación:

- Luria-Bertani (LB): 1% bactotripton (Pronadisa, 1612.00), 0,5% extracto de levadura (Pronadisa, 1702.00), 1% NaCl (Fluka, 71380) (pH 7).

MATERIALES Y MÉTODOS

- LB con agar: LB con 1,5% de agar bacteriológico (Pronadisa, 1800.00).
- Antibióticos: 50µg/ml ampicilina (Sigma, A9518).

IV.1.8 Medios de cultivo celular

Las diferentes líneas celulares eucariotas se mantuvieron con los siguientes medios de cultivo y suplementos:

- Medios de cultivo celular: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Lonza, BE12-614F) y RPMI 1640 (Lonza, BE12-702F).
- Suplementos: L-glutamina (Gibco, 25030), piruvato sódico (Gibco, 11360), penicilina-estreptomicina (Gibco, 15140), suero fetal bovino (FBS) (Sigma, F7524), 2-mercaptoetanol (Gibco, 21985-023), HAT (hipoxantina, aminopterin y timidina) (Sigma, H0262) y HFCS (factor estimulante de hibridomas) (Roche, 11363735001).

IV.1.9 Marcadores de peso molecular

A continuación, se indican los marcadores de peso molecular de ADN utilizados en los geles de agarosa, así como el marcador de peso molecular de proteínas utilizado en los geles de acrilamida:

Marcador de peso molecular	Kb/KDa	Fabricante
1KB plus DNA ladder	0,1-12Kb	Invitrogen (15615-016)
Lambda digerido con <i>Hind</i> III	2-23Kb	Sigma (D-780)
Page ruler Prestained Protein ladder	10-170KDa	Fermentas (32231)

IV.1.10 Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este trabajo para la realización de Western blots, citometría de flujo e inmunohistoquímica, se detallan a continuación:

MATERIALES Y MÉTODOS

Anticuerpos	Ag	Procedencia
Croma-101	IE1	Trgovcich <i>et al.</i> , 2000
Anti-m154	m154	generado en este trabajo (apartado IV.2.7)
Anti-mouse CD48-PE	CD48	Biolegend (103405)
Anti-mouse CD48-Alexa fluor 488	CD48	Biolegend (103414)
Anti-mouse CD84-PE	CD84	Biolegend (122805)
Anti-mouse Ly108-PE	Ly108	Biolegend (134606)
Anti-mouse H2-PE	MHC I	Biolegend (125506)
Anti-mouse CD150-PE	CD150	Biolegend (115904)
Anti-mouse CD86-PE	CD86	Biolegend (105008)
Anti-mouse F4/80-Pacific blue	F4/80	Biolegend (123124)
Anti-mouse CD49b(DX5)-PE/Cy7	CD49b	Biolegend (108922)
Anti-mouse CD107a-Alexa fluor 488	CD107a	Biolegend (121608)
Anti-mouse CD3-Alexa fluor 647	CD3	Biolegend (100322)
Anti-mouse CD55-PE	CD55	Biolegend (131803)
Anti-mouse CD11c-Alexa fluor 647	CD11c	Biolegend (117314)
Anti-mouse 2B4-biotinado	CD244	Becton Dickinson Bioscience (557452)
Anti-mouse CD229-APC	CD229	Becton Dickinson Bioscience (17-2291-82)
Anti-mouse CD11b-PE	CD11b	Becton Dickinson Bioscience (553311)
Anti-mouse GR-1-APC	GR-1	Becton Dickinson Bioscience (553129)
Anti-mouse CD48 (HM48.1)	CD48	Santa Cruz Biotech Biotechnology (D1503)
Anti-mouse IgG-Alexa fluor 555	IgG	Invitrogen (A-21424)
Anti-mouse IgG-Alexa fluor 488	IgG	Invitrogen (A11017)
Anti-rabbit IgG-HRP	IgG	Jackson Immuno Research (211-032-171)
Anti-Armenian Hamster IgG-HRP	IgG	Jackson Immuno Research (127-035-160)
Anti-human IgG Fc-biotinado	IgG	Jackson Immuno Research (109-065-008)
Anti-mouse IgM-FITC	IgM	SouthernBiotech (1020-02)
Anti-mouse IgG-HRP	IgG	Promega (W402B), Sigma (A-3673)
Anti-HA-biotinado	HA	Sigma Aldrich (B9183-100UG)
Anti-mouse β -actina	β -actina	Sigma Aldrich (A2066)
Anti-mouse IgG (Fc específico)	IgG	Sigma Aldrich (M2650)
Anti-rat IgG _{2a,k} -PE	IgG _{2a,k}	Immunotools (21275524)
Anti-rat IgG _{2a,k} -FITC	IgG _{2a,k}	Immunotools (21275523)
Anti-rat IgG _{2a,k} -APC	IgG _{2a,k}	Immunotools (21275526)
Anti-rat IgG _{1k} -PE	IgG _{1k}	Immunotools (21275514)

IV.1.11 Soluciones

A continuación se detalla la composición de algunas soluciones y tampones utilizados a lo largo de este trabajo:

MATERIALES Y MÉTODOS

- PBS: 0,14M NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,76mM KH₂PO₄ (pH 7,4).
- Mini/Maxipreps (lisis alcalina):
 - Solución I: 50mM glucosa, 25mM TRIS-HCl (pH 8,0).
 - Solución II: 0,2N NaOH, 1% SDS.
 - Solución III: 3M acetato potásico, 2M ácido acético glacial.
 - Cloroformo:isoamílico 24:1: 96% cloroformo, 4% alcohol isoamílico.
- Extracción de proteínas:
 - Tampón de lisis: 20mM Tris-HCl (pH 7,5), 150mM NaCl, 1mM EDTA (pH 8,0), 1% Tritón X-100, conteniendo inhibidores de proteasas: 1mM ortovanadato sódico, 1mM PMSF, 0,6µg/ml aprotinina, 2µg/ml leupeptina, 312µg/ml benzamidina.
- SDS-PAGE:
 - Tampón de resolución: 0,75M Tris-HCl (pH 8,8), 0.2% SDS.
 - Tampón empaquetador: 0,25M Tris-HCl (pH 6,8), 0.2% SDS.
 - Tampón de electroforesis 10X: 2M glicina, 0,25M Tris Base, 34mM SDS.
 - Tampón de carga 6X: 300mM Tris-HCl (pH 6,8), 6% βME, 12% SDS, 0,6% azul de bromofenol, 60% glicerol.
- Western blot:
 - Tampón de transferencia 10X: 2,4M glicina, 0,31M Tris base, 8,7mM SDS.
 - TBS 10X: 0,2M Tris base, 1,5M NaCl (pH 7,4).
 - TBS-T: 0,05% Tween 20 en TBS 1X.
 - Tampón de bloqueo: leche 5% en TBS-T 1X.
 - Tampón de *stripping*: 100mM βME, 2% SDS, 62,5mM Tris-HCl (pH 6,7).
 - Solución de Ponceau: 0.2% Ponceau S, 1% ácido acético glacial.
- Electroforesis de ADN:
 - TAE 50X: 2M Tris base, 2M ácido acético glacial, 0,1M EDTA.
 - Tampón de carga 10X: 50% glicerol, 50% agua, 0,25% azul de bromofenol.
- Inmunofenotipado:
 - Tampón de lavado: PBS 1X, 0.01% azida, 2% FBS inactivado.
 - Tampón de fenotipado: tampón de lavado conteniendo 20% de suero de conejo filtrado e inactivado.
- ELISA:

- PBS-T: 0,05% Tween 20 en PBS 1X.
- PBS-BSA: 2% BSA (Albumina Sérica Bobina) en PBS 1X.
- Solución de revelado: 2 Pastillas OPD según instrucciones (Sigma, P-9187).

IV.1.12 Materiales especiales, kits y equipamiento

A continuación se detallan algunos de los equipos y otros materiales utilizados en distintas técnicas empleadas en este trabajo:

- Homogenizador eléctrico TH115 (OMNI Internacional)
- Microscopio invertido de luz visible Axiovert 25 (Zeiss)
- Microscopio invertido de fluorescencia DMI6000B (Leica)
- Termociclador Advanced primus 25 (Peqlab)
- Sonicador Sonic Dismembrator 60 (Fisher Scientific)
- Transiluminador UV GVM30 (Syngene)
- Equipo Crosslinker con luz ultravioleta HL 2000 hybrilinker (UVP laboratory products)
- Electroporador Nucleofector™ Device (Lonza)
- Citómetro de flujo FACSCantoII (BD Biosciences)
- Maquina reveladora Curix 60 (AGFA)
- Sistema para electroforesis de proteínas Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad)
- Sistema Mini trans-blot (Bio-Rad)
- Espectrofotómetro modelo SUNRISA (Tecan)
- Equipo de separación celular autoMACS (Miltenyi Biotec Inc)
- Kit de midipreps, Nucleobond Xtra Midi Plus (Macherey Nagel, 740412)
- Kit de extracción de ADN, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, 740609.50)
- Kit para retrotranscripción de RNA, SuperScript III First-strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, 18080-051)
- Kit de transfección de células 300.19 Amaxa cell line nucleofector kit V (Miltenyi Biotec Inc, VCA-1003)
- Kit de cuantificación de proteínas, BCA Protein Assay (Thermo Scientific, KL141144)
- Kit de revelado de proteínas, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, 34080F)
- Kit para detección de la viabilidad celular, LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, L34955)
- Kit II de purificación de células NK (Miltenyi Biotec Inc, 130-096-892)

IV.2 METODOLOGÍA

IV.2.1 Cultivos celulares

IV.2.1.1 Mantenimiento de los cultivos celulares

Las líneas celulares NS-1 se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con 100U/ml de penicilina, 100U/ml de estreptomina, 1mM de piruvato sódico, 2mM de L-glutamina y 10% de FBS inactivado (30min a 56°C). Las células 300.19 se mantuvieron en RPMI suplementado añadiendo además 0.05mM de 2-mercaptoetanol. Las líneas celulares MEF wt y MEF-p53 se cultivaron con DMEM suplementado de la misma manera que las células NS-1. Los macrófagos murinos primarios se obtuvieron a partir de células del exudado peritoneal (PECs) de ratones BALB/c, tras la inyección de 1ml de 3% tioglicolato (Sigma, T0632), tal y como se indica en el apartado IV.2.10.2). Las PECs extraídas por lavado peritoneal se sembraron en pocillos de placas de cultivo conteniendo RPMI y 10% de FBS. Tras un periodo de dos horas de adhesión de los macrófagos a los pocillos, las células no adherentes se lavaron con PBS. Las preparaciones de los macrófagos se analizaron por citometría de flujo usando los marcadores F4/80 y CD11b (aproximadamente el 95% fueron F4/80+CD11b+). Las células NK se obtuvieron a partir del bazo de ratones BALB/c usando el método de purificación de células mononucleares mediante centrifugación por gradiente de densidad (ver apartado IV.2.2). Posteriormente, se purificaron usando el Kit II de purificación de células NK y un AutoMACS (ver apartado IV.2.2). En todos los casos las células NK se cultivaron en medio RPMI conteniendo 10% de FBS. Las células dendríticas inmaduras se obtuvieron a partir de precursores de medula ósea (ver apartado IV.2.10.3), cultivándose con RPMI conteniendo 10% de FBS. En todos los casos, las células se mantuvieron en un incubador a 37°C y 5% de CO₂. En los ensayos en que se requirió, las células se contaron en cámara de Neu Bauer realizando previamente una dilución de la suspensión celular con azul de tripano.

IV.2.1.2 Infecciones virales

Las infecciones de fibroblastos se llevaron a cabo sobre monocapas de células con un 70-80% de confluencia respecto al área de superficie de cultivo. Previamente a la infección, se retiró el medio de cultivo y se añadió el inóculo viral en el mínimo volumen requerido para cubrir la monocapa celular. La cantidad de virus aplicada en cada infección se define como multiplicidad de infección (MOI) y corresponde al número de partículas virales infecciosas por célula en el cultivo. Los cultivos se mantuvieron durante 2 h en el incubador (37°C y 5% de CO₂) para permitir la adsorción del virus y, transcurrido este tiempo, se retiró el medio de cultivo de las monocapas celulares, se hizo un lavado con PBS y se añadió medio de cultivo conteniendo un 3% de FBS. En el caso de los macrófagos peritoneales murinos, una vez sembrados a una confluencia de 4×10^4 ó 2×10^5 células/ml en placas de 96 o 24 pocillos respectivamente, se infectaron con los MCMV a

MATERIALES Y MÉTODOS

diferentes MOI (desde 0.02 a 10). El inóculo viral se dejó en el cultivo durante un tiempo de adsorción de 2 h a 37°C 5% CO₂, dentro del cual se aplicó un aumento de la infectividad por centrifugación (*centrifugal enhancement*) (Hudson, 1988). Para aplicar esta técnica, las placas de cultivo se centrifugaron a temperatura ambiente durante 15 minutos a 130g y tras su centrifugación, las células se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 15 minutos adicionales. A continuación, se realizó una centrifugación adicional usando las mismas condiciones anteriores, pero esta vez se orientaron las placas dentro de la centrifuga de manera que quedaran en posición opuesta a la de la primera centrifugación. Posteriormente, se retiró el inóculo, se lavaron las células con PBS y se incubaron en medio RPMI conteniendo 10% de FBS. El porcentaje de macrófagos infectados por los MCMV que no expresaban GFP fue estimado por inmunofluorescencia indirecta a las 24 hpi usando un mAb anti-IE1 para el marcaje de los núcleos celulares (ver apartado IV.2.5). En el caso de las infecciones con los MCMV que expresaban GFP, los cultivos se observaron directamente en el microscopio de fluorescencia a 475nm a fin de detectar las células individuales que eran positivas para GFP a las 48 hpi.

IV.2.1.3 Generación de stocks virales

Los stocks de los MCMV se generaron en células MEF wt sembradas en frascos de 175cm² a una confluencia del 70-80% e infectadas a una MOI de 0.01. Cuando el efecto citopático del cultivo fue total, se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 250g durante 10 minutos a 4°C, con el fin de eliminar los restos celulares. El sobrenadante se alicuoteó y se conservó a -80°C hasta su titulación (ver apartado IV.2.1.4) o hasta el momento de su uso. Para concentrar los virus en los casos en que se requirió, una vez recogido el sobrenadante de las células infectadas, se centrifugó a 4°C durante 5 minutos a 250g. A continuación, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo conteniendo 3ml de sorbitol diluido al 20% en TBS. Tras una centrifugación durante 90 minutos a 34500g y 15°C, se descartó el sobrenadante y el sedimento conteniendo las partículas virales se resuspendió en PBS o en medio de cultivo DMEM al 3% FBS.

IV.2.1.4 Titulación vírica

La determinación de los títulos virales de una muestra se realizó o bien por contaje de placas de lisis en células MEF-p53 o bien por contaje de células MEF o macrófagos infectados que expresaban GFP o IE1. Para la titulación por placas de lisis, las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una confluencia del 70-80% en el momento de la infección. La monocapa celular se infectó con diferentes diluciones seriadas de la muestra a titular, con el fin de obtener un número óptimo de placas de lisis individuales. Tras un periodo de adsorción de 2 h y el lavado posterior con PBS, se añadió medio conteniendo 3% FBS y 0,25% agarosa. Al cabo de 4 días, se contaron las placas de lisis mediante visualización al microscopio, determinándose las unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/ml). En el caso de las infecciones realizadas con los MCMV que

expresaban GFP, la titulación vírica se llevó a cabo mediante detección de la expresión de la proteína fluorescente verde. Para ello, las células infectadas con diferentes diluciones seriadas de la muestra durante 2 h a 37°C, se lavaron con PBS y se mantuvieron en medio DMEM que contenía 3% FBS. A las 48 h post-infección, se contaron las células individuales que expresaban GFP mediante visualización en el microscopio de fluorescencia a 475nm. En el caso de las infecciones virales con los MCMVs que no expresaban GFP, la titulación se realizó mediante conteo de núcleos que presentaban una tinción de IE1. Para ello, las células se infectaron de igual manera que en el caso anterior, a diferencia de que a las 24 hpi, se lavaron con PBS, se fijaron y permeabilizaron para su tinción por inmunohistoquímica usando el mAb anti-IE1 (ver apartado IV.2.5).

IV.2.1.5 Cinéticas de replicación viral

Para la realización de las cinéticas de replicación viral, monocapas de MEF sembradas en placas de 24 pocillos se infectaron con el wt MCMV o el MCMV Δ m154 a una MOI de 0.025. Los macrófagos se sembraron a una confluencia de 3×10^5 células/pocillo en placas de 24 pocillos y se infectaron con los mismos virus que las células MEFs a una MOI de 0.2. En ambos casos, tras un periodo de adsorción de 2 h a 37°C, las células se lavaron con PBS y se mantuvieron en DMEM al 3% FBS (MEF) o en RPMI al 10% de FBS (macrófagos) hasta su recolección. En el caso de los macrófagos, a los diferentes tiempos post-infección indicados, las células se lavaron con PBS y se levantaron usando 100 μ l de RPMI al 3% FBS, con ayuda de una espátula. Posteriormente, cada muestra se transfirió a un tubo eppendorf y se sonicó durante 10 segundos a una intensidad de 3 usando el sonicador *Sonic Dismembrator 60*, centrifugándose seguidamente a 16000g. El sobrenadante se recuperó para su titulación por placas de lisis. En el caso de los fibroblastos, los sobrenadantes de los cultivos infectados se recolectaron, se transfirieron a tubos eppendorf, y se centrifugaron las muestras a 16000g. Posteriormente, se recuperaron los sobrenadantes para su titulación por placas de lisis.

IV.2.1.6 Tratamiento del cultivo de macrófagos con diferentes inhibidores

Con el fin de determinar la clase cinética de las proteínas virales de interés, se usó la cicloheximida (CHX) para la expresión selectiva de las proteínas inmediatamente tempranas o el ácido fosfonoacético (PPA) para la expresión de las proteínas tempranas. Para ello, los macrófagos peritoneales se sembraron en placas de 24 pocillos a una confluencia de 2×10^5 células/pocillo y se infectaron con el wt MCMV. En el caso de la expresión selectiva de las proteínas inmediatamente tempranas, las células se incubaron desde 30 minutos antes de la infección hasta 4 hpi, en presencia de 100 μ g/ml CHX (Sigma, C4859). Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con PBS y se mantuvieron durante 12 horas adicionales en RPMI conteniendo 10% de FBS y 10 μ g/ml de actinomicina D (Sigma, A9415). Finalmente, se recogieron

MATERIALES Y MÉTODOS

los extractos celulares para su análisis por Western blot. En el caso del análisis selectivo de las proteínas tempranas, los macrófagos infectados con el wt MCMV, se cultivaron en presencia de 250µg/ml PPA (Sigma, 284270) durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con PBS y se recogieron los extractos celulares para analizarlos por Western blot.

Para los ensayos de inhibición de la proteólisis de CD48, se usó un inhibidor de la vía de degradación en el proteosoma (MG-132) o en el lisosoma (leupeptina). Para ello, los macrófagos sembrados en placas (2×10^5 cel/pocillo) e infectados con el wt MCMV, se lavaron con PBS y se trataron con 75µM MG-132 (Sigma, M7449) o 250µM leupeptina (Sigma, L2884) en RPMI conteniendo 10% de FBS, durante 6 h y 24 h, respectivamente. A continuación, se recogieron los extractos celulares para su análisis por Western blot o se fijaron las células con metanol frío para realizar una inmunocitoquímica. Bajo las condiciones empleadas, ni el MG-132 ni la leupeptina afectaron la viabilidad celular analizada mediante tinción con azul de tripano.

IV.2.1.7 Ensayos de degranulación de las células NK en co-cultivo con macrófagos peritoneales murinos

La degranulación de las células NK fue evaluada mediante ensayos de movilización de CD107a. Para ello, se usaron cultivos de macrófagos peritoneales sembrados en placas de 96 pocillos (4×10^4 células/pocillo) infectadas con el wt MCMV, el MCMVΔm154 o sin infectar. Estos cultivos se incubaron durante 5 h a 37°C con células NK purificadas, a una relación de célula efectora/diana (E/T) de 1:1 en un volumen final de 100µl de medio RPMI conteniendo monensina (*GolgiStop*) (BD Bioscience, 554724) y el anticuerpo anti-CD107a-Alexa fluor 488, en las diluciones recomendadas por los fabricantes. Como control positivo de degranulación se trataron células NK con 1µg/ml ionomicina (Sigma, I0634) y 100ng/ml PMA (Sigma, P8139). Tras su incubación, las células se lavaron con PBS suplementado con 2mM EDTA y se tiñeron durante 30 minutos a 4°C con el anticuerpo anti-CD49b-PE/Cy7 para la detección de DX5. Finalmente, las células NK se analizaron por citometría de flujo. En el caso de los ensayos de bloqueo con la proteína de fusión CD244-Fc, los macrófagos infectados con el MCMVΔm154 se pre-incubaron con 10µg/ml de la proteína de fusión CD244-Fc murina (cedida por el Dr. Pablo Engel) o una proteína de fusión IgG no relevante usada como control, durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se lavaron las células con PBS y se llevaron a cabo los ensayos de movilización de CD107a usando el protocolo descrito anteriormente, a diferencia de que en este caso se usó una relación E/T de 0,5:1. Finalmente, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto II.

IV.2.2 Purificación de células NK

La extracción de las células NK se realizó a partir de células mononucleares murinas provenientes del bazo de ratones BALB/c de aproximadamente 12 semanas de edad. Para ello, cada animal se

sacrificó por dislocación cervical y tras limpiar la zona peritoneal con abundante etanol al 70%, se cortó la piel y la membrana de la cavidad a fin de extraer el bazo. Este órgano se transfirió a una placa de 100mm conteniendo 10ml de RPMI al 10% de FBS, liberándose posteriormente los esplenocitos de su interior con ayuda de dos agujas de calibre 25GA dobladas en su extremo superior. Las células obtenidas se disgregaron con ayuda de una pipeta (subiendo y bajando unas 20 veces) y se transfirieron lentamente a tubos falcon conteniendo 3ml de Histopaque densidad 1083 (Sigma, 10831). Seguidamente, la muestra se centrifugó a 300g durante 30 minutos a temperatura ambiente sin usar el freno de la centrifuga para evitar la ruptura de las fracciones celulares obtenidas. A continuación, la fracción correspondiente a las células mononucleares se extrajo, transfiriéndose a un nuevo tubo conteniendo medio RPMI al 10% de FBS. Finalmente, las células se lavaron dos veces con medio RPMI con objeto de eliminar los restos de Histopaque.

Las células NK se recuperaron de la suspensión de células mononucleares, usando bolas magnéticas del kit II de purificación de células NK, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, para 1×10^7 células mononucleares obtenidas tras la centrifugación por gradiente de densidad, se añadieron 10 μ l del cóctel de anticuerpos conjugados a biotina, en un volumen de 50 μ l del tampón recomendado. Tras incubar la muestra durante 5 min a 4°C, se lavaron las células usando 2ml del tampón recomendado y se centrifugaron a 300g durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 20 μ l de bolas magnéticas en un volumen de 100 μ l con el tampón recomendado y se incubó la muestra durante 10 min adicionales. Finalmente, la separación de las células NK se realizó por selección negativa usando el equipo AutoMACS, en el servicio de citómica del IDIBAPS.

IV.2.3 Transfección celular mediante electroporación

La transfección de células 300.19 se realizó mediante electroporación usando el kit *Amaxa Cell Line Nucleofector V*, siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Para cada transfección, se tomaron 6-8 $\times 10^6$ células de la suspensión celular y se transfirieron a tubos conteniendo medio RPMI sin suero. Tras una centrifugación a 250g durante 5 minutos, al sedimento celular obtenido se le añadieron 100 μ l de la solución de transfección proporcionada por el fabricante y 4 μ g del ADN a transfectar. La muestra transferida a las cubetas proporcionadas por el fabricante, se mezcló suavemente y se electroporó en el electroporador Nucleofector™ Device, usando el programa T-20. Finalmente, las células transfectadas se transfirieron a frascos de 25cm² conteniendo medio RPMI suplementado con 0,05mM de 2-mercaptoetanol, 1,2mg/ml de Geneticina (G418) y 10% de FBS. Las células se mantuvieron en cultivo a 37°C y 5% CO₂, permitiendo así seleccionar las células que expresaban la proteína de interés.

IV.2.4 Inmunofenotipado y análisis por citometría de flujo

Con el fin de analizar la expresión de diferentes moléculas en la superficie celular, se utilizó la técnica de citometría de flujo. Para ello, primero se recolectaron las células a partir del cultivo en el que se encontraban. En el caso de los macrófagos, se levantaron con PBS frío pipeteando unas 10 veces, recuperando las células en suspensión. En el caso de las células 300.19, se recolectaron directamente del cultivo. Para el fenotipado de las células dendríticas, se recuperaron a partir del cultivo celular tras su diferenciación con GM-CSF (ver apartado IV.2.10.3). En todos los casos, las células se lavaron con tampón de lavado frío y se centrifugaron a 250g durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, el sedimento celular se resuspendió con tampón de fenotipado en un volumen apropiado según el número de muestras a analizar, repartiéndose 50µl de esta suspensión en los diferentes tubos de citometría. Paralelamente, se prepararon las diluciones de los anticuerpos en tampón de fenotipado a la concentración recomendada por el fabricante y se añadieron 50µl de estas diluciones a los tubos de citometría conteniendo las células. En el caso de las tinciones con las proteínas de fusión Fc, se usó 1µg de proteína de fusión biotinada seguida de una incubación con estreptavidina-PE (Biolegend, 405203), durante una hora a temperatura ambiente. Para teñir las células muertas excluidas en el análisis, se hizo un marcaje de la preparación usando el kit LIVE/DEAD (*Fixable Violet Dead Cell Stain*), según las instrucciones del fabricante. Todos los marcajes con los anticuerpos se realizaron en oscuridad durante 30-45 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo las células se lavaron con 3ml de tampón de lavado, se centrifugaron y al sedimento se le añadieron 100µl de tampón de lavado. Finalmente, las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACSCanto II en el servicio de citómica del IDIBAPS, pasando entre 10000 y 20000 células de la población de interés. Todos los datos obtenidos se analizaron haciendo uso del software FlowJo (Tree star Inc, Ashland, OR).

IV.2.5 Inmunocitoquímica

Las tinciones se realizaron a partir de macrófagos, bien cultivados sobre cubreobjetos en placas de 24 pocillos a una confluencia de 2×10^5 células/pocillo, o bien a partir de 4×10^4 células/pocillo sembradas directamente en placas de 96 pocillos. En los casos requeridos, los cultivos se trataron con inhibidores de la proteólisis como se indica en el apartado IV.2.1.6. Para la detección de IE1, las células en cultivo se lavaron con PBS y se fijaron usando 50µl de metanol frío (-20°C) durante 2 minutos. Tras retirar el metanol, las células se permeabilizaron con 50µl de 0.3% de Tritón X-100 en PBS, durante 5 minutos. A continuación, se realizaron tres lavados con PBS y se bloquearon las células con 50µl de 1% BSA (Sigma, 05470) en PBS, durante 20 minutos. Pasado el periodo de incubación, se retiró la solución de bloqueo y se añadieron 30µl del tampón de bloqueo conteniendo el mAb anti-IE1 (croma 101) diluido 1/10, incubando la muestra durante una hora adicional. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante una hora en tampón de bloqueo conteniendo 30µl del anticuerpo secundario

anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488 en una dilución 1/200. Finalmente, se lavaron las células tres veces con PBS y las muestras procesadas en la placa se visualizaron en el microscopio de fluorescencia, contándose los núcleos celulares teñidos con el mAb anti-IE1.

En el caso de la tinción de m154 y CD48, las células sembradas en placas de 24 pocillos sobre los cubreobjetos, se lavaron una vez con PBS y se fijaron y permeabilizaron con 1ml de acetona fría (-20°C). Posteriormente, las células se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon con 1ml de PBS conteniendo 20% de suero de conejo (Linus). Las tinciones de las células adheridas a los cubreobjetos, se realizaron sobre un parafilm conteniendo 50µl del mAb anti-m154 diluido en tampón de fenotipado a una concentración apropiada según el stock utilizado, colocando el cubreobjetos de manera que las células estuvieran en contacto con la solución. Tras una hora de incubación con el anticuerpo primario, las células se transfirieron nuevamente a las placas de 24 pocillos y se lavaron tres veces con PBS. A continuación, se transfirieron los cubreobjetos al parafilm y se realizaron las tinciones de las células con el mAb anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 555 y el anti-mouse CD48 Alexa Fluor 488, usando para ambos casos, una dilución 1/300 en tampón de fenotipado. Seguidamente, se lavaron las células con PBS en las placas de 24 pocillos y se volvieron a transferir los cubreobjetos nuevamente al film para realizar la tinción del núcleo. En este caso, se utilizó el reactivo DAPI (Life technologies, D1306) diluido 1/1000 en 50µl de tampón de fenotipado, incubándose las células durante 10 minutos. Finalmente, se lavaron las células tres veces en las placas de 24 pocillos y los cubreobjetos se montaron sobre un portaobjetos conteniendo 10µl de medio de montaje ProLong Gold antifade (Invitrogen, P36934). Las preparaciones se visualizaron en el microscopio invertido de fluorescencia DM16000B y las imágenes se capturaron usando el software LAS AF (Leica Microsystems, Alemania).

IV.2.6 Inactivación viral mediante tratamiento con luz ultravioleta

Con el fin de inactivar el genoma viral del MCMV, se expusieron las partículas virales a luz ultravioleta. Para ello, el stock viral a inactivar se depositó en alícuotas de 50µl en los pocillos de una placa de cultivo de 96 pocillos de fondo curvo. La placa depositada sobre una superficie con hielo, se introdujo en el equipo crosslinker HL 2000 hybridlinker, configurado previamente con las siguientes condiciones: emisión de luz ultravioleta a 360mJ/cm² y tiempo de exposición de 3 minutos. Tras realizar el tratamiento, el virus se transfirió a tubos eppendorf, utilizándose directamente o conservándose a -80°C hasta su uso. La inactivación viral se comprobó visualizando en el microscopio la reducción de las células expresando IE1 tras la infección con los MCMV inactivados.

IV.2.7 Producción de anticuerpos monoclonales anti-m154

MATERIALES Y MÉTODOS

La generación de anticuerpos se realizó siguiendo el protocolo descrito por Romero y colaboradores (Romero *et al.*, 2014).

IV.2.7.1 Inmunización de animales

Ratones hembras BALB/c de aproximadamente 7 semanas de edad fueron inmunizadas inyectando intraperitonealmente, tres veces en intervalos de dos semanas, 50 µg de péptido sintético correspondiente a la cola citoplasmática de la proteína m154 del MCMV (HRWEDDKGGEVALGEGYDESYV) conjugada a KLH (Proteogenix, Oberhusbergen, Francia). Para la primera inmunización se usó adyuvante completo de Freund (Sigma, F5881) en una proporción 1:1 con el péptido. Las siguientes inmunizaciones se realizaron en las mismas condiciones, pero utilizando adyuvante incompleto de Freund (Sigma, F5506). Pasados tres días a partir de la segunda inmunización, se determinó el título del anticuerpo dirigido contra el antígeno empleado. Para ello, se extrajeron aproximadamente 20µl de sangre de la vena de la cola de los animales, centrifugándose a 500g durante 5 minutos a 4°C para obtener el suero. Este se ensayó mediante ELISA usando como antígeno el péptido correspondiente a la cola citoplasmática de m154 sin acoplar a KLH (ver apartado IV.2.7.3). Los animales que presentaron anticuerpos con títulos mayores a 1/40000 fueron sacrificados tras la tercera inmunización, por dislocación cervical, y se les extrajo el bazo.

IV.2.7.2 Fusión celular

Consiste en fusionar un linfocito B productor de anticuerpos con una célula de mieloma NS-1 de ratón. El resultado de la fusión es un hibridoma, una célula inmortal con capacidad ilimitada para producir un anticuerpo monoclonal específico para cierto antígeno, en este caso m154.

En primer lugar, se obtuvieron los esplenocitos a partir de cada uno de los bazos de los animales inmunizados. Para ello, el bazo extraído se depositó en una placa con 10ml de medio RPMI conteniendo 10% de FBS. Con ayuda de dos agujas de calibre 25GA dobladas en la parte superior, a fin de realizar con éstas movimientos de barrido sobre el órgano, se extrajeron los esplenocitos del bazo. Las células se disgregaron por pipeteo de la muestra unas 20 veces, obteniendo de esta manera una suspensión celular homogénea. A continuación, los esplenocitos se lavaron tres veces con RPMI sin suero mediante centrifugación a 250g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se contaron las células obtenidas, se centrifugaron nuevamente y el sedimento celular obtenido se mantuvo en medio RPMI sin FBS hasta realizar la fusión con las células NS-1.

Las células NS-1 provenientes de un cultivo con crecimiento en fase exponencial, se recuperaron y se contaron con objeto de tomar la cantidad de células correspondientes a una proporción de 4/1 con los esplenocitos, es decir 4 esplenocitos por cada célula NS-1. A continuación, las células

MATERIALES Y MÉTODOS

NS-1 recolectadas se lavaron con medio RPMI sin suero mediante una centrifugación a 250g durante 5 minutos a temperatura ambiente y el sedimento celular fue utilizado para realizar la fusión con los esplenocitos.

La fusión celular se realizó juntando los sedimentos de las células de mieloma y los esplenocitos procedentes de los animales inmunizados con el péptido sintético en un mismo tubo, completando con RPMI sin suero hasta 50ml. La suspensión se mezcló y se centrifugó a 130g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se desechó el sobrenadante completamente y al sedimento obtenido, se le añadió gota a gota, con una agitación suave constante, la siguiente secuencia de soluciones:

- 1ml de polietilenglicol al 50% (Sigma, P-7181) en 1 minuto. Incubación de 1 minuto
- 1ml de medio RPMI en 1 minuto
- 2ml de medio RPMI en 1 minuto
- 5ml de medio RPMI en 1 minuto
- 10ml de medio RPMI en 1 minuto

Tras añadir las soluciones, se completó con medio RPMI hasta un volumen de 50ml, las células fusionadas se centrifugaron a 130g durante 10 minutos a temperatura ambiente y el sedimento celular recuperado se transfirió a una botella conteniendo 400ml de medio RPMI enriquecido con 2% HAT, 20% de FBS y 0,5% HFCS. Este medio permite el crecimiento de los esplenocitos fusionados con la línea de mieloma, pero no el de las células NS-1 solas ni el de los esplenocitos individuales, seleccionándose de esta manera las células fusionadas para su crecimiento. La suspensión celular en el medio selectivo se distribuyó en placas de cultivo de 96 pocillos, manteniéndose a 37°C y 5% de CO₂ durante aproximadamente 15 días. Tras visualizar en el microscopio el crecimiento de algunas clonas en los pocillos de las placas, se seleccionaron para analizar la producción de anticuerpos frente a m154 como se describe en el siguiente apartado.

IV.2.7.3 Selección de los hibridomas de interés por ELISA

La selección de hibridomas secretores de anticuerpos reactivos frente a m154, se realizó mediante la técnica ELISA, usando el sobrenadante de las clonas que presentaron crecimiento (por observación al microscopio) en las placas sembradas tras la fusión. Para ello, primero se sensibilizaron placas de ELISA de 96 pocillos con 3µg/ml del péptido sintético m154 (Proteogenix, Oberhusbergen, Francia) en 100µl de PBS, durante toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo, se hicieron dos lavados con PBS-T, bloqueándose posteriormente los pocillos con 200µl de 2% BSA en PBS, durante una hora a 37°C. Seguidamente se realizaron dos lavados con PBS-T, procediéndose a la incubación con una dilución 1/4 de sobrenadante del cultivo de los hibridomas en 100µl de PBS-BSA, durante 1 h a temperatura ambiente. Tras realizar cuatro

lavados con PBS-T, se añadió un anticuerpo secundario anti-mouse IgG-HRP a una dilución 1/2000 en 100µl de PBS-BSA. Finalmente se lavó la placa cuatro veces, dos con PBS-T y dos con PBS, añadiendo a continuación 100µl de la solución de revelado durante 15 minutos aproximadamente hasta la visualización de color. Los datos de absorbancia de cada pocillo se obtuvieron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405nm. Los hibridomas que presentaban los títulos más elevados de anticuerpos reactivos frente a m154 por la técnica de ELISA, fueron seleccionados para realizar un cultivo secundario y subclonados mediante la técnica de dilución límite, procesos descritos en el siguiente apartado.

IV.2.7.4 Subclonaje y cultivo de los hibridomas

Los hibridomas analizados por la técnica de ELISA que fueron positivos para la producción de anticuerpos reactivos frente a m154, se transfirieron a placas de 24 pocillos conteniendo medio RPMI enriquecido con 2% HAT y 20% FBS. Estos cultivos se mantuvieron a 37°C y 5%CO₂ de dos a tres semanas y posteriormente se subclonaron mediante la técnica de dilución límite. Para ello, las células de los hibridomas a subclonar se repartieron en cuatro placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano, calculando que en cada pocillo hubiera 10, 5, 2 o 1 célula. Tras un periodo de diez días, se visualizaron las placas al microscopio y se escogieron aquellos cultivos en donde había una clona crecida por cada cuatro pocillos. A continuación, se analizó la presencia de anticuerpos frente a m154 en los sobrenadantes de estos hibridomas de nuevo mediante ELISA. Los hibridomas que resultaron positivos se subclonaron hasta conseguir que todos los sobrenadantes analizados del mismo clon fueran positivos para la producción del anticuerpo anti-m154.

Una vez subclonado el hibridoma productor de mAb anti-m154 se procedió a su expansión, primero a placas de 24 pocillos y luego a frascos de cultivo de 25cm² o de mayor tamaño. Adicionalmente, se fueron quitando por etapas los suplementos de HAT y HFCS y se redujo progresivamente la concentración de FBS desde el 20% a un 10%.

IV.2.8 Técnicas moleculares del ADN

IV.2.8.1 Minipreps

Para la obtención de los diferentes ADNs plasmídicos, se usó la técnica de la lisis alcalina como se detalla a continuación. En 3ml de LB que contenía el antibiótico adecuado, se inoculó una colonia bacteriana individual que poseía el plásmido que se quería amplificar y purificar. Este cultivo se dejó crecer aproximadamente 16h a 37°C en agitación. Posteriormente, el cultivo se centrifugó dos minutos a 16000g y tras descartar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 100µl de la solución I fría (a 4°C), con ayuda del vórtex. A esta muestra se le añadieron 200µl de la solución II, invirtiéndola suavemente y dejándola en hielo durante 5 minutos. A continuación, se

añadieron 150µl de la solución III fría (a 4°C), se mezcló por inversión y se dejó en hielo durante otros 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugó la muestra a 16000g durante 5 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadió un volumen de 450µl de fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico (25:24:1), se mezcló en el vortex y se centrifugó durante 5 minutos a 16000g a temperatura ambiente. La fase superior se transfirió a un tubo nuevo donde se añadió un volumen igual de cloroformo:alcohol-isoamílico (24:1), se mezcló en el vortex y se centrifugó 5 minutos a 16000g a temperatura ambiente. Posteriormente, se transfirió la fase superior a un tubo nuevo y se precipitó el ADN. Para ello, se añadieron 2-3 volúmenes de 100% etanol y se incubó la muestra durante una hora a -70°C. Seguidamente, se centrifugó durante 15 minutos a 16000g y 4°C y se descartó el sobrenadante. A continuación, se añadieron 800µl de 70% etanol y tras agitar con el vortex, se centrifugó 10 minutos a 16000g y 4°C. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol. Finalmente, se resuspendió el ADN en 50µl de agua conteniendo 100µg/ml RNAsa A.

IV.2.8.2 Midipreps

Para la obtención de ADN plasmídico en mayor cantidad y pureza se realizaron midipreps. Para ello, se inoculó una colonia bacteriana individual que contenía el plásmido a amplificar en 100ml de medio LB con el antibiótico adecuado. Este cultivo se dejó crecer durante 16h a 37°C con agitación. A continuación, se usó el Kit *Nucleobond Xtra Midi Plus*, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Finalmente, el ADN obtenido se resuspendió en 150µl de agua.

IV.2.8.3 Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN se realizó por medio de la determinación de la absorbancia a 260nm (asumiendo que una unidad de absorbancia equivale a una concentración de 50µg/ml). La pureza de ADN se determinó mediante el coeficiente absorbancia 260nm/280nm. En todos los casos se comprobó la integridad de estos ADN mediante electroforesis en geles de agarosa.

IV.2.8.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las PCRs realizadas en este trabajo se llevaron a cabo usando un volumen final de 25µl con los siguientes reactivos: 1X del tampón compatible con la enzima Taq ADN polimerasa, 1,5mM MgCl₂, 200µM dNTPs, 1µM de cada uno de los oligonucleótidos, 0,6U de Taq ADN polimerasa y el molde. Como molde se utilizaron entre 100 y 200ng de plásmido, o 1 ng de ADN procedente de las reacciones de PCR. Los ciclos utilizados para las reacciones fueron: 1 ciclo de 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 51°C y 1 minuto a 72°C y un último ciclo de 10 minutos a 72°C. Las muestras obtenidas se mantuvieron a 4°C hasta el momento de su uso.

IV.2.8.5 Extracción de ARN

Para extraer el ARN, los macrófagos sembrados en las placas de 24 pocillos a una confluencia de 3×10^5 células/pocillo se lavaron con PBS y se resuspendieron en 150 μ l de TRIzol (Invitrogen, 15596-026) con ayuda de una pipeta. Seguidamente, las placas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se transfirieron a tubos eppendorf y se añadieron 90 μ l de cloroformo, invirtiendo los tubos durante 15 segundos vigorosamente y centrifugándolos a 12000g durante 15 minutos a 4°C. A continuación, se recuperó la fase acuosa de cada muestra en nuevo tubos, a los cuales se les añadieron 240 μ l de isopropanol y se incubaron durante 10 minutos adicionales a temperatura ambiente. Tras centrifugar nuevamente a 12000g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y al sedimento de cada tubo, se le añadieron 1,2ml de 75% etanol, centrifugando las muestras a 7500g durante 5 minutos adicionales. Finalmente, los sedimentos obtenidos se secaron hasta que el etanol se evaporó, se resuspendieron en 20 μ l de agua e incubaron a 60°C durante 10 minutos. El ARN obtenido de las muestras se usó al momento o se congeló a -20°C hasta su uso.

IV.2.8.6 Transcripción reversa-PCR (RT-PCR)

Para realizar la transcripción reversa del ARN procedente de los macrófagos peritoneales, se usó el kit *SuperScript III First-strand Synthesis System for RT PCR*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, por cada reacción se hizo un tratamiento de 5 μ g del ARN con 1U de DNAsa I (libre de RNAsa) en un volumen final de 10 μ l de agua conteniendo el tampón de la reacción compatible con la enzima a una concentración 1X. Esta reacción se incubó a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se añadió 1 μ l de la solución RQ1 DNAsa STOP (M199A, Promega) y se incubó la muestra a 65°C durante 10 minutos. A continuación, se transfirieron 8 μ l del ARN tratado previamente con la DNAsa a un nuevo tubo y se incubaron con 5 μ M oligo (dT) y 0.25mM de cada dNT en un volumen final de 10 μ l. Esta reacción se mantuvo a 65°C durante 5 minutos y posteriormente a 4°C durante un minuto. Transcurrido este tiempo, para la síntesis del ADN los 10 μ l de la reacción anterior se incubaron con 500U de retrotranscriptasa SuperScriptIIIIRT, 1X del buffer de reacción de la enzima, 1,25mM de $MgCl_2$, 5mM de DTT y 100u/reacción de RNAsa OUT, en un volumen final de 20 μ l. La reacción se llevó a cabo a 50°C durante 50 minutos y se terminó a 85°C durante 5 minutos. Finalmente, se añadieron 2U de RNAsa H por reacción y la muestra se incubó a 37°C durante 20 minutos. Las muestras se preservaron a -20°C hasta su uso. En todos los casos se llevaron los controles en los que no se incluyó la retrotranscriptasa. Los productos transcritos se amplificaron por PCR usando primers específicos para cada reacción.

IV.2.8.7 Secuenciación del ADN

Todas las reacciones de secuenciación de ADN usadas en este trabajo se hicieron en el Servicio de Secuenciación de ADN del instituto de Biología Molecular de Barcelona.

IV.2.8.8 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

El análisis de los productos amplificados por PCR, así como de la separación de fragmentos de ADN y la visualización de los plásmidos, se hicieron mediante electroforesis en geles conteniendo 1% de agarosa. Para la preparación de los geles, la cantidad apropiada de agarosa se disolvió en 80ml de TAE 1x caliente añadiendo bromuro de etidio a una concentración de 0,5µg/ml. El gel se dejó polimerizar en un molde conteniendo un peine para permitir la formación de los pocillos. Una vez polimerizado el gel, se introdujo en una cubeta de electroforesis con TAE 1X y se cargaron las muestras en los pocillos (conteniendo cada muestra 1/10 del volumen de tampón de carga 10X). Para resolver el gel, se aplicó una corriente de entre 60 y 120V. Por último, el gel se observó en un transiluminador de rayos UV, obteniendo imágenes mediante el software de sistema de captura de imágenes adaptado al equipo. En el caso de tener que recuperar el ADN presente en los geles de agarosa, se usó el kit de extracción de ADN *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

IV.2.8.9 Restricciones del ADN

Para llevar a cabo las digestiones con endonucleasas de restricción, se siguieron las indicaciones facilitadas para cada enzima. En general, las reacciones contenían: el tampón de la enzima 1X, 0,01% BSA (cuando lo requería la enzima) y 2U de enzima por cada µg de ADN, en un volumen final de 20µl. Estas reacciones se llevaron a cabo a 37°C durante 2-3 horas. Posteriormente las digestiones se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

IV.2.8.10 Ligación del ADN

Para las reacciones de ligación de dos fragmentos de ADN se usaron unos 50 ng de vector y una relación 1:3 (vector:inserto) en cuanto al número de moléculas. Para estas reacciones se utilizaron: vector, inserto, tampón de la ligasa T4 1X y 175 unidades de ligasa T4, en un volumen final de 20µl con agua. Las reacciones se incubaron durante un mínimo de 16h a 16°C y posteriormente se transformaron en *E. coli* DH5α.

IV.2.9 Biología molecular de proteínas

IV.2.9.1 Extracción y cuantificación de proteínas a partir de células en cultivo

Los extractos de proteínas celulares se recogieron a partir de cultivos de macrófagos sembrados en placas de 24 pocillos. Como primer paso, se retiró el medio de cultivo de cada pocillo en el que se encontraban las células y se realizó un lavado con PBS. Posteriormente, se añadieron 100µl de PBS, se levantaron las células rascando con una espátula y se transfirieron a un tubo eppendorf. Las muestras se centrifugaron a 5000g durante 6 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se descartaron los sobrenadantes y se resuspendieron los sedimentos en el volumen deseado con tampón de lisis de proteínas conteniendo los inhibidores de proteasas. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a 4°C y se centrifugaron a 16000g durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, se recogieron los sobrenadantes y se cuantificaron con el kit *BCA Protein Assay*, basado en la reacción de biuret, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, en placas de 96 pocillos de fondo curvo se realizaron diferentes diluciones de BSA con PBS a fin de elaborar una recta patrón al final del ensayo. Paralelamente, se hicieron diferentes diluciones del extracto proteico a cuantificar en PBS. A continuación, se añadieron a todos los pocillos cincuenta partes del reactivo A y una parte del reactivo B proporcionados por el fabricante. La placa se incubó a 37°C durante 30 minutos. Finalmente, se determinó la absorbancia de cada uno de los pocillos en un espectrofotómetro a 562nm y en base a la recta patrón de BSA se determinó la concentración de proteína presente en cada extracto celular.

IV.2.9.2 Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida

Los extractos de proteínas celulares se analizaron por electroforesis en geles de acrilamida de acuerdo con los protocolos estándar (Sambrook and Russell, 2001), usando el sistema mini-PROTEAN 3. Todos los geles de resolución se prepararon al 10% acrilamida usando las siguientes cantidades de reactivos: 2,5ml tampón de resolución, 1,7ml acrilamida (30% acrilamida/Bis 29:1), 7µl TEMED y 25µl 13% PSA, completando con agua hasta un volumen final de 5ml. Los geles empaquetadores de las muestras se prepararon al 5% acrilamida usando los siguientes volúmenes de reactivos: 360µl acrilamida (30% acrilamida/Bis 29:1), 7,5µl TEMED y 30µl 13% PSA, completando con agua hasta un volumen de 1,5ml. Una vez mezclados todos los componentes del gel de resolución, se dejó polimerizar en el sistema mini-PROTEAN 3, cubriendo su superficie con agua. Tras la polimerización, se retiró el agua, se añadió el gel empaquetador y se colocó un peine para formar los pocillos donde se cargaron las muestras. A las muestras se le añadieron tampón de carga 6X a una concentración final 1X y se calentaron durante 5 minutos a 100°C. Posteriormente, las muestras se cargaron en los pocillos del gel polimerizado que se colocó en una cubeta con tampón de electroforesis. Inicialmente se aplicó una corriente de 90V y cuando las muestras entraron en el gel de resolución se subió el voltaje a 150V hasta que las muestras llegaron al final del gel. La presencia de un marcador de peso molecular en los geles permitió posteriormente determinar el peso molecular de las proteínas analizadas.

IV.2.9.3 Inmunodetección de proteínas por Western blot

Las proteínas resueltas en los geles de electroforesis, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Protran, Whatman Schleicher & Schuell, Alemania), usando el sistema de transferencia Mini Trans-blot. Sobre un casete de transferencia se realizó el montaje del sistema colocando en el orden indicado: una esponja, un papel Whatman, el gel conteniendo las proteínas (habiendo desechado el gel empaquetador), la membrana de nitrocelulosa, un papel Whatman y una esponja. Todos los componentes fueron previamente humedecidos en tampón de transferencia y empaquetados dentro del sistema. Este casete cerrado, se colocó en la cubeta conteniendo tampón de transferencia y se aplicó un voltaje de 60V durante dos horas a 4°C. Una vez transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, se bloqueó la membrana durante una hora en tampón de bloqueo a temperatura ambiente y se lavó dos veces durante dos minutos en TBS-T. Seguidamente se incubó la membrana con los anticuerpos indicados en cada caso, anti-m154, anti-IE1, anti-CD48 o anti- β -actina, durante una hora a temperatura ambiente y se lavó tres veces usando TBS-T. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG (H+L) HRP de ratón (para m154 e IE1), anti-IgG (H+L) HRP de Armenian hámster (para CD48) o un anti-IgG HRP de conejo (para β -actina), durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente se lavó la membrana tres veces durante 5 minutos en TBS-T y una vez en TBS y se reveló usando el kit *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate*, según las instrucciones del fabricante, a diferentes tiempos según el caso (entre 30 segundos y 10 minutos). Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia sobre placas de radiografías (Agfa-Gevaert N.V, Bélgica), usando una maquina reveladora de películas Curix 60. El peso molecular de las proteínas se determinó por comparación con el marcador de peso de proteínas. En determinados casos, para incubar una misma membrana con un segundo anticuerpo fue necesario separar el primer anticuerpo de la membrana. Para ello, se incubó la membrana en tampón de *stripping* durante 30 minutos a 50°C con agitación y posteriormente se lavó exhaustivamente con TBS-T, repitiendo el procedimiento de marcaje de las proteínas a partir de la etapa del bloqueo de la membrana.

IV.2.10 Experimentos con animales

IV.2.10.1 Ratones e infecciones

En este trabajo se usaron ratones BALB/c hembras de entre 7 y 12 semanas de edad obtenidos de los laboratorios Harlan (Holanda). Estos animales se mantuvieron en el estabulario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona en una unidad libre de patógenos (SPF) y con acceso a comida y agua *ad libitum*. La estabulación, manipulación y tratamiento de los animales fueron debidamente aprobados por el comité ético de experimentación con animales de la Universidad de Barcelona (número de protocolo CEEA 308/12). Los ratones se infectaron intraperitonealmente con 1ml de inóculo conteniendo las dosis indicadas en cada caso del wt

MATERIALES Y MÉTODOS

MCMV o del MCMV Δ m154. Los animales se observaron y pesaron diariamente hasta el momento del sacrificio. En algunos casos, se eliminaron las células NK de los animales mediante dos inyecciones intraperitoneales con el antisero anti-asialo GM1 (Wako Pure Chemical Industries, 986-10001) a una concentración de 25 μ g por ratón. La primera administración del anticuerpo se llevó a cabo un día antes de la infección y la segunda a día 2 post-infección. La eficiencia del tratamiento fue verificada por citometría de flujo usando un anticuerpo anti-mouse pan-célula NK mAb CD49b-PE/Cy7. A diferentes tiempos post-infección, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron sus órganos, los cuales se procesaron para determinar los títulos virales presentes en éstos (ver apartado IV.2.10.4). Para los experimentos en los cuales se analizó la naturaleza de las poblaciones celulares presentes en la cavidad peritoneal, los ratones se sacrificaron al día 2 post-infección y las células presentes en la cavidad peritoneal se extrajeron usando 5 ml de RPMI conteniendo 10% de FBS. El número total de células se determinó por conteo en cámara de Neu Bauer y las tinciones de las poblaciones celulares se llevaron a cabo con los anticuerpos anti-mouse CD11b-PE, anti-mouse Gr-1-APC, anti-mouse CD3-Alexa Fluor 647 y anti-mouse IgM-FITC, con objeto de diferenciar las poblaciones de macrófagos (CD11b+ Gr-1-), neutrófilos (CD11b+ GR-1+), linfocitos T (CD3+) y linfocitos B (IgM+).

IV.2.10.2 Extracción de los macrófagos peritoneales murinos

Para la obtención de los macrófagos peritoneales, se inyectó en ratones BALB/c de entre 7 y 12 semanas de edad, 1ml de 3% tioglicolato vía intraperitoneal. Pasados tres días, se sacrificó cada animal y limpiando la zona peritoneal con abundante etanol al 70%, se extrajeron los macrófagos de la cavidad peritoneal. Para ello, se cortó la piel de la zona peritoneal y sin romper la membrana de la cavidad, se introdujeron 5ml de medio RPMI conteniendo 10% de FBS, usando una jeringa (con aguja 18G). Sin retirar la aguja y tras realizar unos masajes haciendo presión sobre la parte exterior de la cavidad, se recuperó un volumen similar al introducido, de medio conteniendo el lavado peritoneal. A continuación, se transfirió la muestra a un tubo de 15ml y se centrifugó a 250g durante 5 minutos a 4°C. A partir del sedimento recuperado se contaron las células vivas mediante tinción con azul de tripano y tomando la cantidad apropiada de la suspensión celular, se resuspendió en el volumen requerido de medio RPMI conteniendo 10% de FBS. Seguidamente, se sembraron 4x10⁴ ó 2x10⁵ células/pocillo, según se tratase de placas de 96 ó 24 pocillos respectivamente. Transcurridas dos horas en las que se permitió la adhesión de los macrófagos, los pocillos se lavaron con RPMI sin FBS. Finalmente, las células se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂ en medio RPMI conteniendo 10% de FBS, hasta su uso.

IV.2.10.3 Obtención de células dendríticas a partir de precursores de médula ósea

La obtención de precursores de médula ósea se llevó a cabo a partir de las tibias y fémures de los ratones. Para ello, tras sacrificar el animal se extrajeron las tibias y los fémures eliminando previamente el tejido muscular. Los huesos se sumergieron en 70% de etanol para su desinfección, transfiriéndose a continuación a una placa con RPMI conteniendo 10% de FBS. Ambos extremos de los huesos se cortaron con material quirúrgico y usando una jeringa con aguja de 0,45mm, se tomó 1ml de medio de cultivo de la placa y se introdujo en uno de los extremos del hueso para expulsar por presión el contenido de su interior. Las células obtenidas de la médula ósea fueron disgregadas en el medio de cultivo mediante pipeteo vigoroso y posteriormente transferidas a tubos de 15ml para ser lavadas con RPMI sin FBS, mediante una centrifugación a 250g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células obtenidas del sedimento fueron resuspendidas con medio RPMI conteniendo 10% de FBS y contadas mediante tinción con azul de tripano. De cada animal se obtuvieron aproximadamente entre $2,5$ y 3×10^7 células precursoras de médula ósea. A fin de obtener las células dendríticas, se tomaron 2×10^6 células vivas a partir de la suspensión celular y se depositaron en placas de 100mm con 10ml de medio RPMI conteniendo 20ng/ml GM-CSF y 10% de FBS, incubándose el cultivo a 37°C y 5% CO₂. Al día 3, se añadieron otros 10ml de medio conteniendo GM-CSF. Transcurridos 6 días del cultivo inicial, el total del cultivo se recuperó y se centrifugó a 250g durante 5 minutos y el sedimento celular se resuspendió con medio fresco conteniendo GM-CSFs, para sembrarse nuevamente en placas de 100mm. Al día 7 de cultivo, se transfirieron todas las células presentes en el sobrenadante a un tubo y, tras contar las células vivas nuevamente, se tomaron 1×10^5 células y se sembraron en placas de 24 pocillos conteniendo 10ng/ml de GM-CSF en RPMI al 10% de FBS. Transcurridos 9 días del cultivo inicial, las células fueron por una parte analizadas con el anti-mouse CD11c-Alexa fluor 647 (ver apartado IV.2.4) y por otra parte infectadas con el MCMV, aplicando la técnica de *centrifugal enhancement* descrita en el apartado IV.2.1.2.

IV.2.10.4 Determinación de títulos virales a partir de órganos de ratones infectados

Para determinar los niveles de replicación virales en diferentes órganos de los ratones infectados con el wt MCMV y el MCMV Δ m154, en primer lugar los animales se sacrificaron a los diferentes tiempos post-infección indicados en cada caso y se extrajeron los órganos de interés como el bazo, el hígado, el riñón, el corazón, el pulmón y las glándulas salivares. A continuación, se transfirieron a tubos eppendorf que contenían DMEM al 3% y se pesaron en una balanza de precisión. Seguidamente, los diferentes órganos fueron disgregados mediante el homogenizador eléctrico TH115 en DMEM suplementado al 3% con FBS manteniendo una relación del 10% de peso/volumen. A continuación, las muestras se sonicaron durante 10 segundos a intensidad 3 con el sonicador Sonic Dismembrator 60, con objeto de lisar las células y liberar el virus intracelular. Seguidamente, se centrifugaron los diferentes tubos a 16000 g y a 4°C durante 2 minutos, y con

MATERIALES Y MÉTODOS

los sobrenadantes se infectaron monocapas de células MEF-p53 para su titulación mediante ensayos de plaqueo, aplicando la técnica de *centrifugal enhancement* (ver apartado IV.2.1.2). Transcurrido el periodo de adsorción, la monocapa de células MEF-p53 de cada pocillo de la placa de 24 pocillos se lavó con PBS y se mantuvo con medio DMEM al 3% de FBS conteniendo 0,25% agarosa. Al cabo de 4 días, se contaron las placas de lisis en el microscopio, determinando de esta manera las unidades formadoras de placas por cada gramo de tejido (PFU/g).

IV.2.11 Análisis de la secuencia aminoacídica de m154

El péptido señal así como la región transmembrana de m154, se predijeron mediante el servidor SignalP 4.1 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) y el TMHMM 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0), respectivamente. Los sitios de N-glicosilación y O-glicosilación de m154 se identificaron mediante el servidor NetNGlyc 1.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc) y el NetOGlyc 4.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/), respectivamente. La predicción de los motivos presentes en la cola citoplasmática de m154 se obtuvo mediante el programa Minmotif Miner 3.0 (Mi *et al.*, 2012), disponible en <http://minimotifminer.org>.

IV.2.12 Análisis estadísticos

Los diferentes análisis estadísticos realizados en este trabajo se llevaron a cabo con el software GraphPad Prism (versión 3.03, GraphPad Software, San Diego, CA). La significancia estadística de los títulos virales entre diferentes grupos experimentales se determinó mediante un análisis Mann-Whitney (two-tailed). Los valores de $p \leq 0,05$ (*), 0,01 (**), y 0,001 (***) se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

V. RESULTADOS

V.1 MODULACIÓN DE LOS RECEPTORES SLAM POR EL MCMV EN MACRÓFAGOS PERITONEALES

V.1.1 Análisis de la expresión de los receptores SLAM en la superficie de los macrófagos peritoneales murinos

Como se ha comentado en la introducción de esta tesis, los receptores SLAM se encuentran diferencialmente expresados en la superficie de las células hematopoyéticas. Debido a que los macrófagos juegan un papel importante en la replicación, la diseminación y la latencia del MCMV y participan activamente en el control de la respuesta inmune innata y adaptativa, en este trabajo se seleccionó este tipo celular para estudiar la alteración de los receptores SLAM tras la infección por el MCMV. Como primer paso, se quiso analizar por citometría de flujo la presencia, en macrófagos peritoneales murinos activados con tioglicolato, de los receptores SLAM de los cuales se dispone de anticuerpos comerciales: CD48, CD84, CD229, Ly108, CD150 y CD244. La ausencia de anticuerpos comerciales disponibles para la detección de CD319, CD353 y SLAMF9 no permitió el estudio de estos receptores. Como se observa en la figura 10A, los macrófagos peritoneales murinos (F4/80+) expresaban los receptores CD48, CD84, CD229 y en menores niveles Ly108 en su superficie, mientras que los receptores CD150 y CD244 no se detectaron. Sin embargo, si se pudo observar que CD150 se encontraba presente en la superficie de los macrófagos peritoneales tratados con LPS (Figura 10B), siendo este resultado consistente con lo observado en otros estudios (Ma *et al.*, 2012). Por consiguiente, el macrófago peritoneal representa una célula permisiva a la infección por el MCMV capaz de expresar varios receptores SLAM, hecho que permite utilizar este sistema celular para examinar si los miembros de esta familia de receptores son modulados durante la infección por el MCMV.

V.1.2 El MCMV reduce la expresión de los receptores SLAM en la superficie del macrófago

A continuación, se quisieron examinar los niveles de expresión de los receptores SLAM presentes en los macrófagos tras la infección por el MCMV. Debido a que este virus disminuye drásticamente las moléculas de MHC I en la superficie de las células presentadoras de antígeno (Lemmermann *et al.*, 2012), se analizó junto con los receptores SLAM la expresión de estas moléculas en los macrófagos murinos infectados. Para ello se usó el MCMV-GFP, un MCMV que contiene el gen reportero GFP insertado en el locus *ie2* de su genoma (Mathys *et al.*, 2003).

RESULTADOS

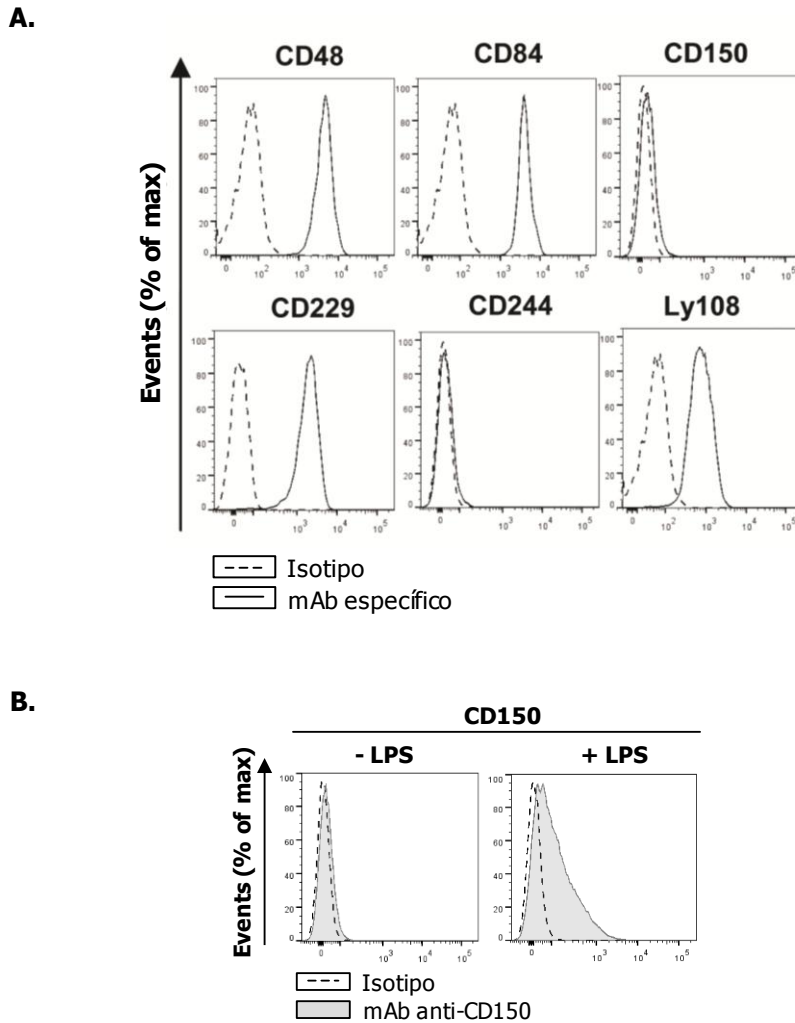


Figura 10. Expresión de los receptores SLAM en la superficie celular de los macrófagos peritoneales murinos.

A. Se muestra la expresión de los receptores SLAM CD48, CD84, CD150, CD229, CD244 y Ly108 analizados por citometría de flujo en la superficie de los macrófagos peritoneales murinos, usando mAb específicos contra cada una de estas moléculas. La población celular mostrada con una línea continua en cada histograma representa el marcaje de cada receptor SLAM con el mAb específico. Los isotipos IgG_{2a,k} ó IgG_{1k} conjugados con PE ó APC fueron usados como controles negativos, representándose con una línea discontinua. Cada histograma corresponde a un experimento representativo de tres ensayos independientes. **B.** El histograma con relleno de color gris muestra la expresión de CD150 en la superficie de los macrófagos peritoneales murinos tratados con 2µg/ml de LPS durante 24 h (+LPS) o sin tratar (-LPS), analizados con un mAb específico frente a esta molécula. El isotipo IgG-PE fue usado como control negativo (histograma con línea discontinua).

El virus MCMV-GFP permite identificar y analizar selectivamente las células infectadas en el cultivo de macrófagos. Usando una multiplicidad de infección (MOI) de 2, aproximadamente el 50% de los macrófagos del cultivo resultaron infectados, un porcentaje apropiado que permite comparar la expresión de los receptores SLAM en células infectadas (GFP+) y sin infectar (GFP-) en el mismo cultivo. Mediante la infección de los macrófagos a diferentes tiempos post-infección (24, 48 y 72 hpi) y el marcaje posterior de los receptores SLAM con los mAb específicos para cada

RESULTADOS

receptor, se observó que el MCMV posee la capacidad para disminuir progresivamente en el curso de la infección la expresión en superficie de los 4 receptores SLAM analizados, en comparación con las células no infectadas (GFP-) del mismo cultivo o con macrófagos mock infectados (datos no mostrados). Como se observa en la figura 11, la reducción de los receptores analizados en la superficie de los macrófagos infectados por el MCMV-GFP, se hace evidente a partir de las 24 hpi para CD84 y Ly108, y a partir de las 48 hpi para CD48 y CD229. A las 72 hpi los macrófagos presentaron una significativa reducción en la expresión de los cuatro receptores SLAM analizados. Como era de esperar, la expresión de MHC I en la superficie celular se encontraba disminuida a las 24 hpi, alcanzando una drástica reducción a las 72 hpi.

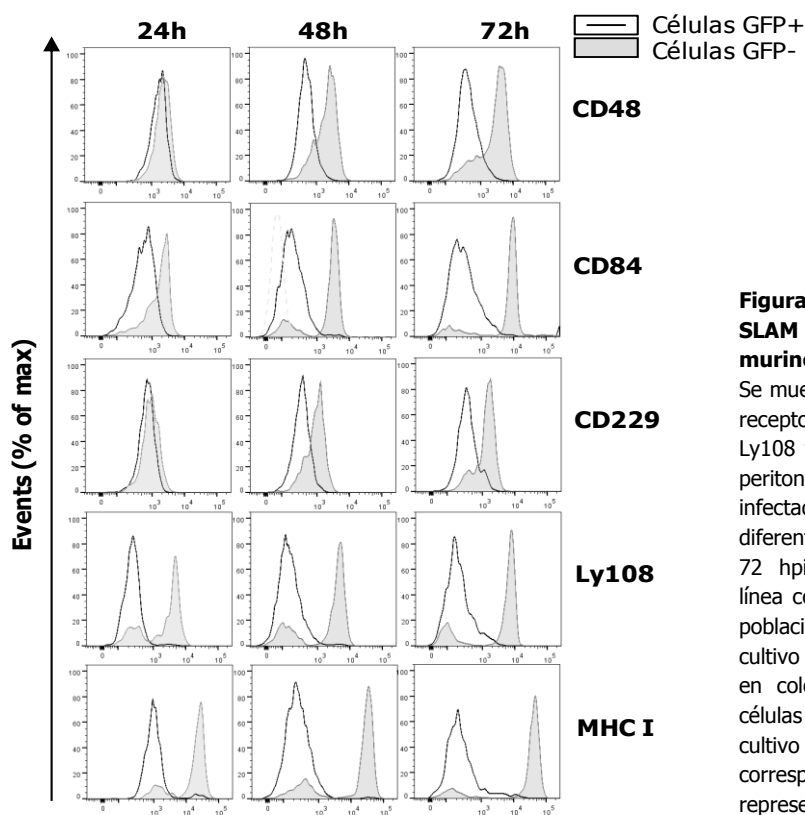


Figura 11. Expresión de los receptores SLAM en macrófagos peritoneales murinos infectados por MCMV

Se muestra la expresión en superficie de los receptores SLAM CD48, CD84, CD229, Ly108 y de MHC clase I en los macrófagos peritoneales murinos. Las células fueron infectadas por MCMV-GFP (MOI de 2) a diferentes tiempos post-infección (24, 48 y 72 hpi). El histograma conteniendo una línea continua en color negro representa la población de células infectadas (GFP+) en el cultivo y el histograma conteniendo relleno en color gris representa la población de células no infectadas (GFP-) en el mismo cultivo celular. Cada histograma corresponde a un experimento representativo de tres ensayos.

V.1.3 La modulación de los receptores SLAM se correlaciona con el nivel de infección por el MCMV

Con objeto de estudiar el efecto de la dosis del MCMV en la disminución de la expresión de los receptores SLAM en la superficie de los macrófagos, se infectaron las células con el MCMV-GFP a diferentes multiplicidades de infección (MOI) que oscilaban entre 0.5 (~5% de células infectadas) y 5 (~70% de células infectadas). Como se muestra en la figura 12, tras realizar el análisis por citometría de flujo de estos 4 receptores SLAM y de las moléculas de MHC I usadas como control, se observó que a medida que la MOI aumentaba, el número de células donde se producía la

RESULTADOS

reducción de los receptores SLAM en superficie incrementaba. Este efecto era concomitante con la disminución de MHC clase I observada en la superficie de las células infectadas. Es decir, la modulación de la expresión en superficie de los receptores SLAM es claramente dependiente de la dosis viral.

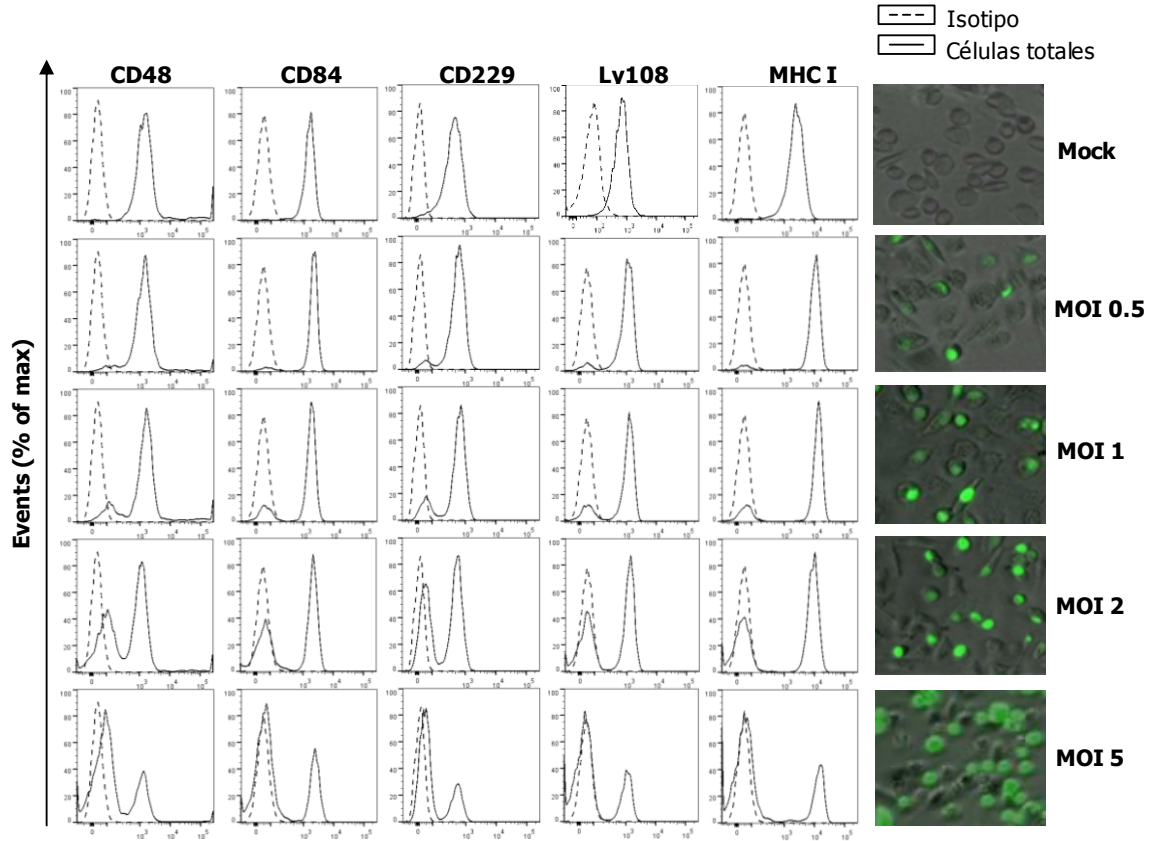


Figura 12. Efecto de la dosis viral sobre la alteración de la expresión de los receptores SLAM en la superficie celular.

Se muestra la expresión en superficie de los receptores CD48, CD84, CD229, Ly108 y MHC I en los macrófagos murinos sin infectar (Mock) o infectados por MCMV-GFP a diferentes MOIs (0.5, 1, 2 y 5) durante 72 h. Los histogramas contienen una línea continua en color negro representando la expresión de estos receptores en la población total de células vivas en el cultivo (incluyendo las células GFP+ y GFP- del mismo cultivo). Los controles del isotipo para cada marcaje se representan con una línea discontinua en color negro. Cada histograma corresponden a un experimento representativo de dos ensayos independientes. Las fotografías de las correspondientes infecciones usando objetivo 40X en el microscopio, se muestran en los paneles de la derecha de los histogramas de cada infección.

V.1.4 El MCMV inactivado por luz ultravioleta (UV) pierde la capacidad de modular los receptores SLAM en los macrófagos murinos

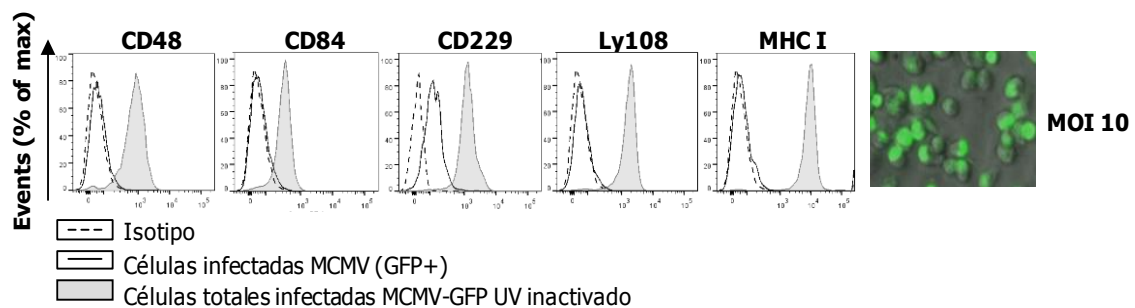
Con el fin de determinar si la expresión génica del MCMV era requerida para la limitar la expresión de los receptores SLAM en la superficie de los macrófagos murinos infectados, se usó el MCMV inactivado con luz ultravioleta (UV). El tratamiento viral con luz UV ha sido ampliamente empleado en diversos estudios debido a que provoca la dimerización del ADN, previniendo la viabilidad y la replicación del MCMV (Shanley, 1982). Como se muestra en la figura 13A, no se

RESULTADOS

observó ningún decremento en la expresión en superficie de los receptores CD48, CD84, CD229 o Ly108 tras la infección durante 72 h de los macrófagos tratados con el MCMV-GFP UV-inactivado, en comparación con las células infectadas por el MCMV-GFP sin inactivar. Estos resultados indican que la modulación en superficie de los receptores SLAM puede ser atribuida a uno o varios productos codificados por el genoma del MCMV.

Curiosamente, como se muestra en la figura 13B, el nivel de expresión de Ly108 en membrana incrementó tras la infección con el MCMV-GFP UV-inactivado. Este resultado podría deberse a la activación del macrófago tras el contacto con la partícula viral.

A.



B.

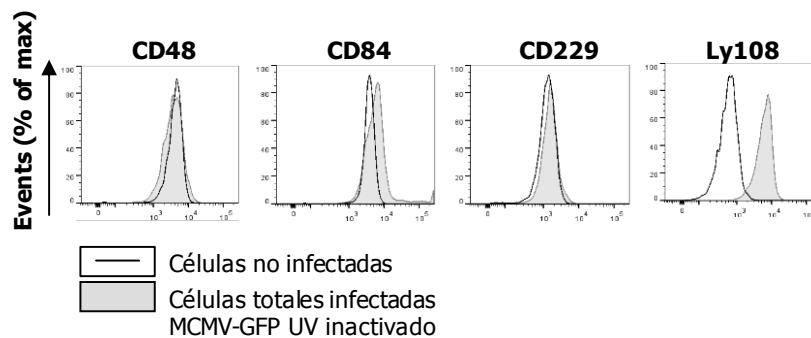


Figura 13. Expresión de los receptores SLAM en macrófagos murinos infectados por el MCMV inactivado con luz ultravioleta.

Se muestra la expresión de los receptores SLAM CD48, CD84, CD229 y Ly108 en los macrófagos infectados con el MCMV-GFP UV inactivado a una MOI de 10 durante 72 h. **A.** Los histogramas conteniendo una línea continua en color negro indican la expresión de los receptores en los macrófagos infectados con el MCMV-GFP. La población total de células vivas en el cultivo tratado con el MCMV-GFP UV inactivado se representa en los histogramas rellenos en color gris. El control del isotipo para cada marcaje usado como control negativo se representa con una línea discontinua. Los histogramas corresponden a un experimento representativo de tres ensayos independientes. En el extremo derecho de la figura, se muestra la fotografía de macrófagos infectados a una MOI de 10 con el MCMV-GFP (~95% de células infectadas en el cultivo), usando un objetivo 40X en el microscopio. **B.** Expresión de los miembros SLAM en células no infectadas (representadas por los histogramas conteniendo una línea continua en color negro) y en la población total de células infectadas con el MCMV-GFP UV inactivado (histogramas con relleno en color gris).

RESULTADOS

V.1.5 El MCMV reduce la expresión de los receptores SLAM en la superficie de las células dendríticas

Con objeto de conocer si la drástica disminución de los miembros de la familia SLAM encontrada en la superficie de los macrófagos infectados por el MCMV se podía extender a otros tipos celulares, se analizó la expresión de estos receptores tras la infección por el MCMV en células dendríticas inmaduras derivadas de médula ósea. Como un primer paso, se examinó por citometría de flujo la presencia de CD48, CD84, CD229, Ly108 y CD150 en la superficie de las células dendríticas inmaduras. Como se observa en la figura 14, las células dendríticas presentaron un nivel considerable de CD48, CD84 y Ly108 en la membrana celular, mientras que CD150 y CD229 se encontraron expresados en menor medida.

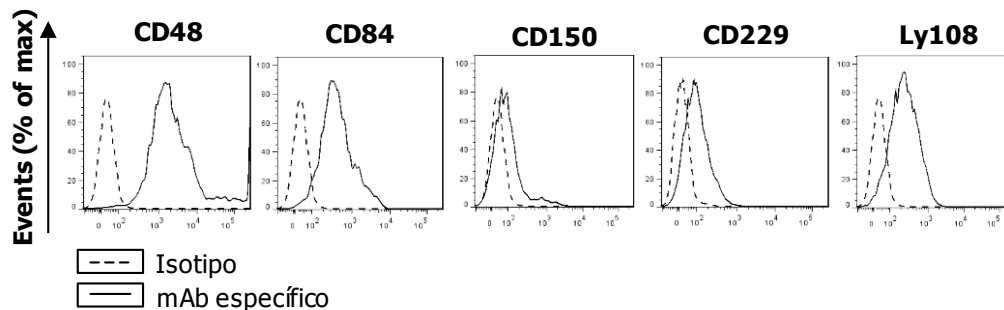


Figura 14. Expresión de los receptores SLAM en la superficie de células dendríticas inmaduras murinas derivadas de médula ósea

Se muestra la expresión de los receptores CD48, CD84, CD150, CD229 y Ly108, en la superficie de las células dendríticas inmaduras derivadas de médula ósea de ratón. Los histogramas conteniendo una línea continua en negro representan el marcaje de cada receptor SLAM con el mAb específico. Los isotipos IgG2_{a,k} o IgG1_k conjugados con PE o APC fueron usados como controles negativos y son representados por una línea discontinua.

En base a estos resultados se examinó si los miembros de la familia SLAM que se expresaban en mayor nivel en la superficie de las células dendríticas (CD48, CD84 y Ly108) podrían ser modulados durante la infección por el MCMV. Usando una MOI de 10, se encontró que aproximadamente de un 20 a un 30% de las células del cultivo resultaron infectadas por el MCMV. Como se observa en la figura 15, de entre los tres miembros de la familia SLAM expresados abundantemente en la membrana, dos de ellos, CD84 y CD48, fueron notoriamente reducidos en la superficie de las células infectadas (GFP+), siendo CD84 mayormente alterado en comparación con las células no infectadas (GFP-) en el mismo cultivo. En el caso de Ly108 se observó una ligera reducción de su nivel en la membrana celular tras la infección por el MCMV en comparación con las células sin infectar. Como se esperaba, la expresión de moléculas MHC I en la superficie celular se vio disminuida en las células dendríticas infectadas por el MCMV, siendo

RESULTADOS

este resultado en cierta medida consistente con lo descrito por Mathys *et al.* (2003), en donde se observa una reducción de estas moléculas por el citomegalovirus murino tras su activación inicial.

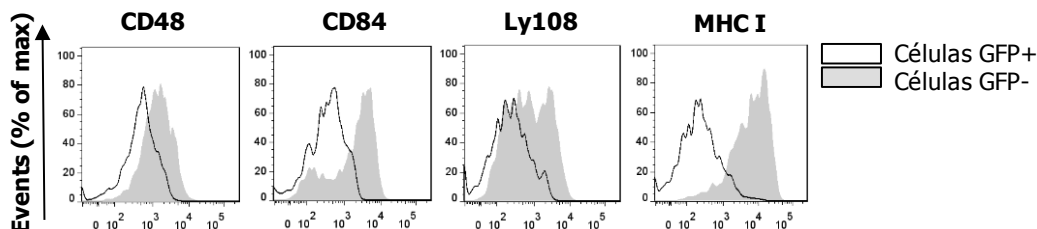


Figura 15. Expresión de los receptores SLAM en células dendríticas inmaduras infectadas por MCMV

Se muestra la expresión en superficie de los receptores SLAM CD48, CD84, Ly108 y moléculas MHC I en células dendríticas inmaduras derivadas de médula ósea de ratón infectadas con MCMV-GFP a una MOI de 10 durante 72 h. El histograma representado por una línea continua en color negro representa la población de células dendríticas infectadas (GFP+) en el cultivo. El histograma conteniendo relleno gris representa la población de células no infectadas (GFP-) en el mismo cultivo celular.

Por lo tanto, los resultados indican que en las condiciones de infección analizadas, la modulación de los receptores SLAM por el MCMV es más drástica y afecta a un mayor número de miembros de esta familia en los macrófagos que en las células dendríticas. Este resultado junto con el hecho de que las células dendríticas constituyen un tipo celular muy heterogéneo que pueden variar considerablemente la expresión de moléculas en superficie dependiendo de su estadio de desarrollo (Kushwah and Hu, 2011) fueron las razones para elegir el sistema de los macrófagos peritoneales para continuar con los estudios del efecto de la infección por el MCMV en la modulación de los receptores SLAM.

V.2 DETERMINACIÓN DE REGIONES GENÓMICAS DEL MCMV QUE CONTIENEN GENES CAPACES DE REGULAR LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES SLAM EN MACRÓFAGOS PERITONEALES

V.2.1 Mutantes del MCMV con deleciones en regiones no esenciales del genoma

El genoma del MCMV tiene aproximadamente 180 pautas de lectura abierta (Rawlinson *et al.*, 1996), conociéndose que la mayoría de los genes de interacción con el huésped tienden a ubicarse en las regiones de los extremos del genoma y que son dispensables durante la replicación viral en cultivo de tejidos. Con objeto de identificar los genes del MCMV capaces de perturbar a los receptores SLAM en la superficie del macrófago infectado, como primer paso en este trabajo se empleó una batería de mutantes del MCMV conteniendo deleciones en diferentes regiones no esenciales del genoma. Estas deleciones, comprendiendo regiones que abarcan

RESULTADOS

desde un ORF (p. ej. en el caso del MCMV-GFP Δ M116) hasta regiones más amplias de 17 ORFs (p. ej. el MCMV-GFP Δ m1-m17), permitían el análisis de 102 ORFs del MCMV, lo que representa aproximadamente un 60% del genoma viral. En la figura 16, se representa el esquema de las regiones delecionadas a partir del MCMV-GFP.



Figura 16. Mutantes de deleción del MCMV-GFP

Representación esquemática del genoma del MCMV-GFP con las regiones individuales delecionadas mostradas por recuadros con relleno en color negro y las regiones no cubiertas por deleciones mostradas con recuadros sin relleno. Sobre los recuadros se indican las ORF delecionadas.

V.2.2 Análisis de la expresión de receptores SLAM en macrófagos infectados por mutantes de deleción del MCMV

Con objeto de infectar los cultivos de macrófagos a MOIs que permitieran llevar a cabo el análisis de los receptores SLAM, comparando células infectadas (GFP+) con células no infectadas (GFP-) dentro de un mismo cultivo, se requirió generar stocks virales con títulos relativamente elevados. De entre los dieciocho mutantes de deleción del MCMV descritos en el apartado anterior, cinco de ellos (M28-M31, m29-M31, M35-M37, M45 y m106-m108) no presentaron una apropiada infectividad viral en los macrófagos, por lo cual estos mutantes virales fueron excluidos del estudio. De esta manera, el análisis de la expresión en superficie de CD48, CD84, CD229 y Ly108 en los macrófagos peritoneales, se realizó usando trece de los dieciocho mutantes de deleción del MCMV. Para ello, se infectaron macrófagos peritoneales con dichos mutantes virales y se realizaron análisis por citometría de flujo, usando anticuerpos específicos frente a los cuatro receptores SLAM mencionados. Como se muestra en la tabla 8, que resume los resultados obtenidos del análisis, once de los trece mutantes del MCMV (MCMV-GFP Δ m1-m17, MCMV-GFP Δ M24-m25.2, MCMV-GFP Δ M33, MCMV-GFP Δ m39-m40, MCMV-GFP Δ m42-M43, MCMV-GFP Δ M116, MCMV-GFP Δ m117-m120, MCMV-GFP Δ M121, MCMV-GFP Δ m128-m138, MCMV-GFP Δ m139-m141 y MCMV-GFP Δ m159-m170), condujeron a una disminución de todos los receptores SLAM en la superficie de los macrófagos infectados de manera similar a la observada en las células infectadas con el MCMV parental.

A modo de ejemplo, en la figura 17 se muestra el análisis de la expresión de CD48, CD84, CD229 y Ly108 en la superficie de los macrófagos infectados con uno de estos mutantes de deleción del

RESULTADOS

MCMV, el MCMV-GFPΔ $m159-170$. Como se observa en la figura, los cuatro receptores SLAM analizados en los macrófagos infectados por el MCMV conteniendo la delección en la región génica comprendida entre $m159-m170$ (células GFP+), fueron reducidos respecto a las células no infectadas en el mismo cultivo (células GFP-), de manera prácticamente idéntica a como lo hacía el MCMV-GFP parental.

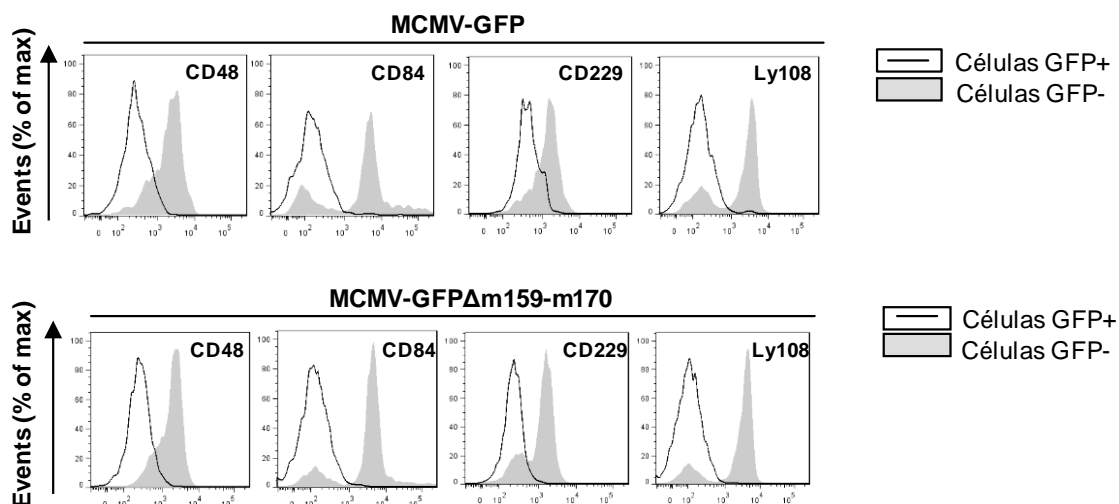


Figura 17. Expresión de los receptores SLAM en macrófagos murinos infectados por el MCMV-GFPΔ $m159-m170$

Se muestra la expresión de CD48, CD84, CD229 y Ly108 en macrófagos murinos infectados a una MOI de 2 durante 72 h usando el virus MCMV-GFP y el virus MCMV-GFP delecionado en $m159-m170$. Los histogramas conteniendo una línea continua en color negro representan la expresión de cada receptor sobre la superficie de las células infectadas en el cultivo (células GFP+). En color gris se representa la expresión de cada receptor en la superficie de las células no infectadas del mismo cultivo (células GFP-). Los histogramas corresponden a un experimento representativo de dos ensayos independientes.

No obstante, se observó que uno de los mutantes del MCMV con delección en la región $m18-m23.1$ (MCMV-GFPΔ $m18-m23.1$) perdió parcialmente la capacidad para reducir las moléculas de CD84 y CD229 en la superficie celular de los macrófagos infectados. Como se muestra en la figura 18, los macrófagos infectados con el mutante MCMV-GFPΔ $m18-m23.1$ recuperaron en cierta medida la expresión en superficie de CD84 y CD229 (siendo mayor en el caso de CD229) en comparación con los macrófagos infectados por el MCMV-GFP. Este restablecimiento de la expresión de ambos receptores en la superficie de las células infectadas con el MCMV-GFPΔ $m18-m23.1$, no llegó sin embargo a los niveles encontrados en las células no infectadas en el mismo cultivo. No obstante, el efecto sobre CD84 y CD229 del mutante de delección viral era específico, ya que por ejemplo, y como se ilustra en la figura 18, la expresión de Ly108 observada fue idéntica en los macrófagos infectados con el MCMV-GFPΔ $m18-m23.1$ y los infectados con el MCMV-GFP. Estos datos indican que la región génica viral comprendida entre $m18-m23.1$

RESULTADOS

contiene genes que modulan en cierta medida la expresión de CD84 y CD229 en la superficie celular de los macrófagos peritoneales.

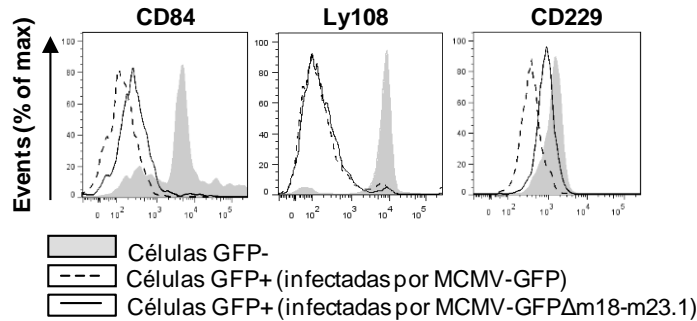


Figura 18. Expresión de CD84, Ly108 y CD229 en la superficie de los macrófagos murinos infectados por MCMV-GFPΔm18-m23.1

Se muestra la expresión de CD84, Ly108 y CD229 en macrófagos murinos infectados por el MCMV-GFP y el mutante MCMV-GFPΔm18-m23.1 a una MOI de 2 durante 72 h. Los histogramas conteniendo una línea continua en color negro representan la población de macrófagos infectados con el mutante viral. La población de células infectadas con el virus parental, se representa en los histogramas conteniendo una línea discontinua. Las células sin infectar, son representadas por los histogramas conteniendo relleno en color gris. Cada histograma corresponde a un experimento representativo de dos ensayos independientes.

De forma notoria, uno de los trece mutantes del MCMV con una delección que se extiende desde *m144* hasta *m158* (MCMV-GFPΔm144-m158), afectando a 15 genes, perdió completamente la capacidad para reducir la expresión de CD48 en la superficie de los macrófagos infectados (figura 19). Las células infectadas con este mutante viral (GFP+) expresaron unos niveles de CD48 que fueron similares a los encontrados en las células no infectadas (GFP-) en el mismo cultivo. Además, durante la infección de los macrófagos con este mutante del MCMV hubo una recuperación parcial de CD229 en la superficie de las células infectadas en comparación con las células infectadas por el MCMV-GFP, no llegando sin embargo a restablecerse la expresión de esta molécula a un nivel comparable al de las células no infectadas en el mismo cultivo. Es importante resaltar que el efecto de la modulación de CD48 y CD229 tras la infección con el MCMV-GFPΔm144-m158 era específico debido a que otros receptores SLAM como Ly108 y CD84 no se vieron afectados de forma diferencial por el mutante viral y el correspondiente virus parental, observándose una reducción de la expresión de estos dos receptores en la membrana celular de los macrófagos prácticamente idéntica tras la infección por los dos virus (figura 19).

Por otro lado, tras analizar la expresión de CD86, una molécula que se usó como control debido a que su expresión en la superficie celular es reducida por el producto viral *m147.5* (Loewendorf *et al.*, 2004), también delecionado en el MCMV-GFPΔm144-m158, como se esperaba, se observó

RESULTADOS

una reversión de los niveles de este receptor en los macrófagos infectados por este mutante viral a niveles comparables a los de las células sin infectar.

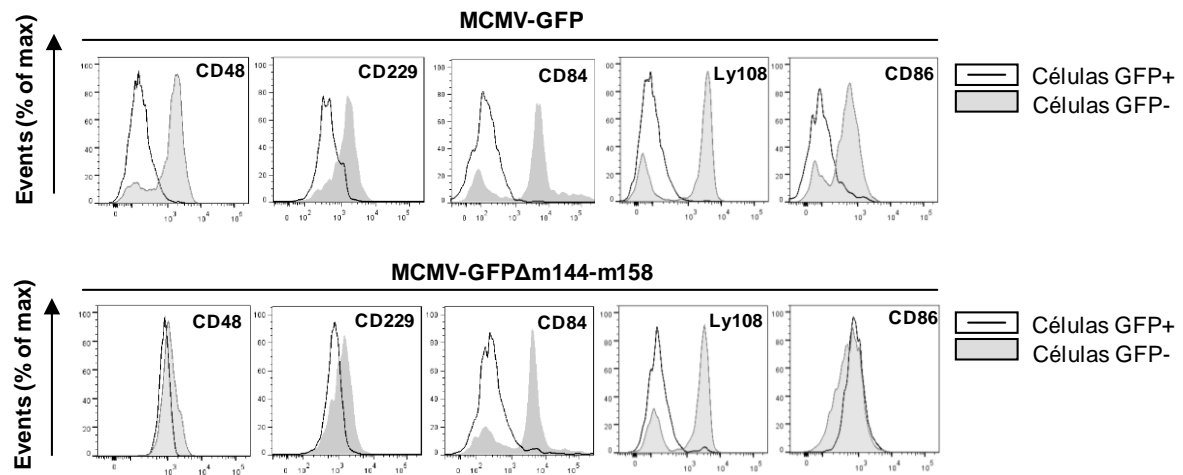


Figura 19. Expresión de los receptores SLAM y de CD86 en macrófagos murinos infectados con el mutante de delección MCMV-GFPΔm144-m158

Se muestra la expresión de CD48, CD229, CD84, Ly108 y CD86 en macrófagos murinos infectados a una MOI de 2 durante 72 h con el MCMV-GFPΔm144-m158 o el MCMV-GFP parental. Los histogramas conteniendo una línea continua en color negro representan la población de macrófagos infectados (células GFP+) con el virus correspondiente. Las células sin infectar en cada caso (GFP-) son representadas por el histograma conteniendo relleno en color gris. Cada histograma corresponde a un experimento representativo de tres ensayos.

Como resumen de estos ensayos, en la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos tras analizar el efecto de los trece mutantes de delección del MCMV sobre la expresión de CD48, CD84, CD229 y Ly108 en la superficie de los macrófagos. Como se indica en esta tabla, mientras que dos regiones presentes en el genoma del MCMV contienen genes que alteran la expresión de CD48, CD84 y CD229 en la superficie de las células infectadas, siendo éstas las comprendidas entre *m18* y *m23.1* y entre *m144* y *m158*, no se identificaron regiones presentes en el genoma viral que modificaran la expresión de Ly108 en las células infectadas. En el caso de CD229, su expresión se encuentra regulada de manera parcial por genes virales contenidos dentro de la región *m18-m23.1* y la región *m144-m158*. Asimismo, la expresión de CD84 es alterada en parte por la expresión de genes presentes en la región *m18-m23.1*. Finalmente, CD48, se encuentra totalmente modulado por la expresión de genes localizados dentro de la región comprendida entre *m144* y *m158*.

RESULTADOS

Delección en MCMV-GFP	CD48	CD84	CD229	Ly108
$\Delta m1-m17$	-	-	-	-
$\Delta m18-m23.1$	-	↑	↑↑	-
$\Delta M24-m25.2$	-	-	-	-
$\Delta M33$	-	-	-	-
$\Delta m39-m40$	-	-	-	-
$\Delta m42-M43$	-	-	-	-
$\Delta M116$	-	-	-	-
$\Delta m117-m120$	-	-	-	-
$\Delta M121$	-	-	-	-
$\Delta m128-m138$	-	-	-	-
$\Delta m139-m141$	-	-	-	-
$\Delta m144-m158$	↑↑↑	-	↑↑	-
$\Delta m159-m170$	-	-	-	-

Tabla 6. Resumen del análisis de la expresión de los receptores SLAM en la superficie de los macrófagos murinos infectados por mutantes de delección de MCMV.

Se muestra el resultado obtenido del análisis realizado por citometría de flujo de la expresión de CD48, CD84, CD229 y Ly108 en macrófagos peritoneales murinos infectados a una MOI de 2 durante 72 h, usando cada uno de los trece mutantes de delección del MCMV, cuyas regiones delecionadas aparecen indicadas en la tabla. El nivel de expresión de cada receptor presente en la superficie celular es representado mediante los siguientes símbolos: (-) reducción similar a la del MCMV-GFP parental, (↑, ↑↑) recuperación parcial de la expresión del receptor en comparación con el MCMV-GFP parental, siendo ↑ en menor medida y ↑↑ en mayor medida, (↑↑↑) recuperación total de la expresión del receptor en comparación con el MCMV-GFP parental.

V.3 IDENTIFICACIÓN DEL GEN DEL MCMV QUE MODULA EL RECEPTOR SLAM CD48 EN MACRÓFAGOS PERITONEALES

V.3.1 Mapeo detallado e identificación de *m154*, el gen del MCMV que interfiere con CD48

El hecho de encontrarse una recuperación total de la expresión en superficie de CD48 en los macrófagos infectados con un único mutante de delección del MCMV (MCMV-GFP $\Delta m144-m158$) y teniendo en cuenta que CD244, el receptor de CD48, se encuentra expresado en las células NK y las células T CD8+, involucradas en la respuesta inmunitaria activa frente a la infección por el MCMV, en este trabajo se decidió explorar las consecuencias de la disminución en superficie de CD48. En primer lugar, se trató de identificar el gen viral causante de ello. Para ello, debido a que en la región delecionada en el mutante MCMV-GFP $\Delta m144-m158$ se localizan quince genes: *m144*, *m145*, *m146*, *m147*, *m148*, *m149*, *m150*, *m151*, *m152*, *m153*, *m154*, *m155*, *m156*, *m157* y *m158*, se usaron tres diferentes submutantes del MCMV con delecciones en las regiones que comprenden los genes que van desde *m144* hasta *m148* (MCMV-GFP $\Delta m144-m148$), desde *m149* hasta *m153* (MCMV-GFP $\Delta m149-m153$) y desde *m154* hasta *m157* (MCMV-GFP $\Delta m154-m157$). En la figura 20 se muestra un esquema de los genes delecionados en cada uno de estos tres mutantes virales.

RESULTADOS

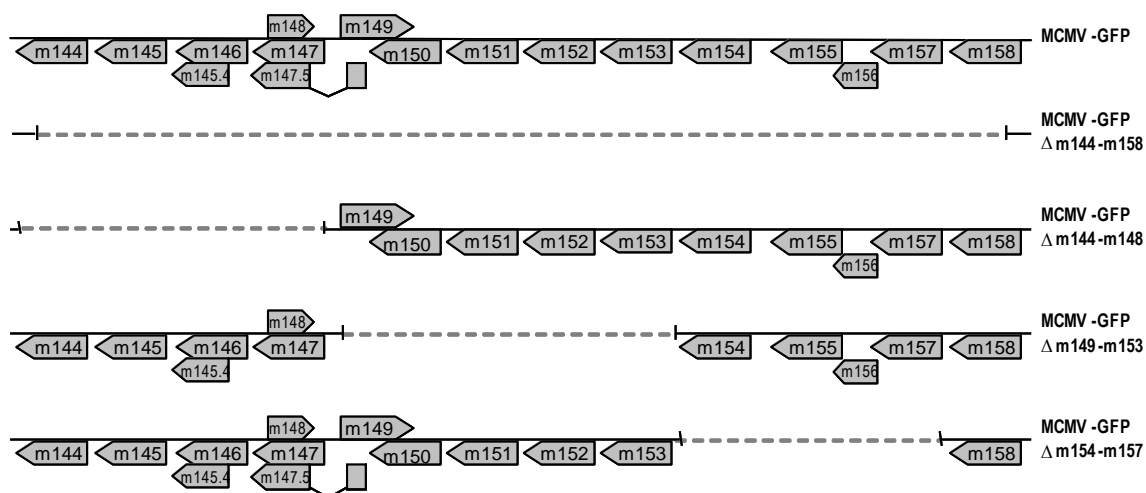


Figura 20. Esquema de submutantes del MCMV con deleciones dentro de la región *m144-m158*

Se muestra un esquema de la región que comprende los genes entre *m144* y *m158* en el MCMV-GFP parental y en los mutantes del MCMV delecionados en las regiones *m144-m158* (MCMV-GFP Δ m144-m158), *m144-m148* (MCMV-GFP Δ m144-m148), *m149-m153* (MCMV-GFP Δ m149-m153) y *m154-m157* (MCMV-GFP Δ m154-m157). Las pautas de lectura abierta delecionadas se representan por líneas discontinuas.

A continuación, se infectaron macrófagos peritoneales con estos cuatro submutantes virales, analizándose la expresión de CD48 a las 72 hpi. En la figura 21 se muestra que, a diferencia de lo que ocurre en las células infectadas por el MCMV-GFP parental o las infectadas por los dos mutantes virales MCMV-GFP Δ m144-m148 y el MCMV-GFP Δ m149-m153, durante la infección del MCMV-GFP Δ m154-m157, incapaz de expresar m154, m155, m156 y m157, se restableció completamente la expresión de CD48 en la superficie de los macrófagos. El hecho de que CD86 continuase expresándose en las células infectadas por el MCMV-GFP Δ m154-m157 de manera similar a las células no infectadas y que sus niveles de expresión se revirtiesen en las células infectadas por el MCMV careciendo de m144-m148 o de m149-m153, confirmó la especificidad del efecto modulador de MCMV-GFP Δ m154-M157 sobre la expresión de CD48.

RESULTADOS

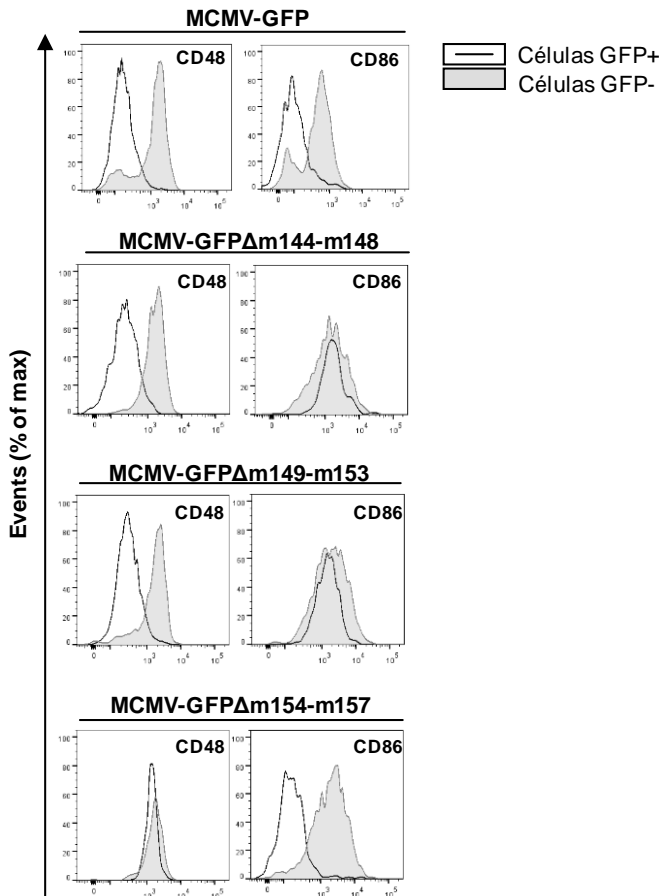


Figura 21. Expresión de CD48 y CD86 sobre la superficie de macrófagos infectados por el MCMV-GFPΔm144-m148, el MCMV-GFPΔm149-m153 y el MCMV-GFPΔm154-m157

Se muestra la expresión de CD48 y CD86 en macrófagos murinos infectados a una MOI de 2 durante 72 h, con el MCMV-GFP o los mutantes MCMV-GFPΔm144-m148, MCMV-GFPΔm149-m153 o MCMV-GFPΔm154-m157. Los histogramas conteniendo una línea continua en color negro representan la población de macrófagos infectados (células GFP+) con el virus correspondiente. Las células sin infectar en cada caso (células GFP-) son representadas por el histograma conteniendo relleno en color gris. Cada histograma corresponde a un experimento representativo de dos ensayos independientes.

Continuando con la misma estrategia y con el fin de de identificar el gen del MCMV localizado dentro de la región genómica comprendida entre *m154* y *m157* con capacidad para reducir los niveles de CD48 en la superficie de los macrófagos murinos, se emplearon dos submutantes del MCMV adicionales (Figura 22). El primer submutante, MCMV-GFPΔm153-m154 conllevaba una deleción que abarcaba dos genes, *m153* y *m154*, y el segundo, MCMV-GFPΔm155-m157, carecía de *m155*, *m156* y *m157*.



Figura 22. Submutantes del MCMV conteniendo deleciones dentro de la región *m153-m157*

Se muestra un esquema de la región que comprende los genes entre *m144* y *m158* en el MCMV-GFP parental y los mutantes del MCMV delecionados en la región *m155-m157* (MCMV-Δm155-m157) y en *m153-m154* (MCMV-GFPΔm153-m154). Con líneas discontinuas se representan las pautas de lectura abierta delecionadas.

RESULTADOS

Tras analizar la expresión de CD48 en la superficie de los macrófagos murinos infectados con cada uno de estos dos submutantes del MCMV, se observó que el MCMV-GFP Δ m153-m154 pero no el MCMV-GFP Δ m155-m157, era capaz de revertir los niveles de CD48 en la superficie de los macrófagos infectados, consiguiendo una expresión de este receptor similar a la de las células sin infectar en el mismo cultivo (figura 23).

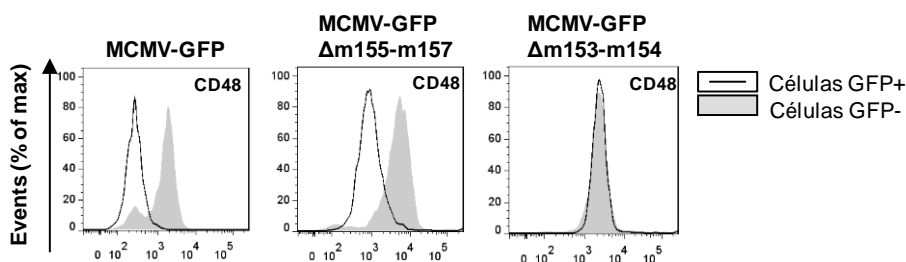


Figura 23. Expresión de CD48 sobre la superficie de macrófagos infectados por el MCMV-GFP Δ m153-m154 y el MCMV-GFP Δ m155-m157

Se muestra la expresión de CD48 en macrófagos murinos infectados a una MOI de 2 durante 72 h usando los mutantes de delección del MCMV carentes de los genes *m153-m154* y *m155-m157*. Los histogramas contienen una línea continua en color negro que representa la población de células infectadas (células GFP+) con el virus correspondiente. Las células sin infectar (células GFP-) en cada caso, son representadas por el histograma con relleno en color gris. Cada histograma corresponde a un experimento representativo de tres ensayos.

Teniendo en cuenta que de los resultados obtenidos al examinar el mutante MCMV-GFP Δ m149-m153 podía excluirse la posibilidad de que el gen *m153* ejerciese un papel modulador sobre la expresión de CD48, se dedujo que el gen *m154* habría de ser el causante de la reducida expresión de CD48 durante la infección viral. Para confirmar esta observación se analizó un mutante del MCMV adicional, el MCMV Δ m154, que presentaba una delección de *m154* (Figura 24A). Dado que el MCMV Δ m154 no contenía el casete GFP dentro de su genoma, impidiendo por lo tanto el análisis de células infectadas (GFP+) respecto a células no infectadas (GFP-) en un mismo cultivo, el estudio se realizó mediante infecciones a alta MOI y comparando la expresión de CD48 con la de las células no infectadas de un cultivo independiente. Además, en este caso se utilizó como control del ensayo su correspondiente virus parental, el wt MCMV. Como se muestra en la figura 24B, a diferencia de lo que ocurre durante la infección por el wt MCMV, tras la infección de los macrófagos con el MCMV Δ m154 la expresión de CD48 en la superficie celular fue muy similar a la de las células no infectadas. El hecho de que el MCMV Δ m154, sin embargo, redujera la expresión de Ly108 y CD84 en los macrófagos infectados, al igual que el virus parental, corroboraba la especificidad de este mutante viral por la modulación de CD48.

RESULTADOS

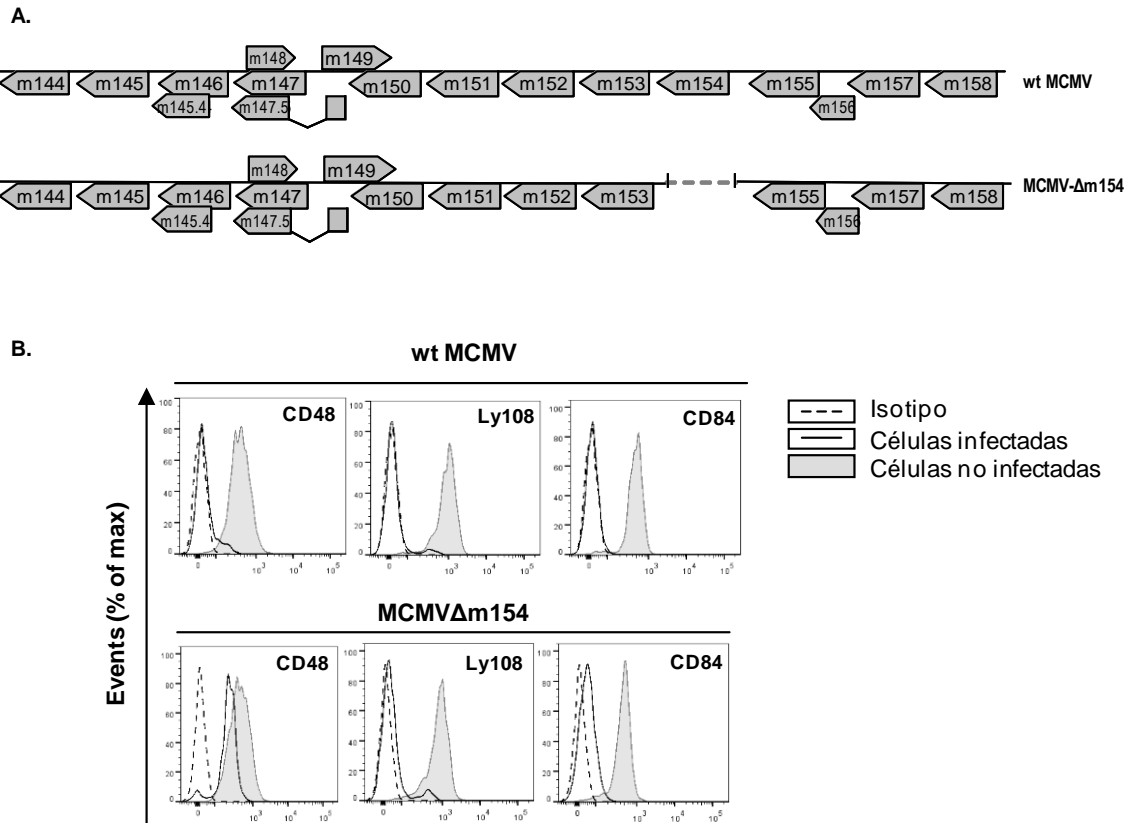


Figura 24. Expresión de los receptores SLAM en la superficie de macrófagos infectados con el MCMVΔm154

A. Se muestra un esquema de la región que comprende los genes entre *m144* y *m158* en el wt MCMV parental y en un mutante del MCMV deleciónado en *m154*. Con líneas discontinuas se representan las pautas de lectura abierta deleciónadas. **B.** Se muestra la expresión de CD48, Ly108 y CD84 en macrófagos infectados a una MOI de 10 durante 72 h con el mutante MCMVΔm154 y el wt MCMV parental. Los histogramas conteniendo una línea continua en color negro representan la población de células infectadas con cada uno de estos virus. Las células sin infectar son representadas por el histograma conteniendo relleno en color gris. El isotipo usado en cada caso es representado por una línea discontinua. Los histogramas corresponden a un experimento representativo de tres ensayos.

En un estudio en el que se evaluó de manera global la expresión génica del MCMV usando el análisis de microarrays de ADN, se describió la presencia de dos pequeñas pautas de lectura abierta (*m154.3* y *m154.4*) potencialmente expresadas en células NIH 3T3 infectadas por el MCMV (Tang *et al.*, 2006), que solaparían parcialmente con *m154*. Para descartar que los efectos observados sobre CD48 fueran debidos a *m154.3* ó *m154.4*, se analizó un nuevo recombinante del MCMV denominado MCMVΔm154Int, portando una deleción interna más pequeña en *m154* que preservaba intactas las pautas de lectura abierta *m154.3* y *m154.4* (Figura 25A). Al igual que el MCMVΔm154, este mutante viral carece del gen *GFP* en su genoma, por lo que se siguió la misma estrategia de análisis que se había llevado a cabo en los macrófagos infectados con el MCMVΔm154. Como se muestra en la figura 25B, mientras el MCMVΔm154Int conservaba la capacidad de modular otros miembros SLAM, como Ly108 y CD84, no alteró significativamente los niveles de CD48 en la superficie de las células infectadas.

RESULTADOS

Estos datos por lo tanto, confirman que el restablecimiento de CD48 en la superficie de los macrófagos infectados era el resultado de delecionar el gen *m154* del genoma del MCMV. Así pues, con estos resultados se concluye que *m154* suprime la expresión de CD48 en la superficie celular.

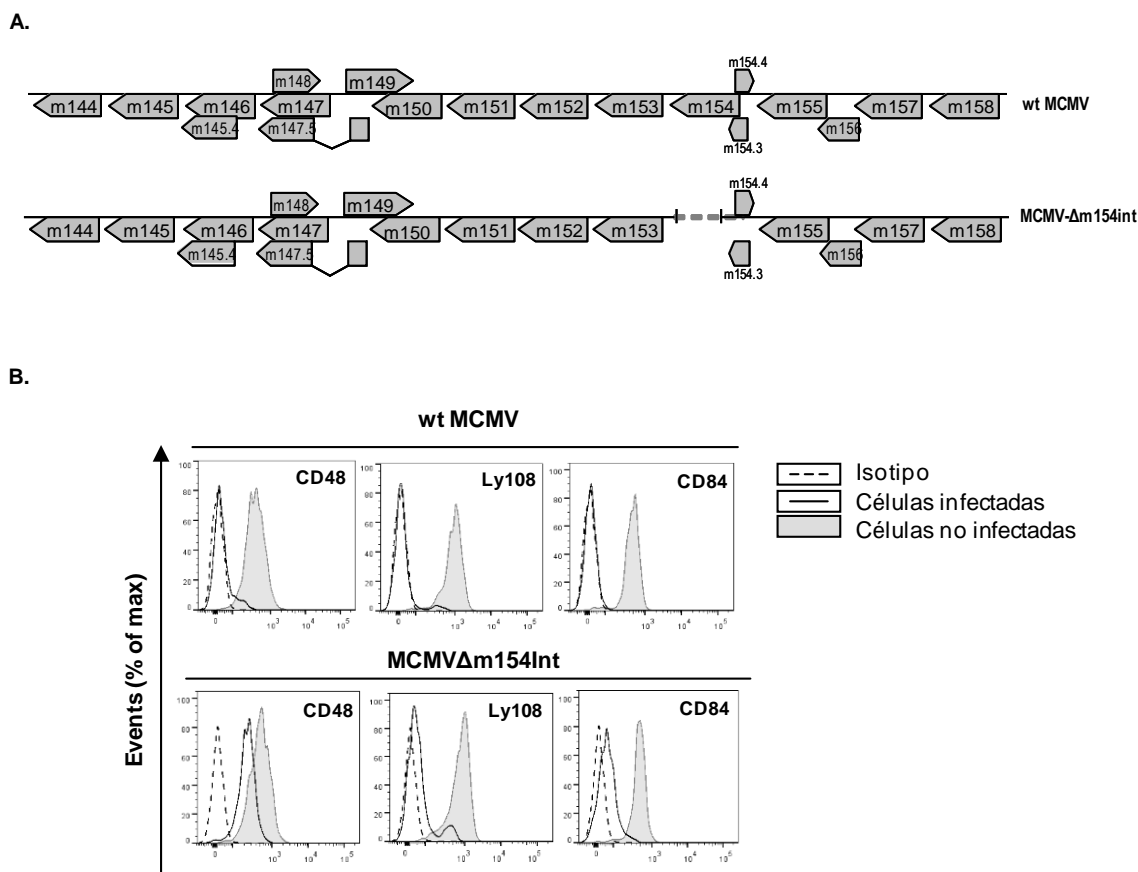


Figura 25. Expresión de los receptores SLAM en la superficie de los macrófagos infectados con MCMV Δ m154Int

A. Se muestra un esquema de la región que comprende los genes entre *m144* y *m158* en el wt MCMV parental y en un mutante del MCMV delecionado en *m154* pero preservando *m154.3* y *m154.4*. Con líneas discontinuas se representan las pautas de lectura abierta delecionadas. **B.** Se muestra la expresión de CD48, Ly108 y CD84 en macrófagos murinos infectados a una MOI de 10 durante 72 h, usando el mutante MCMV Δ m154Int y el wt MCMV. Los histogramas conteniendo una línea continua en color negro representan la población de células infectadas en los cultivos. Las células sin infectar en cada caso, son representadas por el histograma conteniendo relleno en color gris. El control de isotipo es representado por una línea discontinua. Los histogramas corresponden a un experimento representativo de dos ensayos independientes.

V.3.2 *m154* no afecta de modo general a la expresión en superficie de receptores anclados a la membrana por GPI

Teniendo en cuenta que CD48 es el único miembro de la familia SLAM que se une a la membrana celular a través de enlaces GPI y debido a que *m154* modula la expresión de este receptor en la superficie de los macrófagos, se quiso determinar si otros receptores de superficie anclados a la

RESULTADOS

membrana celular por uniones GPI eran perturbados por esta proteína viral. Para evaluar esta posibilidad, se analizó tras la infección por wt MCMV y MCMV Δ m154 la expresión de CD55, un receptor que se ancla a la membrana por GPI. En la Figura 26 se muestra que la expresión de CD55 se reducía en cierta medida en las células infectadas en comparación con las células no infectadas (figura 26). Sin embargo, los macrófagos infectados con el MCMV Δ m154 presentaron una disminución de los niveles de CD55 en superficie prácticamente indistinguible de la del wt MCMV parental. El hecho de no observar un restablecimiento de la expresión de CD55 en los macrófagos infectados con el MCMV delecionado en *m154*, confirma que *m154* no opera a través de un mecanismo general asociado al tráfico de receptores unidos a la membrana por medio de GPI.

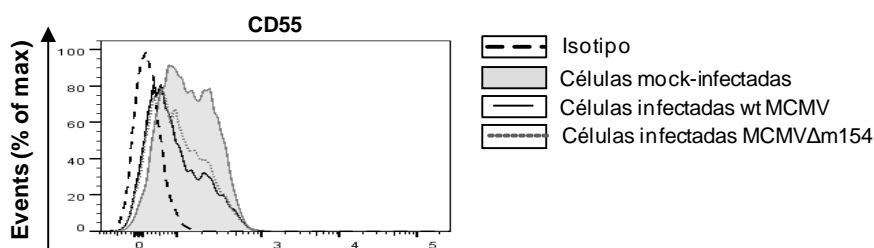


Figura 26. Expresión de CD55 en la superficie de los macrófagos infectados por el wt MCMV y el MCMV Δ m154

Se muestra la expresión de CD55 en macrófagos peritoneales infectados a una MOI de 10 durante 72 h con el wt MCMV o el MCMV Δ m154. Las células sin infectar se representan por el histograma relleno en color gris. Las células infectadas con el wt MCMV se representan con el histograma conteniendo una línea continua en color negro y las células infectadas con el MCMV Δ m154 se muestran en el histograma conteniendo una línea punteada. El control de isotipo es representado por una línea discontinua. El histograma corresponde a un experimento de dos ensayos independientes.

V.4 CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA *m154* DEL MCMV

V.4.1 Análisis de la secuencia aminoacídica de *m154*

El gen *m154* pertenece a la familia multigénica *m145* del MCMV (Rawlinson *et al.*, 1996), comprendida por once miembros algunos de los cuales se encuentran involucrados en la modulación de la respuesta inmunitaria. Varios componentes de esta familia codifican proteínas que adoptan un plegamiento tipo MHC clase I (Smith *et al.*, 2002). Este no es el caso, sin embargo, del gen *m154*, que no presenta homología con genes de MHC clase I. Debido a que el producto codificado por *m154* no había sido caracterizado previamente, se quiso analizar en primer lugar su estructura. Para ello, se usaron ciertos programas de análisis de secuencias como Signal 4.0 Server, NetNGlyc 1.0, NetOGlyc 3.1 y TMHMM 2.0. En la figura 27 se muestra que el gen *m154* codifica una proteína transmembrana tipo I de 368 aa, que contiene un péptido señal de 23 aa en su extremo N-terminal, un ectodominio de 300 aa, una región transmembrana de 23 aa y una cola citoplasmática de 22 aa en su extremo C-terminal. Asimismo, se predijo que el

RESULTADOS

Con el fin de determinar si el anticuerpo generado m154.4.113 reconocía a m154 durante la infección viral, se realizaron ensayos de Western blot a partir de extractos proteicos de macrófagos murinos infectados por el MCMV durante 72 h. Como se observa en la figura 28, el anticuerpo detectó una única banda específica con una masa molecular aparente de ~60 KDa, que como se esperaba, no estaba presente en los extractos de las células no infectadas. La discrepancia entre la masa estimada a partir de la secuencia primaria de m154 de ~40 KDa y la indicada por la migración de la proteína detectada por Western blot, posiblemente sea debida a un alto grado de glicosilación en sus residuos de serina y treonina.

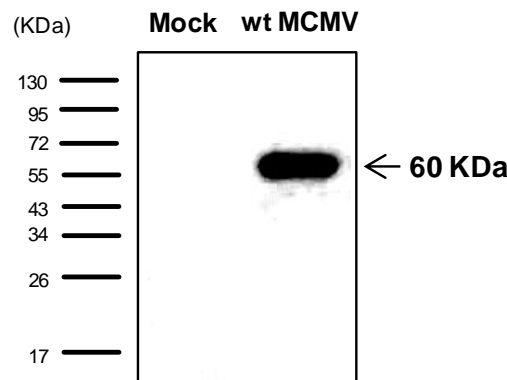


Figura 28. Reconocimiento de m154 por el mAb m154.4.113 durante la infección del macrófago

Los macrófagos peritoneales fueron mock infectados o infectados por wt MCMV a una MOI de 10. Los lisados recogidos a las 72 hpi, fueron separados en condiciones reductoras por SDS-PAGE (10%) y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con el mAb m154.4.113 seguido de un anti-mouse IgG HRP. En el margen izquierdo se han indicado los tamaños de los marcadores de peso molecular y en el derecho el peso molecular de la banda de m154 detectada.

V.4.3 Detección de m154 durante la infección viral

A fin de establecer la clase cinética a la que pertenece la proteína viral m154 se usaron dos inhibidores, el ácido fosfonoacético (PPA), un inhibidor de la síntesis de ADN viral el cual previene la expresión de genes virales tardíos, y la cicloheximida (CHX), un inhibidor de la traducción proteica y que por lo tanto permite únicamente la expresión de genes virales con una clase cinética inmediatamente temprana. Se infectaron macrófagos con el MCMV en presencia o bien de la CHX y actinomicina D durante 16 h, o bien del PPA durante 72 h, se prepararon extractos celulares y se analizaron por Western blot usando el mAb anti-m154. Como se observa en la figura 29, m154 no se detectó en las células infectadas tras el bloqueo con la CHX en presencia de actinomicina D, mientras que como se esperaba, la proteína viral inmediatamente temprana IE1 fue encontrada abundantemente expresada tras este tratamiento. Sin embargo, m154 fue

RESULTADOS

detectada en los extractos celulares que provenían de los cultivos tratados con el PPA, a un nivel prácticamente similar al de los extractos de las células infectadas control que no fueron expuestas a inhibidores. Estos resultados en su conjunto demostraron que m154 es una proteína que se expresa en la fase temprana de la infección.

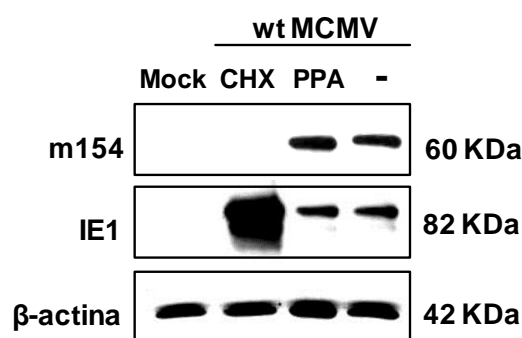


Figura 29. Expresión de m154 durante el curso de la infección por el MCMV

Los macrófagos peritoneales fueron mock infectados o infectados por el wt MCMV a una MOI de 10 en ausencia de inhibidores (-), en presencia de cicloheximida y actinomicina D (CHX) o de ácido fosfonoacético (PPA). A las 16 hpi en el caso de las muestras tratadas con CHX, y a las 72 hpi en el resto de los casos, se prepararon lisados celulares, se separaron en condiciones reductoras por SDS-PAGE (10%) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó con el mAb anti-m154 o anti-IE1 (croma101) seguido de un anti-mouse IgG HRP. Como control se utilizó un mAb anti-β-actina seguido de un anti-rabbit IgG HRP. En el margen derecho se indican los pesos moleculares en KDa de cada proteína.

V.4.4 Localización de m154 en células infectadas por el MCMV

A fin de conocer la localización celular de m154 en el contexto de la infección viral, se examinó por inmunofluorescencia indirecta usando el mAb anti-m154, la expresión de la proteína viral en macrófagos murinos infectados por el wt MCMV durante 72 h. Para ello, y debido a que el anticuerpo frente a m154 reconoce a la proteína viral a través de la región correspondiente a su cola citoplasmática, las células se permeabilizaron previamente. Como se muestra en la figura 30, m154 se expresó abundantemente en la membrana celular, detectándose en menor medida en el citoplasma de los macrófagos infectados por el wt MCMV (panel e y f). Como era de esperar, las células no infectadas no presentaron ninguna tinción específica en estas condiciones (panel b y c). Con estos resultados se determinó que m154 se localiza principalmente en la superficie de los macrófagos infectados por el MCMV.

RESULTADOS

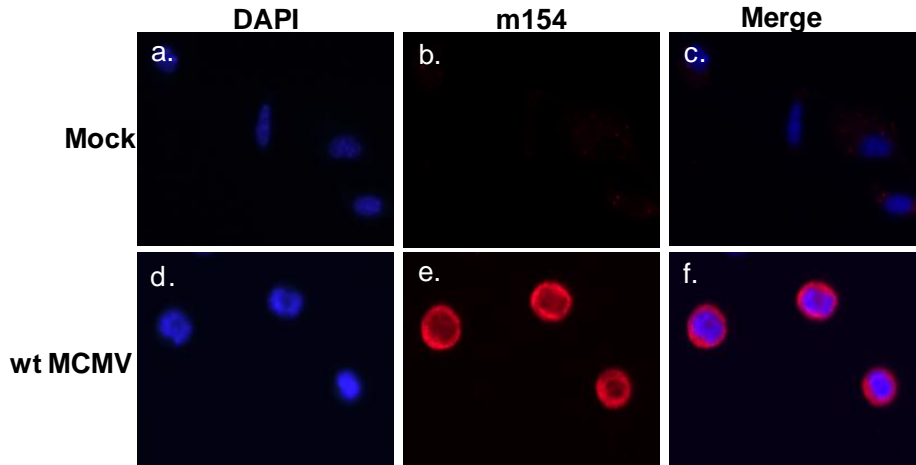


Figura 30. Localización de la proteína viral m154 en el contexto de la infección por el MCMV

Los macrófagos peritoneales se dejaron sin infectar (Mock) o fueron infectados por wt MCMV a una MOI de 10 durante 72 h. Las células fueron fijadas, permeabilizadas y marcadas con el mAb anti-m154 seguido de un anti-mouse IgG Alexa fluor 555 (paneles b y e). El núcleo fue teñido con DAPI (paneles a y d). Las células fueron examinadas en el microscopio de fluorescencia usando un objetivo de aumento 40X y una longitud de onda de 405nm para la detección de DAPI (paneles a y d) y 555-565 nm para la detección de Alexa-555 (paneles b y e). Las tinciones superpuestas se muestran en los paneles c y f.

V.4.5 m154 expresada aisladamente no reduce la expresión de CD48

A continuación se quiso conocer si la proteína m154 aislada del contexto de la infección viral presentaba la capacidad de disminuir los niveles de CD48 en la superficie celular. Como primer paso, se generó una línea celular capaz de expresar m154. Para ello, se construyó un plásmido denominado HA-m154 que contenía *m154* fusionado a un *tag* correspondiente a un epítipo de nueve aminoácidos de la hemaglutinina (HA) en el extremo N-terminal. Este plásmido se transfectó en células 300.19 y el cultivo celular se trató con G418 para seleccionar por resistencia a este agente las células que expresaban m154. Tras examinar estas células por citometría de flujo usando un anticuerpo frente a HA, se observó que m154 se localiza en la superficie celular, de modo similar a lo que ocurre en el contexto de la infección (Figura 31A). Sin embargo, al analizar CD48 en las células transfectadas se observó que m154 no era capaz de reducir la expresión de este receptor en la superficie celular (figura 31B). Así pues, los niveles en superficie de CD48 en las células 300.19 transfectadas con HA-m154 fueron similares a los de las células no transfectadas. Este resultado probablemente estaba sugiriendo que para el correcto funcionamiento de m154 se necesitan productos codificados por el MCMV adicionales, o moléculas celulares inducidas durante la infección viral.

RESULTADOS

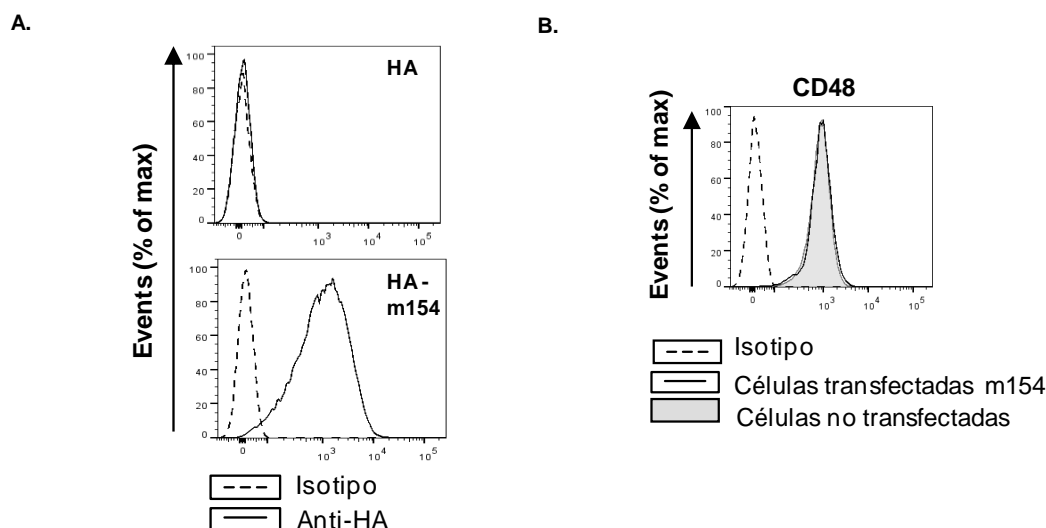


Figura 31. Análisis de la proteína viral m154 expresada aisladamente

A. Se muestra el análisis por citometría de flujo de las células 300.19 transfectadas establemente con el vector vacío que expresa HA o con la construcción HA-m154. Las células fueron analizadas a las 24 h post-transfección usando el mAb anti-HA biotinado (línea continua) o el control de isotipo (línea discontinua), seguido de estreptavidina-PE. **B.** Se muestra el análisis por citometría de flujo de la expresión de CD48 en células 300.19 no transfectadas (histograma conteniendo relleno en gris) o transfectadas establemente con HA-m154 (histograma con línea continua en color negro). El correspondiente isotipo de IgG fue usado como control negativo (histograma con una línea discontinua). Los histogramas corresponden a un experimento representativo de dos ensayos.

V.4.6 m154 expresada ectópicamente en el contexto de la infección viral disminuye la expresión de CD48

Con objeto de evaluar la posibilidad de que m154 requiriese de productos expresados durante la infección para ejercer sus funciones, se analizó la capacidad para modular CD48 presentada por m154 expresada ectópicamente en el contexto de la infección por el MCMV. Para ello, se usó un nuevo mutante viral denominado MCMVm154Ectop que contiene el gen *m154* junto con 210nt de su correspondiente promotor y 60nt de su correspondiente señal de poliA, insertados dentro de una región comprendida entre el gen *ie2* y el gen *m129* del MCMVΔm154 (figura 32A). Tras infectar durante 72 h macrófagos peritoneales con este nuevo mutante viral y analizarlos por inmunocitoquímica usando el anticuerpo anti-m154, se pudo apreciar que la distribución de m154 era comparable a la obtenida durante la infección por el wt MCMV (figura 32B). Además en estas condiciones, cuando se examinaron las células infectadas con el MCMVΔm154Ectop por citometría de flujo, se observó que el mutante viral era capaz de reducir en gran medida los niveles de CD48 en la superficie de los macrófagos infectados (figura 32C). Basados en estos resultados se puede afirmar que m154 disminuye los niveles de CD48 en la superficie celular, tras ser expresado ectópicamente en el contexto de la infección viral.

RESULTADOS

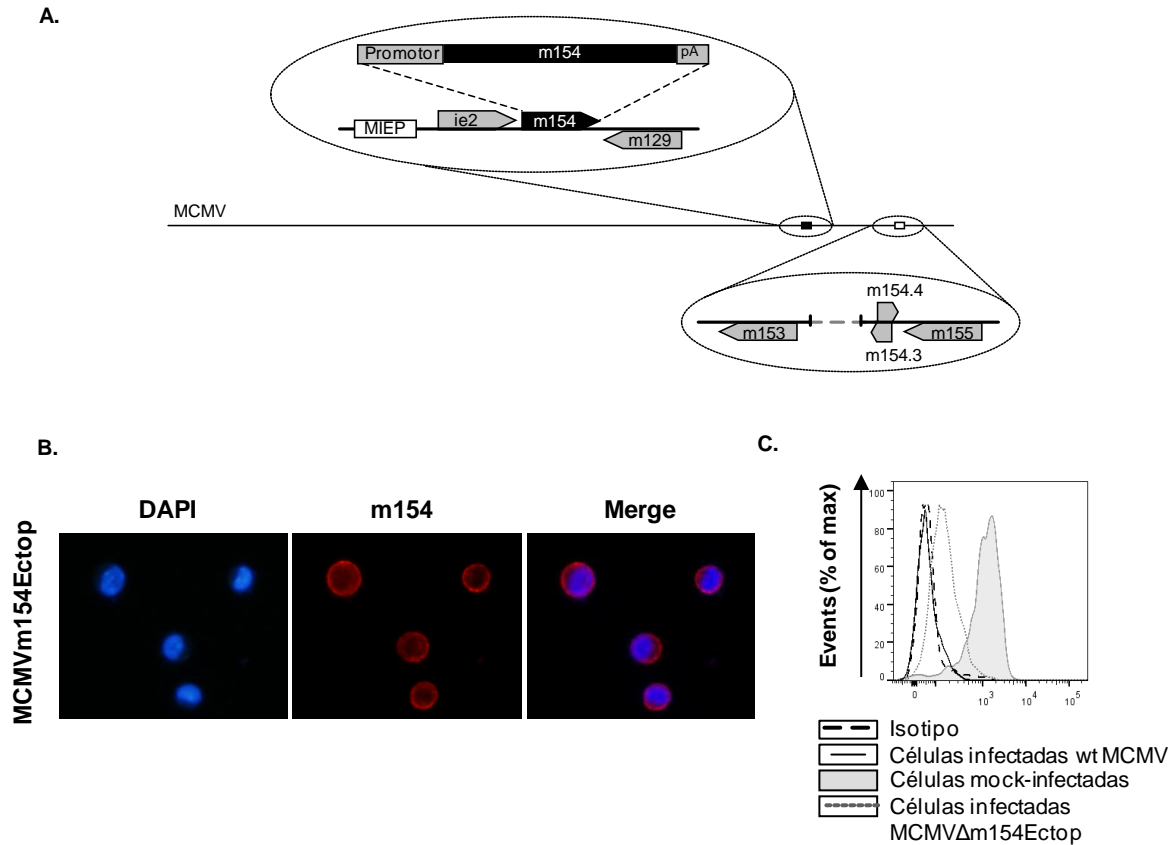


Figura 32. Análisis de la expresión de CD48 sobre la superficie de macrófagos infectados por el MCMVm154Ectop

A. Se muestra una representación esquemática del MCMVm154Ectop. En un cuadrado sin relleno se indica la región comprendida entre *m153-m155*, en la cual se representa de manera expandida, la delección de *m154* pero no de *m154.3* y *m154.4*. En un cuadrado en negro se representa parte de la región principal inmediatamente temprana (MIE), en donde se indica que *m154* (junto con 210 nt de su correspondiente promotor y 60 nt de su señal de poliA), están insertados entre los genes *ie2* y *m129*. **B.** Se muestra la tinción por inmunocitoquímica de los macrófagos peritoneales infectados con el MCMVm154Ectop a una MOI de 10 durante 72 h. Las células fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con el mAb anti-m154 seguido de un anti-mouse IgG Alexa fluor 555 y analizadas como se indica en la figura 30. Se muestra la tinción del núcleo con DAPI (panel de la izquierda), la tinción de m154 (panel del centro) y la superposición de las imágenes (panel de la derecha). Las imágenes fueron capturadas usando un objetivo de aumento 40X. **C.** Los macrófagos peritoneales se dejaron sin infectar o fueron infectados con el wt MCMV o el MCMVm154Ectop a una MOI de 10 durante 72 h. La expresión de CD48 en las células mock se representa con el histograma en gris y su expresión en las células infectadas por el wt MCMV ó el MCMVm154Ectop, se representa en los histogramas con una línea continua y una línea punteada, respectivamente. El isotipo IgG usado como control negativo es representado en el histograma conteniendo una línea discontinua. El histograma corresponde a un experimento representativo de dos ensayos.

V.5 MECANISMO DE ACCIÓN DE m154

V.5.1 m154 no está implicada en la replicación viral *in vitro*

Aunque los productos codificados por MCMV que presentan propiedades inmunomoduladoras en principio no suelen estar involucrados en el ciclo de replicación viral, se analizó si m154 afectaba al crecimiento del MCMV en cultivo de tejidos. Con este propósito, se realizaron curvas de crecimiento del MCMVΔm154 y del wt MCMV en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) y

RESULTADOS

macrófagos peritoneales infectados a una baja MOI, analizándose la cantidad de virus extracelular de los cultivos (en el caso de los MEF) o el virus asociado a las células (en los macrófagos), a diferentes tiempos post-infección. Como se muestra en la figura 33A, la cinética de crecimiento del MCMV Δ m154 en ambos tipos celulares, MEF y macrófagos, fue prácticamente indistinguible de la cinética del wt MCMV, observándose que los títulos virales recuperados a los diferentes tiempos post-infección eran similares en ambos virus. De esta manera, se confirmó la ausencia de un fenotipo defectuoso asociado al MCMV Δ m154 *in vitro*. Además, la morfología de las placas de lisis formadas por el MCMV Δ m154 y el wt MCMV en los cultivos de fibroblastos infectados, no mostraron ninguna diferencia apreciable (figura 33B). Estos resultados en su conjunto indican que m154 no está implicada en el crecimiento viral en cultivo de tejidos.

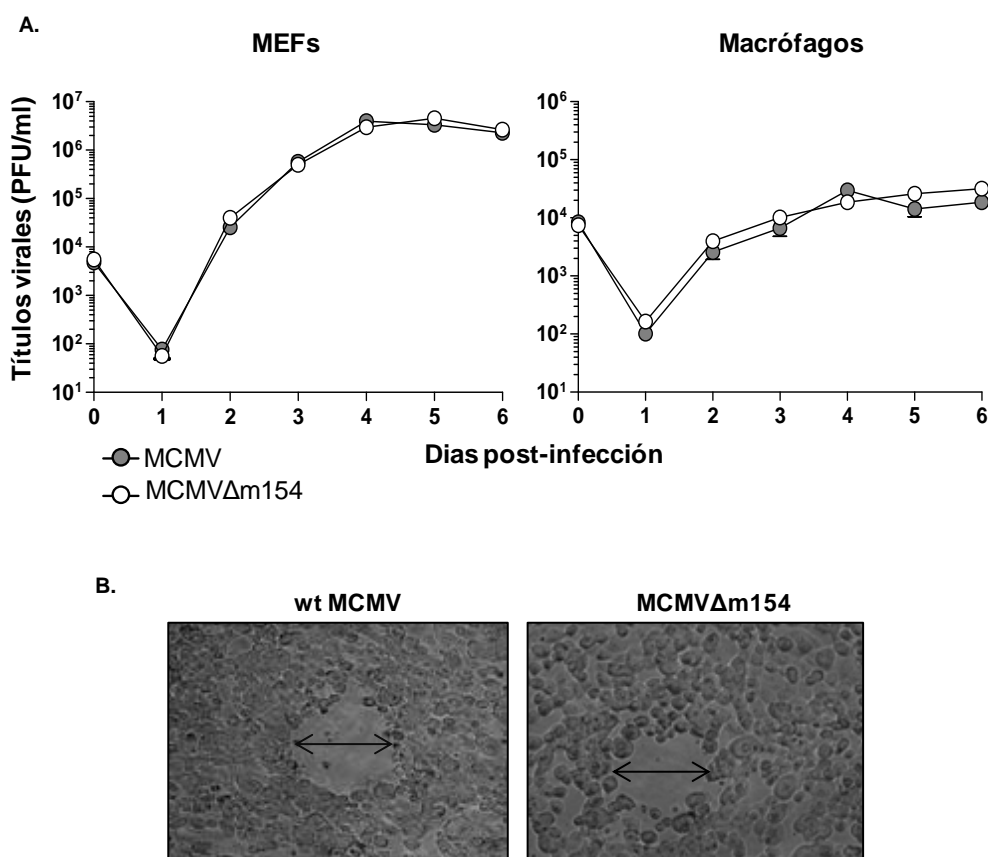


Figura 33. Replicación del MCMV Δ m154 en MEF y macrófagos peritoneales durante la infección viral

A. Cultivos de MEF y macrófagos peritoneales fueron infectados con el wt MCMV y el MCMV Δ m154 a una MOI de 0,025 y 0,1, respectivamente. A los diferentes tiempos post-infección indicados, se determinó la cantidad de virus infeccioso extracelular (MEF) o asociado a células (macrófagos) presente en los cultivos. Cada punto representa la media de tres cultivos independientes con su correspondiente desviación estándar. **B.** Se muestra la morfología de las placas de lisis del wt MCMV y del MCMV Δ m154 a las 96 hpi en los cultivos de las células MEF infectadas, conteniendo medio con agarosa. Las placas se visualizaron con el microscopio óptico usando el objetivo 10X.

RESULTADOS

V.5.2 m154 no altera CD48 a nivel transcripcional

Considerando la posibilidad de que m154 pudiera modular la expresión de CD48 a nivel transcripcional, se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR a fin de comparar los niveles del ARNm de CD48 presentes en los macrófagos infectados con el wt MCMV y en los macrófagos sin infectar. Para ello, se extrajo el ARN total a partir de las células no infectadas o infectadas con el wt MCMV, tratándose a continuación con la enzima transcriptasa reversa para la obtención del cDNA. Como controles, se llevaron reacciones en paralelo donde no se incorporó la transcriptasa reversa. Los cDNAs fueron posteriormente amplificados por PCR usando oligonucleótidos específicos para CD48, así como para m154 y la β -actina utilizados como control. Como se observa en la figura 34, los niveles del ARNm de CD48 provenientes de los macrófagos infectados por el MCMV fueron similares a los encontrados en los macrófagos sin infectar tratados en las mismas condiciones. Como se esperaba, en las células infectadas por el virus y no en las células sin infectar se detectaron ARNm específicos para m154. En ningún caso en las reacciones donde no se incluyó la transcriptasa reversa se observaron productos amplificados. Estos resultados indicaban que el mecanismo de acción de m154 no implica el control transcripcional de CD48 sino que probablemente este receptor esté siendo alterado a través de un mecanismo post-transcripcional.

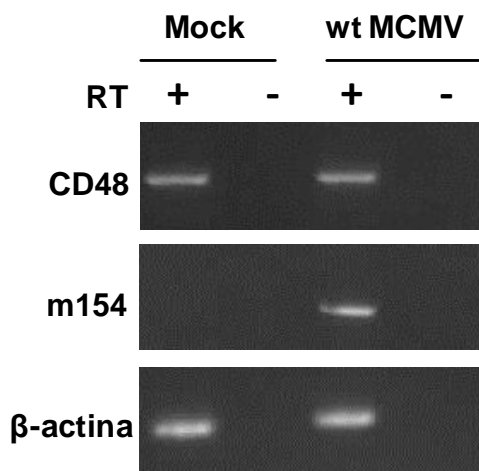


Figura 34. Análisis de la expresión de CD48 por RT-PCR en macrófagos peritoneales infectados por el MCMV

Los macrófagos peritoneales se dejaron sin infectar (mock) o se infectaron con el wt MCMV a una MOI de 10 durante 72 h. El ARNm total fue extraído, tratado con DNasa y retrotranscrito usando oligo (dT). Las PCRs fueron realizadas con oligonucleótidos específicos para CD48 m154 y β -actina. Los productos amplificados fueron separados en geles conteniendo 1% de agarosa y visualizados con bromuro de etidio. Se indica la inclusión (+) o no (-) de la transcriptasa reversa durante las reacciones de retrotranscripción.

V.5.3 CD48 es degradado por m154

En este contexto, se examinó la expresión de CD48 por Western blot en lisados celulares de macrófagos infectados por el wt MCMV a diferentes tiempos post-infección. Para ello, se utilizó un mAb específico frente a CD48 y como control se analizó la presencia de m154 en los extractos celulares usando el anticuerpo anti-m154. Como se muestra en la figura 35, en comparación con las células sin infectar, los niveles de CD48 (banda de 43 KDa) fueron significativamente más

RESULTADOS

bajos en los lisados celulares de los macrófagos infectados a los diferentes tiempos. Los niveles de esta molécula en las células infectadas por el MCMV disminuyeron progresivamente a lo largo del curso de la infección, en particular tras las 48 hpi, siendo prácticamente indetectables a las 72 hpi. Estos datos eran concomitantes con la expresión progresiva de m154 en las células infectadas, la cual empezaba a detectarse a las 48 hpi. Así pues, el resultado de este ensayo apuntaba a una degradación proteolítica de CD48 durante la infección por el MCMV.

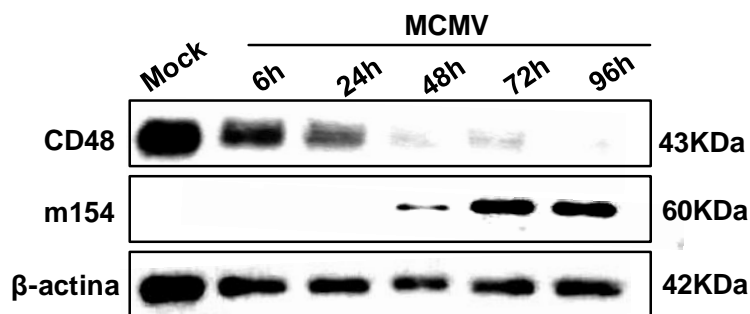


Figura 35. Degradación de CD48 durante el curso de la infección por MCMV

Los macrófagos peritoneales fueron mock-infectados o infectados con el wt MCMV a una MOI de 10. A los tiempos postinfección indicados (6, 24, 48, 72 y 96 hpi), los lisados celulares se recogieron, se separaron en condiciones reductoras por SDS-PAGE (10%) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para su análisis por Western blot. Para su marcaje se usó un mAb anti-CD48 murino o un mAb anti-m154, seguido de un anti-Armenian hámster HRP o de un anti-mouse IgG HRP, respectivamente. Como control interno se usó un anticuerpo anti-β-actina seguido de un anti-rabbit IgG HRP.

V.5.4 m154 degrada CD48 por la vía del proteosoma y del lisosoma

Con el fin de conocer la vía de degradación involucrada en la reducción de CD48, se usaron inhibidores de la proteólisis a través de la vía del lisosoma o del proteosoma. En concreto, se utilizaron la leupeptina, un inhibidor de la proteólisis intralisosomal que bloquea específicamente las serín proteasas y algunas, serin proteasas, y el MG-132, un inhibidor específico del proteosoma 26S. Para llevar a cabo estos ensayos, se infectaron macrófagos con el wt MCMV durante 72 h en presencia o ausencia de los inhibidores de la proteólisis y se analizaron los extractos celulares de los cultivos por Western blot. Como se muestra en la figura 36A, aunque no se recuperaron totalmente los niveles de CD48 en las células infectadas con el wt MCMV en comparación con las células no infectadas, el tratamiento con el MG-132 restableció notablemente los niveles de expresión de CD48 en las células infectadas. A su vez, la leupeptina también inhibió parcialmente su degradación. A continuación se quiso analizar mediante ensayos de inmunocitoquímica el efecto de los dos inhibidores de la proteólisis (el MG-132 y la leupeptina) sobre CD48 en las células infectadas. Como se muestra en la figura 36B, los macrófagos infectados por el wt MCMV y expuestos a los dos diferentes inhibidores de la proteólisis (paneles j y n), presentaron una señal de tinción de CD48 aumentada en comparación con las células

RESULTADOS

infectadas no tratadas con los inhibidores (panel f), cuya señal fue escasamente apreciada. Además, cuando se analizó la expresión de m154, se observó una co-localización de esta proteína viral y CD48 en los macrófagos infectados y tratados tanto con el MG-132 como con la leupeptina (paneles l y o). Estos resultados en conjunto, apuntan a que m154 degrada CD48 usando la vía del proteosoma y la del lisosoma.

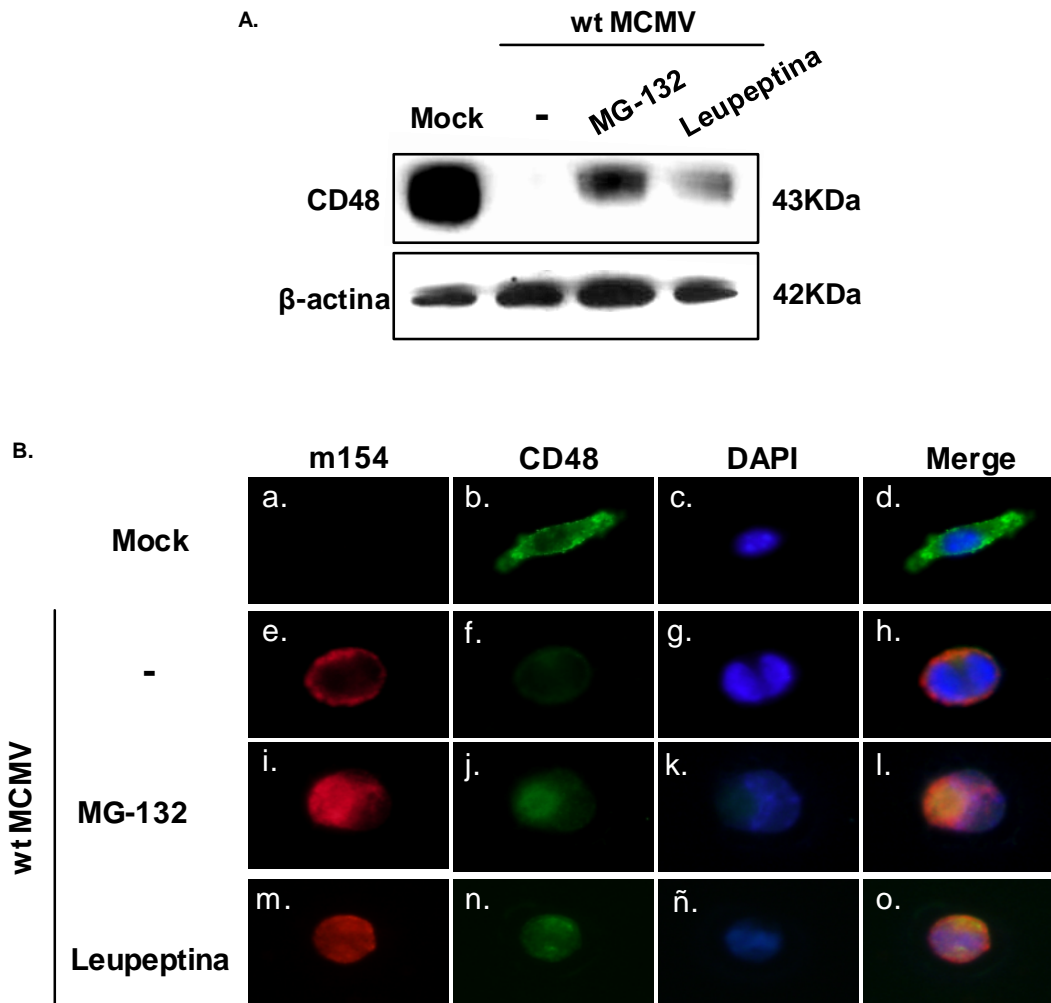


Figura 36. Expresión de CD48 durante la infección de macrófagos por el wt MCMV tras el tratamiento con inhibidores de la proteólisis

Los macrófagos peritoneales se dejaron sin infectar o se infectaron con el wt MCMV a una MOI de 10 durante 72 h. **A.** Las células infectadas fueron tratadas en ausencia (-) o presencia de MG-132 (75 μ M) o de leupeptina (250 μ M). A las 72 hpi se recogieron los lisados celulares y se analizaron por Western blot como se indica en la figura 35, usando un mAb anti-CD48 y el mAb anti- β actina. **B.** Las células fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con un mAb anti-CD48 Alexa fluor 488 y el mAb anti-m154 seguido de un anti-mouse IgG Alexa fluor 555 y posteriormente analizadas por microscopia de fluorescencia usando el objetivo 40X, como se indica en la figura 30. Se muestran células representativas de cada cultivo teñidas para m154 (paneles a, e, i y m), CD48 (paneles b, f, j y n) y el núcleo celular teñido con DAPI (paneles c, g, k y ñ). La sobreposición de las tinciones se muestran en los paneles d, h, l y o.

V.5.5 m154 contribuye a disminuir la susceptibilidad de los macrófagos infectados por el MCMV al ataque de las células NK

El ligando de CD48, CD244, es una proteína que está expresada principalmente en células NK y en menor medida sobre otros leucocitos citotóxicos (Engel et al., 2003). Se quiso examinar si la infección de macrófagos por el MCMV resultaba en un menor reconocimiento de CD244 debido a la pérdida de expresión de CD48 sobre la superficie de las células infectadas. Para este propósito, se generó una proteína de fusión soluble, CD244-Fc, que contiene el ectodominio del CD244 murino fusionado a la región Fc de la IgG humana. En la figura 37 se muestra el análisis por citometría de flujo, donde se observó la ausencia de unión de CD244-Fc a los macrófagos infectados por el MCMV. Sin embargo, esta proteína de fusión era capaz de interactuar con las células infectadas con el MCMVΔm154 y el MCMVΔm154int de manera similar a las células no infectadas.

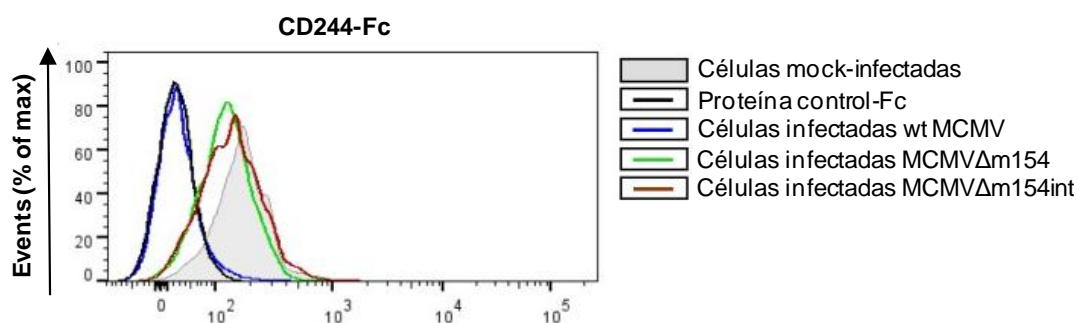


Figura 37. Análisis del reconocimiento de los macrófagos infectados con el wt MCMV, el MCMVΔm154 o el MCMVΔm154Int por CD244

Los macrófagos peritoneales se dejaron sin infectar (mock-infectados) o se infectaron con el wt MCMV, el MCMVΔm154 o el MCMVΔm154Int a una MOI de 10 durante 72 h. Las células fueron incubadas con 1 μg de proteína CD244-Fc biotinada seguida de estreptavidina-PE. El marcaje de CD244-Fc presente en las células sin infectar se representa en el histograma con relleno en gris. Este mismo marcaje en las células infectadas con el wt MCMV, el MCMVΔm154 o el MCMVΔm154Int, se indica en los histogramas conteniendo una línea azul, una verde y una roja, respectivamente. Como control de isotipo se usó una proteína de fusión Fc biotinada no específica (histograma con una línea en negro). Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

La interacción de CD48 con CD244 incrementa la activación de las células NK, aumentando su citotoxicidad. Así pues, al suprimir la expresión de CD48 en la superficie celular, m154 podría ayudar al MCMV a escapar de la respuesta inmunitaria mediada por las células NK. Para conocer si este era el caso, se comparó la capacidad de degranulación de las células NK tras su exposición a los macrófagos infectados por el wt MCMV o el MCMVΔm154. Para ello, se usó un ensayo basado en la detección por citometría de flujo de LAMP-I (CD107a), un marcador de

RESULTADOS

degranulación presente en la superficie de las células NK activadas. Se purificaron las células NK a partir de bazos de ratones y se incubaron con macrófagos sin infectar o con macrófagos infectados con el wt MCMV o el MCMV Δ m154 en una relación NK/macrófago de 1:1. Como se esperaba, el porcentaje de las células NK CD107a⁺ aumentó en respuesta a la infección viral en comparación con el porcentaje de estas células en los cultivos no infectados. Sin embargo, no se apreciaron diferencias sustanciales al comparar el porcentaje de las células NK CD107a⁺ incubadas con los macrófagos infectados con el wt MCMV y el porcentaje de estas mismas células incubadas con los macrófagos infectados con el MCMV Δ m154 (e. j. mock: 5,5 \pm 1,7; wt MCMV: 31,6 \pm 2,9; MCMV Δ m154: 26,3 \pm 1,3). En cambio, sí que se detectaron diferencias en la cantidad de moléculas de CD107a externalizadas o intensidad de fluorescencia media (MFI) entre las células NK cultivadas con las células infectadas con cada uno de estos virus. Como se observa en la figura 38A y 38B, la población de células NK CD107a⁺ co-cultivadas con los macrófagos infectados por el MCMV Δ m154 presentó un incremento del doble en la MFI de CD107a en comparación con la población de estas células co-cultivada con el virus parental. Es decir, la media del número de gránulos liberados por cada célula NK durante la estimulación por macrófagos infectados por el MCMV, era más reducida cuando m154 se estaba expresando. Estos resultados indican que m154 contribuye al escape de la respuesta citotóxica ejercida por las células NK sobre los macrófagos infectados por el MCMV.

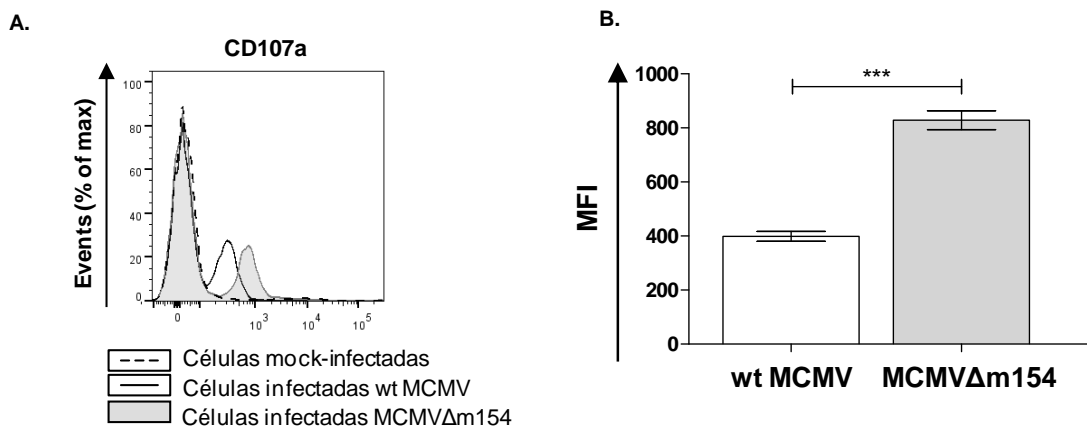


Figura 38. Análisis de la degranulación de las células NK en co-cultivo con macrófagos infectados con el wt MCMV y con el MCMV Δ m154

A. Se muestra en un histograma representativo realizado por citometría de flujo, la expresión de CD107a sobre células NK DX5⁺ co-cultivadas con células sin infectar (mock-infectadas), con células infectadas con el wt MCMV o con el MCMV Δ m154 a una MOI de 10 durante 72 h. La relación entre NK/macrófago usada fue de 1:1. La expresión de CD107a en las células NK co-cultivadas con los macrófagos infectados con el wt MCMV o el MCMV Δ m154 se representa en el histograma conteniendo una línea continua en color negro o con el histograma en gris, respectivamente. El histograma con una línea discontinua representa la expresión de CD107a en la población de células NK co-cultivadas con macrófagos no infectados. **B.** Gráfico de barras de un experimento representativo de tres ensayos, mostrando la MFI de células NK CD107a⁺ co-cultivadas con macrófagos infectados con el wt MCMV ó el MCMV Δ m154, como se indica en el panel A. (***) p < 0.001).

RESULTADOS

V.5.6 La disminución de la citotoxicidad de las células NK sobre los macrófagos infectados mediada por m154 implica el reconocimiento de CD48 por CD244

Con objeto de evaluar si la disminución de la actividad citotóxica de las células NK co-cultivadas con macrófagos infectados por el wt MCMV era causada por m154 actuando en el reconocimiento de CD48 por CD244, se realizaron ensayos de degranulación en un co-cultivo de células NK con macrófagos infectados con el MCMV Δ m154 y preincubados con la proteína de fusión CD244-Fc. Esta proteína de fusión se usó como herramienta para bloquear CD48 en la superficie de los macrófagos infectados por el MCMV Δ m154, impidiendo su reconocimiento por el ligando CD244 presente en la membrana de las células NK. De esta manera, CD244-Fc permite evaluar si la escasa degranulación observada en las células NK sobre células infectadas por el MCMV parental, es producto del fallo en el reconocimiento de CD48 por CD244. Como se muestra en la figura 39, la proteína de fusión CD244-Fc bloqueó parcialmente la expresión en superficie de CD107a sobre las células NK co-cultivadas con los macrófagos infectados por el MCMV Δ m154, mientras que la preincubación de las células diana con una proteína de fusión Fc irrelevante, no presentó un impacto significativo. Como se esperaba, el nivel de expresión en superficie de CD107a en las células NK co-cultivadas con los macrófagos infectados por el wt MCMV no fue alterado por CD244-Fc, resultando en una situación similar al nivel de esta molécula en las células NK expuestas a los macrófagos tratados con la proteína de fusión control. Estos resultados indican que m154 contribuye a conferir protección a los macrófagos infectados por el wt MCMV frente al ataque de las células NK, siendo estos efectos mediados en parte por la disminución en superficie de CD48 por m154.

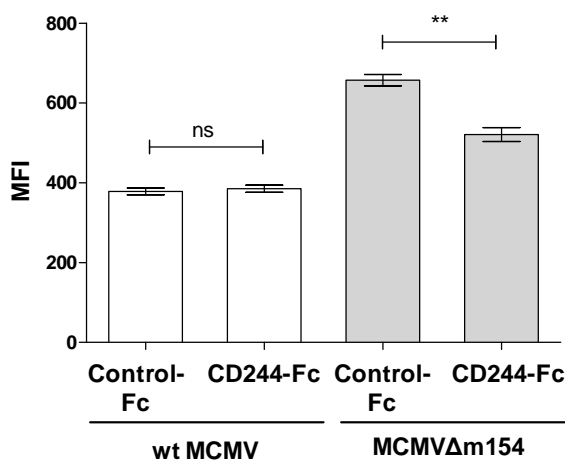


Figura 39. Análisis de la actividad citotóxica de las células NK expuestas a macrófagos infectados con el MCMV Δ m154 y tratados con la proteína de fusión CD244-Fc

Macrófagos peritoneales se dejaron sin infectar o fueron infectados con MCMV Δ m154 a una MOI de 10 durante 72 h. Las células infectadas fueron incubadas con 10 μ g/ml de CD244-Fc o con la misma cantidad de una proteína de fusión Fc no relevante usada como control. Los cultivos fueron lavados y expuestos a las células NK en una relación NK/macrófago de 0.5:1. La gráfica corresponde a un experimento representativo de tres, mostrando el error estándar de la media (\pm SEM) del porcentaje normalizado de células NK CD107a+ para cada muestra referida al número de células NK CD107a+ en co-cultivo con los macrófagos infectados con el MCMV Δ m154 en ausencia de la proteína de fusión. ns: diferencias estadísticamente no significativas. ** p<0.01.

RESULTADOS

V.6 PAPEL DE m154 DURANTE LA INFECCIÓN *IN VIVO* DEL MCMV

V.6.1 La ausencia de m154 disminuye la aparición de los signos de la enfermedad producida por el MCMV durante la infección del ratón

Debido a que la reducción de CD48 sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno podría contribuir a mermar la capacidad del huésped a controlar la infección viral, se estudió el papel de m154 en el contexto de la infección aguda del MCMV en el modelo murino. Para ello, se inocularon vía intraperitoneal animales BALB/c con 2×10^6 PFU del wt MCMV parental o con el MCMV Δ m154, analizándose como primera medida el peso corporal de los animales tratados durante el curso de la infección. Como se muestra en la figura 40, al día 2 post-infección, los animales inoculados con el MCMV Δ m154 ganaron más peso corporal que los animales infectados con una dosis viral similar del wt MCMV. Además, mientras que los animales infectados con el virus parental perdieron un porcentaje de peso importante en los días 4, 6 y 8 post-infección, los animales infectados con el MCMV Δ m154, mantuvieron su peso sin cambios significativos durante el curso del ensayo. De esta manera, a día 8 post-infección el porcentaje de peso corporal de los animales infectados con wt MCMV fue de $14,4 \pm 4,0$ g, mientras que los animales infectados con el MCMV Δ m154 presentaron un promedio de peso corporal de $18,3 \pm 4,3$ g (datos no mostrados). En concordancia con la pérdida de peso corporal, los animales infectados por el wt MCMV desarrollaron unos signos clínicos de la enfermedad más exacerbados, tales como el pelo erizado, la postura encorvada y una mayor letargia, en comparación con los animales inoculados con el MCMV Δ m154 (datos no mostrados). Estos resultados indicaron que m154 aumenta la aparición de los signos de la enfermedad producida por el MCMV durante el curso de la infección *in vivo*.

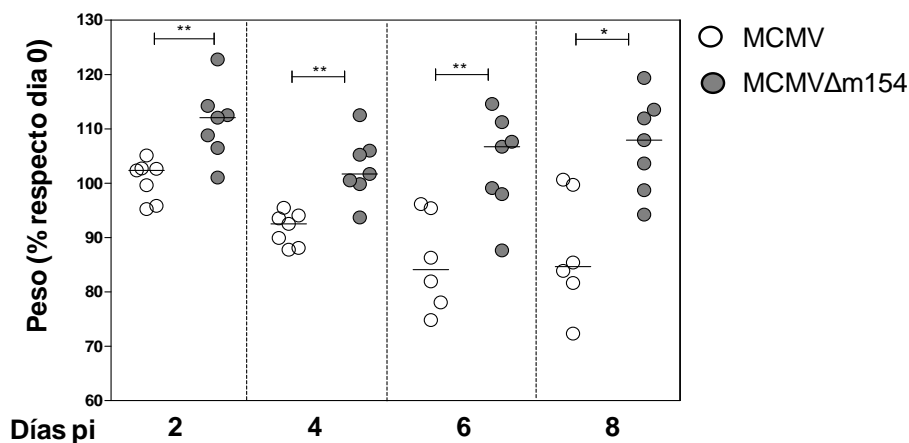


Figura 40. Análisis del peso corporal de los ratones BALB/c inoculados con el wt MCMV o el MCMV Δ m154

Grupos de 7 ratones BALB/c hembras de 7 semanas de edad fueron inoculados vía intraperitoneal con 2×10^6 PFU del wt MCMV (círculos sin relleno) o el MCMV Δ m154 (círculos con relleno en gris). Se muestran los cambios en el porcentaje del peso corporal relativo a día 0, medido a los días 2, 4, 6 y 8 post-infección (pi). Cada círculo representa un ratón individual. Las barras horizontales indican los valores de la mediana. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

V.6.2 m154 no altera la naturaleza de las poblaciones celulares presentes en la cavidad peritoneal tras la infección viral *in vivo*

Con objeto de determinar si las diferencias observadas en el fenotipo de los animales infectados con el wt MCMV o el MCMV Δ m154 eran debidas a variaciones que pudiesen haber *in vivo* en la frecuencia de los macrófagos peritoneales infectados, se quiso analizar el porcentaje de éstos en la cavidad peritoneal de los ratones inoculados con el wt MCMV o con el MCMV Δ m154. Para ello, se extrajeron los macrófagos peritoneales de los animales infectados con cada uno de los dos virus a día 2 post-infección, evaluándose mediante la detección de IE1 por inmunocitoquímica, el número de macrófagos infectados. Tras analizar los resultados del recuento celular, no se apreciaron diferencias significativas en el porcentaje de los macrófagos peritoneales infectados entre los animales inoculados con el wt MCMV y los inoculados con el MCMV Δ m154 (wt MCMV: 3,0% \pm 0,6; MCMV Δ m154: 2,9% \pm 0,2). Por otra parte, se quiso evaluar si existían variaciones en la naturaleza del contenido celular presente en la cavidad peritoneal de los animales infectados con el wt MCMV y con el MCMV Δ m154. Con este propósito, se analizó por citometría de flujo usando anticuerpos específicos, los niveles a día 2 post-infección de los neutrófilos (CD11b+ Gr-1+), los macrófagos (CD11b+ Gr-1-), los linfocitos T (CD3+) y los linfocitos B (IgM+), presentes en el lavado peritoneal de los animales inoculados con el wt MCMV y el MCMV Δ m154. Como se muestra en la figura 41A y 41B, no se observaron diferencias en los porcentajes de las diferentes poblaciones celulares analizadas entre los dos grupos de animales infectados con cada virus. Así pues, estos resultados indicaron que m154 no parece alterar a tiempos tempranos de la infección *in vivo*, la naturaleza de las diferentes poblaciones celulares presentes en la cavidad peritoneal de los ratones.

V.6.3 Los MCMV defectivos en m154 están atenuados durante la infección *in vivo*

A continuación, se quisieron determinar los niveles de replicación del MCMV Δ m154 en diferentes órganos del ratón a diferentes días post-infección. Para ello se infectaron ratones BALB/c con el wt MCMV y el MCMV Δ m154 y se sacrificaron a los días 2, 4 y 8 post-infección, para el análisis de los títulos virales en el bazo, el hígado, el riñón, el corazón, el pulmón y las glándulas salivares. Como se muestra en la figura 42A, a día 2 post-infección los títulos virales presentes en el bazo de los animales infectados con el wt MCMV y el MCMV Δ m154 fueron similares. Sin embargo, a día 4 post-infección, se observó que el MCMV Δ m154 presentaba títulos significativamente más bajos (32, 6, 9 y 4 veces más bajos en el bazo, el hígado, el riñón y el corazón, respectivamente), que los encontrados en los mismos órganos de los animales infectados con el wt MCMV. Igualmente, a día 8 post-infección, los títulos virales del MCMV Δ m154 fueron considerablemente menores en los órganos analizados (el riñón, el corazón, el pulmón y las glándulas salivares), en comparación con los títulos obtenidos en el wt MCMV. Además, a este tiempo post-infección, algunos animales

RESULTADOS

infectados con el MCMV Δ m154 presentaron títulos virales que se encontraron por debajo del límite de detección del ensayo. Resultados comparables se obtuvieron cuando los animales fueron infectados con MCMV Δ m154Int, el MCMV delecionado en *m154* pero conteniendo *m154.3* y *m154.4*. Como se observa en la figura 42B, los títulos del MCMV Δ m154Int presentes en los diferentes órganos analizados a día 4 post-infección fueron significativamente más bajos que los títulos encontrados en los animales infectados con el virus wt. En su conjunto, con estos resultados se puede concluir que los MCMV delecionados en *m154* se encuentran atenuados en órganos clave durante la infección por el MCMV.

A.

	Animales		
	No infectados	wt MCMV	MCMV Δ m154
Número total de células (x 10 ⁶)	5.0 ± 1.6	2.7 ± 0.3	2.6 ± 0.6
% Neutrófilos (CD11b ⁺ Gr-1 ⁺)	25.0 ± 2.0	54.3 ± 8.6	54.0 ± 2.7
% Macrófagos (CD11b ⁺ Gr-1 ⁻)	40.3 ± 1.7	19.6 ± 2.8	20.1 ± 1.2
% Linfocitos T (CD3 ⁺)	7.0 ± 0.7	5.5 ± 0.8	5.1 ± 0.5
% Linfocitos B (IgM ⁺)	28.0 ± 0.2	24.3 ± 7.6	16.2 ± 4.3

B.

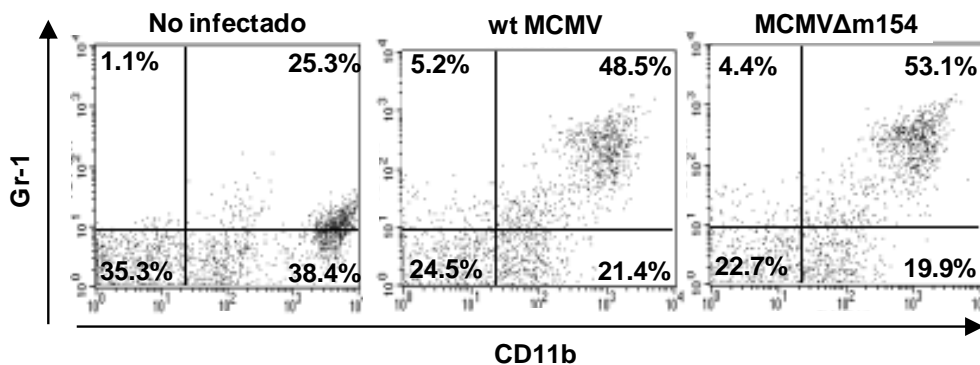


Figura 41. Análisis de la composición celular del lavado peritoneal de los ratones inoculados con el wt MCMV y el MCMV Δ m154

Grupos de 7 ratones BALB/c hembras de 7 semanas de edad se dejaron sin infectar o fueron infectados vía intraperitoneal con 2×10^6 PFU del wt MCMV o del MCMV Δ m154. Al día 2 post-infección se extrajeron las células de la cavidad peritoneal para su análisis por citometría de flujo, usando una combinación de mAb anti-CD11b-PE y anti-Gr-1-APC o anti-CD3-Alexa Fluor 647 o anti-IgM-FITC. **A.** Se muestra el número total de células y el porcentaje de neutrófilos (CD11b⁺ Gr-1⁺), macrófagos (CD11b⁺ Gr-1⁻), linfocitos T (CD3⁺) y linfocitos B (IgM⁺). Los datos mostrando los errores estándar de la media (\pm SEM) representan tres ratones individuales. Las diferencias en los valores entre los grupos de animales infectados con el wt MCMV y con el MCMV Δ m154 no son estadísticamente significativas ($p > 0.05$). **B.** se muestra la doble tinción de CD11b y Gr-1 de las células provenientes de la cavidad peritoneal de un animal representativo de cada grupo.

RESULTADOS

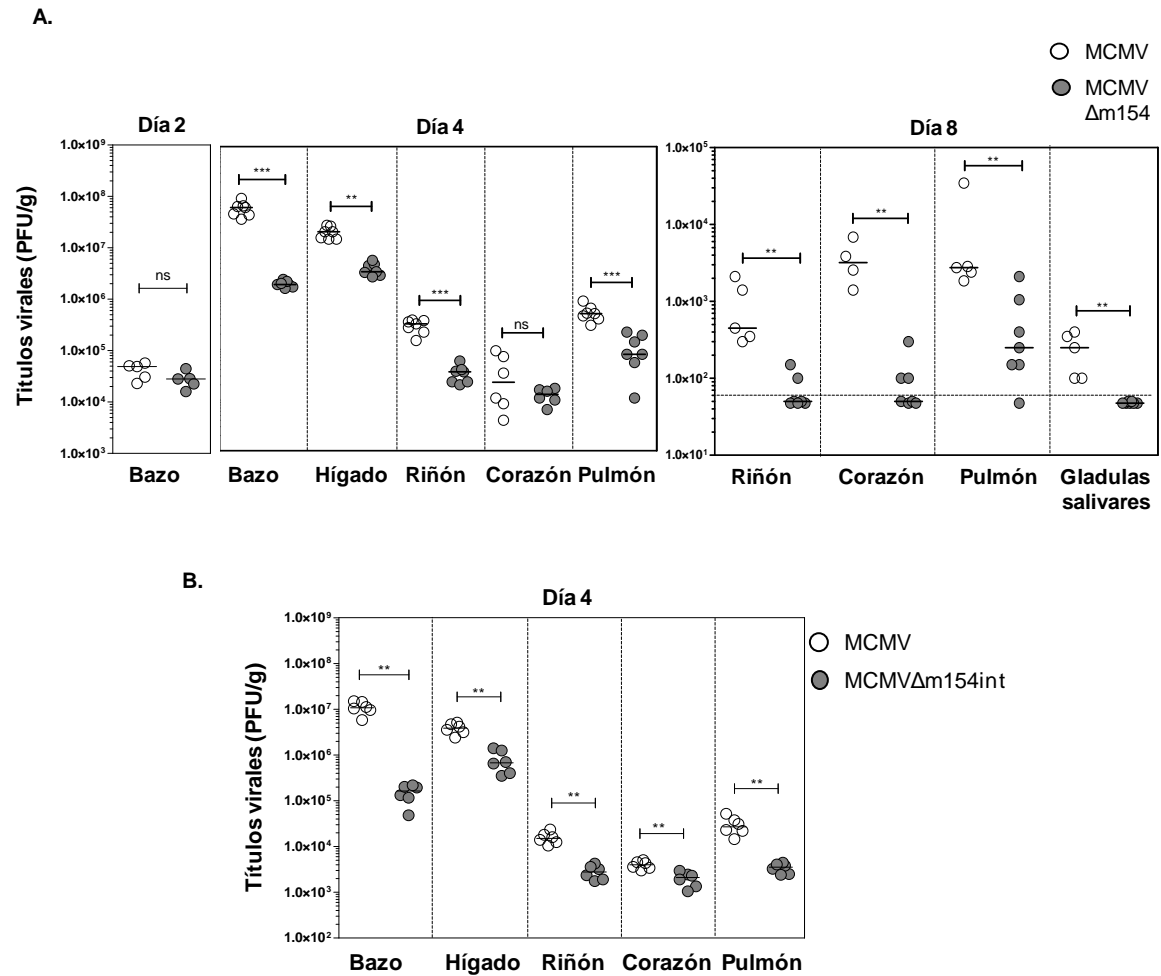


Figura 42. Análisis de la replicación del MCMV Δ m154 y del MCMV Δ m154Int en diferentes órganos de los ratones infectados

A. Grupos de 7 ratones BALB/c hembras con 7 semanas de edad fueron inoculados intraperitonealmente con 2×10^6 PFU del wt MCMV (círculos sin relleno) o del MCMV Δ m154 (círculos con relleno en color gris) y sacrificados a día 2, 4 y 8 post-infección. Se muestran los títulos virales obtenidos de los diferentes órganos analizados. La barra horizontal discontinua marca el límite de detección **B.** Grupos de 7 ratones BALB/c hembras con 7 semanas de edad fueron inoculados con el wt MCMV como se indica en A o con la misma dosis del MCMV Δ m154Int (círculo con relleno en color gris). Los títulos virales de los diferentes órganos se analizaron al día 4 postinfección. Cada círculo representa un ratón individual. Las barras horizontales indican los valores de la mediana. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: diferencias estadísticamente no significativas.

V.6.4 m154 promueve el crecimiento del MCMV *in vivo* mediante la evasión de la respuesta de las células NK

La reducción significativa de los títulos virales a tiempos tempranos de la infección aguda (a día 4), así como los datos obtenidos *in vitro* de la contribución de m154 a una disminución de la citotoxicidad de células NK frente al macrófago infectado, apuntaban a una posible implicación de m154 en la evasión de la respuesta inmunitaria ejercida por las células NK durante la infección del MCMV *in vivo*. Por este motivo, se decidió examinar si la replicación reducida del MCMV Δ m154 era una consecuencia de la aumentada susceptibilidad de las células infectadas a las células NK

RESULTADOS

durante la infección *in vivo*. Para ello, se eliminaron específicamente las células NK en los animales usando un antisero anti-asialo GM1. Posteriormente, estos animales se infectaron con 8×10^5 PFU del wt MCMV o del MCMV Δ m154 y se analizaron los títulos virales a día 4 post-infección en el bazo y el hígado, los dos órganos principales en los cuales se ha descrito mayoritariamente la intervención de las células NK en el control del MCMV (Loh *et al.*, 2005). Como se esperaba, todos los animales tratados con el anti-asialo GM1, presentaron títulos virales más altos en comparación con el grupo control de los animales no tratados (figura 43). Sin embargo, el nivel de aumento de los títulos virales conseguido tras la supresión de las células NK fue significativamente mayor en los animales infectados por el MCMV Δ m154 (en particular en el bazo, 101.2 veces), que en animales infectados por el wt MCMV (9 veces). Esta recuperación sustancial de los títulos del MCMV Δ m154, demuestra que m154 promueve el crecimiento del MCMV *in vivo* de manera dependiente de células NK.

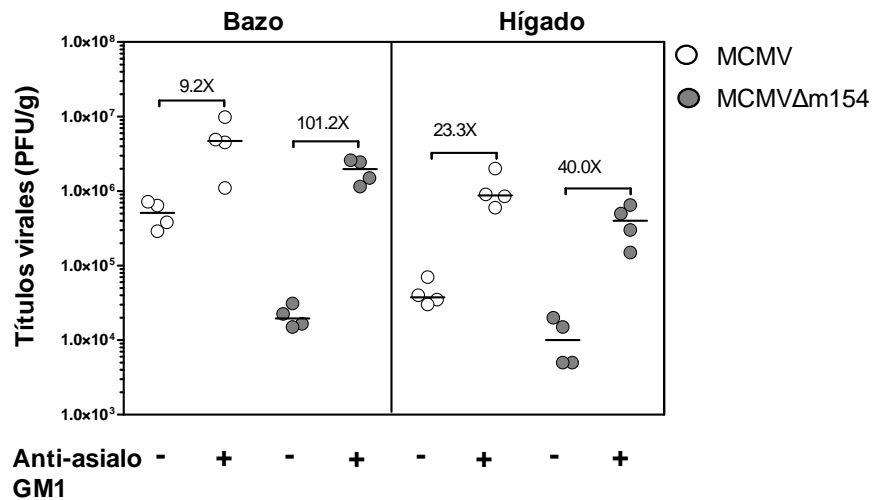


Figura 43. Análisis de la replicación del MCMV Δ m154 en el bazo e hígado de ratones con las células NK eliminadas

Grupos de 5 ratones BALB/c hembras de 7 semanas de edad fueron inyectados vía intraperitoneal con anti-asialo GM1 (+) o no inyectados (-). Los ratones fueron inoculados con 5×10^5 PFU del wt MCMV (círculos sin relleno) o del MCMV Δ m154 (círculos con relleno en gris), sacrificados a día 4 post-infección y los títulos en el bazo e hígado determinados. Cada círculo representa un ratón individual. En valor numérico se indican las diferencias en los valores de la mediana entre los animales infectados con el mismo virus, sin tratar y tratados con el anti-asialo GM1. La barra horizontal indica los valores de la mediana.

DISCUSIÓN



VI. DISCUSIÓN

Durante los millones de años de coevolución con sus respectivos huéspedes, los CMVs han desarrollado numerosas estrategias para mermar los mecanismos de defensa inmunológica de éstos con objeto de asegurar un entorno favorable para su replicación, diseminación y mantenimiento de latencia (Halenius and Hengel, 2014; Jackson *et al.*, 2011). A fin de conseguir una respuesta inmune eficiente frente a la infección viral, las células presentadoras de antígeno del huésped, como los macrófagos y las células dendríticas, han de exponer en su superficie un repertorio apropiado de receptores/ligandos que alerten a las células T y a las células NK para su correcta activación. La alteración de estas moléculas en la superficie de la célula infectada es una estrategia ampliamente empleada por diferentes virus, incluidos los CMVs, para escapar de la respuesta inmunológica. En este contexto, en este estudio se planteó analizar si los miembros de la familia SLAM, los cuales funcionan interaccionando con sus contra-receptores SLAM implicados en la coseñalización de las células T y las células NK, constituyen dianas manipulables por el CMV en la célula presentadora de antígeno infectada. Con objeto de poder abordar este estudio tanto en el contexto de la infección *in vitro* como, en un último término, en el contexto de la infección del CMV en su huésped natural, se seleccionó el MCMV. Como sistema celular para el análisis *in vitro* se eligieron los macrófagos murinos ya que, por una parte, juegan un papel clave en la replicación, la diseminación y el establecimiento de la latencia viral y, por otra parte constituyen uno de los principales efectores de la inmunidad innata y adaptativa. Debido bien a la ausencia de una expresión constitutiva de algunos de estos receptores SLAM en este tipo celular bien a la falta de anticuerpos que permitieran su detección, los análisis presentados en este trabajo se han restringido específicamente a cuatro receptores SLAM: CD48, CD84, CD229 y Ly108.

Mediante análisis por citometría de flujo se ha demostrado que la infección por MCMV reduce diferencialmente, y de una manera substancial, la expresión de los cuatro receptores SLAM en la superficie de los macrófagos peritoneales murinos. Esta disminución en superficie se produce de modo progresivo, culminando tras la compleción del ciclo viral, a las 72 hpi, en una pérdida dramática en el macrófago infectado de la expresión de estos receptores. Estos datos, a su vez, se han confirmado en las células dendríticas murinas, donde la expresión de CD48, CD84 y Ly108, los tres receptores SLAM presentes en este tipo celular, se ve alterada por el MCMV, aunque en menor medida que en los macrófagos. El hecho de que sea ventajoso para el MCMV interrumpir las interacciones mediadas por los miembros de la familia SLAM mediante la reducción de éstos en la superficie de las células infectadas sugiere que, al menos para los cuatro miembros de esta familia analizados, las interacciones con sus correspondientes contra-receptores habrían de ejercer señales preferentemente activadoras en células que juegan un papel importante en la respuesta inmunológica hacia la infección por el MCMV.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mostraron que la alteración de los receptores SLAM está directamente relacionada con la dosis viral empleada en la infección de los macrófagos, indicando por lo tanto que es causada por un efecto directo del MCMV sobre la célula infectada y descartando posibles efectos *bystander*, mediados por ejemplo por ciertas citocinas, sobre las células no infectadas en los mismos cultivos. Adicionalmente, el uso del MCMV inactivado tras el tratamiento con luz ultravioleta, incapaz de reducir la expresión de estos cuatro receptores SLAM en la superficie del macrófago, permitió concluir que para que estas alteraciones ocurran se requiere la expresión del genoma viral. Es decir, la modulación de los receptores SLAM analizados es atribuible a productos génicos codificados por el MCMV. El hecho de que la reducción de los cuatro miembros SLAM examinados fuera evidente a diferentes tiempos post-infección, aunque ciertos factores como la densidad, vida media o *turnover* de cada receptor puedan influir, apuntaría a que distintos productos génicos sintetizados a lo largo del ciclo infeccioso del MCMV sean los encargados de perturbar la expresión de estas moléculas.

En este contexto, nos planteamos identificar las regiones del MCMV que codifican los productos causantes de la alteración de estos receptores SLAM. Hay que tener en cuenta que los genomas de los CMVs poseen una amplia capacidad codificadora. Nuevos hallazgos por Stern-Guinossar y colaboradores analizando el proteoma del HCMV han revelado que, lejos de las aproximadamente 200 potenciales pautas de lectura abierta predichas hasta el momento, este patógeno podría llegar a sintetizar más de 750 productos durante la infección de fibroblastos humanos (Stern-Guinossar *et al.*, 2012). Aunque estudios de este tipo no se han llevado a cabo con el MCMV, es probable que también en este caso los mapas existentes del potencial codificador del virus estén subestimados. Adicionalmente, es importante resaltar que las funciones virales accesorias de interacción con el huésped, la mayoría aun sin dilucidar, tienden a estar codificadas en los aproximadamente dos tercios del genoma que son dispensables para la replicación del MCMV en cultivo de tejidos (Redwood *et al.*, 2013). Esperaríamos, por lo tanto, que los genes con potencial en inmunoevasión se encontraran en estas regiones. Teniendo esto en cuenta, el abordaje seleccionado fue el escrutinio de una librería de mutantes del MCMV conteniendo deleciones en regiones no esenciales para su crecimiento *in vitro*. Hace varios años el clonaje del CMV como un cromosoma artificial bacteriano (BAC) en *E. coli* por Messerle y colaboradores (Messerle *et al.*, 1997) abrió la posibilidad de manipular de una forma rápida y efectiva el genoma del MCMV. Esta tecnología, que permite no sólo la interrupción o delección de genes individuales o regiones específicas del genoma, sino también la inserción de secuencias genéticas propias o heterólogas (Dekhtiarenko *et al.*, 2014), posibilitando analizar directamente el papel que juega un determinado gen o región de interés en el contexto de la infección, fue la utilizada para generar dicha batería de mutantes del MCMV.

DISCUSIÓN

Este trabajo, se inició con 18 mutantes del MCMV conteniendo deleciones de entre uno y diecisiete genes localizadas mayormente en las regiones terminales del genoma viral, donde se acumulan preferentemente los genes no esenciales. Las dificultades asociadas a algunos de estos mutantes en cuanto a la obtención de preparaciones virales con títulos suficientemente altos para la infección de los cultivos de macrófagos a alta MOI, condujo al uso final de trece mutantes del MCMV en nuestro estudio. Ello posibilitó analizar un total de 85 genes virales, los cuales representan el 50% del genoma. Los resultados permitieron identificar dos regiones genómicas del MCMV que codifican productos involucrados en modular la expresión de tres de los miembros de la familia de receptores SLAM. La primera región, que comprende los genes entre *m18* y *m23.1* (ambos incluidos), codificaría uno o varios productos virales capaces de reducir parcialmente la expresión de CD84 y CD229 en la superficie del macrófago infectado. La segunda región, que engloba los genes entre *m144* y *m158*, codificaría a su vez algún producto o productos del MCMV con el potencial de disminuir en parte la expresión de CD229 y completamente los niveles de CD48. El hecho de que no se observara una recuperación de la expresión de Ly108 en la superficie de las células infectadas con ninguno de los mutantes virales analizados en comparación con las células no infectadas, podría indicar que los productos génicos que modulan esta molécula se encuentran en regiones del MCMV no incluidas en el análisis, por ser esenciales o por estar delecionadas en alguno de los cinco mutantes MCMV defectivos en su crecimiento *in vitro* (MCMV Δ M28-M31, MCMV Δ m29-M31, MCMV Δ M35-M37, MCMV Δ M45 y MCMV Δ m106-m108). Alternativamente, también podría darse la posibilidad de que la expresión de Ly108 se encontrara regulada por varios genes localizados en distintos puntos del genoma viral y cuya deleción combinada fuera necesaria para observar los efectos debido a una función redundante en el genoma. Este papel redundante es frecuente entre las inmunoevasinas del CMV. Así por ejemplo, la eliminación de las moléculas de MHC clase I en la superficie de las células infectadas por el MCMV es llevada a cabo por tres proteínas distintas *m04*, *m06* y *m152* (Lemmermann *et al.*, 2012), observándose que es necesaria la deleción conjunta de los tres productos virales para restablecer completamente la expresión de moléculas MHC clase I en superficie de las células infectadas (Wagner *et al.*, 2002). En el caso de CD84, su expresión estaría regulada por un producto o productos codificados dentro de la región genómica *m18-m23.1*, y por algún otro producto del MCMV no identificado en el estudio por las mismas razones argumentadas para Ly108. En cuanto a CD229, se podría inferir de los resultados obtenidos, que su expresión en superficie estaría controlada por productos virales codificados tanto en la región *m18-m23.1*, como en la región *m144-m158*. La deleción conjunta de estas dos regiones del MCMV habría de posibilitarnos confirmar esta hipótesis.

Debido a que la disminución de la expresión de CD48 en superficie se encontraba íntegramente controlada por una región específica del MCMV y que este miembro de la familia SLAM interacciona con una alta afinidad con CD244, molécula presente en las células NK y las células T

DISCUSIÓN

CD8+, las cuales a su vez desempeñan un papel importante en la resolución de la infección, se decidió identificar el gen del MCMV cuyo producto modula la expresión de CD48 en la superficie de las células infectadas. Para ello, se utilizaron mutantes del MCMV conteniendo deleciones cada vez más pequeñas dentro de la región genómica viral comprendida entre *m144* y *m158*. Finalmente, el análisis de un mutante viral, MCMV Δ m154, que abarca una deleción de un gen individual, *m154*, nos permitió concluir que m154 es el producto viral capaz de limitar CD48 en la superficie de las células infectadas por el MCMV.

Sin embargo, en un estudio en el que se re-evaluaron globalmente las pautas de lectura abierta codificadas durante la infección de células NIH-3T3 por el MCMV a través de microarrays de DNA, Tang y colaboradores (Tang *et al.*, 2006) documentaron la presencia de dos pequeñas pautas de lectura abierta adicionales, m154.3 y m154.4, que solaparían parcialmente con m154. Dado que ambas pautas de lectura abiertas se encontrarían interrumpidas en MCMV Δ m154, se generó y analizó un mutante viral adicional (MCMV Δ m154Int) que contenía una deleción interna en m154, preservando intactos los ORFs m154.3 y m154.4. Las infecciones de los macrófagos con este mutante viral permitieron confirmar que m154 es la proteína que causa la disminución de CD48 en la superficie del macrófago infectado.

La proteína m154, de la que se carecía de información alguna hasta el momento, pertenece a la familia de glicoproteínas m145 del MCMV, formada por once productos virales: m17, m145, m146, m150, m151, m152, m153, m154, m155, m157 y m158. Ninguno de los componentes de esta familia presenta homología con proteínas conocidas en otros herpesvirus (Rawlinson *et al.*, 1996). Una característica de la mayoría de los miembros de esta familia, en concreto de m17, m145, m150, m151, m152, m153, m155 y m157, es que adoptan un plegamiento tipo MHC clase I (Smith *et al.*, 2002). Sin embargo, m154, no parece contar con una estructura proteica que le permita plegarse de esa manera. A excepción de m157, que se ancla a la membrana celular a través de un motivo GPI, todos los integrantes de la familia m145 son proteínas transmembrana tipo I. En este sentido, m154 contiene un péptido señal, un dominio extracelular tipo mucina con un elevadísimo contenido en serinas y treoninas que constituyen potenciales sitios de O-glicosilación, una región transmembrana y un tallo citoplasmático. La discrepancia entre la masa molecular esperada a partir de la secuencia primaria de m154 (~40 kDa) y su masa molecular aparente (~60 kDa) cuando se analizó por Western blot, apoya el alto grado de glicosilación asignado a esta molécula. Aunque por el momento se desconoce la función que la copiosa glicosilación de m154 pueda desempeñar, ésta podría estar contribuyendo a estabilizar su propio plegamiento y/o ser un mecanismo de protección frente a proteasas presentes en la célula infectada (Rudd *et al.*, 2001). Respecto a la cola citoplasmática de m154 compuesta por 23 aminoácidos, resultan interesantes las predicciones realizadas en esta región en colaboración con uno de los miembros de nuestro grupo, el Dr. Domènec Farré, utilizando el programa Minimotif

DISCUSIÓN

Miner 3.0 (Mi *et al.*, 2012) que examina la presencia de motivos peptídicos cortos con función conocida en otras proteínas (figura anexo2). Estos motivos podrían contribuir a esclarecer el mecanismo de acción de m154. Entre los diferentes motivos reconocidos se podría destacar la presencia de una señal basada en di-leucina no convencional implicada en el direccionamiento de proteínas al lisosoma (Piccirillo *et al.*, 2006), así como dos sitios de unión para la proteína adaptadora AP-2 involucrada en la endocitosis dependiente de clatrina (Boucrot *et al.*, 2010). Estos motivos podrían ser de especial relevancia, como se discutirá más adelante, en el tráfico intracelular de m154 para conducir a la degradación de CD48 por la vía del lisosoma. Por otra parte, la cola citoplasmática de m154 presenta diversos posibles motivos de modificación de proteínas, como una región de unión a la cinasa c-Raf1, un sitio de fosforilación de la treonina lindante con la membrana por la proteína quinasa C (1-3aa, motivo THR), así como un motivo de fosforilación de la tirosina de la región C-terminal. Además, se identificaron dos sitios de unión a GDP y/o GTP, los cuales podrían contribuir en la activación o inhibición de la función de la proteína (Kjeldgaard *et al.*, 1996). Finalmente, en el extremo C-terminal de la cola citoplasmática se predijo un potencial motivo de unión al dominio PDZ, implicado en la regulación de distintos procesos biológicos como el anclaje de proteínas transmembrana al citoesqueleto o el mantenimiento de la estructura de los complejos de señalización (Ye and Zhang, 2013).

Con objeto de conocer la variabilidad de m154 en diferentes aislados del MCMV, se hicieron análisis comparativos de la secuencia genómica de *m154* en once cepas del citomegalovirus murino. Estos análisis, igualmente realizados en colaboración con el Dr. Domènec Farré, señalan que de entre las once cepas virales cuyo genoma ha sido completamente secuenciado, 8 de ellas claramente codifican m154 con una identidad aminoacídica de entre el 88% (cepa C4C) y el 99% (cepa K181), respecto a la cepa Smith (figura anexo 1A). Se ha observado sin embargo que en tres de las cepas secuenciadas (C4D, NO7 y AA18d) la codificación de m154 parece estar alterada substancialmente de forma que la proteína predicha es mucho más corta (está truncada) y presenta variaciones en aminoácidos a partir de la posición 159 (figura anexo 1A). Para entender esto hay que tener en cuenta que en el genoma, a partir del codón que codifica el aminoácido 159, existe una región con bastante polimorfismo entre las distintas cepas, con inserciones/deleciones de uno o varios nucleótidos. A pesar de dicha variación, la mayoría de las cepas conservan el marco de lectura y recuperan la conservación después de esa región polimórfica, terminando finalmente en el mismo codón de parada. En cambio, dicha pauta de lectura se ve alterada en las tres cepas indicadas (C4D, NO7 y AA18d) (figura anexo 1B), por lo que los aminoácidos codificados a partir de ese punto son distintos y, además, la proteína se trunca cuando encuentra el primer codón de parada fuera del marco normal (figura anexo 1C). Por lo tanto, podemos afirmar que dichas cepas (C4D, NO7 y AA18d) no codifican m154. Puesto que todas las cepas excepto Smith fueron secuenciadas mediante la tecnología 454 de Next-Generation Sequencing (Smith *et al.*, 2013), cabría la posibilidad de que las diferencias en esas

DISCUSIÓN

tres cepas fuesen debidas a errores de secuenciación, sin embargo resulta extraño que estos errores se produzcan en la misma región en tres cepas distintas. La cepa AA18d fue aislada a partir de las glándulas salivares de un ratón capturado en Macquarie Island (a unos 2300 km de Australia) y parece ser que los ratones de esta isla constituyen una población diferente de la del continente australiano (Smith *et al.*, 2013), por lo que es consistente que exista cierta divergencia también en los MCMVs que infectan esta población de ratones respecto a los de Australia. La cepa NO7 fue aislada a partir de un ratón capturado en otra isla, Beacon Island (Western Australia) (Smith *et al.*, 2013). En cambio, la cepa C4D fue aislada a partir de las glándulas salivares de un ratón capturado en Gunghalin (cerca de Canberra, Australia) y curiosamente, de las glándulas salivares del mismo ratón se aislaron también otras tres cepas distintas: C4A, C4B y C4C (Gorman *et al.*, 2006). Sería interesante estudiar cómo afecta el hecho de carecer de m154 a la biología de esas cepas de MCMV.

Con el fin de estudiar la expresión de m154 durante la infección se decidió generar un anticuerpo monoclonal frente a esta proteína. Como primera aproximación y con el fin de que el anticuerpo pudiera reconocer la proteína en su conformación nativa, se usó como estrategia de partida la inmunización de ratones con células 300.19 que expresaban m154 de manera estable. Aunque este sistema ha sido utilizado para la producción de mAb dirigidos contra diferentes proteínas asociadas a la membrana celular, en nuestro caso esta alternativa no resultó ser apropiada, induciéndose unos títulos de IgG muy reducidos tras la inmunización de los animales (datos no mostrados). Estos resultados, podrían ser debidos a una baja inmunogénicidad de m154 derivada con gran probabilidad, de su alto grado de O-glicosilación, lo que podría perturbar la eliminación enzimática de los azúcares para su posterior procesamiento y presentación a través de las moléculas MHC (Rudd *et al.*, 2001). Por esta razón, la estrategia alternativa que se empleó para obtener un anticuerpo contra m154 fue la de usar como inmunógeno un péptido sintético correspondiente a la cola citoplasmática de m154 conjugado a KLH. El mAb anti-m154 generado en estas condiciones, permite reconocer a la proteína en ensayos de Western blot e inmunofluorescencia en células fijadas y permeabilizadas (Figura 28 y 30).

El uso de este mAb ha resultado ser de gran utilidad para caracterizar el producto codificado por *m154*. Este mAb no sólo facilitó la determinación del peso molecular de la proteína viral, sino que además permitió demostrar que m154 se expresa a tiempos tempranos de la infección y que su síntesis continúa en la célula infectada durante todo el ciclo viral. Por otra parte, a través de ensayos de inmunofluorescencia indirecta se demostró que m154, tanto cuando se expresa de manera aislada en células transfectadas como en el contexto de la infección viral, se localiza principalmente en la superficie celular y en menor medida en el citoplasma. Este resultado fue confirmado mediante ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-m154 a partir de macrófagos infectados marcados con biotina en su superficie (datos no mostrados). De manera

DISCUSIÓN

similar a m154, otros productos de la familia de genes *m145* se expresan en la superficie celular, siendo el caso de las proteínas virales m153 (Mans *et al.*, 2007) y m157 (Tripathy *et al.*, 2006).

La posibilidad de que m154 operase de forma aislada, independientemente del contexto de la infección viral, simplificaría su estudio funcional. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que la proteína viral expresada por si sola era incapaz de modular CD48. Ante este resultado, y para descartar que la delección de m154 en el genoma viral hubiera provocado la disrupción de secuencias adicionales que fueran las causantes de los efectos observados sobre CD48, se generó y analizó un nuevo mutante del MCMV que expresaba el gen *m154* ectópicamente en el contexto del mutante MCMV Δ m154 que contenía la delección de m154 en su posición natural. En este contexto, m154 demostró tener capacidad de reducir la expresión en superficie de CD48, indicando que para ejercer su correcto funcionamiento m154 requiere, o bien de proteínas adicionales codificadas por el MCMV, o bien de factores celulares inducidos por la infección viral. Cabe mencionar que esta situación no es inusual en MCMV, ocurriendo por ejemplo en la modulación viral de ciertos ligandos para otras moléculas coseñalizadoras donde se ha documentado que se necesita el contexto de la infección, tal es el caso de CD86 perturbado por m147.5 (Loewendorf *et al.*, 2004) o la alteración de CD40 por el producto m155 (Loewendorf *et al.*, 2011).

Con objeto de determinar cuál era el mecanismo por el que se perdía la expresión de CD48 en la membrana celular de los macrófagos infectados, en primer lugar se descartó mediante ensayos de RT-PCR que m154 modulase este receptor SLAM a nivel transcripcional. Debido a que CD48 se ancla a la membrana celular a través de uniones a GPI (Elishmereni and Levi-Schaffer, 2011) nos planteamos la posibilidad de que m154 estuviera actuando a través de un mecanismo general que afectase a la localización en la membrana de proteínas con enlaces GPI. Para analizar esta posibilidad, examinamos mediante citometría de flujo los niveles de CD55, un receptor también anclado a la membrana celular por GPI, en los macrófagos infectados por MCMV y MCMV Δ m154. Los resultados indicaron que m154 no altera la expresión de CD55, descartando de este modo que la proteína viral afecte de modo global a receptores GPI.

Como se ha mencionado en la introducción, la mayor parte de las inmunoevasinas codificadas por MCMV, con actividades dirigidas a alterar en la superficie de la célula infectada ligandos de moléculas coseñalizadoras, ejercen sus funciones a través de dos mecanismos principales, reteniendo estas moléculas en compartimentos intracelulares o induciendo su degradación. Debido a que mediante ensayos de Western blot se mostró una disminución progresiva de los niveles totales de CD48 en el macrófago a lo largo de la infección, concomitante con el incremento de expresión de m154, se concluyó que el mecanismo de acción de m154 involucraba la degradación proteolítica de CD48. El uso de inhibidores de cada una de las dos vías principales

DISCUSIÓN

de degradación proteolítica, la del proteosoma y la del lisosoma, indicaron que ambas vías juegan un papel relevante en la regulación de CD48 por parte de m154. Adicionalmente, utilizando estos inhibidores de la proteólisis, se pudo apreciar una co-localización de m154 y CD48 en las células infectadas por MCMV. Como se ha comentado anteriormente, es importante resaltar en este contexto que la cola citoplasmática de m154 presenta un motivo de tráfico a lisosomas, así como dos sitios de unión para el complejo AP-2 involucrado en la endocitosis dependiente de clatrina. Estos motivos podrían permitir el tráfico intracelular de m154 con objeto de dirigir CD48 al lisosoma para su degradación. La generación y análisis de un MCMV conteniendo mutaciones en estos motivos de la cola citoplasmática de m154 podría darnos información sobre su funcionalidad.

De este modo, m154 entra a formar parte del grupo de proteínas de la familia m145 con propiedades de inmunoevasión asignadas, en el que se encuentran 5 de sus 11 miembros (Revilleza *et al.*, 2011). Concretamente, las proteínas m145, m152 y m155 cuentan con capacidad para disminuir la expresión en superficie de uno o más ligandos del receptor activador NKG2D presente en las células NK, como son H60, RAE1 o MULT-1 (Hasan *et al.*, 2005; Lodoen *et al.*, 2003; Slavuljica *et al.*, 2011). Adicionalmente, m152 retiene intracelularmente moléculas MHC clase I (Ziegler *et al.*, 1997), mientras que m155 reduce la expresión de la molécula coestimuladora CD40 en la superficie celular (Loewendorf *et al.*, 2011). Por otra parte, m157 interactúa con los receptores Ly49H y Ly49I que están presentes en células NK y participan en la activación e inhibición, respectivamente, de estas células (Arase *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002). Mientras que es importante señalar que m154 es capaz de manipular selectivamente CD48, ya que como se ha presentado no afecta a la expresión en superficie ni de CD55, ni de otras moléculas como CD86 u otros receptores de la familia SLAM, como Ly108 o CD84, no se puede excluir no obstante, que al igual que otros miembros de la familia m145, esta proteína viral pueda tener una naturaleza multifuncional e influir en la expresión de otras moléculas adicionales.

Ninguno de los 11 CMVs de distintas especies secuenciados completamente hasta el momento contiene homólogos de *m154*. De hecho, el único genoma que posee homólogos de genes de la familia m145 del MCMV, es el CMV de rata, en el cual se ha descrito que seis de los quince miembros que conforman esta familia de genes presentan homología a nivel de secuencia y posición genómica con el MCMV, siendo éstos: r145, r150, r151, r152, r155 y r157 (Vink *et al.*, 2000). En el caso del HCMV, si bien no alberga un homólogo de *m154*, sí que se ha descrito que al igual que el MCMV, limita la expresión de CD48 en la superficie de los macrófagos humanos infectados (Romo *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta esta observación, se podría concluir que cada CMV ha desarrollado su propio inhibidor específico de CD48 y que, pese a que en el HCMV aún no se ha identificado el gen viral causante de ello, la modulación de CD48 podría servirle a los CMVs para escapar del reconocimiento de las células NK durante la infección. Por otra parte, de manera

DISCUSIÓN

similar al MCMV, ensayos realizados en nuestro laboratorio han mostrado que, además de CD48, otros receptores SLAM ven reducida significativamente su expresión en la superficie de los macrófagos humanos tras la infección con el HCMV (Angulo, observaciones no publicadas). Quedaría aún por explorar si la regulación de miembros de la familia SLAM es una propiedad única e inherente de los CMVs o si esta estrategia podría ser extensible a otros virus, utilizándose como un mecanismo más general de evasión del sistema inmunitario. En este sentido, a fecha de hoy se ha descrito que el HIV es capaz de disminuir la expresión de CD48 y NTB-A en la superficie de las células T CD4+ infectadas, afectando a su reconocimiento por las células NK e inhibiendo su lisis, siendo la proteína viral accesoria (Vpu) la responsable de la alteración de NTB-A (Shah *et al.*, 2010; Ward *et al.*, 2007). Dado que parte de las estrategias de inmunoevasión de los CMVs implican el uso de homólogos celulares, es concebible, por lo tanto, que la manipulación de los receptores SLAM en la célula infectada también se lleve a cabo mediante la expresión de homólogos de miembros de la familia SLAM. En este sentido, en nuestro grupo se ha descrito que el HCMV codifica una proteína viral (UL7) que es un homólogo estructural de CD229. Pese a que UL7 no interacciona con CD229 como se esperaría, se ha mostrado que la proteína viral comparte algunas propiedades con este receptor SLAM, siendo capaz de mediar adhesión celular y atenuar la producción de citocinas proinflamatorias en células dendríticas (Engel *et al.*, 2011).

Cada vez existen un mayor número de evidencias que indican que CD244 contribuye a la regulación tanto de la actividad antiviral de las células NK, como de la funcionalidad de las células T CD8+ específicas contra el virus, en ratones y en humanos (Lee *et al.*, 2003; Waggoner and Taniguchi, 2010). La interacción de CD48 con CD244 en las células NK conduce al reclutamiento y la agregación del receptor en las balsas lipídicas de la membrana, la fosforilación de los ITSM de su cola intracelular y su posterior asociación con la molécula adaptadora SAP (Meinke and Watzl, 2013; Watzl *et al.*, 2000). Ello induce una cascada de señalización que resulta en la formación de la sinapsis de la célula NK, caracterizada por la liberación polarizada de los gránulos citolíticos que contienen perforina y granzimas. La sinapsis de la célula NK es crítica para que las células NK activadas interactúen de una manera productiva con las células diana negativas para MHC clase I e induzcan una potente citotoxicidad celular dirigida (Veillette, 2006). Por otra parte, sin embargo, se conoce que en ausencia de SAP funcional, CD244 es capaz de inhibir la activación de las células NK, tal y como ocurre en las células de pacientes con el síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP) (Tangye and Phillips, 2000). En conjunto, estas observaciones indican que CD244 y SAP modulan la actividad de las células NK. En este trabajo se ha demostrado que la delección de *m154* del MCMV resulta en una respuesta antiviral incrementada de las células NK *in vitro*. En concreto, esta proteína viral limita la capacidad de degranulación de las células NK frente a los macrófagos murinos infectados por el MCMV. Con objeto de comprobar si el efecto protector de *m154* era debido a la modulación específica de CD48 en la superficie de las células infectadas, se llevaron a cabo ensayos en los que se empleó como herramienta una

DISCUSIÓN

proteína de fusión CD244-Fc. De este modo, al bloquear CD48 en la superficie de los macrófagos infectados con el mutante viral carente de *m154* con la proteína de fusión CD244-Fc, se encontró que la respuesta de las células NK hacia las células infectadas era parcialmente inhibida. Por consiguiente, de estos resultados se puede inferir que mediante la eliminación de CD48 en la superficie celular, *m154* ayuda a proteger a las células infectadas por el MCMV del ataque de las células NK. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que *m154* pueda también ejercer otras funciones que contribuyan a este efecto.

Como se esperaba, el gen *m154* no es requerido durante la replicación viral en cultivo de tejidos, exhibiendo el MCMV carente de *m154* un crecimiento en macrófagos y fibroblastos murinos comparable al del MCMV parental. Cabe señalar que tanto el virus parental como todos los mutantes virales usados a lo largo de este estudio derivan del MCMV-BAC pSM3fr, el cual contiene una mutación en *mck-2* asociada a una capacidad reducida para infectar macrófagos y atraer leucocitos (Jordan *et al.*, 2011; Wagner *et al.*, 2013). No obstante, el hecho que todos los recombinantes de MCMV usados presenten el mismo fondo pSM3fr, les hace comparables a nivel del fenotipo asociado a *mck-2*.

El análisis del MCMV delecionado en *m154* en el contexto de la infección aguda en el ratón mostró con claridad su atenuación. Se observó que los ratones infectados con el MCMV Δ *m154* presentaban una menor pérdida de peso corporal y unos síntomas clínicos de enfermedad (pelo erizado, postura encorvada y letargia generalizada) más reducidos que los infectados con el MCMV. Acorde con ello, al analizar los títulos virales se encontró que el MCMV Δ *m154* presentaba un crecimiento notoriamente más debilitado que el MCMV parental en todos los órganos analizados de los animales infectados. Al día 4 post-infección, las diferencias en el crecimiento viral en el bazo e hígado entre los animales infectados con el MCMV y el MCMV Δ *m154* fueron de alrededor de 30 y 10 veces, respectivamente. Estos efectos *in vivo* fueron confirmados mediante el análisis del MCMV Δ *m154*Int conteniendo la deleción interna de *m154*. Es decir, en ausencia de *m154* el MCMV exhibe un crecimiento limitado en órganos clave en la infección por CMV.

El fenotipo atenuado del MCMV a tiempos tempranos de la infección en el ratón, junto a las evidencias funcionales obtenidas *in vitro*, apuntaban a que *m154* estuviera contrarrestando la respuesta de las células NK, las cuales desempeñan un papel crucial en el control temprano de la replicación del MCMV. Este aspecto se examinó, empleando un antisuero anti-asialo GM1 capaz de reconocer específicamente un glicosfingolípido presente en altas concentraciones en las células NK y de reducir por tanto esta población celular en diferentes cepas murinas (Harshan and Gangadharam, 1991). Se demostró, que en los animales en los que las células NK se habían eliminado tras el tratamiento con el antisuero anti-asialo GM, los niveles de replicación en bazo e hígado del mutante delecionado en *m154* estaban incrementados en mayor medida que los del

DISCUSIÓN

virus parental. Estos resultados confirman que el mecanismo por el cual m154 ejerce su papel protector *in vivo* es dependiente de las células NK.

Debido a que la expresión de CD244 no está restringida a las células NK, encontrándose también en niveles más bajos en otras células citotóxicas como las células T CD8+, las células T $\gamma\delta$, los basófilos y los eosinófilos (Chlewicki *et al.*, 2008), el efecto de m154 sobre las células infectadas podría tener implicaciones más allá de la regulación de la función de las células NK. En particular, tras la interacción con CD48, CD244 contribuye a iniciar la señalización y la actividad citotóxica en las células T CD8+ (Lee *et al.*, 2003). Por lo tanto, se podría pensar que otros mecanismos, independientes de las respuestas mediadas por las células NK, estuvieran contribuyendo a los efectos netos protectores del m154 *in vivo*. Sin embargo, el hecho de que exista un restablecimiento prácticamente completo del crecimiento del MCMV Δ m154 *in vivo* tras la eliminación de las células NK, indica que al menos en las condiciones de infección aguda temprana analizadas, el potencial de esta proteína viral para influir en procesos mediados por otros subtipos celulares, habría de ser limitado. Quedaría por determinar, no obstante, si m154 es capaz de ejercer efectos adicionales de relevancia en otros entornos en los que se pueda encontrar el virus.

En definitiva, los resultados obtenidos en este proyecto de tesis presentan a la familia de inmunorreceptores SLAM, como una nueva diana de manipulación por el CMV, sumándose a la diversidad de estrategias incorporadas por este patógeno para escapar del reconocimiento inmunológico. En este trabajo se ha identificado por primera vez un gen de herpesvirus implicado en limitar la expresión en superficie del miembro SLAM CD48, documentándose su papel protector *in vivo* contrarrestando el ataque de las células NK. Conjuntamente, los conocimientos aportados con estos resultados contribuyen a un mejor entendimiento de la compleja interacción virus-huésped, así como del funcionamiento de los receptores SLAM en la inmunidad viral.

CONCLUSIONES



VII. CONCLUSIONES

1. El MCMV reduce la expresión de los receptores CD48, CD229, Ly108 y CD84 en la superficie de los macrófagos infectados.
2. La expresión génica del MCMV es requerida para provocar la disminución de los receptores SLAM en los macrófagos murinos, identificándose las regiones virales que contienen genes capaces de modular la expresión de CD48, CD229 y CD84.
3. El producto codificado por el gen *m154* del MCMV perturba la expresión de CD48 en la superficie celular.
4. *m154* es una proteína transmembrana tipo I, la cual se expresa con una cinética temprana y se localiza principalmente en la superficie de la célula infectada.
5. *m154* expresada aisladamente no es capaz de alterar CD48, sin embargo la expresión ectópica de esta proteína en el contexto de la infección viral conduce a la disminución de CD48 en la superficie de las células infectadas.
6. Durante la infección, el mecanismo de acción de *m154* implica la degradación proteolítica de CD48, tanto a través de las vía del proteosoma como del lisosoma.
7. *m154* contribuye a limitar la respuesta citotóxica de las células NK frente a los macrófagos infectados por MCMV, siendo este efecto mediado en parte por un fallo en el reconocimiento de CD48 por CD244.
8. *m154* promueve el crecimiento del MCMV *in vivo* protegiendo del control mediado por las células NK.
9. En su conjunto, los resultados presentan a la familia de inmunoreceptores SLAM como una nueva diana de la manipulación por el MCMV, incrementando de esta forma la diversidad de estrategias incorporadas por este patógeno para mermar la respuesta inmune del huésped.

ABREVIACIONES



VIII. ABREVIACIONES

aa	aminoácidos
ADCC	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
ADN	ácido desoxirribonucleico
APC	células presentadoras de antígeno profesionales
BAC	cromosoma artificial bacteriano
BMDC	células dendríticas derivadas de médula ósea
BSA	albúmina sérica bovina
C2-Ig	dominio constante de la inmunoglobulina
CEEA	comité ético de experimentación con animales
CHX	cicloheximida
CMV	citomegalovirus
CxC	dominio di-cisteína
DC	célula dendrítica
DMEM	medio <i>Dulbecco Eagle</i> modificado
DRs	repeticiones directas
E	temprano
EAT-2	transcrito 2 EWS/FLI1 del sarcoma de Ewing
EBV	virus del Epstein-Barr
EGFR	receptor epidérmico de factores de crecimiento
ELISA	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERGIC	compartimento intermedio RE-golgi
FBS	suero fetal bovino
FCRL	moléculas tipo receptores Fc
FDA	administración de alimentos y medicamentos
GFP	proteína fluorescente verde
GM-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos
GPCMV	citomegalovirus de cobaya
GPI	glicosil-fosfatidil-inositol
HA	hemaglutinina
HAT	hipoxantina, aminopterina y timidina
HCMV	citomegalovirus humano
HFCS	factor estimulante de hibridomas
hpi	horas post-infección
HSC	células madre hematopoyéticas
HVEM	mediador de entrada de los herpesvirus

ABREVIACIONES

iDC	células dendríticas inmaduras
IE	Inmediatamente temprano
IgG	inmunoglobulina G
IgM	inmunoglobulina M
IgSF	superfamilia de las inmunoglobulinas
IL	interleucina
INF	interferon
IRL	repeticiones internas largas
IRS	repeticiones internas cortas
ITAM	motivo de activación basado en tirosinas
ITIM	motivo de inhibición basado en tirosinas
ITSM	motivo de cambio de inmunorreceptor basado en tirosina
Kb	kilobases
KIR	receptor tipo inmunoglobulina de las células NK
L	tardío
LAMP-1	proteína asociada a la membrana lisosomal - 1
LPS	lipopolisacárido
LT	linfocitos T
mAb	anticuerpo monoclonal
MCMV	citomegalovirus murino
M-CSF	factor estimulador de colonias de monocitos
mDC	células dendríticas mieloides
MEF	fibroblastos embrionarios murinos
MFI	intensidad de fluorescencia media
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
MIEP	promotor inmediatamente temprano
MOI	multiplicidad de infección
MPP	progenitores hematopoyéticos multipotentes
MΦs	macrófagos
NK	asesinas naturales
NRM	resonancia magnética nuclear
nt	nucleótidos
ORF	pautas abiertas de lectura
PBMC	células mononucleares de sangre periférica
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pDC	células dendríticas plasmacitoides
PEC	células del exudado peritoneal

ABREVIACIONES

PMA	forbol 12-miristato 14-acetato
PPA	ácido fosfonoacético
RE	retículo endoplasmático
RhCMV	citomegalovirus de macaco rhesus
RPMI	medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAP	proteína asociada a SLAM
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SLAM	molécula señalizadora de la activación linfocitaria
TAP	transportador asociado con el procesamiento de antígenos
TCR	receptor de células T
Th	células T ayudadoras
TLR	receptores tipo <i>toll</i>
TNF	factor de necrosis tumoral
TNF-R	receptor del factor de necrosis tumoral
TRL	repeticiones terminales largas
TRS	repeticiones terminales cortas
UFP	unidad formadora de placas
UL	región única larga
US	región única corta
UV	ultravioleta
V-Ig	dominio variable de la inmunoglobulina
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
wt	tipo salvaje
XLP	síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X

BIBLIOGRAFÍA



IX. BIBLIOGRAFIA

- Ahn, K., Angulo, A., Ghazal, P., Peterson, P., Yang, Y., and Froh, K.** (1996). Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:10990–10995.
- Ames, J.B., Vyas, V., Lusin, J.D., and Mariuzza, R.** (2005). NMR structure of the natural killer cell receptor 2B4 (CD244): implications for ligand recognition. *Biochemistry* 44:6416–6423.
- Anders, D., Kerry, J., and Pari, G.** (2007). CMV DNA synthesis and late viral gene expression. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, E. Mocarski, ed. (New York, United States of America), pp. 295–310.
- Andrews, D.M., Andoniou, C.E., Granucci, F., Ricciardi-castagnoli, P., and Degli-esposti, M.A.** (2001). Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nat. Immunol.* 2:1077–1084.
- Arase, H., Mocarski, E.S., Campbell, a E., Hill, a B., and Lanier, L.L.** (2002). Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science.* 296:1323–1326.
- Arnon, T.I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., *et al.*** (2005). Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat. Immunol.* 6:515–523.
- Ashiru, O., Bennett, N.J., Boyle, L.H., Thomas, M., Trowsdale, J., and Wills, M.R.** (2009). NKG2D ligand MICA is retained in the cis-Golgi apparatus by human cytomegalovirus protein UL142. *J. Virol.* 83:12345–12354.
- Assarsson, E., Kambayashi, T., Persson, C.M., Ljunggren, H.G., and Chambers, B.J.** (2005). 2B4 co-stimulation: NK cells and their control of adaptive immune responses. *Mol. Immunol.* 42:419–423.
- Baorto, D.M., Gao, Z., Malaviya, R., Dustin, M.L., Merwe, A. van der, Lublin, D.M., and Abraham, S.N.** (1997). Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature* 389:636–639.
- Beck, S., and Barrell, B.G.** (1988). Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature* 331:269–272.
- Benedict, C.A., Loewendorf, A., Garcia, Z., Blazar, B.R., and Janssen, E.M.** (2008). Dendritic cell programming by cytomegalovirus stunts naive T cell responses via the PD-L1/PD-1 pathway. *J. Immunol.* 180:4836–4847.
- Bennett, N.J., Ashiru, O., Morgan, F.J., Pang, Y., Okecha, G., Eagle, R.A., Trowsdale, J., Sissons, J.G., and Wills, M.R.** (2010). Intracellular sequestration of the NKG2D ligand ULBP3 by human cytomegalovirus. *J. Immunol.* 185:1093–1102.
- Boeckh, M., and Geballe, A.P.** (2011). Science in medicine cytomegalovirus: pathogen , paradigm , and puzzle. *J. Clin. Invest.* 121:1673–1680.
- Boehme, K., Guerrero, M., and Compton, T.** (2006). Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J. Immunol.* 177:7094–7102.
- Boles, K.S., Stepp, S.E., Bennett, M., Kumar, V., and Mathew, P.A.** (2001). 2B4 (CD244) and CS1: novel members of the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily molecules expressed on natural killer cells and other leukocytes. *Immunol. Rev.* 181:234–249.

BIBLIOGRAFIA

- Borst, E.M., and Messerle, M.** (2005). Analysis of human cytomegalovirus oriLyt sequence requirements in the context of the viral genome. *J. Virol.* 79:3615–3626.
- Borst, E.M., Benkartek, C., and Messerle, M.** (2007). Use of bacterial artificial chromosomes in generating targeted mutations in human and mouse cytomegaloviruses. *Curr Protoc Immunol* 10:32-35.
- Bottino, C., Augugliaro, R., Castriconi, R., Nanni, M., Biassoni, R., Moretta, L., and Moretta, A.** (2000). Analysis of the molecular mechanism involved in 2B4-mediated NK cell activation: evidence that human 2B4 is physically and functionally associated with the linker for activation of T cells. *Eur. J. Immunol.* 30:3718–3722.
- Boucrot, E., Saffarian, S., Zhang, R., and Kirchhausen, T.** (2010). Roles of AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *PLoS One* 5:e10597.
- Britt, W.** (2008). Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325:417–470.
- Brown, M., Boles, K., Merwe, P.A., Kumar, V., Mathew, P., and Barclay, A.N.** (1998). 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J. Exp. Med.* 188:2083–2090.
- Bryceson, Y.T., March, M.E., Barber, D.F., Ljunggren, H. G., and Long, E.O.** (2005). Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J. Exp. Med.* 202:1001–1012.
- Bukowski, J., Warner, J., Dennert, G., and Welsh, R.** (1985). Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J. Exp. Med.* 161:40–52.
- Bukowski, J.F., Woda, B.A., and Welsh, R.M.** (1984). Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J. Virol.* 52:119–128.
- Calpe, S., Wang, N., Romero, X., and Berger, S.** (2008). The SLAM and SAP gene families control innate and adaptive immune responses. *Adv. Immunol.* 97:177–250.
- Cannon, M.J., Schmid, D.S., and Hyde, T.B.** (2010). Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with. *Rev. Med. Virol.* 20:202–213.
- Cannons, J.L., Tangye, S.G., and Schwartzberg, P.L.** (2011). SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 29:665–705.
- Cepeda, V., Esteban, M., and Fraile-Ramos, A.** (2010). Human cytomegalovirus final envelopment on membranes containing both trans-Golgi network and endosomal markers. *Cell. Microbiol.* 12:386–404.
- Cha, T., Tom, E., Kemble, G.W., Duke, G.M., Mocarski, E.S., and Spaete, R.R.** (1996). Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J. Virol.* 70:78–83.
- Chee, M., Bankier, A., Beck, S., Bohni, R., Brown, C., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C., Kouzarides, T., Martignetti, J., *et al.*** (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 154:125–169.
- Chen, R., Relouzat, F., Roncagalli, R., Aoukaty, A., Tan, R., and Latour, S.** (2004). Molecular dissection of 2B4 signaling: Implications for signal transduction by SLAM-related receptors. *Mol. Cell. Biol.* 24:5144–5156.
- Chlewicki, L.K., Velikovsky, C.A., Balakrishnan, V., Mariuzza, R., and Kumar, V.** (2008). Molecular basis of the dual functions of 2B4 (CD244). *J. Immunol.* 180:8159–8167.

BIBLIOGRAFIA

- Dalod, M., Hamilton, T., Salomon, R., Salazar-Mather, T.P., Henry, S.C., Hamilton, J.D., and Biron, C.** (2003). Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J. Exp. Med.* 197:885–898.
- Davison, A.J., and Bhella, D.** (2007). Comparative betaherpes viral genome and virion structure. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, E.S. Mocarski, ed. (New York, United States of America), pp. 177–203.
- Davison, A.J., Dolan, A., Akter, P., Addison, C., Dargan, D.J., Alcendor, D.J., Mcgeoch, D.J., and Hayward, G.S.** (2003). The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J. Gen. Virol.* 84:17–28.
- Davison, A.J., Holton, M., Dolan, A., Dargan, D., Gatherer, D., and Hayward, G.** (2013). Comparative genomics of primate cytomegalovirus. In *Cytomegalovirus: From Molecular Pathogenesis to Intervention*, (Mainz, Germany), pp. 1–22.
- Dekhtiarenko, I., Čičin-Šain, L., and Messerle, M.** (2014). Use of recombinant approaches to construct human cytomegalovirus mutants. *Methods Mol. Biol.* 1119:59–79.
- Detre, C., Keszei, M., Romero, X., Tsokos, G.C., and Terhorst, C.** (2010). SLAM family receptors and the SLAM-associated protein (SAP) modulate T cell functions. *Semin. Immunopathol.* 32:157–171.
- Dolan, A., Cunningham, C., Hector, R., Hassan-Walker, A., and Lee, L.** (2004). Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 85:1301–1312.
- Dunn, C., Chalupny, N.J., Sutherland, C.L., Dosch, S., Sivakumar, P. V, Johnson, D.C., and Cosman, D.** (2003a). Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 197:1427–1439.
- Dunn, W., Chou, C., Li, H., Hai, R., Patterson, D., Stolc, V., Zhu, H., and Liu, F.** (2003b). Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:14223–14228.
- Eagle, R.A., Traherne, J.A., Ashiru, O., Wills, M.R., and Trowsdale, J.** (2006). Regulation of NKG2D ligand gene expression. *Hum. Immunol.* 67:159–169.
- Eagle, R.A., Traherne, J.A., Hair, J.R., Jafferji, I., and Trowsdale, J.** (2009). ULBP6/RET1L is an additional human NKG2D ligand. *Eur. J. Immunol.* 39:3207–3216.
- Elishmereni, M., and Levi-Schaffer, F.** (2011). CD48: A co-stimulatory receptor of immunity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43:25–28.
- Elkington, R., Walker, S., Crough, T., Menzies, M., Tellam, J., Bharadwaj, M., and Khanna, R.** (2003). Ex vivo profiling of CD8⁺-T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J. Virol.* 77:5226–5240.
- Engel, P., and Angulo, A.** (2012). Viral immunomodulatory proteins: usurping host genes as a survival strategy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 738:256–276.
- Engel, P., Eck, M.J., and Terhorst, C.** (2003). The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3:813–821.
- Engel, P., Pérez-Carmona, N., Alba, M.M., Robertson, K., Ghazal, P., and Angulo, A.** (2011). Human cytomegalovirus UL7, a homologue of the SLAM-family receptor CD229, impairs cytokine production. *Immunol. Cell Biol.* 89:753–766.
- Fannin-Rider, J., Dunn, W., Yang, E., and Liu, F.** (2008). Human cytomegalovirus microRNAs. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325:21–39.

BIBLIOGRAFIA

- Feire, A., and Compton, T.** (2013). Virus entry and activation of innate defence. In *Cytomegalovirus: From Molecular Pathogenesis to Intervention*, (Mainz, Germany), pp. 125–140.
- Fielding, C.A., Aicheler, R., Stanton, R.J., Wang, E.C., Han, S., Seirafian, S., Davies, J., McSharry, B.P., Weekes, M.P., Antrobus, P.R., et al.** (2014). Two novel human cytomegalovirus NK cell evasion functions target MICA for lysosomal degradation. *PLoS Pathog.* 10:e1004058.
- Fowler, K.B., and Boppana, S.B.** (2006). Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. *J. Clin. Virol.* 35:226–231.
- Garni-Wagner, B., Purohit, A., Mathew, P., Bennett, M., and Kumar, V.** (1993). A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. *J. Immunol.* 151:60–70.
- Gibson, W.** (2008). Structure and formation of the cytomegalovirus virion. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325:187–204.
- Gilbert, M.J., Riddell, S.R., Plachter, B., and Greenberg, P.D.** (1996). Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* 383:720–722.
- González-Cabrero, J., Wise, C.J., Latchman, Y., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., and Reiser, H.** (1999). CD48-deficient mice have a pronounced defect in CD4(+) T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:1019–1023.
- Gorman, S., Harvey, N.L., Moro, D., Lloyd, M.L., Voigt, V., Smith, L.M., Lawson, M.A., and Shellam, G.R.** (2006). Mixed infection with multiple strains of murine cytomegalovirus occurs following simultaneous or sequential infection of immunocompetent mice. *J. Gen. Virol.* 87:1123–1132.
- Halenius, A., and Hengel, H.** (2014). Human Cytomegalovirus and Autoimmune Disease. *Biomed Res. Int.* 2014:1–15.
- Hanson, L., Slater, J., Karabekian, Z., and Virgin, H.** (1999). Replication of murine cytomegalovirus in differentiated macrophages as a determinant of viral pathogenesis. *J. Virol.* 59:5970–5980.
- Harshan, K. V., and Gangadharam, P.R.** (1991). In vivo depletion of natural killer cell activity leads to enhanced multiplication of *Mycobacterium avium* complex in mice. *Infect. Immun.* 59:2818–2821.
- Hasan, M., Krmpotic, A., and Ruzsics, Z.** (2005). Selective down-regulation of the NKG2D ligand H60 by mouse cytomegalovirus m155 glycoprotein. *J. Virol.* 79:2920–2930.
- Hegde, N.R., Tomazin, R.A., Wisner, T.W., Dunn, C., Boname, J.M., Lewinsohn, D.M., and Johnson, D.C.** (2002). Inhibition of HLA-DR assembly, transport, and loading by human cytomegalovirus glycoprotein US3: a novel mechanism for evading major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J. Virol.* 76:10929–10941.
- Hengel, H., Koopmann, J.O., Flohr, T., Muranyi, W., Goulmy, E., Hämmerling, G.J., Koszinowski, U.H., and Momburg, F.** (1997). A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. *Immunity* 6:623–632.
- Hengel, H., Reusch, U., Gutermann, A., Ziegler, H., Jonjic, S., Lucin, P., and Koszinowski, U.H.** (1999). Cytomegaloviral control of MHC class I function in the mouse. *Immunol. Rev.* 168:167–176.
- Horejsí, V., Cebecauer, M., Cerný, J., Brdicka, T., Angelisová, P., and Drbal, K.** (1998). Signal transduction in leucocytes via GPI-anchored proteins: an experimental artefact or an aspect of immunoreceptor function? *Immunol. Lett.* 63:63–73.
- Hudson, J.** (1988). Further studies on the mechanism of centrifugal enhancement of cytomegalovirus infectivity. *J. Virol. Methods* 2:97–108.

BIBLIOGRAFIA

- Isaacson, M.K., Juckem, L.K., and Compton, T.** (2008). Virus entry and innate immune activation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325:85–100.
- Jackson, S.E., Mason, G.M., and Wills, M.R.** (2011). Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus Res.* 157:151–160.
- Jawahar, S., Moody, C., Chan, M., Finberg, R., Geha, R., and Chatila, T.** (1996). Natural killer (NK) cell deficiency associated with an epitope-deficient Fc receptor type IIIA (CD16-II). *Clin. Exp. Immunol.* 103:408–413.
- Jenkins, C., Garcia, W., Godwin, M.J., Spencer, J. V, Stern, J.L., Abendroth, A., and Slobedman, B.** (2008). Immunomodulatory properties of a viral homolog of human interleukin-10 expressed by human cytomegalovirus during the latent phase of infection. *J. Virol.* 82:3736–3750.
- Jones, T.R., and Sun, L.** (1997). Human cytomegalovirus US2 destabilizes major histocompatibility complex class I heavy chains. *J. Virol.* 71:2970–2979.
- Jordan, S., Krause, J., Prager, A., Mitrovic, M., Jonjic, S., Koszinowski, U.H., and Adler, B.** (2011). Virus progeny of murine cytomegalovirus bacterial artificial chromosome pSM3fr show reduced growth in salivary Glands due to a fixed mutation of MCK-2. *J. Virol.* 85:10346–10353.
- Kalejta, R.F.** (2008). Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72:249–265.
- Kärre, K.** (2002). NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol* 55:221–228.
- Kato, K., Koyanagi, M., Okada, H., Takanashi, T., Wong, Y.W., Williams, A.F., Okumura, K., and Yagita, H.** (1992). CD48 is a counter-receptor for mouse CD2 and is involved in T cell activation. *J. Exp. Med.* 176:1241–1249.
- Khan, S., Zimmermann, A., Basler, M., Groettrup, M., and Hengel, H.** (2004). A cytomegalovirus inhibitor of gamma interferon signaling controls immunoproteasome induction. *J. Virol.* 78:1831–1842.
- Kim, S., Lee, S., Shin, J., Kim, Y., Evnouchidou, I., Kim, D., Kim, Y.K., Kim, Y.E., Ahn, J.H., Riddell, S.R., *et al.*** (2011). Human cytomegalovirus microRNA miR-US4-1 inhibits CD8(+) T cell responses by targeting the aminopeptidase ERAP1. *Nat. Immunol.* 12:984–991.
- Kjeldgaard, M., Nyborg, J., and Clark, B.F.** (1996). The GTP binding motif: variations on a theme. *FASEB J.* 10:1347–1368.
- Krmpotic, A., Bubic, I., Polic, B., Lucin, P., and Jonjic, S.** (2003). Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes Infect.* 5:1263–1277.
- Krmpotic, A., Hasan, M., Loewendorf, A., Saulig, T., Halenius, A., Lenac, T., Polic, B., Bubic, I., Kriegeskorte, A., Pernjak-Pugel, E., *et al.*** (2005). NK cell activation through the NKG2D ligand MULT-1 is selectively prevented by the glycoprotein encoded by mouse cytomegalovirus gene m145. *J. Exp. Med.* 201:211–220.
- Kubin, M.Z., Parshley, D.L., Din, W., Waugh, J.Y., Davis-Smith, T., Smith, C.A., Macduff, B.M., Armitage, R.J., Chin, W., Cassiano, L., *et al.*** (1999). Molecular cloning and biological characterization of NK cell activation-inducing ligand, a counterstructure for CD48. *Eur. J. Immunol.* 29:3466–3477.
- Kubota, A., Kubota, S., Farrell, H.E., Davis-Poynter, N., and Takei, F.** (1999). Inhibition of NK cells by murine CMV-encoded class I MHC homologue m144. *Cell. Immunol.* 191:145–151.
- Kumaresan, P., and Mathew, P.** (2000). Structure of the human natural killer cell receptor 2B4 gene and identification of a novel alternative transcript. *Immunogenetics* 11:987–992.

BIBLIOGRAFIA

- Kushwah, R., and Hu, J.** (2011). Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology* 133:409–419.
- Lee, K., Bhawan, S., Majima, T., Wei, H., Nishimura, M., Yagita, H., and Kumar, V.** (2003). Cutting edge: the NK cell receptor 2B4 augments antigen-specific T cell cytotoxicity through CD48 ligation on neighboring T cells. *J. Immunol.* 170:4881–4885.
- Lee, S.H., Girard, S., Macina, D., Busà, M., Zafer, A., Belouchi, A., Gros, P., and Vidal, S.M.** (2001). Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nat. Genet.* 28:42–45.
- Lemmermann, N. a W., Fink, A., Podlech, J., Ebert, S., Wilhelmi, V., Böhm, V., Holtappels, R., and Reddehase, M.J.** (2012). Murine cytomegalovirus immune evasion proteins operative in the MHC class I pathway of antigen processing and presentation: state of knowledge, revisions, and questions. *Med. Microbiol. Immunol.* 201:497–512.
- Lenac, T., Budt, M., Arapovic, J., Hasan, M., Zimmermann, A., Simic, H., Krmpotic, A., Messerle, M., Ruzsics, Z., and Koszinowski, U.H.** (2006). The herpesviral Fc receptor fcr-1 down-regulates the NKG2D ligands MULT-1 and H60. *J. Exp. Med.* 203:1843–1850.
- Lenac, T., Arapović, J., Traven, L., Krmpotić, A., and Jonjić, S.** (2008). Murine cytomegalovirus regulation of NKG2D ligands. *Med. Microbiol. Immunol.* 197:159–166.
- Ljunggren, H.G., and Kärre, K.** (1990). In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 11:237–244.
- Lodoen, M., Ogasawara, K., Hamerman, J. a, Arase, H., Houchins, J.P., Mocarski, E.S., and Lanier, L.L.** (2003). NKG2D-mediated natural killer cell protection against cytomegalovirus is impaired by viral gp40 modulation of retinoic acid early inducible 1 gene molecules. *J. Exp. Med.* 197:1245–1253.
- Loewendorf, A., Krüger, C., Borst, E.M., Wagner, M., Just, U., and Messerle, M.** (2004). Identification of a mouse cytomegalovirus gene selectively targeting CD86 expression on antigen-presenting cells. *J. Virol.* 78:13062–13071.
- Loewendorf, A.I., Steinbrueck, L., Peter, C., Busche, A., Benedict, C. a, and Kay-Jackson, P.C.** (2011). The mouse cytomegalovirus glycoprotein m155 inhibits CD40 expression and restricts CD4 T cell responses. *J. Virol.* 85:5208–5212.
- Loh, J., Chu, D., O’Guin, A., Yokoyama, W., and Virgin, H.** (2005). Natural killer cells utilize both perforin and gamma interferon to regulate murine cytomegalovirus infection in the spleen and liver. *J. Virol.* 79:661–667.
- Lurain, N., and Chou, S.** (2010). Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 23:689–712.
- Ma, C., Wang, N., Detre, C., Wang, G., O’Keeffe, M., and Terhorst, C.** (2012). Receptor signaling lymphocyte-activation molecule family 1 (Slamf1) regulates membrane fusion and NADPH oxidase 2 (NOX2) activity by recruiting a Beclin-1/Vps34/ultraviolet radiation resistance-associated gene (UVRAG) complex. *J. Biol. Chem.* 287:18359–18365.
- Ma, C.S., Nichols, K.E., and Tangye, S.G.** (2007). Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 25:337–379.
- Mach, M., Wieggers, A., Spindler, N., and Winkler, T.** (2013). Protective humoral immunity. In *Cytomegalovirus: From Molecular Pathogenesis to Intervention*, M. Reddehase, ed. (Mainz, Germany), pp. 215–231.

BIBLIOGRAFIA

- Machold, R., Wiertz, E.J., Jones, T.R., and Ploegh, H.L.** (1997). The HCMV gene products US11 and US2 differ in their ability to attack allelic forms of murine major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chains. *J. Exp. Med.* 185:363–366.
- Manley, T.J., Luy, L., Jones, T., Boeckh, M., Mutimer, H., and Riddell, S.R.** (2004). Immune evasion proteins of human cytomegalovirus do not prevent a diverse CD8+ cytotoxic T-cell response in natural infection. *Blood* 104:1075–1082.
- Mans, J., Natarajan, K., Balbo, A., Schuck, P., Eikel, D., Hess, S., Robinson, H., Simic, H., Jonjic, S., Tiemessen, C.T., et al.** (2007). Cellular expression and crystal structure of the murine cytomegalovirus major histocompatibility complex class I-like glycoprotein, m153. *J. Biol. Chem.* 282:35247–35258.
- Mathys, S., Schroeder, T., Ellwart, J., Koszinowski, U.H., Messerle, M., and Just, U.** (2003). Dendritic cells under influence of mouse cytomegalovirus have a physiologic dual role: to initiate and to restrict T cell activation. *J. Infect. Dis.* 187:988–999.
- McGeoch, D.J., Rixon, F.J., and Davison, A.J.** (2006). Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.* 117:90–104.
- Meinke, S., and Watzl, C.** (2013). NK cell cytotoxicity mediated by 2B4 and NTB-A is dependent on SAP acting downstream of receptor phosphorylation. *Front. Immunol.* 4:1–6.
- Messerle, M., Crnkovic, I., Hammerschmidt, W., Ziegler, H., and Koszinowski, U.H.** (1997). Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:14759–14763.
- Messmer, B., Eissmann, P., Stark, S., and Watzl, C.** (2006). CD48 stimulation by 2B4 (CD244)-expressing targets activates human NK cells. *J. Immunol.* 176:4646–4650.
- Mettenleiter, T.C., Klupp, B.G., and Granzow, H.** (2006). Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr. Opin. Microbiol.* 9:423–429.
- Mi, T., Merlin, J.C., Deverasetty, S., Gryk, M.R., Bill, T.J., Brooks, A.W., Lee, L.Y., Rathnayake, V., Ross, C.A., Sargeant, D.P., et al.** (2012). Minimotif Miner 3.0: database expansion and significantly improved reduction of false-positive predictions from consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* 40:252–260.
- Miletić, A., Krmpotić, A., and Jonjić, S.** (2013). The evolutionary arms race between NK cells and viruses: who gets the short end of the stick? *Eur. J. Immunol.* 43:867–877.
- Miller-Kittrell, M., and Sparer, T.E.** (2009). Feeling manipulated: cytomegalovirus immune manipulation. *Virology* 396:4–10.
- Mintern, J.D., Klemm, E.J., Wagner, M., Paquet, M.E., Napier, M.D., Kim, Y.M., Koszinowski, U.H., and Ploegh, H.L.** (2006). Viral interference with B7-1 costimulation: a new role for murine cytomegalovirus fc receptor-1. *J. Immunol.* 177:8422–8431.
- Mocarski, E.S., Shenk, T.E., Griffiths, P.D., and Pass, R.F.** (2013). Cytomegaloviruses. In *In Fields Virology*, (Philadelphia, United States of America), pp. 1960–2014.
- Morra, M., Howie, D., Grande, M.S., Sayos, J., Wang, N., Wu, C., Engel, P., and Terhorst, C.** (2001a). X-linked lymphoproliferative disease: a progressive immunodeficiency. *Annu. Rev. Immunol.* 19:657–682.
- Morra, M., Lu, J., Poy, F., Martin, M., Sayos, J., Calpe, S., Gullo, C., Howie, D., Rietdijk, S., Thompson, A., et al.** (2001b). Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *EMBO J.* 20:5840–5852.
- Murphy, E., Rigoutsos, I., Shibuya, T., and Shenk, T.E.** (2003). Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:13585–13590.

BIBLIOGRAFIA

- Mutter, W., Reddehase, M.J., Busch, F.W., Bühring, H.J., and Koszinowski, U.H.** (1988). Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *J. Exp. Med.* 167:1645–1658.
- Park, B., Spooner, E., Houser, B.L., Strominger, J.L., and Ploegh, H.L.** (2010). The HCMV membrane glycoprotein US10 selectively targets HLA-G for degradation. *J. Exp. Med.* 207:2033–2041.
- Parolini, S., Bottino, C., Falco, M., Augugliaro, R., Giliani, S., Franceschini, R., Ochs, H.D., Wolf, H., Bonnefoy, J.Y., Biassoni, R., et al.** (2000). X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J. Exp. Med.* 192:337–346.
- Pass, R.F., Zhang, A., Evans, T., Simpson, W., Andrews, M., Huang, L., Corey, J., Hill, E., Davis, C., and Flanagan, C.** (2009). Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* 1191–1199.
- Paulus, C., and Nevels, M.** (2009). The human cytomegalovirus major immediate-early proteins as antagonists of intrinsic and innate antiviral host responses. *Viruses* 1:760–779.
- Pellet, P., and Roizman, B.** (2007). The family Herpesviridae: A Brief Introduction. In *In Fields Virology*, P. Howley, D. Knipe, R. Griffin, R. Lamb, and M. Martin, eds. (Philadelphia, United States of America), pp. 2479–2499.
- Philip, E., Pellett, P., and Roizman, B.** (2013). herpesviridae. In *In Fields Virology*, (Philadelphia, United States of America), pp. 1802–1822.
- Piccirillo, R., Palmisano, I., Innamorati, G., Bagnato, P., Altimare, D., and Schiaffino, M. V** (2006). An unconventional dileucine-based motif and a novel cytosolic motif are required for the lysosomal and melanosomal targeting of OA1. *J. Cell Sci.* 119:1–39.
- Polic, B., Hengel, H., Krmpotic, A., Trgovcich, J., Pavic, I., Luccaronin, P., Jonjic, S., and Koszinowski, U.H.** (1998). Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J. Exp. Med.* 188:1047–1054.
- Pollock, J.L., Presti, R.M., Paetzold, S., and Ivth, H.W.V.** (1997). Latent murine cytomegalovirus infection in macrophages. *Virology* 179:168–179.
- Powers, C., and Früh, K.** (2008). Rhesus CMV: an emerging animal model for human CMV. *Med. Microbiol. Immunol.* 197:109–115.
- Prod'homme, V., Griffin, C., Aicheler, R.J., Wang, E.C., McSharry, B.P., Rickards, C.R., Stanton, R.J., Borysiewicz, L.K., López-Botet, M., Wilkinson, G.W., et al.** (2007). The human cytomegalovirus MHC class I homolog UL18 inhibits LIR-1+ but activates LIR-1- NK cells. *J. Immunol.* 178:4473–4481.
- Prod'homme, V., Sugrue, D.M., Stanton, R.J., Nomoto, A., Davies, J., Rickards, C.R., Cochrane, D., Moore, M., Wilkinson, G.W., and Tomasec, P.** (2010). Human cytomegalovirus UL141 promotes efficient downregulation of the natural killer cell activating ligand CD112. *J. Gen. Virol.* 91:2034–2039.
- Pyzik, M., Gendron-Pontbriand, E.M., and Vidal, S.M.** (2011). The impact of Ly49-NK cell-dependent recognition of MCMV infection on innate and adaptive immune responses. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011:1–9.
- Raftery, M.J., Schwab, M., Eibert, S.M., Samstag, Y., Walczak, H., and Schönrich, G.** (2001). Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity* 15:997–1009.
- Ravetch, J. V, and Lanier, L.L.** (2000). Immune inhibitory receptors. *Science* 290:84–89.
- Rawlinson, W.D., Farrell, H.E., and Barrell, B.G.** (1996). Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* 70:8833–8849.

BIBLIOGRAFIA

- Reddehase, M.J., Weiland, F., Munch, K., Jonjic, S., Luske, A., and Koszinowski, U.H.** (1985). Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J. Virol.* 55:264–273.
- Redpath, S., Angulo, A., Gascoigne, N.R., and Ghazal, P.** (1999). Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages by induction of IL-10. *J. Immunol.* 162:6701–6707.
- Redwood, A., Shellam, G., and Smith, L.** (2013). Molecular evolution of murine cytomegalovirus genomes. In *Cytomegalovirus: From Molecular Pathogenesis to Intervention*, (Mainz, Germany), pp. 23–37.
- Reusch, U., Muranyi, W., Lucin, P., Burgert, H.G., Hengel, H., and Koszinowski, U.H.** (1999). A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J.* 18:1081–1091.
- Reusser, P., Riddell, S.R., Meyers, J.D., and Greenberg, P.** (1991). Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 78:1373–1380.
- Revilleza, M.J., Wang, R., Mans, J., Hong, M., Natarajan, K., and Margulies, D.H.** (2011). How the virus outsmarts the host: function and structure of cytomegalovirus MHC-I-like molecules in the evasion of natural killer cell surveillance. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011:1–12.
- Rölle, A., Mousavi-Jazi, M., Eriksson, M., Odeberg, J., Söderberg-Nauclér, C., Cosman, D., Kärre, K., and Cerboni, C.** (2003). Effects of human cytomegalovirus infection on ligands for the activating NKG2D receptor of NK cells: up-regulation of UL16-binding protein (ULBP)1 and ULBP2 is counteracted by the viral UL16 protein. *J. Immunol.* 171:902–908.
- Romero, X., Cañete, J.D., and Engel, P.** (2014). Determination of soluble tumor necrosis factor receptor 2 produced by alternative splicing. *Methods Mol. Biol.* 1155:187–199.
- Romo, N., Magri, G., Muntasell, A., Heredia, G., Baía, D., Angulo, A., Guma, M., and López-Botet, M.** (2011). Natural killer cell-mediated response to human cytomegalovirus-infected macrophages is modulated by their functional polarization. *J. Leukoc. Biol.* 90:717–726.
- Rudd, P.M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I.A., and Dwek, R.** (2001). Glycosylation and the Immune System. *Science* 291:2370–2376.
- Ryckman, B.J., Chase, M.C., and Johnson, D.C.** (2008). HCMV gH/gL/UL128-131 interferes with virus entry into epithelial cells: evidence for cell type-specific receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 37:14118–14123.
- Saborit-Villarroya, I., Del Valle, J.M., Romero, X., Esplugues, E., Lauzurica, P., Engel, P., and Martín, M.** (2005). The adaptor protein 3BP2 binds human CD244 and links this receptor to Vav signaling, ERK activation, and NK cell killing. *J. Immunol.* 175:4226–4235.
- Sacher, T., Mohr, C.A., Weyn, A., Schlichting, C., Koszinowski, U.H., and Ruzsics, Z.** (2012). The role of cell types in cytomegalovirus infection in vivo. *Eur. J. Cell Biol.* 1:70–77.
- Sambrook, J., and Russell, D.** (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*, (New York), pp.1483–1634.
- Schatzle, J.D., Sheu, S., Stepp, S.E., Mathew, P.A., Bennett, M., and Kumar, V.** (1999). Characterization of inhibitory and stimulatory forms of the murine natural killer cell receptor 2B4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:3870–3875.
- Schleiss, M.R.** (2006). Nonprimate models of congenital cytomegalovirus (CMV) infection: gaining insight into pathogenesis and prevention of disease in newborns. *ILAR J.* 47:65–72.

BIBLIOGRAFIA

- Schleiss, M.R.** (2008). Cytomegalovirus vaccine development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325:361–382.
- Shah, A.H., Sowrirajan, B., Davis, Z.B., Ward, J.P., Campbell, E.M., Planelles, V., and Barker, E.** (2010). Degranulation of natural killer cells following interaction with HIV-1-infected cells is hindered by downmodulation of NTB-A by Vpu. *Cell Host Microbe* 8:397–409.
- Shanley, J.D.** (1982). Ultraviolet irradiation of murine cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 63:251–254.
- Shin, J., and Abraham, S.** (2001). Glycosylphosphatidylinositol-anchored receptor-mediated bacterial endocytosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 197:131–138.
- Sintes, J., Engel, P., and Bastos, R.** (2011). SLAM family receptors and autoimmunity. In *autoimmune disorders - pathogenetic aspects*, (Rijeka, Croatia), pp. 53–72.
- Sinzger, C., Digel, M., and Jahn, G.** (2008). Cytomegalovirus cell tropism. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325:63–83.
- Slavuljica, I., Krmpotić, A., and Jonjić, S.** (2011). Manipulation of NKG2D ligands by cytomegaloviruses: impact on innate and adaptive immune response. *Front. Immunol.* 2:1–11.
- Smith, M.** (1954). Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 3:435–440.
- Smith, H.R., Heusel, J.W., Mehta, I.K., Kim, S., Dorner, B.G., Naidenko, O. V, Iizuka, K., Furukawa, H., Beckman, D.L., Pingel, J.T., et al.** (2002). Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:8826–8831.
- Smith, L.M., McWhorter, A.R., Shellam, G.R., and Redwood, A.J.** (2013). The genome of murine cytomegalovirus is shaped by purifying selection and extensive recombination. *Virology* 435:258–268.
- Stern-Ginossar, N., Elefant, N., Zimmermann, A., Wolf, D.G., Saleh, N., Biton, M., Horwitz, E., Prokocimer, Z., Prichard, M., Hahn, G., et al.** (2007). Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* 20:376–381.
- Stern-Ginossar, N., Gur, C., Biton, M., Horwitz, E., Elboim, M., Stanietsky, N., Mandelboim, M., and Mandelboim, O.** (2008). Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nat. Immunol.* 9:1065–1073.
- Stern-Ginossar, N., Weisburd, B., Michalski, A., Le, V.T., Hein, M.Y., Huang, S.X., Ma, M., Shen, B., Qian, S.B., Hengel, H., et al.** (2012). Decoding human cytomegalovirus. *Science* 338:1088–1093.
- Stinski, M., and Meier, J.** (2007). Immediate-early viral gene regulation and function. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, (New York, United States of America), pp. 241–263.
- Stoddart, C.A., Cardin, R.D., Boname, J.M., Manning, W.C., Abenes, G.B., and Mocarski, E.S.** (1994). Peripheral blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* 68:6243–6253.
- Stulnig, T.M.** (1997). Signal transduction via glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins in T cells is inhibited by lowering cellular cholesterol. *J. Biol. Chem.* 272:19242–19247.
- Sylwester, A.W., Mitchell, B.L., Edgar, J.B., Grabstein, K.H., Hosken, N.A., Kern, F., Nelson, J.A., Picker, L.J., Taormina, C., Pelte, C., et al.** (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus- specific CD4+ and CD8+T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J. Exp. Med.* 202:673–685.

BIBLIOGRAFIA

- Tang, Q., Murphy, E.A., and Maul, G.G.** (2006). Experimental confirmation of global murine cytomegalovirus open reading frames by transcriptional detection and partial characterization of newly described gene products. *J. Virol.* 80:6873–6882.
- Tangye, S., and Phillips, J.** (2000). Cutting edge: Functional requirement for SAP in 2B4-mediated activation of human natural killer cells as revealed by the X-linked lymphoproliferative syndrome. *J. Immunol.* 165:2932–2936.
- Tatsuo, H., Ono, N., and Yanagi, Y.** (2001). Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation Molecules (CD150) as cellular receptors. *J. Virol.* 75:5842–5850.
- Thorley-Lawson, D., Schooley, R., Bhan, A., and Nadler, L.** (1982). Epstein-Barr virus superinduces a new human B cell differentiation antigen (B-LAST 1) expressed on transformed lymphoblasts. *Cell* 30:415–425.
- Tomasec, P., Braud, V.M., Rickards, C., Powell, M.B., McSharry, B.P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L., McMichael, A.J., and Wilkinson, G.W.** (2000). Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 287:1031.
- Tomazin, R., Boname, J., Hegde, N., Lewinsohn, D., and Altschuler, Y.** (1999). Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway , preventing recognition by CD4+ T cells. *Nat. Med.* 5:1039–1043.
- Tomtishen, J.P.** (2013). Cytomegalovirus tegument proteins and the development of novel antiviral therapeutics. In *Manifestations of Cytomegalovirus Infection*, (Perth, Australia), pp. 111–131.
- Tournier, C., Hess, P., Yang, D., Xu, J., Turner, T., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S., Flavell, R., and Davis, R.** (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288:870–874.
- Trgovcich, J., Stimac, D., Polić, B., Krmpotić, A., Pernjak-Pugel, E., Tomac, J., Hasan, M., Wraber, B., and Jonjić, S.** (2000). Immune responses and cytokine induction in the development of severe hepatitis during acute infections with murine cytomegalovirus. *Arch. Virol.* 145:2601–2618.
- Tripathy, S.K., Smith, H.R., Holroyd, E.A., Pingel, J.T., and Yokoyama, W.M.** (2006). Expression of m157, a murine cytomegalovirus-encoded putative major histocompatibility class I (MHC-I) -like protein , is independent of viral regulation of host MHC-I. *J. Virol.* 80:545–550.
- Vaidya, S. V., and Mathew, P.** (2006). Of mice and men: different functions of the murine and human 2B4 (CD244) receptor on NK cells. *Immunol. Lett.* 105:180–184.
- Veillette, A.** (2006). NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adapters. *Immunol. Rev.* 214:22–34.
- Veillette, A.** (2010). SLAM-family receptors: immune regulators with or without SAP-family adaptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:1–15.
- Velardi, A.** (2012). Natural revenge over cytomegalovirus. *Blood* 119:2438–2439.
- Vidal, S., Krmpotić, A., Pyzik, M., and Jonjić, S.** (2013). Innate immunity to cytomegalovirus in the murine model. In *Cytomegalovirus: From Molecular Pathogenesis to Intervention*, (Mainz, Germany), pp. 192–214.
- Vink, C., Beuken, E., and Bruggeman, C.A.** (2000). Complete DNA sequence of the rat cytomegalovirus genome. *J. Virol.* 74:7656–7665.
- Waggoner, S., and Taniguchi, R.** (2010). Absence of mouse 2B4 promotes NK cell-mediated killing of activated CD8+ T cells, leading to prolonged viral persistence and altered pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 120:1925–1938.

BIBLIOGRAFIA

- Wagner, F.M., Brizic, I., Prager, A., Trsan, T., Arapovic, M., Lemmermann, N., Podlech, J., Reddehase, M.J., Lemnitzer, F., Bosse, J.B., et al.** (2013). The viral chemokine MCK-2 of murine cytomegalovirus promotes infection as part of a gH/gL/MCK-2 complex. *PLoS Pathog.* 9:e1003493.
- Wagner, M., Jonjic, S., Koszinowski, U.H., and Messerle, M.** (1999). Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J. Virol.* 73:7056–7060.
- Wagner, M., Gutermann, A., Podlech, J., Reddehase, M.J., and Koszinowski, U.H.** (2002). Major Histocompatibility Complex Class I Allele-specific Cooperative and Competitive Interactions between Immune Evasion Proteins of Cytomegalovirus. *J. Exp. Med.* 196:805–816.
- Ward, J., Bonaparte, M., Sacks, J., Guterman, J., Fogli, M., Mavilio, D., and Barker, E.** (2007). HIV modulates the expression of ligands important in triggering natural killer cell cytotoxic responses on infected primary T-cell blasts. *Blood* 110:1207–1214.
- Watzl, C., Stebbins, C., and Long, E.** (2000). Cutting edge: NK cell inhibitory receptors prevent tyrosine phosphorylation of the activation receptor 2B4 (CD244). *J. Immunol.* 4:2–6.
- White, E., and Spector, D.** (2007). Early CMV gene expression and function. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, (New York, United States of America), pp. 264–294.
- Wilkinson, G.W.G., Tomasec, P., Stanton, R.J., Armstrong, M., Prod'homme, V., Aicheler, R., McSharry, B.P., Rickards, C.R., Cochrane, D., Llewellyn-Lacey, S., et al.** (2008). Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J. Clin. Virol.* 41:206–212.
- Yang, Z., and Bjorkman, P.J.** (2008). Structure of UL18, a peptide-binding viral MHC mimic, bound to a host inhibitory receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:10095–10100.
- Ye, F., and Zhang, M.** (2013). Structures and target recognition modes of PDZ domains: recurring themes and emerging pictures. *Biochem. J.* 455:1–14.
- Ziegler, H., Tha, R., Lucin, P., Muranyi, W., Flohr, T., Hengel, H., Farrell, H., Rawlinson, W., Koszinowski, U.H., and Institut, M.V.P.** (1997). A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC / cis -golgi compartments molecules induced by the MCMV. *Immunity* 6:57–66.

ANEXOS



X.2 ANEXO 2. ANÁLISIS DE LA COLA CITOPLASMÁTICA DE m154

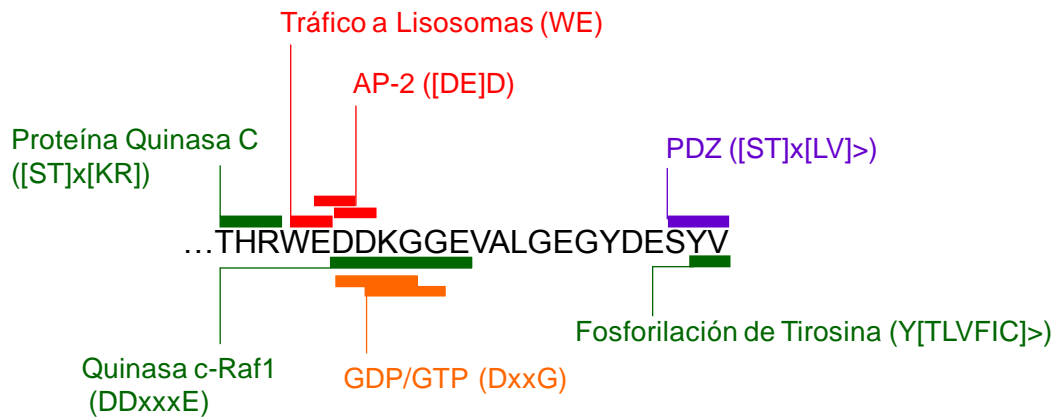


Figura Anexo 2. Motivos asociados a la cola citoplasmática de m154

Secuencia de la cola citoplasmática de m154 donde se muestran los posibles motivos de interacción a proteínas celulares, modificaciones postraduccionales o tráfico de proteínas, identificadas mediante el programa Minimotif Miner 3.0 (Mi *et al.*, 2012).

X.3 PUBLICACIÓN

Cytomegalovirus m154 Hinders CD48 Cell-Surface Expression and Promotes Viral Escape from Host Natural Killer Cell Control

Angela Zarama, Natalia Pérez-Carmona, Domènec Farré, Adriana Tomic, Eva Maria Borst, Martin Messerle, Stipan Jonjic, Pablo Engel and Ana Angulo. PLoS Pathogen. 2014.10:e1004000.