

**TÍTULO:** *STUDY OF NOVEL PRO-VIRAL ACTIVITIES OF NON-STRUCTURAL PROTEIN 1 (NS1) OF INFLUENZA A VIRUS*

**AUTORA:** DÑA. SADAF ASLAM

**PROGRAMA DE DOCTORADO:** CIENCIAS DE LA SALUD

**ACTO Y FECHA DE LECTURA:** EL ACTO PÚBLICO DE DEFENSA DE TESIS SE DESARROLLARÁ EL DÍA 9 DE MARZO DE 2026, A LAS 14:00 HORAS DE MANERA TELEMÁTICA

**DIRECTORES:** DR. D. JUAN AYLLÓN BARASOAIN  
DR. D. ADOLFO GARCÍA-SASTRE

**TRIBUNAL:** DR. D. STEPHAN LUDWIG  
DRA. DÑA. CARMEN ELENA GÓMEZ RODRÍGUEZ  
DRA. DÑA. MARÍA ISABEL MUÑOZ-BARROSO

**RESUMEN:** La proteína no estructural 1 (NS1) del virus de la gripe A desempeña una amplia variedad de funciones provirales en la célula infectada, mediando principalmente la evasión de la respuesta inmune innata del huésped al actuar como el principal antagonista viral del sistema de interferón. Sin embargo, entre las múltiples interacciones descritas para esta pequeña proteína multifuncional, existen varias cuya relevancia biológica sigue siendo desconocida, como la capacidad de NS1 para unirse y activar las fosfatidilinositol 3-quinasas (PI3Ks) de clase IA. Las PI3Ks son quinasas lipídicas altamente reguladas que actúan como nodos críticos en múltiples redes de señalización celular y regulan la fisiología celular, incluyendo la diferenciación, el crecimiento, la supervivencia, el tráfico y la función inmunológica. Por todo ello, las PI3Ks también son protooncogenes importantes cuya desregulación está detrás de un número considerable de distintos tipos de cáncer humano. Estructuralmente, las PI3Ks de clase IA son heterodímeros formados por una subunidad reguladora (p85) y una subunidad catalítica (p110), de las cuales se han descrito varias isoformas, lo que añade niveles adicionales de complejidad a su actividad. La activación de PI3K por NS1 se da mediante su unión a la subunidad p85. Es relevante que esta unión es específica para la isoforma p85 $\beta$ , y se asume que cualquier heterodímero de PI3K que contenga p85 $\beta$  es activado por NS1, independientemente de su p110. No obstante, aún se desconoce el significado de esta especificidad por p85 $\beta$ , así como las contribuciones de las diferentes isoformas de p110.

Con el fin de comprender mejor las consecuencias de la activación de PI3K por NS1, hemos desarrollado un ensayo de complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC, por sus siglas en inglés) para rastrear selectivamente los distintos heterodímeros de PI3K según sus isoformas reguladoras y catalíticas específicas, así como para evaluar su comportamiento durante la activación. Usando este sistema, encontramos que NS1 induce una reubicación y activación específica por isoforma de los distintos heterodímeros de PI3K. Los efectos de otros activadores conocidos de PI3K, como Ras y Src, fueron distintos a los inducidos por NS1. Observamos que mutaciones oncogénicas hiperactivadoras clínicamente relevantes, tanto en las subunidades

catalíticas como en las reguladoras de PI3K, reproducen el efecto causado por NS1 y rescatan parcialmente la pérdida de capacidad replicativa en virus recombinantes que codifican una versión de NS1 deficiente en la unión a p85 $\beta$ . Proponemos que, al imitar una desregulación oncogénica de la vía de PI3K en la célula infectada, el virus de la gripe A induce un estado transitorio similar al de una célula transformada para estimular su replicación.

**PALABRAS CLAVE:** *Virus de la gripe A, Proteína no estructural 1 (NS1), Fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), Complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC), Oncogénesis.*

The non-structural protein 1 (NS1) of influenza A virus performs a broad variety of pro-viral activities in the infected cell, primarily mediating evasion from the host innate immune response by being the main viral interferon antagonist. However, among the multiple interactions described for this small multifunctional protein, there are several whose biological relevance remains obscure, such as the ability of NS1 to bind and activate class IA phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks). PI3Ks are highly regulated lipid kinases that act as critical nodes in multiple cell signaling networks and regulate cellular physiology, including differentiation, growth, survival, trafficking, and immune function. As such, PI3Ks are also important proto-oncogenes whose deregulation lies behind a substantial number of different human cancers. Structurally, class IA PI3Ks are heterodimers formed by a regulatory (p85) and catalytic (p110) subunit, of which there are several isoforms described, adding further layers of complexity to their activity. Activation of PI3K by NS1 is mediated by NS1 binding to the p85 subunit. Interestingly, such binding is specific to the p85 $\beta$  isoform, and PI3K heterodimers containing p85 $\beta$  and any of the other three p110 isoforms are presumably activated by NS1. However, the significance of this p85 $\beta$  specificity, and the contributions of different p110 isoforms, remains unknown.

In order to better understand the consequences of PI3K activation by NS1, we have developed a bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay to selectively track the different PI3K heterodimers according to their specific regulatory and catalytic isoforms, as well as to assess their behavior upon activation. Using this system, we found that NS1 induces an isoform-specific relocation and activation of the different PI3K heterodimers. However, the effects of other known activators of PI3K, such as Ras and Src, were different from those induced by NS1. We found that clinically relevant, oncogenic hyper-activating mutations in both catalytic and regulatory subunits of PI3K could mimic the effect caused by NS1 and partially rescued the loss of viral fitness in a recombinant virus encoding a p85 $\beta$ -binding deficient NS1. We postulate that by mimicking an oncogenic deregulation of the PI3K pathway, influenza A virus induces a transient, transformed-like status in the infected cell to stimulate virus replication

**KEYWORDS:** *Influenza A virus, Non-structural protein 1 (NS1), Phosphoinositide-3-kinase (PI3K), Bimolecular fluorescence complementation (BiFC), Oncogenesis.*