

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

**REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN DE
mRNAs VIRALES Y CELULARES.
EFECTO DE PROTEASAS VIRALES**

TESIS DOCTORAL

Pablo Moral López

Madrid, 2015

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el **Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”**, bajo la dirección del Dr. Luis Carrasco Llamas, con una beca FPU (AP2009-0982) otorgada por el Ministerio de Educación y Ciencia.

AGRADECIMIENTOS

Ninguna de estas letras existiría sin la infinita paciencia y ayuda de Luis. Además de agradecerle la oportunidad de trabajar en su equipo debo agradecerle su ejemplo.

Es imposible no estar agradecido a la enorme ayuda desinteresada de Miguel Ángel, desde el principio hasta el final. Sin él, no sabría ni manejar una pipeta. El resto de compañeros del laboratorio me han dado la ayuda y alegría que he necesitado constantemente; gracias Diana, Ester, Manuel y súper-Ruth además de Kike y Alfredo, que han tenido que hacer de hermanos mayores. Alfonso, el compañero de la sonrisa eterna. Guarnier, que sin ella me habría vuelto loco más de una vez y José y sus cafés.

Fuera del laboratorio, lejos de probetas y penumbras, mucha gente, a veces queriendo y otras sin querer, me han dado la fuerza y apoyo que he necesitado. A todos los amigos les tengo que agradecer su apoyo.

Mi familia, siempre ha estado ahí; mi madre con su cariño, ternura y comprensión, mi padre con su apoyo sin condición, mi hermano del que hay mucho que aprender. Sin olvidarme de la prima Mónica, que me enseñó que era aquello de la ciencia. Mis abuelos que me enseñaron que la grandeza de las personas no se puede medir en títulos ni diplomas. Mi abuela Teresa, mi enciclopedia particular. Mis cuñados Nota y Cris, que son maravillosos.

Por último, Ana, mi Ana, mi compañera de aventuras, sin ella todo sería muy aburrido.

ÍNDICE

ÍNDICE

SUMMARY

RESUMEN EN INGLÉS (SUMMARY)	1
------------------------------------	----------

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN	2
1. MECANISMOS DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN LA CÉLULA EUCARIOTA	3
1.1. Mecanismo canónico de la iniciación	3
1.2. Mecanismo de traducción independiente de cap o no canónico	6
1.3. Regulación del inicio de la traducción	6
2. SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE PICORNAVIRUS	7
2.1. Proteasas de picornavirus	8
2.2. IRES de picornavirus	9
3. SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE HIV-1	10
3.1. La proteasa HIV-1	12
3.2. La proteína Rev de HIV-1	12
3.3. El IRES de HIV-1	12
4. APLIDINA: UN PROMETEDOR AGENTE ANTITUMORAL	13
4.1. El factor de elongación EF1A2	14

OBJETIVOS

OBJETIVOS	15
------------------	-----------

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS	16
1. MATERIAL BIOLÓGICO	16
1.1. Líneas celulares	16
1.2. Virus	17
1.3. Bacterias	17
1.4. Plásmidos	17
1.5. Oligonucleótidos	20
1.6. Proteínas y péptidos	20
2. MATERIAL NO BIOLÓGICO	20
2.1. Sueros y anticuerpos	20
2.2. Inhibidores	22
3. MANIPULACIÓN DE CÉLULAS BACTERIANAS	22
3.1. Mantenimiento y cultivo de E. coli	22
3.2. Transformación de bacterias	23
3.3. Purificación de DNA plasmídico	23
4. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	23
4.1. Recombinación de DNA	23
4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
4.3. Electroforesis en gel de agarosa	24
4.4. Transcripción in vitro	24
4.5. RT-PCR a tiempo real	24
4.6. Traducción in vitro	25
5. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	25
5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida	25
5.2. Fluorografía	26
5.3. Inmunodetección de proteínas mediante western blot	26
5.4. Análisis de interacciones en extractos mediante cromatografía de afinidad en condiciones nativas	26
5.5. Ensayo de interacciones directas mediante Slot blot	27
5.6. Ensayo de interacción de dominios por PepSpot	27
5.7. Coimmunoprecipitación	28

5.8. Medida de actividad de la luciferasa	28
5.9. Purificación de proteínas en condiciones nativas	28
6. MANIPULACIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS	28
6.1. Mantenimiento y cultivo celular	28
6.2. Expresión transitoria en células	29
6.3. Marcaje metabólico de proteínas	29
RESULTADOS	
<hr/>	
RESULTADOS	30
1. EFECTO DE FMDV L^{pro} SOBRE LA TRADUCCIÓN DIRIGIDA POR IRESs DE PICORNAVIRUS	30
1.1. Estimulación por FMDV L ^{pro} sobre el IRES de FMDV y traducción eIF2 independiente	30
1.2. Efecto de FMDV L ^{pro} sobre la traducción dirigida por el IRES de FMDV in vitro	35
1.3. Efecto de los iones monovalentes sobre la traducción dirigida por los IRESs de picornavirus	40
2. ESTUDIO DE LOS REQUERIMIENTOS DE FACTORES DE INICIACIÓN PARA LA TRADUCCIÓN DE LOS mRNAs DEVIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO I (HIV-1)	45
2.1. Bloqueo del inicio de la traducción cap y poli(A) dependiente por HIV-1 PR	45
2.2. Rescate de la traducción poli(A) dependiente en extractos de HeLa	49
2.3. Efecto de HIV-1 PR sobre la traducción de mRNA genómico de HIV-1	50
2.4. Requerimiento de eIF4GI para la traducción de los mRNAs de HIV-1 a tiempos tempranos y tardíos	52
2.5. Efecto de las proteasas FMDV L ^{pro} y HRV 2A ^{pro} sobre la traducción del mRNA _g de HIV-1 en RRL	53
2.6. Estudio de la proteína HIV-1 Rev sobre la traducción del mRNA _g de HIV-1	55
2.7. Interacción de HIV-1 Rev con factores de iniciación celulares	57
3. EFECTO DE LA APLIDINA EN LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS	64
3.1. Efecto de la aplidina sobre la traducción en un sistema libre de células	64

3.2. Efecto de la aplidina sobre la traducción celular en células HeLa	65
3.3. Efecto de la aplidina sobre la traducción celular en líneas HeLa resistentes al compuesto	66
3.4. Estudio de la aplidina sobre la síntesis de proteínas virales.	68
3.5. Participación del eIF2 en la inhibición por aplidina	70
3.6. Efecto de la aplidina sobre la traducción de mRNAs dirigida por IRESs	71
3.7. Estudio del efecto de la aplidina en células Hap-1 eEF1A2-	72

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN	76
1. TRADUCCIÓN DIRIGIDA POR LOS IRESs DE PICORNAVIRUS EN AUSENCIA DE eIF2 ACTIVO	76
2. REQUERIMIENTO DE FACTORES PARA LA TRADUCCIÓN DIRIGIDA POR EL IRES DE HIV-1	79
3. EFECTO DE LA APLIDINA SOBRE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS	84

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES	87
---------------------	-----------

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS	89
---------------------	-----------

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA	91
---------------------	-----------

ANEXO

ANEXO	105
--------------	------------

SUMMARY

RESUMEN EN INGLÉS (SUMMARY)

Success of viral infection relies on the viral ability to overcome host antiviral response at the same time that their mRNAs hijack components of the translation machinery including ribosomes. Some viruses have developed the ability to bypass cellular antiviral response and optimize viral protein synthesis by inhibiting host translation. In the case of picornaviruses and human immunodeficiency virus type 1, this ability relies on viral proteases that cleave host initiation factors required for cellular but not viral mRNA translation. For example, picornavirus proteases 2A^{pro} and L^{pro} are able to block cellular translation by cleavage of eIF4GI. Under these conditions, and considering that picornavirus mRNAs utilize internal ribosome entry site (IRES) sequences to promote non canonical translation, viral mRNAs have a clear advantage over host mRNAs for ribosome association. HIV-1 mRNAs also contain an IRES sequence that is able to promote translation when HIV-1 protease (PR) cleaves eIF4GI and PABP impairing canonical translation. Strikingly, both picornavirus and HIV-1 mRNAs are translated using a dual mechanism for the initiation of translation with different factor requirements depending on the progress of the infection. In the case of picornaviruses, proteases 2A^{pro} and L^{pro} confer independence for eIF2 during translation of viral mRNAs while in the case of HIV-1 mRNAs, Rev protein could hijack host translation initiation factors and reconstruct an alternative eIF4F complex enabling an efficient late viral protein synthesis.

Disruption of cations gradient is also associated to viral infection. Increase of K⁺ in the cytoplasm blocks canonical translation while stimulates picornavirus protein synthesis. Notably, optimal K⁺ concentration for picornavirus mRNA translation in *in vitro* systems confers independence of eIF2 whereas enhances the requirements for helicase eIF4A, suggesting a robust conformation of mRNA that increments the affinity for ribosomes but impedes translation in the absence of the helicase activity.

Finally, the anti-cancer compound aplidin strongly inhibits cellular protein synthesis with the exception of a HeLa cell line with low levels of elongation factor eEF1A2. On the other hand, aplidin does not have significant impact on late protein synthesis of Sindbis virus or vesicular stomatitis virus and neither on translation driven by the intergenic IRES of cricket paralysis virus. Therefore, as cellular and viral translation differ mainly in the requirements of initiation factors, aplidin presumably inhibits by some mechanism the initiation step of translation of cellular mRNAs.

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

La decodificación de la información genética en un producto peptídico funcional es un proceso tremendamente complejo y muy regulado. Este proceso, denominado traducción, está dividido en tres etapas básicas: iniciación, elongación y terminación. La etapa de la iniciación es la más regulada y el acceso a esta, el objetivo prioritario de los virus.

El campo de estudio de los mecanismos y estrategias empleados por los virus para acceder a la maquinaria de traducción celular es de gran relevancia científica y ha generado una enorme cantidad de novedades en los últimos años. Algunos ejemplos de mecanismos virales que resultan especialmente interesantes son el cambio de fase de lectura (*frameshifting*) y la selección fallida del AUG iniciador (*leaky scanning*), que permiten compactar la información en genomas reducidos manteniendo un tamaño funcional del genoma y proporcionando buenos niveles de síntesis de enzimas y proteínas estructurales, como en el caso de virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) (Brierley, 1995; Ryabova et al., 2006). Los *Upstream Open Reading Frame* (UORF) del virus del Ébola (EBOV) modulan la síntesis de proteínas y la replicación en función del estado de fosforilación del eIF2, permitiendo la adaptación a las condiciones celulares (Shabman et al., 2013). También resultan especialmente interesantes las secuencias IRESs (*Internal Ribosome Entry Site*), que permiten dirigir la traducción con bajos requerimientos de factores y que fueron descritas por primera vez en picornavirus (Pelletier and Sonenberg, 1988). Además, se han descrito proteínas virales capaces de sustituir componentes de la maquinaria de traducción, como en el caso de la proteína N de hantavirus (Mir and Panganiban, 2008). En este campo, nuestro grupo de investigación ha realizado interesantes aportes de relevancia, como la descripción de proteínas virales que confieren independencia del eIF2 (Moral-López et al., 2014; Redondo et al., 2011), la iniciación en codones alternativos en función del estado de fosforilación del eIF2 (García-Moreno et al., 2015), la inhibición de la traducción celular por HIV-1 PR (Castelló et al., 2009a) o mecanismos duales de traducción (Ventoso et al., 2001) viral con diferentes requerimientos de factores en función de la fisiología celular (Sanz et al., 2009). Esta tesis pretende continuar las aportaciones de nuestro grupo al descubrimiento de nuevas estrategias y mecanismos que permiten la

adaptación de ciertos virus a la dinámica de infección y que contribuyen en última instancia al éxito de cada virus en particular. Nos centraremos en la capacidad de la proteasa de FMDV L^{pro} para estimular y conferir independencia del eIF2 no solo a la traducción dirigida por el IRES de FMDV, sino a otros IRESs de picornavirus. Evaluaremos el papel de los cambios iónicos en la capacidad de traducción de los mRNAs de picornavirus y su papel en la síntesis de proteínas en condiciones restrictivas. Además, estudiaremos los requerimientos de los mRNAs de HIV-1 para su traducción, así como el mecanismo, hasta ahora desconocido, que emplea la proteína HIV-1 Rev para potenciar la síntesis de proteínas virales. Por último, gracias a la experiencia obtenida en la investigación de la traducción, examinaremos el mecanismo por el cual un prometedor fármaco antitumoral inhibe de manera selectiva la síntesis de proteínas en ciertas células.

1. MECANISMOS DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN LA CÉLULA EUCARIOTA

En la célula eucariota se pueden identificar dos mecanismos generales de traducción: la traducción canónica, que implica a todos los factores de la maquinaria de traducción junto a la estructura *cap* y la cola de poli(A) del mRNA, y que es la más común, y el mecanismo de iniciación interna de la traducción, con bajos niveles de requerimiento de factores de iniciación (Jackson et al., 2010; Pisarev et al., 2005). Ambos mecanismos pueden ser empleados por la propia célula y por los virus (Hellen and Sarnow, 2001), y su uso podrá depender del contexto celular.

1.1. Mecanismo canónico de la iniciación

El mecanismo canónico de la traducción se basa en el reconocimiento de la estructura *cap* (m⁷GpppN) localizada en el extremo 5' del mRNA por el factor de iniciación eIF4E, por lo que a esta traducción también se la denomina *cap* dependiente. La proteína de unión a *cap* eIF4E interacciona con la proteína de andamiaje eIF4GI, que a su vez se une a la helicasa eIF4A; entre las tres forman el complejo eIF4F. El factor eIF4G es capaz de interactuar también con la proteína de unión a la cola de poli(A) (PABP), de manera que el complejo eIF4F interacciona con el mRNA a través de *cap* en

el extremo 5' y con la cola de poli(A) en el extremo 3'. Al interactuar el mRNA por sus extremos con el eIF4F, adopta una conformación circular, de manera que cuando el ribosoma llega al final de la secuencia se encuentra de nuevo con el principio, lo que se conoce como reciclado del ribosoma, incrementando así la eficacia de traducción (Kahvejian et al., 2001). En paralelo, la proteína eIF2 reconoce y se une al tRNA iniciador unido a metionina (tRNA_i-Met) y a una molécula de GTP, formando el complejo ternario (Met-tRNA_i-eIF2-GTP). Junto con eIF1, eIF1A, eIF5 y eIF3, el complejo ternario se une a la subunidad ribosómica 40S y forma así el complejo de preiniciación 43S (Lorsch and Dever, 2010). En este punto, la proteína de andamiaje eIF4GI vuelve a tomar protagonismo interactuando a través de su dominio central con el factor eIF3, uniendo el complejo eIF4F al complejo de preiniciación 43S. De esta manera, el extremo 5' del mRNA queda expuesto a la subunidad ribosómica 40S, la cual inicia el *scanning* o escaneado del RNA mientras la helicasa eIF4A desenrolla la estructura secundaria del RNA hasta encontrar el AUG iniciador (Asano and Sachs, 2007; Preiss and W Hentze, 2003). En este momento, mediante el apareamiento de bases, el tRNA_i-Met reconoce el AUG y se establece el complejo de iniciación 48S. A continuación se dispara un conjunto de eventos que remodela el complejo ribosómico, como la hidrólisis de GTP-eIF2 por eIF5 (Jackson et al., 2010) o la expulsión de todos los factores del complejo 48S, a excepción de eIF5 y eIF1, así como la interacción con la subunidad 60S, promovida por eIF5B-GTP (Pestova et al., 2000), y que culmina con la unión del Met-tRNA_i al sitio P del ribosoma 80S. En este punto finaliza la fase de iniciación de la traducción y da comienzo la fase de elongación. Mientras tanto, el GDP-eIF2 debe ser reciclado por el eIF2B para mantener la disponibilidad de GTP-eIF2 para futuros eventos de iniciación.

Existen variantes para este tipo de iniciación de la traducción que difieren en el *scanning*, como el *leaky scanning* o el *shunting*; sin embargo, al requerir la estructura *cap*, se engloban dentro de la iniciación canónica o *cap* dependiente.

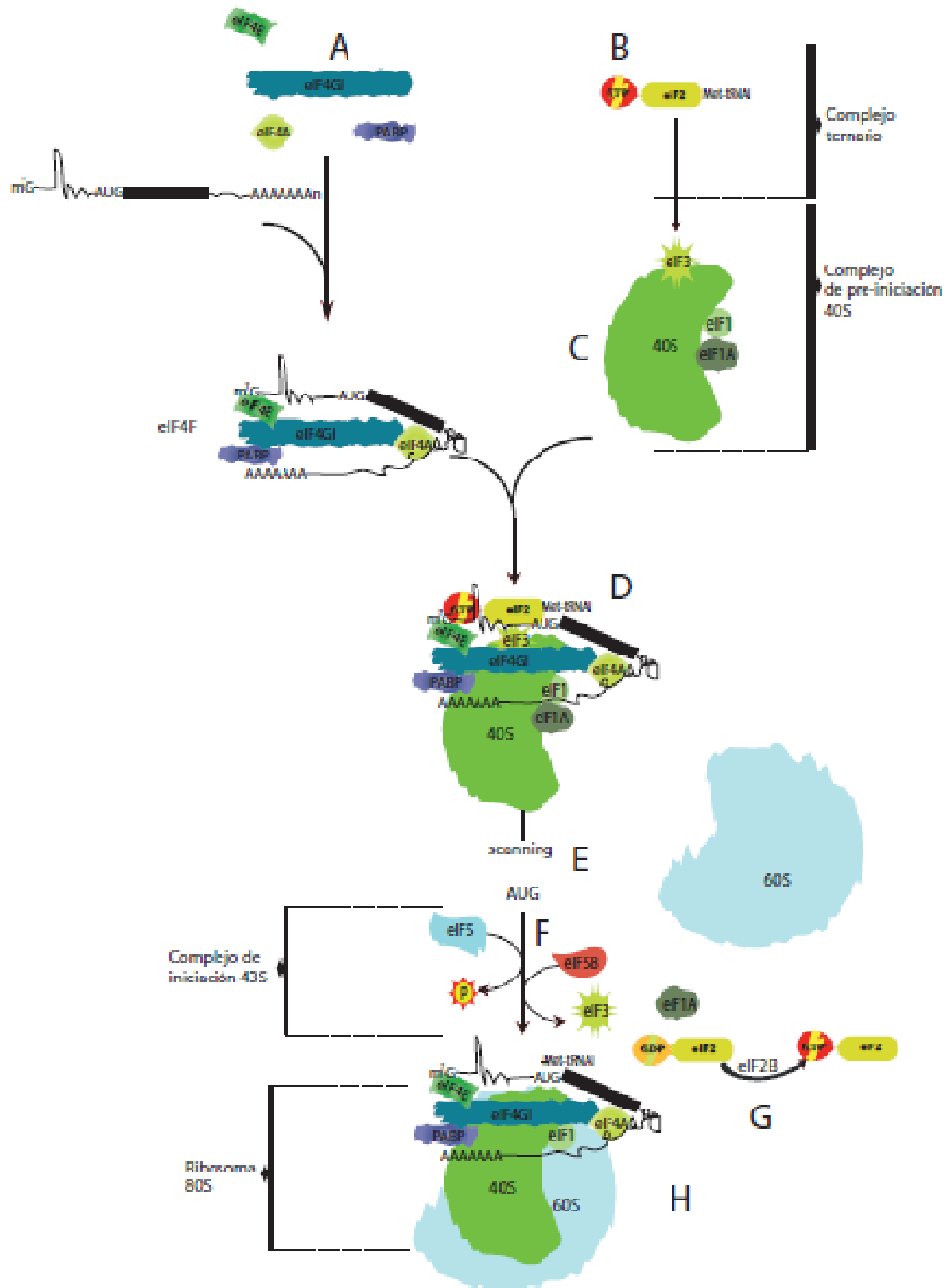


Figura 1. Representación esquemática del mecanismo de iniciación de la traducción.

A) Los factores eIF4G1, eIF4A y eIF4E forman el complejo eIF4F, que junto con PABP reconoce los extremos 5' y 3' del mRNA. B) Se forma el complejo ternario Met-tRNA_i-eIF2-GTP. C) A través de eIF3, el complejo ternario se une a la subunidad ribosómica 40S junto con eEF1 y eEF1B para formar el complejo de preiniciación 43S. D) A través de eIF3, se une el complejo eIF4F junto con el mRNA al 43S. E) Se inicia el *scanning* hasta llegar al AUG. F) eIF5 hidroliza el GTP del complejo ternario con la consecuente salida de fosfato inorgánico. A continuación eIF5B promueve la salida de factores y la asociación de la subunidad ribosómica 60S. G) El eIF2-GDP es reciclado por eIF2B para una nueva iniciación. H) Una vez formado el ribosoma 80S, da inicio la etapa de elongación.

1.2. Mecanismo de traducción independiente de *cap* o no canónico

Algunos mRNAs celulares y virales son capaces de iniciar la traducción de un modo alternativo en el que no están implicadas la estructura *cap*, ni el *scanning*, ni ciertos factores de iniciación. Este fenómeno reside en las secuencias IRESs localizadas en las regiones 5'UTR de los mRNAs. El mecanismo consiste en la aproximación del AUG iniciador directamente al ribosoma (Jackson et al., 2010), y aunque fue descubierto en el virus de la encefalomiocarditis (EMCV) (Pelletier and Sonenberg, 1988), actualmente se han caracterizado en multitud de mRNAs virales y celulares. Dada su diversidad en origen, estructura y función, se ha realizado una clasificación de los IRESs teniendo en cuenta estas variables (Balvay et al., 2009; Belsham, 2009). Atendiendo a su origen, se pueden dividir en IRESs celulares o virales, y en el caso de los virales se subdividen en IRES de picornavirus, IRES de flavivirus, IRES de retrovirus e IRES de dicistrovirus. Según Balvay y col., en el caso de los IRESs de picornavirus se pueden clasificar a su vez por su estructura y función en clase I (HRV y PV), clase II (EMCV y virus de la fiebre aftosa (FMDV)), clase III (virus de la hepatitis A (HAV)) y clase IV (teschovirus porcino) (Balvay et al., 2009). Los requerimientos de factores varían para cada tipo y clase, aunque en general la traducción dirigida por los IRESs virales no requiere de eIF4E o eIF4GI intacto, pero suelen requerir factores como el eIF4A, el eIF2, el eIF1 y especialmente el eIF3. En el caso de los IRESs de picornavirus de clase I y II, se había descrito que requieren el factor eIF2 activo; sin embargo, estudios recientes realizados por nuestro grupo han demostrado lo contrario (Moral-López et al., 2014; Redondo et al., 2011; Welnowska et al., 2011). Estos requerimientos pueden ser modulados por factores transactivadores (ITAFS) como HuR o Ago2 (Lin et al., 2015). Por tanto, existe una gran variabilidad de requerimientos que, además, está sujeta a nuevos descubrimientos.

Existe otro mecanismo de traducción alternativo a la estructura *cap* y a las secuencias IRESs descubierto en ciertos virus de plantas. En este caso la traducción está dirigida por secuencias CITEs comúnmente localizadas en el extremo 3' del mRNA viral (Simon and Miller, 2013).

1.3. Regulación del inicio de la traducción

Las células eucariotas han desarrollado mecanismos para responder a los diferentes estímulos externos e internos, tales como hormonas, factores de crecimiento,

estrés celular o infecciones virales, que conllevan la modificación de la síntesis de proteínas. La fosforilación de ciertos factores del inicio de la traducción representa un mecanismo recurrente y eficaz. Así, por ejemplo, la fosforilación de 4E-BP disminuye su afinidad por eIF4E, lo que permite la unión de este al eIF4GI y a la estructura *cap*, y promueve el inicio de la traducción (Sonenberg and Gingras, 1998). Por el contrario, la fosforilación de la subunidad α del eIF2 opera inhibiendo el inicio de la traducción. El factor eIF2 es un elemento fundamental en el control del inicio de la traducción y en este sentido se encuentra regulado por cuatro quinasas que responden a diferentes estímulos fosforilando la serina 51 de la subunidad α del eIF2 (de Haro et al., 1996); HRI responde a la privación de hierro durante la formación del grupo hemo, además de al choque térmico o a la presencia de arsenito sódico (McEwen et al., 2005). La quinasa PKR se activa en presencia de RNA de doble cadena, lo que permite emplear poli(I:C) para su activación. PERK responde ante el estrés del retículo, siendo sensible a la taspigargina, mientras que GCN2 se activa ante la privación de nutrientes. La fosforilación de eIF2 aumenta su afinidad por eIF2B, por lo que se convierte en un inhibidor por competición que bloquea el intercambio GDP-GTP. Además, al ser el eIF2B un factor limitante en la célula, es posible bloquear su actividad por completo sin fosforilar todo el eIF2 celular (Dever et al., 1995). Estas quinasas son sensibles a los efectos asociados a la infección viral, por lo que los virus han desarrollado diferentes estrategias para enfrentarse a este impedimento. Un ejemplo curioso es el CrPV, cuyo IRES intergénico es capaz de dirigir la traducción de manera eficaz cuando eIF2 está fosforilado (Hertz and Thompson, 2011).

2. SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE PICORNAVIRUS

La familia *picornaviridae* está compuesta por un nutrido grupo de virus pertenecientes a 12 géneros diferentes. Su información está codificada en una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva con una secuencia IRES en el extremo 5' y cola de poli(A) en el extremo 3'. El RNA viral se traduce en la fase temprana de la infección generando una poliproteína que contiene las proteínas estructurales en la mitad amino y las no estructurales en la mitad carboxilo. La proteasa 2A ($2A^{pro}$) hace de frontera entre las proteínas estructurales y no estructurales, de manera que al hidrolizar su extremo amino terminal libera el precursor P1 que contiene las proteínas estructurales. A su vez, la proteasa 3C ($3C^{pro}$), mediante hidrólisis, libera los precursores P2 y P3. En el caso de

los aftovirus, este procesamiento lo realiza la proteasa líder (L^{pro}). A partir de este punto las proteasas procesan los tres precursores, lo que da lugar al resto de proteínas virales y permite el inicio de la replicación viral. Tras esta etapa comienza la fase tardía de infección y la traducción canónica queda inhibida por el corte de factores de la iniciación por las proteasas virales y por la fosforilación de eIF2 como respuesta antiviral (Redondo et al., 2011). Dado que las proteínas no estructurales son necesarias para la replicación, esta está supeditada a una síntesis eficaz de proteínas virales (Almela et al., 1991). Finalmente, la viroporina 2B y el precursor 2BC inducen cambios en la permeabilidad de la membrana celular que promueven la liberación de las partículas virales (Aldabe et al., 1996).

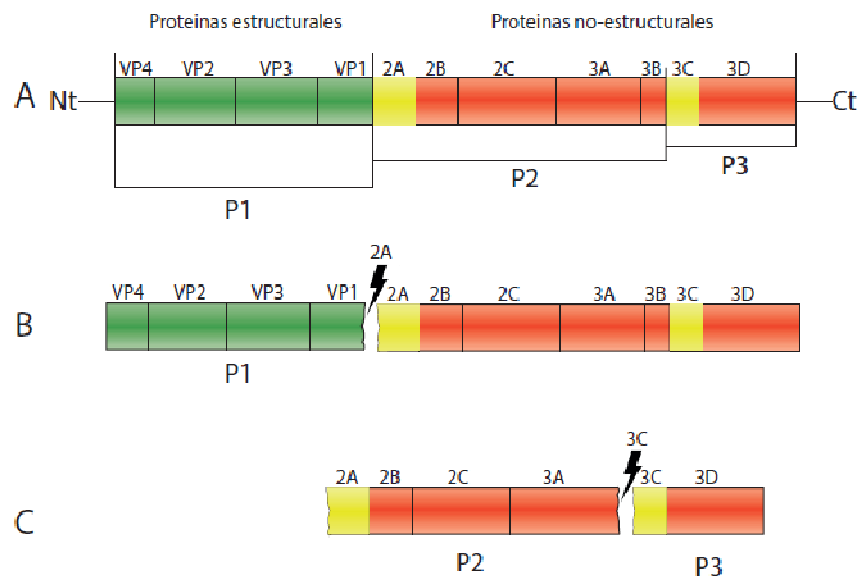


Figura 2. Representación esquemática del procesamiento de la poliproteína de picornavirus.

A) Poliproteína viral en la que se identifican la región de proteínas estructurales en verde y las no estructurales en rojo. Además, se incluyen en amarillo las proteasas virales $2A^{pro}$ y $3C^{pro}$. B) Productos generados por la proteólisis de $2A^{pro}$. C) Productos generados por la actividad catalítica de $3C^{pro}$.

2.1. Proteasas de picornavirus

Como ya se ha visto, las proteasas virales tienen un papel fundamental en el procesamiento de la poliproteína viral, pero además tienen un profundo impacto sobre la fisiología celular. Tanto $2A^{pro}$ como L^{pro} tienen un rol limitado en el procesamiento de las proteínas virales y su principal campo de acción es el del metabolismo de proteínas celulares. Estas dos proteasas son herramientas fundamentales en la estrategia viral por el control de la maquinaria de traducción y en la evasión de la respuesta antiviral (de Los

Santos et al., 2006; Glaser and Skern, 2000). Ambas proteasas están presentes en diferentes picornavirus, pero las más estudiadas son la 2A^{pro} de PV y la L^{pro} de FMDV. La proteasa 2A^{pro} de PV hidroliza los factores eIF4GI y PABP inhibiendo la formación del complejo eIF4F y, por lo tanto, la traducción celular (Kuyumcu-Martinez et al., 2002; Redondo et al., 2011). Además, se ha observado que interrumpe otros pasos del proceso de expresión genética mediante la inhibición del *splicing* y también la exportación nuclear de mRNAs (Castelló et al., 2011). Estas condiciones favorecen la síntesis de las proteínas virales dirigidas por los diferentes IRESs de picornavirus, evitan la competencia por la maquinaria celular e incluso estimulan, mediante algún mecanismo no determinado completamente, la traducción viral (Redondo et al., 2011). Por otro lado, PV 2A^{pro} está implicada en la evasión de la respuesta a la infección, lo que evita la inhibición mediada por interferón α y γ (Castelló et al., 2009b; Morrison and Racaniello, 2009) y confiriendo independencia de eIF2 a la traducción tardía de los mRNAs virales (Redondo et al., 2011).

La proteasa L^{pro} de FMDV también es capaz de degradar eIF4GI y eIF4GII (de Los Santos et al., 2006), además de PTB, PABP y las subunidades a y b de eIF3 (Rodríguez Pulido et al., 2007), inhibiendo la traducción canónica. Por otro lado, dependiendo de donde se inicie la traducción del mRNA de FMDV, se puede producir una variante denominada Lab^{pro} o variante larga que posee una secuencia adicional en su extremo amino que le confiere la capacidad de entrada al núcleo, donde inactivaría el factor nuclear NF- κ B, lo que reduciría la respuesta inflamatoria (de Los Santos et al., 2007), mientras que FMDV L^{pro} bloquea la inducción de interferon- β (de Los Santos et al., 2006), permitiendo la evasión del virus a la respuesta antiviral.

En esta tesis se muestra, además, que cuando eIF2 ha sido fosforilado, FMDV L^{pro} propicia una eficaz traducción a los mRNAs que portan IRESs de diferentes picornavirus.

2.2. IRES de picornavirus

La inhibición de la traducción celular por las proteasas virales en combinación con la presencia de la secuencia IRES en el mRNA otorga una importante ventaja traduccional al mRNA viral sobre el celular. El IRES de PV pertenece a la clase I dentro de picornavirus. La iniciación de la traducción en este caso requiere de los factores

eIF3, eIF4A, eIF1A y el dominio central de eIF4GI, además de PCBP2 como ITAF (Sweeney et al., 2014). Recientemente se ha demostrado que el factor eIF2 no es necesario en presencia de PV 2A^{pro}, lo que implica que durante la infección la traducción del mRNA de PV es viable en ausencia de eIF2 activo. Adicionalmente la proteasa 2A^{pro} de enterovirus es capaz de estimular notablemente la traducción dirigida por estos IRESs. Ambas funciones están estrechamente relacionadas con la capacidad catalítica de 2A^{pro} (Redondo et al., 2011). Tras el corte de eIF4GI por la proteasa 2A^{pro}, la traducción dependiente de *cap* queda inhibida, mientras que los IRESs de la clase I son capaces de traducirse eficazmente y se apoderan por completo de la maquinaria de traducción celular.

Los IRESs de FMDV y EMCV pertenecen a la clase II. Los factores requeridos para el inicio de la traducción dirigida por estos IRESs son eIF3, eIF4A, la región carboxilo terminal de eIF4GI y el factor eIF2, además del ITAF PTB (Pestova et al., 1996; Pilipenko et al., 2000). Sin embargo, nuestro grupo ha comprobado que tanto EMCV como FMDV pueden prescindir del factor eIF2 en la fase tardía de la infección (Welnowska et al., 2011) y, además, en esta tesis se mostrarán datos que indican que este fenómeno se debe a la presencia de la proteasa L^{pro}.

En esta tesis también se han empleado el IRES de HCV (familia *Flaviviridae*), que puede dirigir la traducción en ausencia de eIF4A, eIF4B y del complejo eIF4F (Pisarev et al., 2004), y el IRES de la región intergénica de CrPV (familia *Dicistroviridae*), que no requiere ningún factor para dirigir el inicio de la traducción (Garrey et al., 2010a).

3. SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE HIV-1

El genoma del retrovirus HIV-1 (género *Lentivirus*) consiste en dos moléculas de RNA monocatenarias de polaridad positiva idénticas, de unas 10 Kb, flanqueadas por una estructura *cap* en el extremo 5' y una cola de poli(A) en el extremo 3', ambas acompañadas por secuencias LTR. El genoma de HIV-1 codifica para 15 proteínas diferentes empleando únicamente 3 marcos de lectura y 9 genes. Por este motivo, la expresión génica está sometida a fenómenos de *splicing* alternativo, *leaky scanning*, *frameshifting* y, finalmente, procesamiento postraduccional. Los 9 genes se pueden clasificar en 3 genes estructurales (gag, pol y env), 2 genes para proteínas reguladoras

(tat y env) y 4 genes que codifican proteínas auxiliares (vpr, vif, vpu y nef) (Seelamgari et al., 2004).

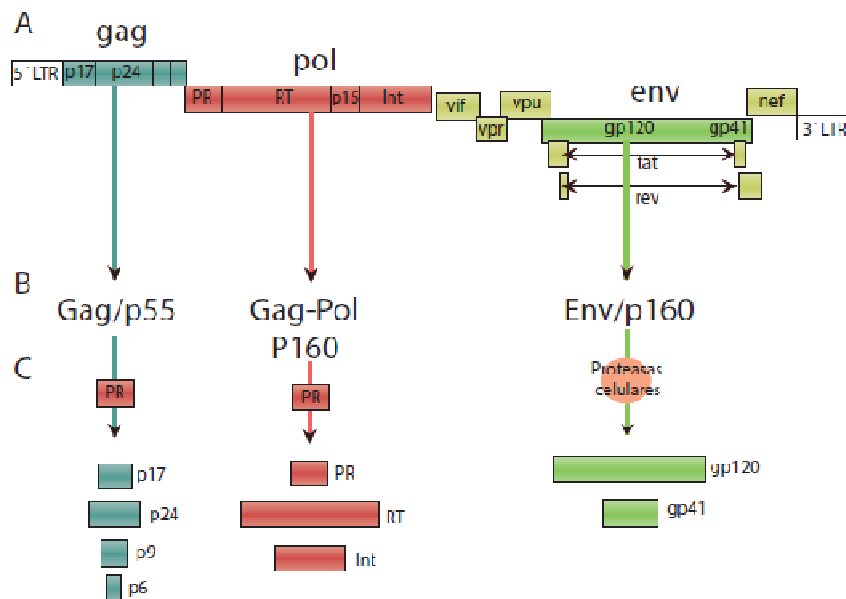


Figura 3. Esquema de expresión del RNAg de HIV-1.

A) Representación esquemática del genoma de HIV-1 en el que se muestran los genes estructurales gag en azul, pol en rojo y env en verde, además de las proteínas auxiliares en amarillo. B) Poliproteínas precursoras estructurales. C) Procesamiento proteolítico de los precursores.

Una vez que el virus entra en la célula a través de los receptores CCR5 y/o CXCR4, se libera el RNA al citoplasma, donde la retrotranscriptasa viral (RT) lo emplea para transcribir una copia en DNA, la cual a su vez será empleada para generar nuevas copias de DNA por la RT (Jonckheere et al., 2000). El dsDNA generado se integrará a través de las secuencias LTR y de la integrasa viral (Int) en el genoma celular. Ya en el núcleo, la RNA polimerasa II celular, junto con la proteína viral Tat, realiza una primera ronda de transcripción cuyo producto será procesado por *splicing* y exportado al citoplasma, donde el mRNA se traducirá en las proteínas Nef, Tat y Rev. La proteína Rev es capaz, mediante una señal de localización nuclear (NLS), de entrar al núcleo (Askjaer et al., 1998) y unirse, mediante la secuencia RRE (*Rev Response Element*), a los diferentes mRNAs virales que han sido parcialmente o no procesados por la maquinaria de *splicing*, promoviendo la exportación al citoplasma del resto de RNAs virales, incluyendo el RNA genómico (Cullen and Malim, 1991). En este momento se puede sintetizar ya el resto de proteínas virales. Debe destacarse que todos los RNAs producidos por *splicing* total o parcial contienen, junto al RNA no sometido a *splicing*, la secuencia 5'UTR del RNA viral que contiene la estructura *cap* seguida de

una secuencia altamente estructurada. Una vez en el citoplasma, los genes estructurales gag, pol y env permiten la síntesis de las poliproteínas Gag/p55, Gag-Pol/p160 y Env/p160. Las dos primeras serán procesadas por la proteasa viral, mientras que Env/p160 será procesada por proteasas celulares (Robey et al., 1985).

3.1. La proteasa HIV-1

La proteasa de HIV-1 (HIV-1 PR) se libera por autoescisión de la poliproteína Gag-Pol y está estrechamente implicada en el procesamiento postraduccional de las proteínas de HIV-1. Además, es capaz de hidrolizar los factores eIF4GI y PABP inhibiendo potentemente la traducción canónica (Castelló et al., 2009a; Ventoso et al., 2001). Adicionalmente, HIV-1 PR es capaz de regular el estado de fosforilación de eIF2 mediante la hidrólisis de GCN2 (del Pino et al., 2012).

3.2. La proteína Rev de HIV-1

La proteína Rev se traduce a través de un mRNA completamente procesado por la maquinaria de *splicing*. Su presencia en el citoplasma marca la fase intermedia de la infección y es fundamental en la expresión viral. Además de ser responsable de la exportación nuclear a través de CRM-1 de los RNA no procesados por la maquinaria de *splicing* (Fritz and Green, 1996), ha sido relacionada en los últimos años con la regulación de la traducción de ciertos mRNAs virales (Perales et al., 2005; Kimura et al., 1996). En la presente tesis se analiza el efecto de Rev sobre la traducción viral, así como el mecanismo molecular responsable de esta función.

3.3. El IRES de HIV-1

Además de la estructura *cap* en el extremo 5' del RNA viral, existe una secuencia altamente estructurada que se expande por la región 5'UTR hasta gag y que constituye un exón común en todos los transcritos virales sometidos a *splicing* (Plank et al., 2014). Se ha descrito que esta estructura presenta actividad IRES y que permite la síntesis de proteínas en condiciones incompatibles con la traducción canónica (Amorim et al., 2014). Por tanto, todos los transcritos de HIV-1, procesados o no, tienen *cap* e

IRES, lo que les confiere una enorme flexibilidad para adaptarse a las condiciones celulares. Hasta la fecha no se han descrito los requerimientos para el inicio de la traducción dirigida por el IRES de HIV-1, por lo que en esta tesis se analizará, mediante el uso de proteasas virales e inhibidores, el requerimiento de factores del IRES de HIV-1 en diferentes contextos.

4. APLIDINA: UN PROMETEDOR AGENTE ANTITUMORAL

El 80 % de la biodiversidad del planeta se encuentra sumergido en los océanos y con él, una gran diversidad de compuestos bioquímicos en forma de metabolitos. Se han descrito más de 10 000 metabolitos capaces de interactuar con diferentes rutas moleculares en humanos (Fuesetani, N, 2000; Scofield et al., 1982), por lo que no resulta sorprendente que muchos de estos compuestos tengan un enorme impacto en el tratamiento de enfermedades como el cáncer. El primer compuesto antitumoral de origen marino fue la citarabina, obtenida de la esponja *Cryptotheca cripta*, y es empleado actualmente en diferentes tipos de linfoma y leucemia (Newman and Cragg, 2014). Otros ejemplos son los derivados de la dolastatina 10, un pentapéptido con origen en el molusco *Dolabella auricularia* empleado en linfoma de Hodgkin (Gajula et al., 2013), o la trabectedina (Yondelis®), que proviene del tunicado *Ecteinascidia turbinata* y posee una gran actividad citotóxica contra el sarcoma de tejidos blandos (Demetri et al., 2015; D’Incalci and Galmarini, 2010). En la actualidad, la aplidina (Aplidin™), obtenida del tunicado *Aplidium albicans*, se ha convertido en uno de los más prometedores compuestos antitumorales de origen marino (Losada et al., 2014) y se encuentra en el tramo final de la fase III de ensayos clínicos para mieloma múltiple.

La aplidina pertenece a los ciclodepsipéptidos, los cuales tienen un amplio espectro de actividad biológica, como el antibiótico beauvericina o la kahalalide F y la didemnina B. La aplidina ha demostrado ser un fármaco selectivo en varios tipos de células tumorales (Gajate et al., 2003) con especificidad por el factor de elongación eEF1A2 (Losada et al., 2014). Una vez que la aplidina interactúa con la membrana celular, podría promover mediante Rac1 la activación de p38, induciendo citostasis (Losada et al., 2014) a la vez que inhibiría los procesos de proliferación y migración celular inducidos por la activación de Akt por eEF1A2 (Amiri et al., 2006). En esta tesis, además, se mostrará por primera vez el efecto de la aplidina sobre la

síntesis de proteínas celulares y virales, aportando nuevos datos sobre el mecanismo de acción de este fármaco.

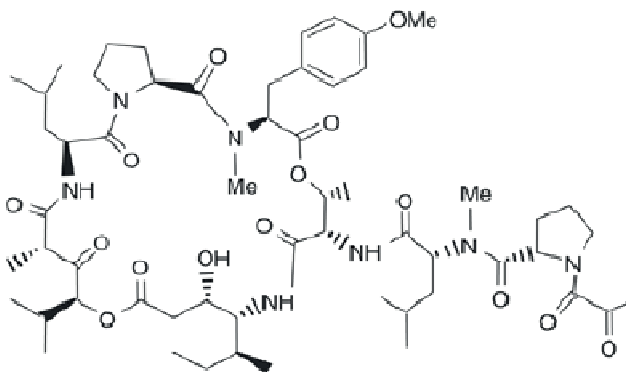


Figura 4. Estructura molecular de la aplidina.

4.1. El factor de elongación EF1A2

El factor de elongación eEF1- α (eEF1) presenta dos variantes muy similares, el eEF1A1 y el eEF1A2, pero con una diferente distribución histológica. Ambos factores están estrechamente implicados en la elongación de la traducción; sin embargo, presentan funciones no canónicas antagonistas. Mientras que eEF1A1 promueve la apoptosis al bloquear la acción de HDM2 sobre p53 (Frum et al., 2007), eEF1A2 promueve la proliferación y migración celular a la vez que inhibe la apoptosis mediante la activación de Akt/mTOR (Amiri et al., 2006). Por tanto, eEF1A2 es una proteína común en múltiples tipos de tumores y procesos neoplásicos con metástasis asociada (Pinke et al., 2008, 2008; Tomlinson et al., 2005, p. 1; Xu et al., 2013, p. 1). Recientemente se ha comprobado que la aplidina es capaz de unirse de manera directa a este factor (Losada et al., 2014) a la vez que la sensibilidad celular al compuesto es correlativa a los niveles de eEF1A2 presentes en la célula (Losada et al., 2015). En esta tesis se abordará el papel del factor de elongación eEF1A2 en el mecanismo de acción de la aplidina en diferentes sistemas celulares.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis doctoral han sido:

1. Determinar el efecto de la proteasa L^{pro} de FMDV sobre la traducción dirigida por el IRES del RNA de FMDV.
2. Estudiar el efecto de la proteasa L^{pro} de FMDV sobre la traducción dirigida por diferentes IRESs de picornavirus cuando eIF2 está inactivado por fosforilación.
3. Analizar el efecto del incremento de las concentraciones de K⁺ sobre la traducción *cap* dependiente y la dirigida por diferentes IRESs de picornavirus en sistemas de traducción *in vitro*, así como los requerimientos de factores de iniciación en esas condiciones.
4. Ensayar el efecto de la proteasa PR de HIV-1 sobre la traducción *cap* y poli(A) dependiente, y sobre la traducción del mRNA_g de HIV-1.
5. Examinar el efecto de la hidrólisis de eIF4GI por las proteasas 2A^{pro} de PV y L^{pro} de FMDV sobre la traducción mediada por el IRES de HIV-1 en diferentes contextos traduccionales.
6. Estudiar el efecto de la proteína Rev de HIV-1 sobre la traducción de mRNAs que contiene la secuencia IRES y/o la secuencia RRE de HIV-1.
7. Dilucidar el mecanismo de acción de la proteína Rev de HIV-1 sobre la traducción de los mRNAs de HIV-1 mediante la identificación de sus interacciones directas con factores de iniciación de la traducción.
8. Estudiar el efecto de la aplidina sobre la síntesis de proteínas celulares y virales, y analizar la posible implicación del factor eEF1A2.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Líneas celulares

BHK-21 (Colon BSR T7/5): Células de riñón de hámster neonato que expresan constitutivamente la polimerasa del bacteriófago T7 (Buchholz et al., 1999). Se empleó G418 (2 mg/ml) como antibiótico de selección. En esta tesis se nombran como BHK-T7.

HeLa (ATCC CCL 2): Células epiteliales obtenidas a partir de carcinoma de cuello de útero.

HeLa GFP-eEF1A1: Línea celular HeLa que sobre-expresa de manera constitutiva el factor de elongación eEF1A1. Esta línea fue desarrollada y cedida por PharmaMar.

HeLa GFP-eEF1A2: Línea celular HeLa que sobre-expresa de manera constitutiva el factor de elongación eEF1A2. Esta línea fue desarrollada y cedida por PharmaMar.

HeLa Apl-R: Estas células provienen de la línea celular HeLa en las que se generó resistencia a la aplidina mediante múltiples pases en presencia del compuesto. Fueron obtenidas y cedidas por PharmaMar.

HeLa Apl-R GFP eEF1A1: Línea celular derivada de la anterior que sobreexpresa el factor de elongación eEF1A1 y que fue cedida por PharmaMar.

HeLa Apl-R GFP eEF1A2: Línea celular derivada de las células HeLa Apl-R que sobreexpresa el factor de elongación eEF1A2 y que fue donada por PharmaMar.

C2C12 (ATCC CRL-1772): Mioblastos de ratón capaces de diferenciar a miocitos. Fueron empleados en el estudio del efecto de la aplidina.

Hap-1 y Hap-1 eEF1A2 -: Fibroblastos haploides derivados de la línea KBM-7. La variante Hap-1 eEF1A2 - es un *knockout* para eEF1A2. Fueron obtenidos de Oryzon Genomics. Se crecieron en el medio Iscove Modified Dulbecco's Medium (IMDM).

MEF S51A: Fibroblastos de ratón que expresan una forma no fosforilable de eIF2 α debido a una sustitución de la serina 51 por alanina.

1.2. Virus

Virus Sindbis (SV): El *stock* de este virus fue obtenido a partir del clon infectivo pT7 SVwt y ha sido descrito en detalle previamente (Sanz and Carrasco, 2001).

Virus de la estomatitis vesicular (VSV): Se empleó la cepa Indiana. El *stock* se amplificó mediante pases consecutivos en células HeLa y se tituló por plaqueo en medio agar en las mismas células.

1.3. Bacterias

En esta tesis se han empleado las siguientes cepas de *Escherichia coli*.

DH5 α : Cepa empleada en la amplificación y purificación de plásmidos.

BL21 (DE3): Esta cepa contiene el gen de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 controlado por el promotor *lacUV5*.

1.4. Plásmidos

Plásmidos derivados de pTM1

pTM1: Contiene la región 5'UTR de EMCV precedido por el promotor para la RNA polimerasa del bacteriófago T7 (pT7), de manera que en presencia de esta polimerasa se transcribe un mRNA cuyo gen queda dirigido por el IRES del EMCV.

pTM1-Luc: Este plásmido contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga *Photinus pyralis* y ha sido descrito previamente (Sanz et al., 2010).

pTM1-2A^{pro}: Este plásmido codifica la proteasa 2A de PV (Aldabe et al., 1995a).

Plásmidos derivados de pKSBluescript

pKS: Al igual que el pTM1, contiene el pT7 y requiere de la polimerasa T7 para transcribir mRNA *in vitro* o *in vivo* (Stratagene).

pKS-Luc: Codifica el gen de la luciferasa de luciérnaga *Photinus pyralis* (Barco et al., 2000).

pKS-FMDV-Luc: Contiene el IRES completo de FMDV seguido del gen de la luciferasa de luciérnaga *Photinus pyralis*.

pKS-FMDV-L^{pro}: Al igual que el plásmido anterior, este presenta el IRES de FMDV, pero, en esta ocasión, seguido de la proteasa L^{pro} de FMDV.

pKS-PV-Luc: En este caso, el gen de la luciferasa está precedido por el IRES del PV.

pKS-HIV-1: Este plásmido transcribe, en presencia de la polimerasa del bacteriófago T7, el mRNA genómico de HIV-1 y fue obtenido mediante la digestión con SacI de los plásmidos pBH10 y pKS, y su posterior ligación con la T4 ligasa (Castelló et al., 2009a).

Plásmidos de expresión bacteriana

pTE-eIF4E y pTE-p97: Contienen los genes de los factores eIF4E y p97 humanos, respectivamente, y expresan las proteínas como un producto de fusión a una cola de histidinas. Fueron amablemente cedidos por el laboratorio del Dr. Matthias W. Hentze (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg).

pGEX-2T-eIF4GI y pGEX-2T-PABP1: Contienen los genes de los factores eIF4GI y PABP1 humanos, respectivamente. Se expresan como un producto de fusión con GST. Fueron amablemente cedidos por la Dra. Amelia Nieto (Centro de Biotecnología, Madrid).

Otros plásmidos

pT7 RLuc ΔEMCV IGR-Fluc(CrPV-Luc): Este plásmido contiene el pT7 seguido del IRES correspondiente a la región intergénica del CrPV, seguido por el gen de la luciferasa de *Photinus pyralis* (Redondo et al., 2011).

pCMV-rev: Este plásmido contiene el gen rev de HIV-1 controlado por el promotor del CMV. Fue amablemente cedido por la Dra. Marie-Louis Hammarskjöld y el Dr. David Rekosh a través del programa de reactivos del NIH-AIDS.

pCDNA3.1+ LGag-Luc-poliA: Este plásmido posee el pT7 seguido del IRES de HIV-1 y el gen de la luciferasa de luciérnaga. Para obtener este plásmido, se amplificó la región correspondiente a la secuencia 5'UTR y Gag de HIV-1 del plásmido pKS-HIV-1 con los oligos 5'Gag-*NheI* y 3'Gag-*KpnI*, y simultáneamente se amplificó el gen de la luciferasa a partir del plásmido pTM1-Luc con los oligonucleótidos 5'Luc-*KpnI* y 3'Luc-*BamHI*. Los resultados se digirieron con las enzimas correspondientes junto con el plásmido pCDNA3.1+ y se ligaron con la ligasa T4.

pCDNA3.1+ LGag-Luc-RRE: Para obtener el inserto de RRE, se realizó una PCR con los oligonucleótidos 5'*BamHI*-RRE y 3'*XhoI*-RRE empleando como molde el cDNA genómico de la cepa pNL4.3 de HIV-1. El producto de la PCR se insertó en el pCDNA3.1+ LGag-Luc-poliA mediante digestión con *BamHI/XhoI*.

Replicones

pNL4.3-Renilla: Consiste en el replicón infeccioso de HIV-1 pNL4.3 con el gen de la luciferasa de *Renilla reniformis* insertado en la ORF de gag. De esta manera la luciferasa se sintetiza junto con las proteínas estructurales. Fue cedido amablemente por el Dr. Théophile Ohlmann (L'Université de Lyon, Lyon).

1.5. Oligonucleótidos

Oligonucleótido	Secuencia
5'Gag- <i>NheI</i>	cgacgcGCTAGCggtctctctggttagaccagatc
3'Gag- <i>KpnI</i>	cgcagGGTACCttgtgacgaggggtcgc
5'Luc- <i>KpnI</i>	cgacgcGGTACCatggaagacgccaanaaac
3'Luc- <i>BamHI</i>	tcactaGGATCCttacaattggactttccgccc
5' <i>BamHI</i> -RRE	ggggggGGATCCtagcaccaccaagg
3' <i>XhoI</i> -RRE	ggggggCTCGAGtagcattccaaggca

1.6. Proteínas y péptidos

HIV-1 Rev: Proteína Rev de HIV-1 pura. Fue amablemente cedida por la Dra. Marie-Louis Hammarskjöld, el Dr. David Rekosh y Michael Orsin a través del programa de reactivos del NIH-AIDS.

Set de péptidos de Rev: Conjunto de péptidos que componen la secuencia consenso completa de la proteína Rev de HIV-1 (subtipo B). Los péptidos tienen una longitud de 15 aminoácidos (aa) con solapamientos de 11 aa entre las secuencias. Fue cedido por el programa de reactivos del NIH-AIDS.

FMDV Lb^{pro} y Lb^{pro} mut: Las dos variantes de la proteína purificada Lb^{pro} de FMDV fueron amablemente cedidas por el Dr. Tim Skern (Max F. Perutz Laboratories, Viena). Lb^{pro} es una variante activa capaz de hidrolizar eIF4GI de manera eficaz, mientras que Lb^{pro} mut es una forma no activa por sustitución de la cisteína 21 por alanina.

2. MATERIAL NO BIOLÓGICO

2.1. Sueros y anticuerpos

Anti-eIF4GI: Anticuerpo policlonal que reconoce el factor de iniciación de la traducción eIF4GI (Aldabe et al., 1995b). Se empleó en una dilución 1:5000 para western blot.

Anti-PABP: Anticuerpo monoclonal que reconoce la proteína PABP. Fue adquirido de Abcam. Se empleó en una dilución 1:500 para western blot.

Anti-p97: Anticuerpo policlonal dirigido contra la proteína NAT1/DAP-5/p97, miembro de la familia eIF4G. Fue amablemente cedido por el Dr. Thomas Preiss (Victor Chang Cardiac Research Institute, Sydney). Para western blot se empleó en una dilución 1:1000.

Anti-eIF2 total: Este anticuerpo policlonal reconoce la región correspondiente a los aminoácidos 1-315 del factor eIF2 humano. Se adquirió de Santa Cruz Biotechnology y se empleó para western blot en una dilución 1:500.

Anti-eIF2 fosforilado: Anticuerpo policlonal que reconoce el grupo fosfato de la serina 51 de la subunidad α del factor de iniciación eIF2. Suministrado por Cell Signaling Technology. Se empleó en una dilución 1:500 para western blot.

Anti- α -Tubulina: Anticuerpo monoclonal frente a α -Tubulina. Obtenido de Sigma. Empleado en una dilución 1:5000 para western blot.

Anti-Luciferasa: Anticuerpo policlonal que reconoce la proteína luciferasa de *Photinus pyralis*. Suministrado por Promega y empleado en una dilución 1:1000 para western blot.

Anti-GST: Este anticuerpo policlonal reconoce la proteína de fusión GST. Fue amablemente cedido por el Dr. Juanjo Berlanga (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Madrid). Fue empleado en una dilución 1:1000.

Anti-HIV-1 Rev: Anticuerpo monoclonal que reconoce la región comprendida entre los aminoácidos 91-105 de HIV-1 Rev. Fue donado por la Dr. Anne Marie Szilvay a través del programa de reactivos del NIH-AIDS. Se empleó en una dilución 1:500.

Anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa: Se emplearon los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo (Pierce) y anti-IgG de ratón (Promega). Ambos se emplearon en una dilución 1:10000.

2.2. Inhibidores

A23187: Depsipéptido que actúa como ionóforo de calcio. Distribuido por Abcam.

Ácido poliinosínico:policitidílico (poli(I:C)): RNA sintético de doble cadena que induce la fosforilación de eIF2 por activación de la quinasa PKR. Fue obtenido de Amersham.

Aplidina: Agente antitumoral de origen marino. Fue cedido por PharmaMar.

Arsenito sódico: Compuesto químico que induce la fosforilación de eIF2 a través de la quinasa HRI. Fue obtenido de Riedel-de Haën.

Cicloheximida (CHX): Interfiere en la actividad peptidil transferasa de la subunidad ribosómica 60S bloqueando, por tanto, la elongación. Distribuida por Sigma.

Geneticina (G418): Antibiótico aminoglicósido de la familia de la gentamicina empleado en la selección de líneas celulares. Distribuido por Sigma.

Hipuristanol: Biomolécula de origen marino que inhibe específicamente la unión del eIF4A al mRNA. Fue amablemente cedido por el Dr. Jerry Pelletier (McGill University, Quebec).

Tapsigargina: Compuesto químico que induce la fosforilación de eIF2 por activación de la quinasa PERK. Fue adquirido a Sigma.

3. MANIPULACIÓN DE CÉLULAS BACTERIANAS

3.1. Mantenimiento y cultivo de *E. coli*

Los cultivos de *E. coli* se realizaron en el medio Luria-Bertani (LB) suplementado con ampicilina a 100 µg/ml. Para el crecimiento en medio sólido, se empleó el mismo medio suplementado con bacto-Agar (Difco) al 1,5 %. El mantenimiento de las bacterias se realizó a -70 °C en el medio LB y glicerol al 20 % (v/v).

3.2. Transformación de bacterias

3.2.1. Transformación por choque térmico

Se incubaron 50 µl de la cepa bacteriana DH5α en presencia de DNA transformante en hielo. Tras 20 min se realizó el choque térmico (40 s a 42 °C), se volvieron a enfriar en hielo durante 5 min, se añadió 1 ml del medio LB y se incubaron a 37 °C durante 1 h. Finalmente, el volumen total se extendió sobre una placa LB-Agar con ampicilina (100 µg/ml) y se incubó toda la noche a 37 °C.

3.2.2. Electrotransformación

Se descongelaron en hielo 50 µl de la cepa BL21 y, tras añadirle el DNA transformante, se realizó una electroporación (2,5 kV / 125 Ω / 5 ms). Seguidamente se añadió 1 ml del medio LB y las bacterias se incubaron a 37 °C durante una hora; finalmente, el volumen total se extendió en una placa de LB-Agar (ampicilina: 100 µg/ml) que se incubó a 37 °C toda la noche.

3.3. Purificación de DNA plasmídico

Para confirmar la presencia de plásmido en las colonias, se empleó el kit comercial Wizard Plus SV Minipreps de Promega. Para extraer grandes cantidades de plásmido, se empleó el kit comercial Wizard Maxipreps de Promega según el protocolo comercial.

4. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.1. Recombinación de DNA

Las digestiones con enzimas de restricción se realizaron según las recomendaciones de los proveedores. Para las reacciones de ligación, se empleó la ligasa del bacteriófago T4 (New England Biolabs) aplicando el protocolo comercial.

4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 50-100 µl en medio tamponado (Tris-HCl (pH 8) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, gelatina al 0,01 % [p/v]) incluyendo 0,5 µM de cada oligonucleótido de iniciación, 200 µM de cada dNTP,

0,5-1 ng de DNA molde y 5 unidades de Taq DNA polimerasa (Perkin Elmer). El programa empleado varió en función del tamaño del producto esperado y de las características de los oligonucleótidos. Los productos de PCR se purificaron mediante el kit Wizard PCR Preps de Promega según el protocolo comercial.

4.3. Electroforesis en gel de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizó en gel de agarosa de 0,7 % a 2 % (p/v) en función del tamaño empleando tampón TAE como electrolito y tampón de carga (azul de bromofenol al 0,25 %, xilén cianol al 0,25 % y ficoll al 15 %). Tras separar el DNA se tiñó el gel con 5 mg/ml de bromuro de etidio para su visualización por transiluminación. En el caso del RNA, se aplicó el mismo procedimiento, pero tratando previamente los soportes con H₂O₂ y etanol para inactivar las RNAsas. La extracción de las bandas seleccionadas se realizó mediante el kit Wizard PCR Minipreps de Promega siguiendo el protocolo comercial.

4.4. Transcripción *in vitro*

El DNA molde se linearizó previamente con la enzima de restricción correspondiente. La transcripción se realizó con la RNA polimerasa T7 recombinante (Promega), tampón de transcripción y DTT (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se emplearon 0,25 μM de análogo de *cap*, m⁷G(5´)ppp(5´)G (Biolabs) en los casos correspondientes. Para añadir la cola de poli(A), se suplementó la mezcla de transcripción con 0,75 μM de rATP y 5 unidades de poli(A) polimerasa (Invitrogen) y se incubó a 37 °C durante 1 h extra. La purificación se realizó con el kit comercial RNAspin Mini de GE Healthcare y el resultado se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodorp ND-100.

4.5. RT-PCR a tiempo real

Tras extraer el RNA con el kit RNeasy de Qiagen, se realizó una RT-PCR a tiempo real empleando sondas Taqman (Applied Biosystems) para cuantificar RNA con el kit Master SYBR Green I (Roche Diagnostics); los datos fueron analizados con el *software* SDS-7000 (Castelló et al., 2006)(Castelló et al., 2009a).

4.6. Traducción *in vitro*

4.6.1. Lisados de reticulocitos de conejo (RRLs) tratados con nucleasas

Los mRNAs sintetizados *in vitro* y purificados se tradujeron en RRL (Promega) tratados con nucleasas según el protocolo comercial en un volumen final de 16,5 μ l y una concentración final estándar de acetato potásico (AcK) de 80 mM y de 0,75 mM de MgCl₂. Para medir la actividad de la luciferasa, las muestras se recogieron en 50 μ l de buffer de lisis de luciferasa (glicilglicina 25 mM; pH: 7,8; DTT 1 mM y Tritón x100 0,55 % [v/v]) y se midieron 5 μ l del lisado. Las mismas muestras se emplearon para la detección de proteínas mediante western blot, en cuyo caso se añadió buffer 4X LDS (Promega) al lisado. En los ensayos de suplementación con KCl extra, los RRL fueron optimizados llevando el volumen final a 50 μ l con una concentración basal de 1,2 mM de MgCl₂ y 80 mM de AcK.

4.6.2. Extractos de células HeLa

Las fracciones S₁₀ tratadas con nucleasas y procedentes de la lisis de células HeLa fueron amablemente cedidas por el Dr. Eckard Wimmer (Stony Brook University, Stony Brook, New York). El protocolo de reacción ha sido descrito anteriormente (Molla et al., 1991).

4.6.3. Extractos Krebs-2

Las fracciones S₁₀ de lisados de células Krebs de tumor ascítico fueron obtenidas y amablemente cedidas por el Dr. Juanjo Berlanga (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid). El protocolo de reacción ha sido descrito en detalle previamente (Khaleghpour et al., 2001).

5. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación de proteínas por tamaño se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) empleando diferentes porcentajes de acrilamida en función del tamaño de la proteína por estudiar, siendo los geles más

comúnmente empleados los del 15 % de acrilamida. Para las proteínas de alto peso molecular, se emplearon geles del 10 %, y del 17,5 % para las de bajo peso molecular. La electroforesis se realizó en tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1 % [v/v]) a 150 V (Sambrook, J. et al., 2001).

5.2. Fluorografía

Tras el marcaje metabólico con [³⁵S]Met/Cys, las muestras fueron procesadas en geles SDS-PAGE. El protocolo de fluorografía-autorradiografía ha sido descrito en detalle previamente (Sanz, M.A., 1998). A partir de las películas fotográficas, se realizó un análisis cuantitativo mediante densitometría óptica empleando el densitómetro Bio-Rad GS-800.

5.3. Inmunodetección de proteínas mediante western blot

Una vez separadas las proteínas mediante SDS-PAGE, se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) en tampón de transferencia (Tris HCl 25 mM; pH 8,3; glicina 190 mM, metanol 20 % [v/v] y SDS 0,1 % [v/v]) a 200 mA durante 12 h (Harlow, E. and Lane, D., 1988). La membrana de nitrocelulosa se bloqueó por saturación en leche al 5 % en BSA 1X durante 1 h a temperatura ambiente (RT). El anticuerpo primario se incubó a la concentración recomendada por el proveedor durante 2 h a 4 °C en agitación suave. A continuación se realizaron 3 lavados con TTBS (Tween-20 0,05 % en TBS 1X) de 10 min a RT y agitación fuerte. Finalmente, se emplearon anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa en incubación de 45 min a RT con agitación suave. El revelado se realizó mediante ECL (Amersham Bioscience) y las membranas se expusieron sobre una película autorradiográfica.

5.4. Análisis de interacciones en extractos mediante cromatografía de afinidad en condiciones nativas

Se incubaron extractos celulares correspondientes a 6 placas p100 de células HeLa con 50 µl de resina glutatión-sefarosa (GE HealthCare) y 50 µg de GST-Rev o GST solo como control durante toda la noche a 4 °C en agitación suave. Al día siguiente se centrifugó la resina y se tomó el sobrenadante para analizar la fracción de proteínas no unidas; a continuación se aplicó la resina a una columna de cromatografía y se lavó con

diez volúmenes de buffer de lavado (DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM, Triton 1 %) y se tomaron muestras para analizar las proteínas presentes en las fracciones de lavado. Finalmente, se eluyó el GST-Rev o GST junto con las proteínas unidas mediante 10 mM de glutatión reducido (Sigma) en tampón de elución (Tris-HCl 50 mM; pH 8, NaCl 50 mM y DTT 1 mM). Las muestras se procesaron en geles SDS-PAGE para analizar el resultado mediante western blot.

5.5. Ensayo de interacciones directas mediante Slot blot

Tras hidratar una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) con TBS, se montó sobre el aparato Bio-Dot SF (Bio-Rad). Se emplearon 5 µg de cada proteína purificada diluidas en 200 µl de TBS, que se aplicaron a cada pocillo. Tras fijar las proteínas o péptidos por vacío, se realizó un bloqueo por saturación de la membrana con BSA al 3 % en TBS durante 1 h y a continuación se incubó la membrana con 15 µg de proteína cebo purificada en 3 ml de TBS durante toda la noche a 4 °C con agitación suave. Finalmente, se realizó un western blot frente a la proteína cebo empleada.

5.6. Ensayo de interacción de dominios por PepSpot

Sobre una membrana de nitrocelulosa se reconstruyó la secuencia peptídica completa de eIF4GI y PABP mediante grupos de polipéptidos consecutivos de 13 aminoácidos con solapamientos entre sí de 9 aminoácidos. Además, como control positivo se incluyó el dominio de multimerización de Rev y como control negativo se emplearon secuencias repetidas de un mismo aminoácido. La reproducción de las secuencias peptídicas sobre la membrana de nitrocelulosa fue desarrollada por el servicio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (Madrid). Para el ensayo, la membrana fue hidratada en PBS y bloqueada por saturación con BSA 3 % en PBS. A continuación se incubó a 4 °C en agitación suave con 15 µg de GST-Rev o GST solo en 5 ml de PBS durante toda la noche. Al día siguiente se realizó un western blot para detectar la señal de GST-Rev o GST.

5.7. Coinmunoprecipitación

Para la coinmunoprecipitación, se empleó el sistema Dynabeads Protein G de Thermo Fisher Scientific según las indicaciones del proveedor empleando RRL tratados con nucleasas y suplementados con extractos de HeLa S₁₀ junto a 5 µg de HIV-1 Rev.

5.8. Medida de actividad de la luciferasa

La actividad de la luciferasa se midió empleando el kit comercial Luciferase Assay System (Promega) empleando 5 µl de muestra en el luminómetro Monolight 2010 (Molecular Dynamics). Las representaciones gráficas de las mediciones se realizaron a partir de los datos obtenidos de al menos dos ensayos independientes.

5.9. Purificación de proteínas en condiciones nativas

Las proteínas His-eIF4E y His-p97 se purificaron mediante cromatografía de afinidad con el sistema Ni-NTA Superflow (Qiagen) siguiendo el protocolo comercial. Las proteínas GST-eIF4GI y GST-PABP fueron purificadas por cromatografía de afinidad empleando el sistema Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE HealthCare) siguiendo también el procedimiento comercial. En todos los casos, la síntesis de proteínas se realizó en la cepa BL21 de *E. coli* por inducción con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 42 °C para inducir la síntesis de proteínas chaperonas. Para analizar los resultados, las proteínas se separaron por SDS-PAGE y el gel se tiñó con azul de Coomassie (Bio-Rad).

6. MANIPULACIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS

6.1. Mantenimiento y cultivo celular

Las células se cultivaron en un medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Difco) suplementado con 50 U/ml de penicilina, 50 U/ml de estreptomina, 0,2 µg/ml de éster butírico del ácido p-hidroxibenzoico (Sigma), 4 mM de glutamina (Merck) y aminoácidos no esenciales. Los medios fueron suplementados con suero fetal bobino al 10 % (v/v) y se mantuvieron en incubadora a 37 °C, con 95 % de humedad relativa y 5 % de presión parcial de CO₂. En el caso de las células BHK-T7 se

añadieron, además, 2 mg/ml de G418 cada tres pases como sistema de selección. Para conservar las células durante largos periodos, se congelaron en nitrógeno líquido en el mismo medio suplementado con dimetilsulfóxido (DMSO) al 7 % (v/v).

6.2. Expresión transitoria en células

Se empleó el sistema lipofectamina 2000 (Invitrogen) tanto para plásmidos como para mRNAs sintetizados *in vitro*. El procedimiento ha sido descrito en detalle previamente (Redondo, N., 2012). Los plásmidos fueron transfectados en la línea celular BHK-T7 en una mezcla de 2 µg de plásmido y 2 µl de lipofectamina en un volumen final de 100 µl de Optimem por pocillo de L-24. En el caso de los mRNAs se emplearon 1 µg de mRNA y 2 µl de lipofectamina por pocillo de L-24.

6.3. Marcaje metabólico de proteínas

Las células se incubaron en un medio DMEM sin metionina ni cisteína suplementado con 25 µCi de mezcla translabel [³⁵S] (Amersham) durante el tiempo estipulado. Las muestras se recogieron en un tampón de carga de proteínas (SDS al 2 %, pH 7,2, glicerol al 11,6 %, DDT 100 mM, Tris-HCl 160 mM, pH 6,8 y azul de bromofenol al 0,03 %) y se hirvieron durante 5 min.

RESULTADOS



RESULTADOS

1. EFECTO DE FMDV L^{pro} SOBRE LA TRADUCCIÓN DIRIGIDA POR IRESs DE PICORNAVIRUS

Durante las infecciones, algunos picornavirus como PV o FMDV son capaces de bloquear la traducción celular mediante proteasas que hidrolizan el factor eIF4G, impiden de este modo la formación del complejo eIF4F (Sonenberg and Hinnebusch, 2009) y provocan la interrupción de la traducción *cap* dependiente (Castelló et al., 2011). Al contrario que la traducción celular, la traducción dirigida por IRESs de picornavirus como EMCV o PV se ve fuertemente estimulada por las proteasas 2A^{pro} de PV, HRV o por la proteasa L^{pro} de FMDV (Ziegler et al., 1995a; Borman et al., 1997b; Borman et al., 1997a; Roberts et al., 1998). Sin embargo, y sorprendentemente, hasta ahora se pensaba que FMDV L^{pro} no era capaz de estimular la traducción de los mRNAs de FMDV (Ziegler et al., 1995b).

Otro evento clave que ocurre en muchas infecciones virales como respuesta antiviral es la fosforilación de la subunidad α del factor eIF2, que impide la formación del complejo ternario Met-tRNA-eIF2-GTP. Mientras que ciertos virus, como HCV o CrPV, poseen la habilidad intrínseca de traducir sus mRNAs de una forma eIF2 independiente (Kim et al., 2011; Garrey et al., 2010b), los picornavirus muestran dependencia del factor en la fase temprana de infección, mientras que en fases tardías manifiestan independencia del factor (Welnowska et al., 2011). Se ha descrito que la PV 2A^{pro} es responsable de conferir esta dualidad traduccional a los mRNAs de picornavirus (Redondo et al., 2011). A continuación se estudian los factores que permiten al IRES de FMDV dirigir la traducción en ausencia de eIF2 operativo.

1.1. Estimulación por FMDV L^{pro} sobre el IRES de FMDV y traducción eIF2 independiente

La idea establecida de que la hidrólisis de eIF4G por FMDV L^{pro} estimula la traducción dirigida por los IRESs de PV y EMCV, mientras que no causa efectos estimulatorios sobre su propio IRES (Devaney et al., 1988; Borman et al., 1995), podría

estar basada en resultados engañosos debido a los sistemas de mRNAs bicistrónicos empleados (Niepmann, 2009; Jünemann et al., 2007). Por este motivo en nuestros estudios decidimos emplear mRNAs monocistrónicos. Para evaluar el efecto de la proteasa FMDV L^{pro} sobre la traducción dirigida por el IRES de FMDV, se cotransfectaron los plásmidos pKS-FMDV-Luc y pKS-FMDV-L^{pro} en células BHK-T7 para producir los mRNAs IRES FMDV-luc e IRES FMDV-L^{pro}; además, se emplearon como controles los plásmidos pTM1-Luc y pKS-PV-Luc, que producen los mRNAs IRES EMCV-luc e IRES PV-luc. 2 h después de la transfección se realizó un marcaje metabólico con [³⁵S]Met/Cys durante 45 min y las proteínas sintetizadas en presencia del compuesto radiactivo se analizaron por SDS-PAGE seguido de fluorografía y autorradiografía. Adicionalmente también se analizó la traducción de estos mRNAs cuando eIF2a está fosforilado, ya que se ha descrito que eIF2 se fosforila en las fases tardías de las infecciones (Redondo et al., 2011). Para inducir la fosforilación de eIF2, empleamos arsenito sódico (Ars), que es un conocido inductor de fosforilación de este factor. El experimento consistió en realizar un marcaje radiactivo de proteínas durante 45 min a las 2 h posttransfección (hpt). En su caso este marcaje se hizo también en presencia de 200 μM de Ars para garantizar la fosforilación de eIF2α. Posteriormente las muestras se analizaron mediante separación por SDS-PAGE, fluorografía y exposición autorradiográfica. En la Figura 5 se observa el efecto de la coexpresión de FMDV L^{pro} y diferentes mRNAs en ausencia o presencia de Ars. La expresión de L^{pro} indujo una clara estimulación de la traducción dirigida por los diferentes IRESs de picornavirus, y especialmente en el caso del mRNA IRES PV. En este caso, en ausencia de FMDV L^{pro}, se observa muy poca síntesis de luciferasa debido a que la traducción dirigida por el IRES de PV es muy poco eficaz en BHK (Figura 5A). El tratamiento con Ars tuvo un potente efecto de inhibición tanto en la traducción celular como en la dirigida por IRES. Sin embargo, la presencia de FMDV L^{pro} mantuvo la traducción dirigida por los diferentes IRESs de picornavirus. Al fijarnos en cada IRES en particular, FMDV L^{pro} no solo estimuló la traducción dirigida por el IRES FMDV, sino que esta traducción se sostuvo en presencia de Ars, siendo el efecto de FMDV L^{pro} análogo al de PV 2A^{pro} (Redondo et al., 2011).

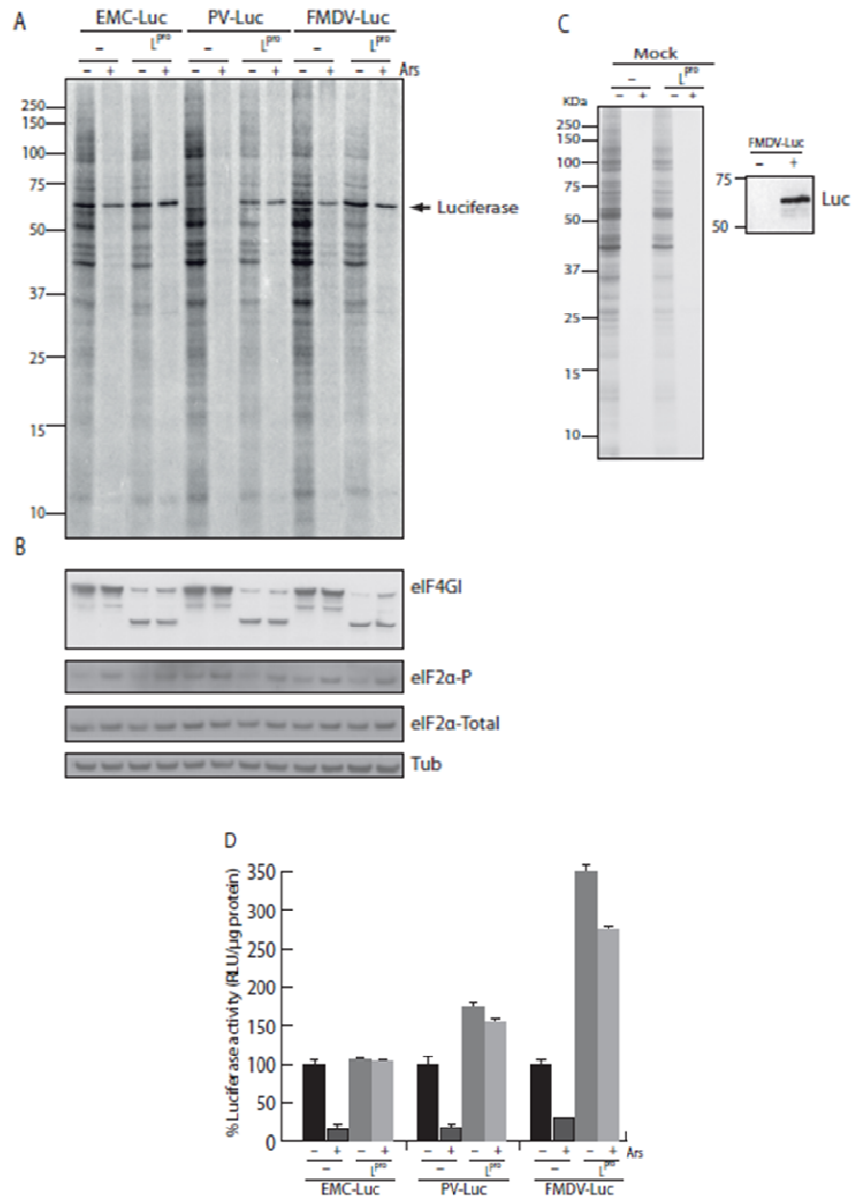


Figura 5. Inhibición por arsenito de la traducción de los IRESs de EMCV, PV y FMDV en células BHK-T7. Rescate por la proteasa L^{pro} de FMDV.

A) Las células fueron transfectadas con pKS-FMDV-Luc, pPV-Luc y pTM1-Luc, y en su caso cotransfectadas con pKS-FMDV-L. A las 2 hpt se añadió arsenito (Ars, 200 μ M) en los casos indicados durante 15 min, seguido de 45 min de incubación con [³⁵S]Met/Cys. Las muestras fueron procesadas en gel SDS-PAGE (17,5 %) seguido de autorradiografía. La flecha indica la posición de la proteína luciferasa. B) Las mismas muestras se usaron para detectar eIF4GI, eIF2 α -P, eIF2 α total y tubulina mediante western blot. C) Panel izquierdo: las mismas células se transfectaron (L^{pro}) o no (-) con pKS-FMDV-L. A las 2 hpt se añadió (+) o no (-) Ars (200 μ M) durante 15 min para después marcar 45 min con [³⁵S]Met/Cys. Los extractos celulares se analizaron por SDS-PAGE (17,5 %) para autorradiografía. Panel derecho: en paralelo, las células se transfectaron (+) o no (-) con FMDV-Luc durante 3 h y el resultado fue analizado por western blot para detectar luciferasa mediante anticuerpo policlonal contra esta proteína. D) Las células se transfectaron (L^{pro}) o no (-) con pKS-FMDV-L. A las 2 hpt, las células se transfectaron nuevamente con pKS-FMDV-Luc, pPV-Luc y pTM1-Luc en presencia (+) o ausencia (-) de 200 μ M Ars. Finalmente, las células se recogieron y se procesaron para estimar la actividad de la luciferasa. Se muestra el porcentaje de actividad de la luciferasa tomando el 100 % en ausencia de Ars y proteasa. Las barras de error representan la D.E. de al menos tres ensayos independientes.

En paralelo, y empleando las mismas muestras, se realizó un awestern blot para identificar el estado de fosforilación del eIF2 α en cada caso (Figura 5B) en el que se pudo comprobar que la expresión de FMDV L^{pro} no disminuye ni bloquea el efecto del Ars, pero sí es capaz de hidrolizar el factor eIF4GI (Figura 5B). Además, se realizó un control complementario en el que las células se transfectaron únicamente con pKS-FMDV-L^{pro} para a continuación realizar un marcaje radioactivo en presencia (+) o no (-) de Ars (Figura 5C). Se puede observar que tanto el Ars como la expresión de FMDV L^{pro}, por si solos o en combinación, inducen un fuerte bloqueo de la traducción celular. Igualmente, tras transfectar las células únicamente con el plásmido pKS-FMDV-Luc durante 2 h, se pudo determinar la posición de la banda correspondiente a la luciferasa en el gel mediante western blot, lo que aseguró que la banda de 60 KDa observada en la autorradiografía se correspondía con la proteína Luciferasa (Figura 5C).

Para cuantificar con más precisión el efecto de FMDV L^{pro} sobre la síntesis de luciferasa dirigida por los diferentes IRESs y su efecto cuando eIF2 está fosforilado, se repitió el ensayo anterior para esta vez medir la actividad de la luciferasa. En el caso del IRES de FMDV, la coexpresión con FMDV L^{pro} dio como resultado una estimación del 350 % con respecto al mismo IRES en ausencia de FMDV L^{pro}. La traducción dirigida por el IRES de PV en presencia de FMDV L^{pro} alcanzó el 177 % con respecto al mensajero solo, mientras que el IRES de EMCV junto con FMDV L^{pro} no reflejó incremento de la expresión relevante con respecto al control (Figura 5D). Por otro lado, el efecto del Ars sobre la traducción fue notable en todos los casos y a la vez se observó igualmente una restitución de la traducción al coexpresar FMDV L^{pro}; mientras que la traducción dirigida por el IRES de FMDV se inhibió un 74 % por el efecto del Ars, la presencia de la proteasa amortigua la inhibición hasta solo el 20 %. En el caso del IRES de EMCV, la inhibición pasó del 89 % a tan solo un 1 % en presencia de FMDV L^{pro}, y para la traducción dirigida por el IRES de PV, la inhibición pasó del 88 % al 10 %. El conjunto de los datos muestra que la traducción dirigida por el IRES de FMDV se ve estimulada por FMDV L^{pro} y que este, además, permite el inicio de la traducción en ausencia de eIF2 activo.

Para examinar con más detalle la traducción dependiente del IRES de FMDV en presencia de eIF2 fosforilado, recurrimos a la tapsigargina (Tg), que al igual que el Ars induce la fosforilación del eIF2 α , pero en este caso mediante la movilización de calcio intracelular (Prostko et al., 1992; Novoa et al., 2001; Garrey et al., 2010a). En

esta ocasión, las células se transfectaron con el mRNA EMC-L^{pro} y 1,5 h después se añadieron 0,75 μ M de Tg y las células se retransfectaron con los mRNAs FMDV-Luc, EMC-Luc y cap-Luc, de manera que el inicio de la traducción coincidiría con altos niveles de proteasa sintetizada con anterioridad. A las 2 hpt se midió la actividad de la luciferasa.

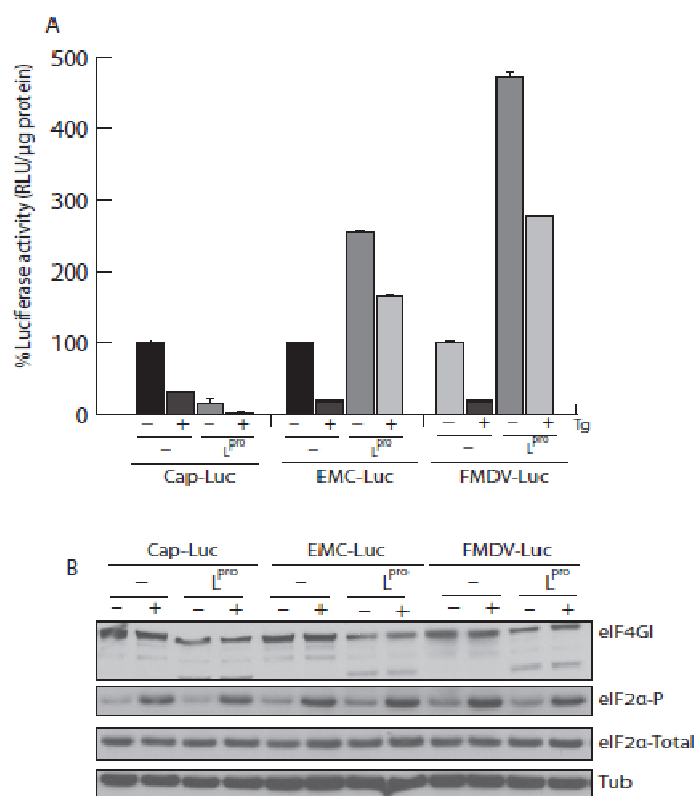


Figura 6. Efecto de la taspargargin sobre la traducción de mRNA transfectado en BHK-T7.

Los plásmidos pTM1-Luc, pKS-FMDV-Luc, pTM1-L y pKS-Luc se linearizaron y se transcribieron *in vitro*. En el caso del pKS-Luc, se añadió análogo de *cap* a la transcripción para obtener el mRNA cap-Luc. Las células fueron transfectadas (L^{pro}) o no (-) con el mRNA EMC-L. Tras 1,5 h se cambió el medio para añadir Tg a 0,75 μ M en los puntos correspondientes y se retransfectó con los mRNAs cap-Luc, EMC-Luc y FMDV-Luc. A) Las células se recogieron para medir la actividad de la luciferasa. El 100 % representa los valores de síntesis en ausencia de Tg y L^{pro}. B) Las mismas muestras se usaron para detectar por western blot eIF2 α -P, eIF2 α total, eIF4GI y tubulina como control de carga.

En la Figura 6 se observa el efecto de FMDV L^{pro} sobre la traducción de los diferentes mRNAs en presencia de Tg. La Tg indujo una profunda inhibición de la traducción en todos los casos, mientras que FMDV L^{pro} estimuló la traducción de los mRNAs EMC-Luc y FMDV-Luc, pero no de mRNA cap-Luc debido al corte de eIF4GI (Figura 6A). En conjunto, FMDV L^{pro} fue capaz de estimular la traducción dirigida por el IRES de FMDV en un 471 %, mientras que el efecto de la Tg inhibió un 80 % la

síntesis de luciferasa; sin embargo, en presencia de FMDV L^{pro} la inhibición fue solo del 42 %. En el caso del IRES de EMCV, la estimulación en presencia de la proteasa fue del 257 %; además, se observa un descenso promedio de la traducción del 81 % inducido por la Tg, que se reduce al 36 % en presencia de L^{pro}. Tal y como se esperaba, tanto FMDV L^{pro} como la Tg bloquearon fuertemente la traducción *cap* dependiente, siendo la inhibición fue aún mayor al combinar ambas.

Apartir de estos resultados se puede concluir que, en células, FMDV L^{pro} es capaz de estimular la traducción dirigida por el IRES de FMDV. Además, la presencia de esta proteasa fue capaz de mantener la traducción en presencia de diferentes compuestos que inducen la fosforilación de eIF2.

1.2. Efecto de FMDV L^{pro} sobre la traducción dirigida por el IRES de FMDV *in vitro*

Se sabe que la entrada directa al ribosoma del mRNA de FMDV y de otros picornavirus está sujeta a concentraciones óptimas de iones monovalentes que difieren entre los sistemas *in vitro* y celulares, y que se requiere una concentración más elevada en el primer caso (Carrasco and Smith, 1976; Niepmann, 2003). Por lo tanto, el primer paso fue establecer la dosis óptima de ion K⁺ en los RRL tratados con nucleasas. Con este fin, se partió de RRL que contenían 80 mM de KCl programados con el mRNA cap-Luc o FMDV-Luc a los que se añadieron dosis crecientes de KCl. Tras 1 h de incubación, se midió la actividad de la luciferasa. En la Figura 7 se muestra el efecto de la adición de dosis crecientes de KCl sobre la traducción de ambos mRNAs. Como se puede apreciar, la síntesis de luciferasa dirigida por el IRES de FMDV se vio fuertemente estimulada al añadir KCl extra a la mezcla de reacción, con lo que se obtuvo la concentración final óptima entre 120 y 140 mM de KCl, mientras que la síntesis del mRNA cap-Luc se redujo drásticamente al aumentar la dosis del ion monovalente, que dio como resultado una inhibición de entorno al 70 % a una concentración final de 140 mM de KCl. Estos resultados corroboran el efecto estimulador del KCl sobre la traducción dirigida por un IRES de picornavirus, mientras que inhibe la traducción dependiente de *cap*.

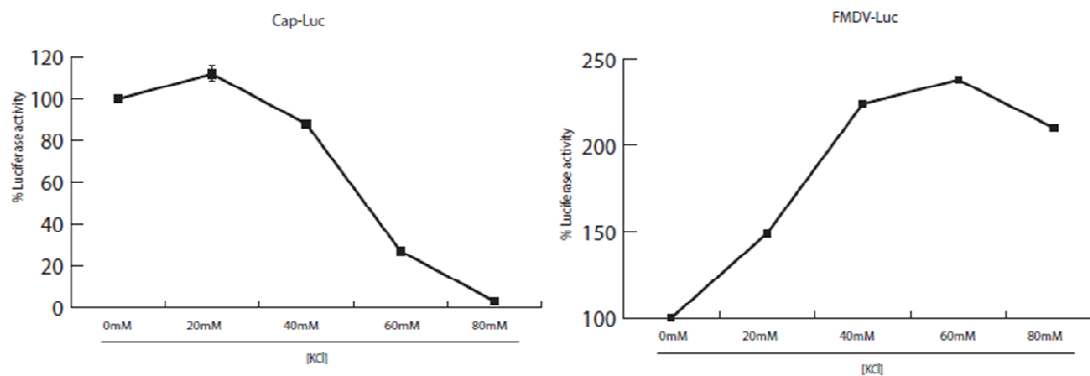


Figura 7. Estudio del efecto de iones monovalentes sobre la traducción cap-dependiente y cap-independiente en RRL.

Los RRL se suplementaron con dosis crecientes de KCl y se programaron con 200 ng de mRNA cap-Luc o FMDV-Luc. Tras 1 h de reacción, se recogieron las muestras para medir la actividad de la luciferasa. El resultado se representa en porcentaje de síntesis con respecto al control en ausencia de KCl extra. Las barras de error representan la D. E. de dos ensayos independientes.

Además, se quiso evaluar el efecto combinado de FMDV L^{pro} junto con el del KCl, para lo que esta vez se añadieron 20 µg/ml de FMDV L^{pro} purificada en los ensayos de traducción con las diferentes concentraciones de KCl. Tras 20 min de tratamiento con la proteasa, los RRL fueron programados con los mRNAs FMDV-Luc o cap-Luc durante 1 h. Posteriormente las muestras se utilizaron para evaluar la producción de luciferasa midiendo su actividad. En concordancia con los resultados de la Figura 8, la traducción del mRNA cap-Luc, en condiciones normales de KCl, quedó fuertemente inhibida en presencia de FMDV L^{pro}, mientras que la síntesis de luciferasa dirigida por el IRES de FMDV experimentó una estimulación (Figura 8A, panel superior). Cuando se aumentaron las concentraciones de KCl, el mRNA FMDV-Luc se comportó igual en ausencia o en presencia de FMDV L^{pro}. Por otra parte, la traducción del mRNA cap-Luc se inhibió tanto por la presencia de FMDV L^{pro} que apenas hubo inhibición adicional por el aumento de KCl. En paralelo se comprobó que la presencia de FMDV L^{pro} efectivamente cortó eIF4GI y que los tratamientos con proteasa y KCl no tuvieron efectos sobre la fosforilación de eIF2 (Figura 8A, panel inferior). Adicionalmente se comprobó si el efecto estimulador de FMDV L^{pro} requiere de la actividad proteolítica de la proteína. Para ello se dispuso de una variante de la proteína en la que la cisteína 21 ha sido sustituida por alanina y es incapaz de cortar eIF4GI. Se analizó el efecto de las proteasas wt y mutante sobre la traducción de FMDV L^{pro} en

condiciones normales de KCl y aumentando el KCl hasta 120 mM de concentración final. En condiciones normales solo la proteasa wt es capaz de estimular la traducción de FMDV-Luc. Con elevada concentración de KCl ninguna de las proteasas fue capaz de estimular la síntesis de luciferasa (Figura 8B). Estos resultados indican que la estimulación inducida por FMDV L^{pro} es correlativa a su actividad catalítica y que al aumentar la concentración final de KCl la proteasa no es capaz de mejorar la traducción dirigida por el IRES de FMDV.

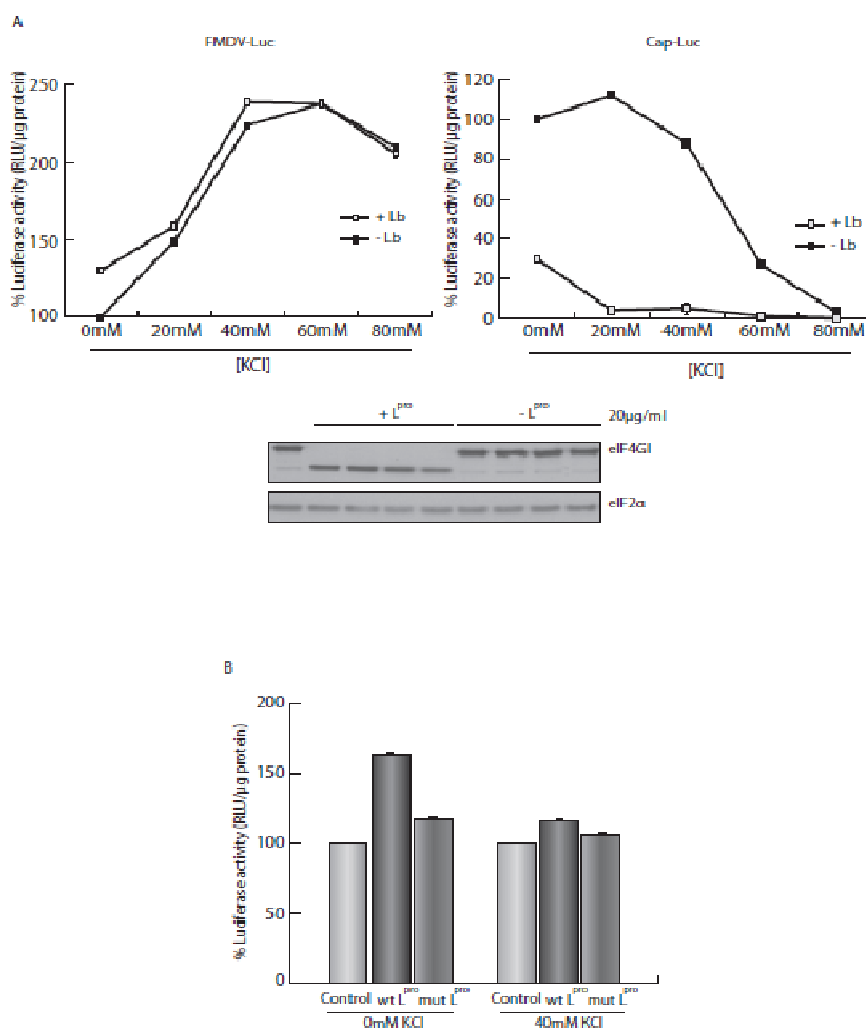


Figura 8. Respuesta del mRNA FMDV-Luc a cambios en la concentración de iones monovalentes.

A) Se emplearon RRL pretratados durante 20 min con concentraciones crecientes de KCl y 20 μg/ml de L^{pro} según se indica en cada caso. Después se añadieron 200 ng de mRNA FMDV-Luc o cap-Luc durante 1 h y después se midió la actividad de la luciferasa. Los resultados muestran el porcentaje de estimulación o inhibición de la producción de actividad de la luciferasa para los mRNAs con respecto a un control sin FMDV L^{pro} ni KCl extra. Las mismas muestras se emplearon para detectar mediante western blot eIF4GI y eIF2α. B) Los RRL fueron tratados con 40 mM de KCl y 20 μg/ml de la proteasa de FMDV activa (wt L^{pro}) o de una forma inactiva (mut L^{pro}), según se indica, durante 20 min. Finalmente, se incubó la mezcla con 200 ng de mRNA FMDV-Luc durante 1 h y después se midió la actividad de la luciferasa. Las barras de error representan la D. E. del ensayo realizado por triplicado.

Para evaluar en RRL el requerimiento de eIF2 para la traducción dirigida por el IRES de FMDV, se empleó el compuesto poli(I:C), el cual al ser un dsRNA sintético induce la fosforilación de IF2 por activación de PKR. Los RRL se trataron con dosis crecientes del compuesto durante 30 min y posteriormente se incorporó el mRNA FMDV-Luc o los mRNAs controles cap-Luc (traducción canónica) y CrPV-Luc (traducción no canónica sin requerimiento de eIFs). Tras 1 h de incubación, se midió la actividad de la luciferasa. En la Figura 9 se muestra el efecto del compuesto sobre la traducción de los diferentes mRNAs. Tanto la traducción *cap* dependiente como la dirigida por el IRES de FMDV resultaron inhibidas en presencia de poli(I:C), mientras que la del mRNA control CrPV no se vio afectada significativamente en presencia de poli(I:C), excepto en dosis altas. Sin embargo, por encima de 50 ng/ μ l y hasta 150 ng/ μ l de poli(I:C), la traducción del mRNA FMDV-Luc fue parcialmente restaurada. A partir de estos resultados se estableció la concentración óptima de poli(I:C) en 50 ng/ml, ya que a esta concentración no fue capaz de inhibir la traducción del mRNA CrPV-Luc, el cual se traduce con independencia del eIF2, pero bloqueó entorno al 50 % la traducción dirigida por el IRES de FMDV.

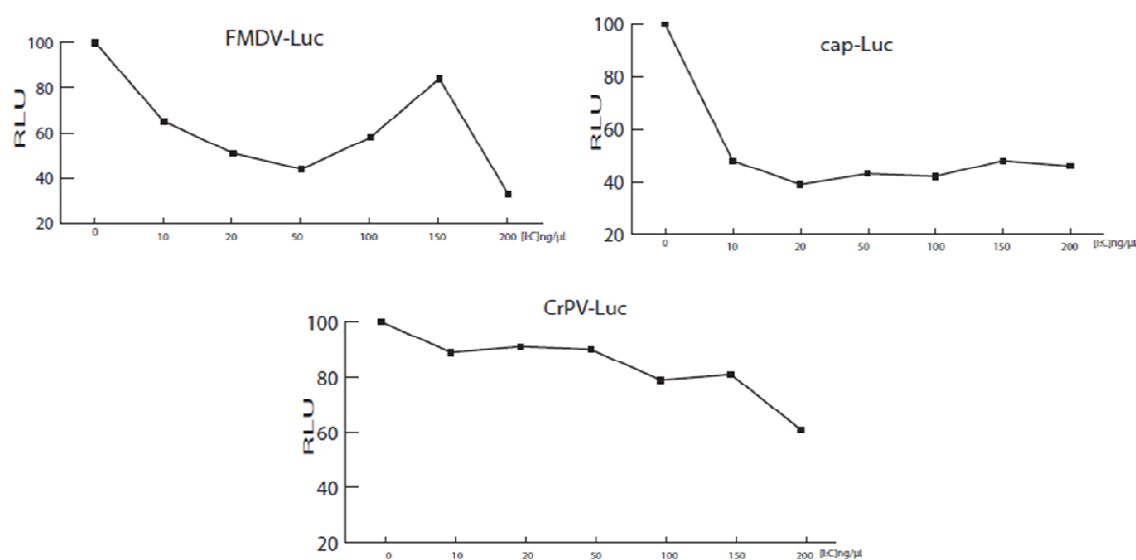


Figura 9. Inhibición inducida por poli(I:C) en traducción de mRNA *in vitro*.

Los RRL se trataron con dosis crecientes de poli(I:C) durante 30 min. Después se añadieron 200 ng de mRNA FMDV-Luc, cap-Luc o CrPV-Luc durante 1 h. Finalmente, las muestras se procesaron para medir la actividad de la luciferasa. Los resultados se presentan en forma de porcentaje; 100 % es la síntesis de luciferasa en ausencia de poli(I:C).

Una vez establecida la dosis óptima de poli(I:C), se quiso evaluar la capacidad de FMDV L^{pro} para restituir la traducción dirigida por el IRES de FMDV cuando eIF2 está fosforilado *in vitro*. Por ello, los RRL fueron incubados con la dosis establecida de poli(I:C) y 5 µg/ml de FMDV L^{pro} purificada en los casos correspondientes; 30 min después se añadió el mRNA FMDV-Luc o los mRNAs cap-Luc o CrPV-Luc como controles. En la Figura 10A se muestra el efecto de FMDV L^{pro} y poli(I:C) sobre la traducción de los diferentes mRNAs. La presencia de FMDV L^{pro} estimuló la síntesis de luciferasa de los mRNAs FMDV-Luc y CrPV-Luc, pero bloqueó profundamente la traducción *cap* dependiente y todo de manera correlativa al corte de eIF4GI (Figura 10B). Por otro lado, el tratamiento con poli(I:C) inhibió parcialmente la traducción *cap* dependiente y la dirigida por el IRES de FMDV, pero no la mediada por el IRES de la región intergénica de CrPV; estos hechos coincidieron con una fuerte fosforilación de eIF2 en presencia del compuesto (Figura 10B).

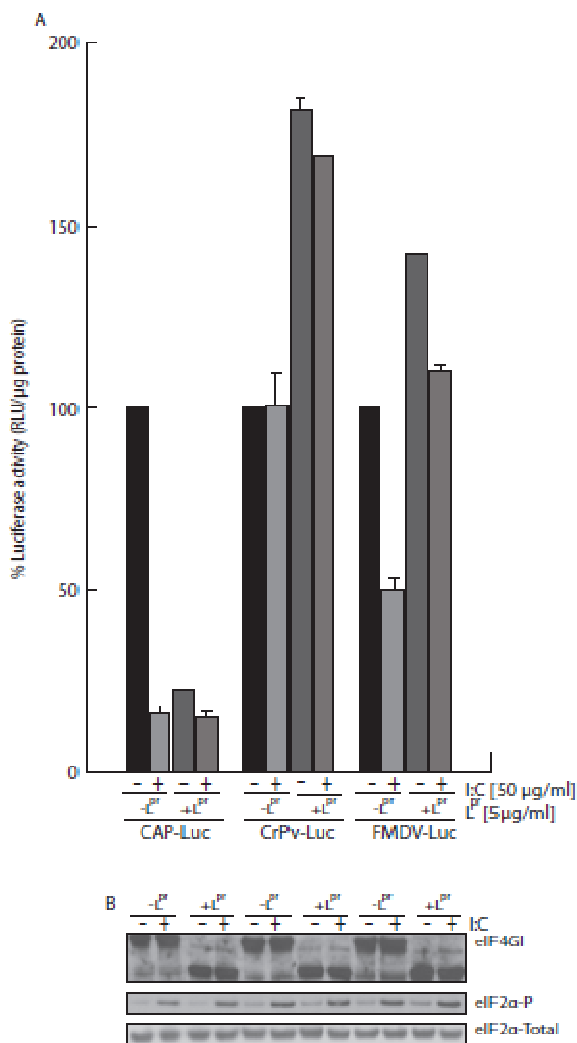


Figura 10. Estudio del efecto de FMDV L^{pro} sobre traducción *in vitro* inhibida por poli(I:C).

Los RRL se trataron con 5 µg/ml de FMDV L^{pro} durante 10 min y 50 µg/ml de poli(I:C) durante 20 min. A continuación se añadió el mRNA FMDV-Luc, cap-Luc y CrPV-Luc durante 1 h. A) Se midió la actividad de la luciferasa y se representó el resultado en porcentajes, donde el 100 % indica la ausencia de FMDV L^{pro} y poli(I:C), y las barras de error, la D.E. de tres ensayos independientes. B) Las mismas muestras se emplearon para detectar eIF2α-P, eIF2α total y eIF4GI mediante western blot.

Al añadir FMDV L^{pro} en presencia de poli(I:C), la síntesis de luciferasa a partir del mRNA FMDV-Luc fue restaurada de manera significativa. En conjunto estos datos sugieren que FMDV L^{pro} es capaz de conferir independencia de eIF2 a la traducción dirigida por el IRES de FMDV en RRL.

1.3. Efecto de los iones monovalentes sobre la traducción dirigida por los IRESs de picornavirus

En picornavirus, la síntesis tardía de proteínas virales no requiere de eIF2 activo (White et al., 2011; Welnowska et al., 2011). Este fenómeno parece estar relacionado con la expresión de FMDV L^{pro} o PV 2A^{pro} (Moral-López et al., 2014; Redondo et al., 2011). Además de los efectos de las proteasas virales en la traducción, también se sabe que los cambios en la permeabilidad celular inducidos por la infección viral conducen a la ruptura del gradiente iónico celular y aumentan la concentración de cationes intracelulares propiciando la inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares (Lubin, 1967), mientras que la síntesis de las proteínas de picornavirus se ve favorecida (Carrasco and Smith, 1976; Castrillo et al., 1987; Niepmann, 2003). A continuación se estudia el papel del catiónpotasio en la traducción dirigida por IRESs de picornavirus.

1.3.1. Estimulación y rescate de la traducción de mRNA por KCl *in vitro*

Para estudiar el efecto de los iones sobre la traducción dirigida por los IRESs de picornavirus en ausencia de eIF2 activo, se optimizaron los RRL para este tipo de ensayo. Los lisados fueron preparados para reacciones de 100 μ l en condiciones óptimas de AcMg y estándares para KCl. Después los RRL fueron suplementados con dosis crecientes de KCl en presencia de 50 ng/ μ l de poli(I:C). Tras 30 min de incubación, se incorporó el mRNA FMDV-Luc y 1 h después se midió la actividad de la luciferasa. En la Figura 11A se puede observar cómo la síntesis de luciferasa a partir del IRES de FMDV se incrementa al aumentar la concentración final de KCl hasta 160 mM, mientras que por encima de este punto se observa un descenso. Paralelamente, en ausencia de KCl extra, la presencia de poli(I:C) indujo una inhibición de la traducción del 60 %, y se observa igualmente un aumento de la síntesis de luciferasa en presencia

del inhibidor al aumentarla en 80 mM, llegando a la concentración final de KCl hasta 160 mM.

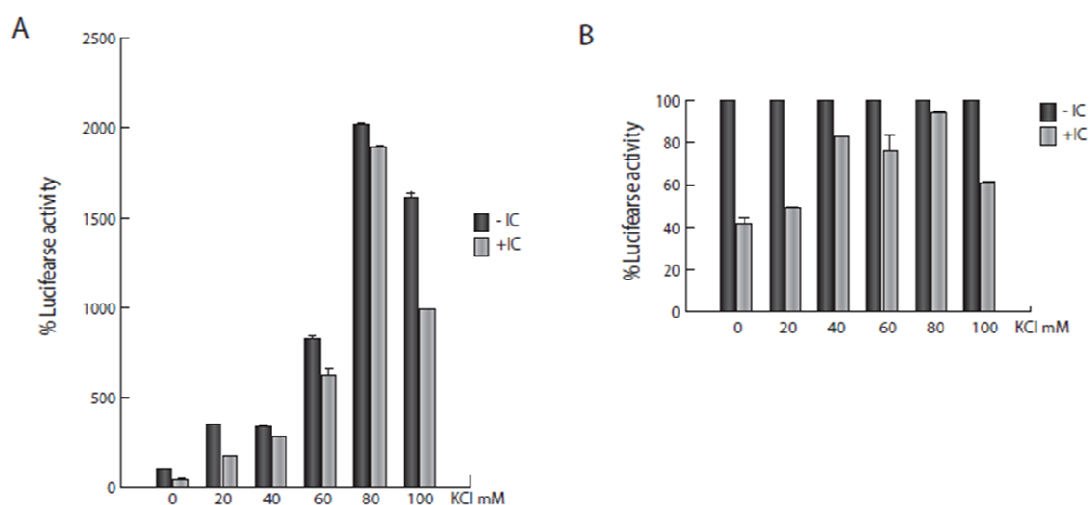


Figura 11. Estudio de la inhibición de la traducción por poli(I:C) del IRES de FMDV en RRL en presencia de iones monovalentes.

Los RRL fueron tratados con 50 $\mu\text{g/ml}$ de poli(I:C) y dosis crecientes de KCl durante 30 min. Después se incorporaron 200 ng de mRNA FMDV-Luc. Finalmente, tras 1 h de incubación, se midió la actividad de la luciferasa. Los resultados están representados en porcentaje, tomando el control sin poli(I:C) ni KCl extra como el 100 %. Las barras de error representan la D. E. del mismo ensayo realizado por triplicado.

En la Figura 11B se puede observar con más detalle el efecto de las sales sobre la inhibición por poli(I:C); cuando se añadió KCl extra, la inhibición inducida por el poli(I:C) se redujo progresivamente. De hecho, tras añadir 80 mM de KCl sobre los 80 mM basales (160 mM de KCl final), el tratamiento con poli(I:C) apenas inhibió la traducción dirigida por el IRES de FMDV; sin embargo, a concentraciones superiores de KCl, como 180 mM, se volvió a observar un significativo bloqueo de la traducción. Estos resultados sugieren que a concentraciones óptimas de KCl el IRES de FMDV es capaz de iniciar la traducción con independencia del factor eIF2.

Para profundizar más en este tema, se decidió realizar el mismo ensayo, pero empleando un mRNA que expresara luciferasa bajo el control del IRES de mengovirus (Mengo-Luc), un cardiovirus muy similar al EMCV. El resultado muestra una vez más un fuerte aumento de la traducción no canónica dependiente de KCl con un punto óptimo a 160 mM (Figura 12A).

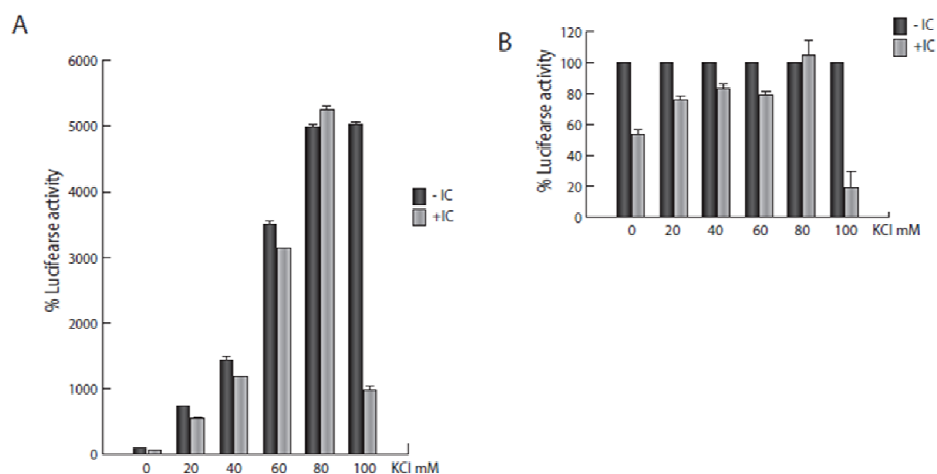


Figura 12. Estudio de la inhibición de la traducción por poli(I:C) del IRES de mengovirus en RRL en presencia de iones monovalentes.

Los RRL se trataron con 50 $\mu\text{g/ml}$ de poli(I:C) junto con diferentes concentraciones de KCl durante 20 min y a continuación se programaron con 200 ng de mRNA Mengo-Luc. A la hora de incubación, se midió la actividad de la luciferasa. A) Representación de síntesis relativa de luciferasa con respecto al punto no tratado con poli(I:C) ni KCl extra. B) Gráfica que representa el porcentaje de síntesis de luciferasa tomando como referencia el punto no tratado con poli(I:C) para la misma concentración de KCl.

En detalle se puede observar que en presencia de poli(I:C), el mRNA Mengo-Luc se inhibió un 55 % en condiciones basales de KCl, pero al añadir 80 mM de KCl extra (concentración final, 160 mM) la traducción quedó completamente restaurada en presencia del inhibidor (Figura 12B). Según estos resultados, al igual que el IRES de FMDV, el IRES de mengovirus es capaz de dirigir una eficiente traducción cuando eIF2 está fosforilado en concentraciones óptimas de KCl.

Finalmente, una vez establecida la concentración final óptima de KCl en 160 mM para nuestro sistema *in vitro*, se quiso comparar el efecto que causan las crecientes concentraciones de KCl sobre la traducción en presencia de poli(I:C) para tres mRNAs que contienen el gen de la luciferasa precedida por los IRESs de CrpV, EMCV o FMDV. Para ello, los RRL se trataron con 50 ng/ml de poli(I:C) y se suplementaron con 80 mM de KCl extra para alcanzar una concentración final de 160 mM de KCl. A los 30 min se añadieron los mRNAs EMC-Luc, FMDV-Luc o CrpV-Luc. Tras 1 h de incubación, se midió la actividad de la luciferasa. En la Figura 13 se muestra el efecto sobre la traducción en concentración estándar de KCl o en concentración óptima de KCl sobre la traducción inhibida por poli(I:C). En el caso del mRNA CrpV-Luc (Figura 13A) no se observaron cambios en la eficacia de la traducción en presencia de poli(I:C), ya que este IRES es capaz de dirigir la traducción

con total independencia de eIF2. En el caso del mRNA EMC-Luc (Figura 13B), se observó una drástica inhibición (82 %) bajo el efecto del poli(I:C), pero al añadir 80 mM de KCl extra la traducción quedó completamente restaurada (97 %). En el caso del mRNA FMDV-Luc (Figura 13C), se volvió a comprobar cómo la adición de 80 mM de KCl extra reinstaura una traducción eficiente aun en ausencia de eIF2 funcional.

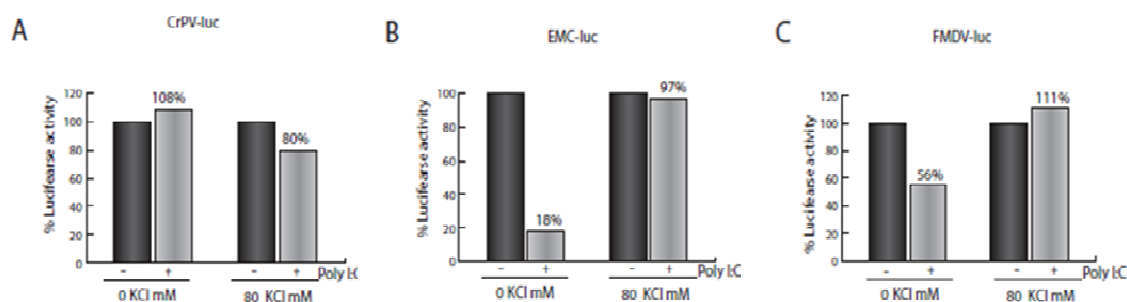


Figura 13. Impacto del KCl sobre la inhibición de la traducción inducida por poli(I:C) para los IRES de EMC, FMDV y CrpV *in vitro*.

Los RRL fueron tratados con 50 µg/ml de poli(I:C) junto con 80 mM de KCl en los casos correspondientes durante 30 min. Finalmente, se programaron con 200 ng de los mRNAs (A) FMDV-Luc, (B) EMC-Luc y (C) CrpV-Luc. 1 h después se midió la actividad de la luciferasa. El resultado se muestra como actividad relativa de luciferasa con respecto a un control en ausencia de poli(I:C) o KCl extra.

En general, los resultados indican que en concentraciones óptimas de K^+ para la traducción en RRL los IRESs de picornavirus son capaces de unirse directamente al ribosoma en ausencia del complejo ternario. Además, el aumento en la concentración de cationes monovalentes en nuestro sistema experimental no solo inhibe la traducción *cap* dependiente en RRL, sino que también permite una eficiente traducción de mRNAs con IRESs de picornavirus en condiciones similares a las propiciadas por una respuesta antiviral, cuando el eIF2 resulta fosforilado. Resulta interesante que el efecto de los cationes monovalentes supera incluso el observado en presencia de las proteasas virales.

1.3.2. Efecto del hipuristanol sobre la traducción de picornavirus a concentraciones óptimas de KCl

Para profundizar en el mecanismo de rescate de la traducción por KCl, se decidió emplear hipuristanol (Hip), un inhibidor específico del factor eIF4A (Lindqvist et al., 2008). El factor eIF4A, además de participar en la unión del mRNA a la subunidad 40S, presenta actividad helicasa (Rogers et al., 2002). Al igual que en los casos anteriores, se suplementaron los RRL con 80 mM de KCl extra y en este caso se

añadieron 0,1 mM de Hip. Tras 20 min de incubación, los RRL fueron programados con mRNA FMDV-Luc o EMC-Luc y después de 1 h de incubación se midió la actividad de la luciferasa. Tal y como se preveía, la inhibición del factor eIF4A causó un bloqueo parcial (50 %) en la traducción dirigida por el IRES de FMDV. Al añadir 80 mM de KCl extra para llegar a la concentración final de 160 mM, la inhibición se incrementó hasta llegar al 80 % con respecto al control (Figura 14A). En la Figura 14B se observa un resultado similar para el IRES de EMCV; el Hip por sí solo redujo la traducción un 50 %, pero al combinarse con el aumento en la concentración de KCl la traducción se inhibió hasta el 95 %.

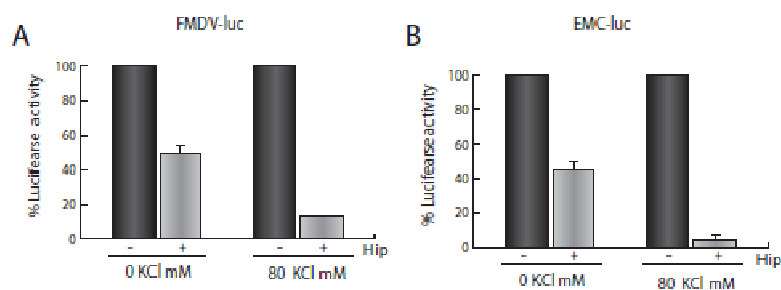


Figura 14. Evaluación del impacto de los iones monovalentes sobre la inhibición de la traducción por hipuristanol.

Los RRL fueron tratados con 0,1 mM de Hip y 80 mM de KCl en los casos correspondientes durante 20 min. A continuación se programaron con 200 ng de mRNA (A) EMC-Luc o (B) FMDV-Luc. Tras 1 h de reacción, se midió la actividad de la luciferasa y el resultado se representó en porcentaje con respecto a los puntos no tratados con poli(I:C) para cada dosis de KCl.

Por tanto, a diferencia de la inhibición por poli(I:C), el efecto del Hip no solo no pudo ser rescatado por el potasio, sino que además aumentó el efecto inhibitor. Estos resultados sugieren que el KCl induce cambios conformacionales en la estructura del IRES que mejoran la capacidad de entrada directa al ribosoma, pero que, sin embargo, incrementan el requerimiento por la helicasa eIF4A activa.

2. ESTUDIO DE LOS REQUERIMIENTOS DE FACTORES DE INICIACIÓN PARA LA TRADUCCIÓN DE LOS mRNAs DE VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO I (HIV-1)

Los mRNAs de HIV-1 se diferencian de otros mRNAs virales, como los de los picornavirus, por presentar una estructura *cap* en su extremo 5'. También poseen una cola de poli(A) en su extremo 3'. Estas características sugieren que su traducción debe operar mediante un mecanismo canónico, con intervención de todos los factores del complejo eIF4F (eIF4GI, eIF4E y eIF4A) y también de PABP (Soto-Rifo et al., 2012; Berkhout et al., 2011). Sin embargo, la región 5'UTR que se expande hasta la región codificante, cuya función resulta aún controvertida, se encuentra altamente estructurada y varios autores la han descrito como una secuencia con actividad IRES (Ohlmann et al., 2000; Brasey et al., 2003a). De hecho, permite dirigir la traducción de los mRNAs que la portan incluso cuando la traducción canónica ha sido bloqueada por la expresión de la proteasa 2A de PV (2A^{pro}), que corta, entre otros, el factor eIF4G (Amorim et al., 2014). Otra característica relevante de los mRNAs de HIV-1 reside en las secuencias Rev Response Element (RRE), que permiten la interacción con la proteína viral Rev (Cullen and Malim, 1991; Heaphy et al., 1990). Entre otras funciones, la unión de Rev a la secuencia RRE de los mRNA de HIV-1 podría estimular la traducción de estos (Perales et al., 2005; Kimura et al., 1996). En los experimentos que se describen a continuación se han evaluado los requerimientos, tanto virales como celulares, necesarios para la traducción no canónica de los mRNAs de HIV-1.

2.1. Bloqueo del inicio de la traducción *cap* y poli(A) dependiente por HIV-1 PR

En el caso de los picornavirus, el corte de factores del complejo eIF4F conlleva la supresión de la traducción canónica que favorece la traducción dirigida por la secuencia IRES de los mRNAs virales. Si HIV-1 emplea una estrategia similar, lo primero es identificar la capacidad de su proteasa para impedir la traducción canónica. Por ello, se quiso evaluar si HIV-1 PR es capaz de hidrolizar factores celulares necesarios para la traducción *cap*-poli(A) dependiente. Se emplearon extractos de HeLa tratados durante 1 o 3 h con 20 ng de HIV-1 PR purificada, además de 1 µg de MBP-

(PV)2A^{pro} como control. Adicionalmente, se incluyó un control con saquinavir (Sq), un inhibidor de HIV-1 PR, junto con la proteasa, de manera que se pudiese estudiar el efecto de la proteasa de HIV-1 cuando está inactivada. Tras la incubación, las muestras se separaron por SDS-PAGE y se realizó un western blot para analizar el estado de eIF4GI, eIF4GII y PABP. En la Figura 15 se observa el efecto de las proteasas sobre estos factores. La presencia de HIV-1 PR indujo una profunda degradación, desde la hora 1, de los factores eIF4GI y PABP, y un ligero cambio en la movilidad del factor eIF4GII, posiblemente debido al corte de la región N-terminal por parte de HIV-1 PR.

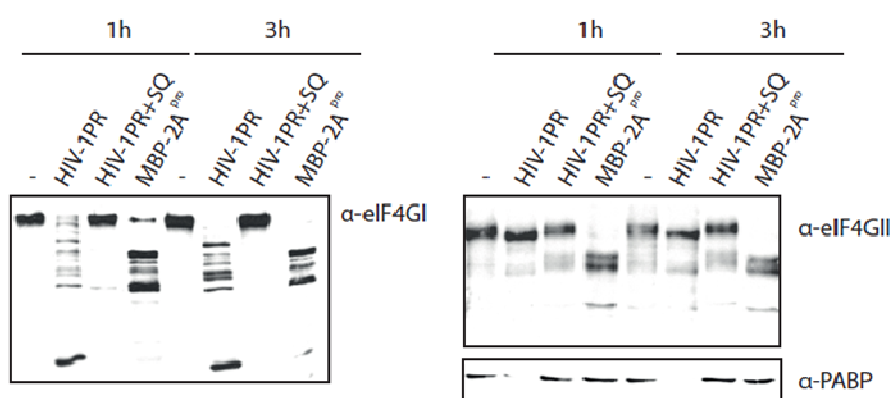


Figura 15. Efecto de la proteasa de HIV-1 sobre eIF4G y PABP en extractos de células HeLa.

Se incubaron con extractos de células HeLa con 20 ng de proteína purificada HIV-1PR, 20 ng de HIV-1PR + Sq o 1 μ g de MBP-2A^{pro} durante 1 o 3 h. Después se realizó un western blot para detectar el estado de eIF4GI, eIF4GII y PABP.

La proteína MBP-2A^{pro} hidrolizó, como se esperaba, el eIF4GI y el eIF4GII, pero no PABP, mientras que la proteasa de HIV-1 en presencia de Sq no indujo el corte de ningún factor. Estos resultados indican que, en presencia de HIV-1 PR, la traducción cap-poli(A) dependiente debería quedar inhibida al anularse el complejo eIF4F y la proteína PABP, lo que impediría la circularización de los mRNAs y la iniciación de la traducción.

Para profundizar en este supuesto, quisimos estudiar el efecto de HIV-1 PR sobre la traducción cap-poli(A) dependiente en extractos de células HeLa usando dos mRNAs que contienen el gen de la luciferasa como reportero: uno sin cola de poli(A), pero con estructura *cap* (+/-), y otro con estructura *cap* y cola de poli(A) (+/+) (Figura 16A). Para simular las condiciones de la infección sobre la traducción celular, el mRNA debería estar unido a la maquinaria de traducción antes de la aparición de HIV-1 PR,

por lo que los mRNAs se incorporaron 8 min antes de añadir HIV-1 PR o, como controles, MBP-2A^{pro} o HIV-1 PR + Sq. Una hora después se midió la actividad de la luciferasa y se observó un fuerte bloqueo de la traducción en presencia de HIV-1 PR y MBP-2A^{pro}, llegando a inhibirse la traducción del mRNA con *cap* (+/-) en un 80 % y en casi un 100 % la del mRNA con *cap* y cola de poli(A) (+/+). La presencia de Sq redujo considerablemente el bloqueo de la traducción de ambos tipos de mRNAs (Figura 16B).

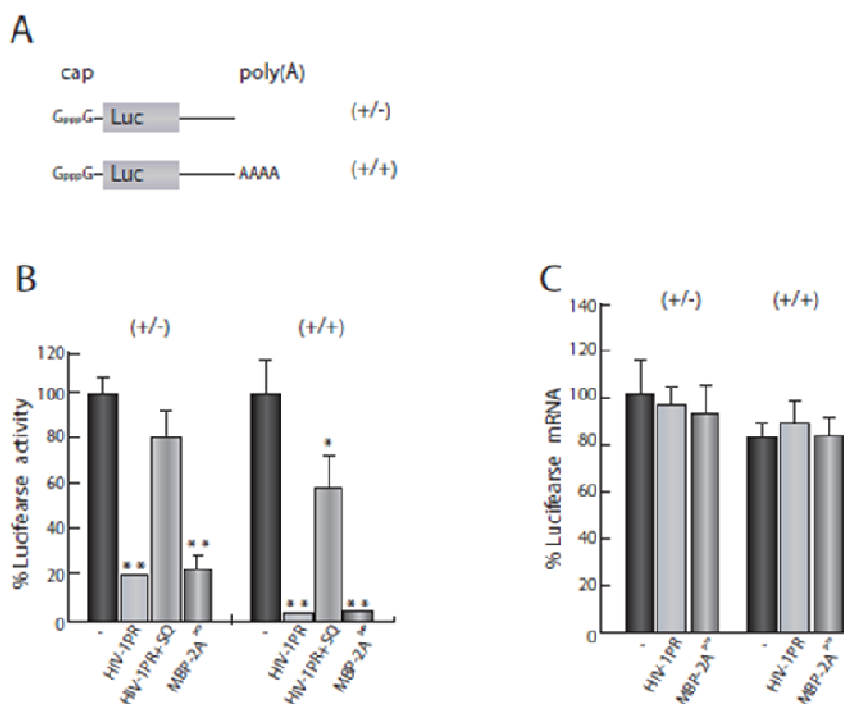


Figura 16. Efecto de HIV-1 PR sobre la reiniciación de la traducción en extractos de células HeLa.

Los extractos fueron programados durante 8 min con 50 ng de mRNA con estructura *cap* (+/-) o *cap* y poli(A) (+/+). A continuación se añadieron 20 ng de HIV-1 PR o, como controles, 1 µg de MBP-2A^{pro} o 20 ng de HIV-1 PR + Sq durante 1 h. A) En la figura se muestra el resultado expresado en porcentaje; el 100 % es el valor de actividad de la luciferasa en ausencia de proteasa. Las barras de error muestran la D. E. de tres experimentos independientes. B) En paralelo se aislaron los mRNAs tras 1 h de incubación y se cuantificaron mediante RT-PCR. Se representan los niveles relativos de mRNA. *P < 0,05; **P < 0,01.

La fuerte inhibición de la traducción observada tras el tratamiento con HIV-1 PR en ambos mRNAs sugiere que HIV-1 PR es capaz de producir un eficaz bloqueo de la traducción *cap* y poli(A) dependiente asociado con la hidrólisis de eIF4GI, eIF4GII y PABP. Además, se comprueba que esta inhibición no se debe a cambios en la cantidad de mRNA, ya que al realizar una cuantificación de los diferentes mRNAs Luc mediante *real-time* RT-PCR no se observaron disminuciones significativas de las cantidades de mRNA en ningún caso (Figura 16C).

El siguiente paso fue analizar la capacidad de HIV-1 PR para inhibir la traducción poli(A) dependiente. Para ello se comparó el efecto de HIV-1 PR sobre la traducción de dos mRNAs, ambos sin *cap* y uno de ellos con cola de poli(A) (Figura 17A), en diferentes sistemas de traducción *in vitro* y añadiendo, en su caso, Sq como control. La presencia de la cola de poli(A) no mejoró la eficacia de traducción con respecto al mRNA sin cola de poli(A) en RRL (Figura 17D), tal como se esperaba (Kuyumcu-Martinez et al., 2004; Michel et al., 2000); sin embargo, sí estimuló la traducción de manera notable en los extractos de células HeLa (cuatro veces) (Figura 17B) y Krebs-2 (cinco veces) (Figura 17C).

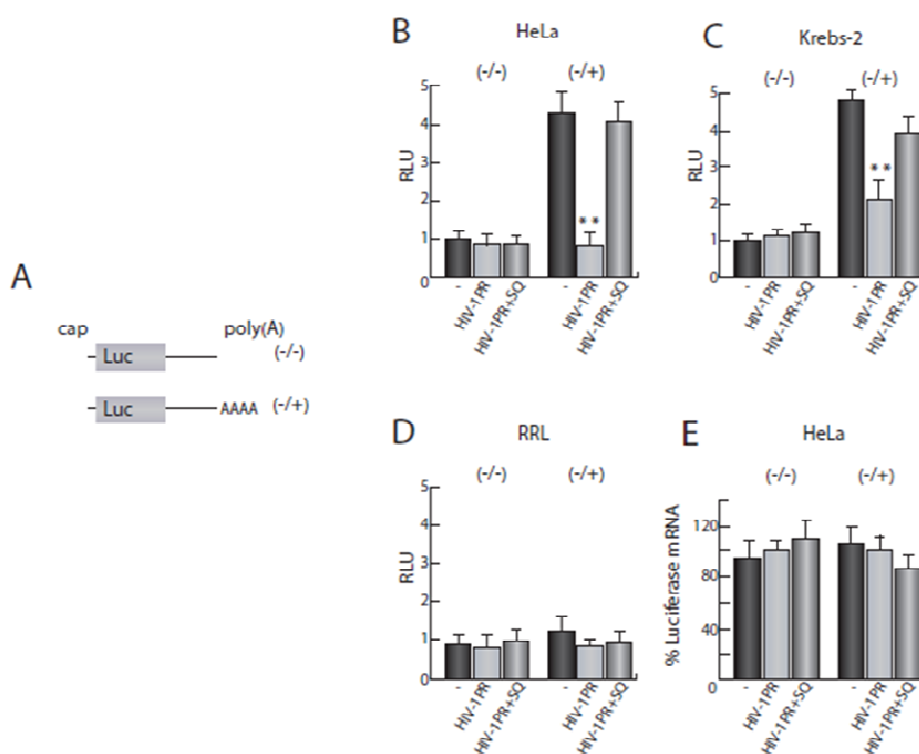


Figura 17. Efecto de HIV-1 PR sobre la traducción poli(A) dependiente en diferentes extractos.

A) Representación esquemática de los mRNAs empleados. Los extractos se trataron con 20 ng de HIV-1 PR durante 30 min para a continuación añadir 200 ng de mRNA sin poli(A) (-/-) o con poli(A) (-/+) y, en su caso, 2,5 μ M de Sq. 30 min después se midió la actividad de la luciferasa de dos ensayos independientes; los valores obtenidos están representados en gráficas de barras para B) extractos de HeLa, C) Krebs-2 y D) RRL. E) En paralelo se aislaron los mRNAs de los extractos de células HeLa para realizar *real time* RT-PCR.

La presencia de HIV-1 PR redujo considerablemente la traducción del mRNA con cola de poli(A) (-/+) en HeLa y Krebs-2, mientras que el mRNA sin cola de poli(A) (-/-) se mostró insensible a la proteasa. Por otro lado, HIV-1 PR no tuvo efectos significativos sobre la traducción de ninguno de los mRNAs en RRL. La Figura 17E muestra cómo la cantidad de mRNA cuantificado por *real-time* RT-PCR permaneció

estable en todos los casos. En conjunto, estos datos sugieren que HIV-1 PR bloquea de manera específica la traducción poli(A) dependiente.

2.2. Rescate de la traducción poli(A) dependiente en extractos de HeLa

Los resultados del experimento anterior indican que la traducción de los mRNAs con cola de poli(A) se ve fuertemente inhibida en presencia de HIV-1 PR. Si esta inhibición se debe al corte del factor PABP, la incorporación de PABP exógeno intacto debería restablecer la traducción. Por ello se trataron extractos de células HeLa con 10 ng de HIV-1 PR durante 30 min, de manera que todo el PABP quedara hidrolizado. A continuación se añadió Sq para inactivar la proteasa y se programaron los extractos con 20 ng de mRNA_{Luc} con estructura *cap* (+/-), con estructura *cap* y cola de poli(A) (+/+), solo con cola de poli(A) (-/+ o sin ninguna de las estructuras (-/-). Al mismo tiempo se añadieron 25 ng de GST-PABP o de GST solo como control en los puntos correspondientes. Tras 1 h de incubación se midió la actividad de la luciferasa y observándose una drástica caída en la síntesis de luciferasa (Figura 18A, 18B y 18C) en presencia de HIV-1 PR, excepto en el caso del mRNA sin estructura *cap* ni cola de poli(A) (-/-) (Figura 18D), lo que indica que, en concordancia con los resultados anteriores, HIV-1 PR inhibe tanto la traducción *cap* dependiente como la poli(A) dependiente. La adición de GST-PABP restauró la traducción de los mRNAs con cola de poli(A) o cola de poli(A) y estructura *cap* de manera significativa (Figura 18B y 18C), pero no tuvo efectos relevantes en los mRNAs sin cola de poli(A).

Asimismo, el GST solo no tuvo efecto alguno sobre la traducción de ninguno de los mRNAs. En conjunto, los datos indican que la adición de PABP exógeno es capaz de restablecer la traducción poli(A) dependiente en nuestro sistema experimental tras la adición de HIV-1 PR. Por tanto, la inhibición de la traducción poli(A) dependiente inducida por la proteasa de HIV-1 se debe al corte proteolítico del factor de la traducción PABP.

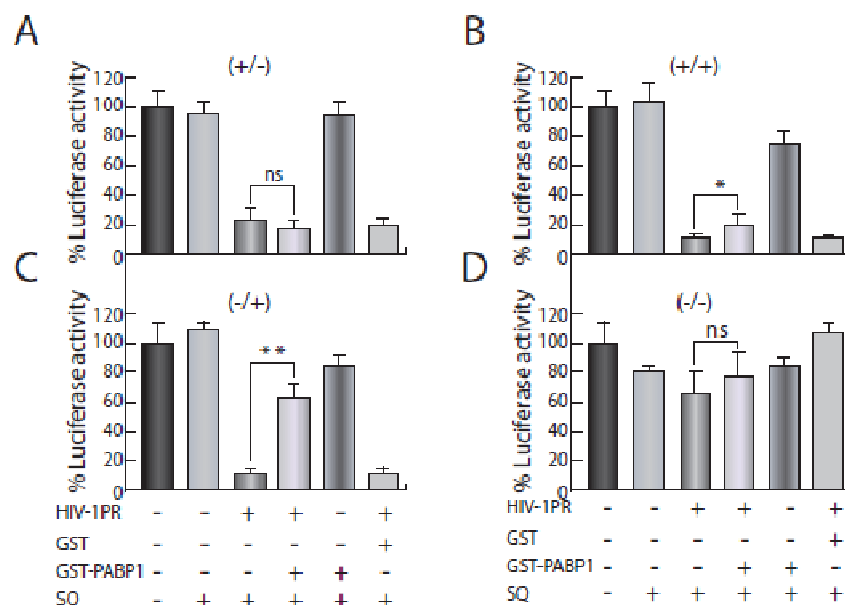


Figura 18. GST-PABP rescata la traducción poli(A) dependiente en extractos celulares tratados con HIV-1 PR.

Los extractos se incubaron con 10 ng de HIV-1 PR durante 30 min y a continuación se añadieron a 20 ng del mRNA correspondiente y 25 ng de GST-PABP o GST y, cuando procedió, 2,5 μ M Sq. 1 h después se analizó la actividad de la luciferasa de los mRNAs: A) (+/-), B) (+/+), C) (-/+) y D) (-/-).

*P < 0,05; **P < 0,01; N. S.: no significativo.

2.3. Efecto de HIV-1 PR sobre la traducción de mRNA genómico de HIV-1

Hasta ahora, los datos sugieren que la proteasa de HIV-1 es capaz de inhibir la traducción *cap* y poli(A) dependiente al hidrolizar los factores de la traducción eIF4GI y PABP. El mRNA genómico de HIV-1 (HIV-1g mRNA) presenta, además de las estructuras *cap* y poli(A), una estructura del tipo de IRES en la región 5'UTR que se expande hasta la región codificante (Ohlmann et al., 2000; Brasey et al., 2003a; Amorim et al., 2014). Para determinar el efecto de la hidrólisis de eIF4GI y PABP sobre la traducción dirigida por el IRES de HIV-1, se trataron extractos de células HeLa con dosis crecientes de HIV-1 PR durante 30 min para después inactivar la proteasa con Sq. Al mismo tiempo, los extractos se programaron con 50 o 100 ng de HIV-1g mRNA con estructura *cap* y cola de poli(A) (Figura 19A). Como control se emplearon 100 ng de mRNA Luc con *cap* y cola de poli(A) (+/+). Tras realizar un marcaje radiactivo de proteínas de 1 h, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE y fluorografía, seguidas de autorradiografía. En la Figura 19B se puede observar como 20 ng de

HIV-1 PR son suficientes para hidrolizar eIF4GI y PABP, e inhibir casi por completo la traducción del mRNA control (+/+) (Figuras 19C y 19D).

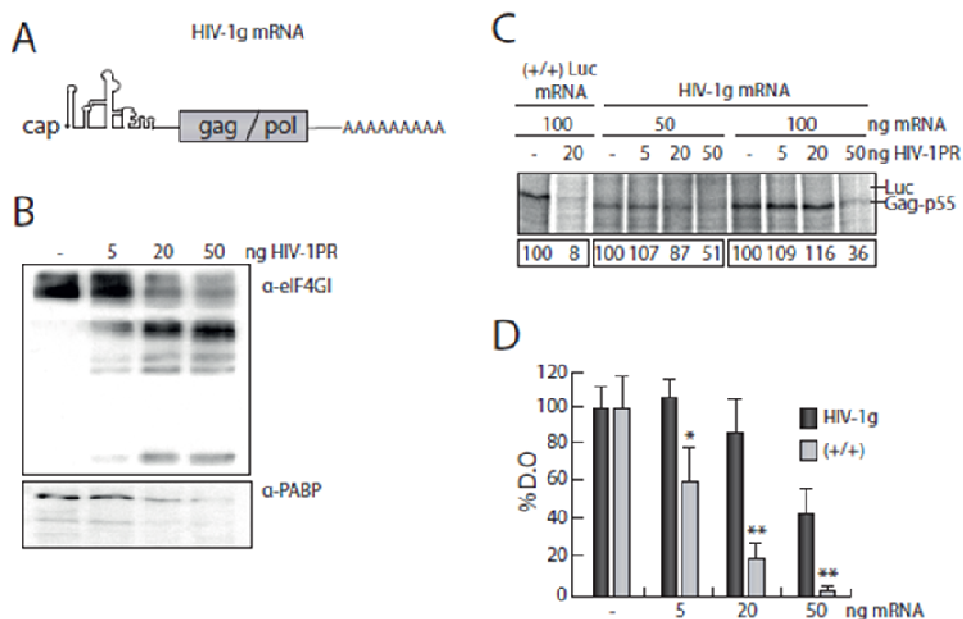


Figura 19. Efecto de HIV-1 PR sobre la traducción del mRNA genómico de HIV-1.

A) Representación esquemática del mRNA sintetizado *in vitro* HIV-1g mRNA. B) Dosis crecientes de HIV-1 PR fueron añadidas a los extractos de células HeLa durante 30 min; después, estos extractos se emplearon para detectar eIF4GI y PABP mediante western blot. C) Los extractos de células HeLa fueron tratados con 20 ng de HIV-1 PR durante 30 min. Después se añadieron 2,5 μ M de Sq y se programaron con 100 ng del mRNA Luc (+/+) o 50 y 100 ng de HIV-1g mRNA, respectivamente, y se suplementaron con metionina radioactiva. Finalmente, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE, fluorografía y autorradiografía. Los valores porcentuales de la señal correspondiente a Luc y Gag-p55 están indicados debajo de cada carril. D) Representación en diagrama de barras de la expresión porcentual respecto a las muestras no tratadas con HIV-1 PR. Las barras en negro indican traducción de gag, mientras que las barras grises corresponden a la síntesis de luciferasa por el mRNA control. La D. E. se obtuvo a partir de dos ensayos independientes.*P < 0,05; **P < 0,01.

No obstante, la síntesis de la poliproteína Gag en presencia de 5 o 20 ng de HIV-1 PR fue similar a la obtenida en ausencia de la proteasa con independencia de la cantidad de mRNA empleado. En cambio, al incrementar la dosis de HIV-1 PR a 100 ng, se pudo apreciar una inhibición del 50 % para 50 ng de mRNA y del 64 % para 100 ng del mismo mRNA (Figuras 19C y 19D). Estos resultados sugieren que la traducción de HIV-1g mRNA, aunque es sensible a altas dosis de proteasa, es más resistente a HIV-1 PR que la traducción dependiente de *cap* y cola de poli(A).

2.4. Requerimiento de eIF4GI para la traducción de los mRNAs de HIV-1 a tiempos tempranos y tardíos

Para estudiar con más detalle los requerimientos de factores para la traducción de los mRNAs de HIV-1, empleamos un replicón de HIV-1 que contiene, como reportero, el gen de la luciferasa de *Renilla reniformis* insertado en la región codificante de Gag (pNL4.3-Renilla). El replicón se transfectó en células HeLa. Tras 6 h se cambió el medio y se volvieron a transfectar las células con mRNA EMC-2A^{pro} o EMC-L^{pro} para sintetizar las proteasas PV 2A^{pro} o FMDV L^{pro}. Para determinar el valor de la actividad de la luciferasa asignable a estas primeras 6 h, en una muestra se añadió cicloheximida (CHX) para usarla como control. 4 h después se midió la actividad de la luciferasa y se observó una fuerte inhibición de la traducción en presencia de PV 2A^{pro} (76 %) y FMDV L^{pro} (94 %) (Figura 20A). Además, esta inhibición correlaciona con el corte total del factor eIF4GI por ambas proteasas (Figura 20B).

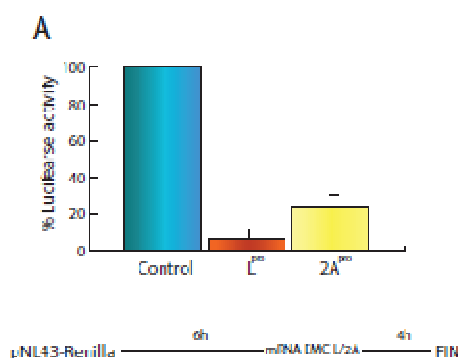
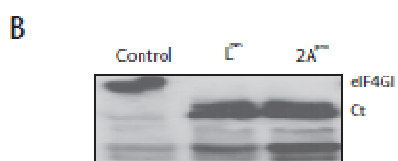


Figura 20. Efecto de proteasas de picornavirus en la traducción dirigida por el IRES de HIV-1 a tiempos cortos.

A) Las células se transfectaron con el replicón pNL4.3-Renilla. A las 6 hpt, las células se retransfectaron en los casos indicados con los mRNAs FMDV-L^{pro} o EMC PV 2A^{pro}. 4 h después se analizó la síntesis de luciferasa y el resultado se muestra como valores porcentuales del obtenido en la muestra de control sin proteasas. B) Las mismas muestras se emplearon para analizar el estado de eIF4GI mediante western blot.



El siguiente paso fue evaluar el requerimiento de eIF4F a tiempos más tardíos, por lo que se transfectaron células HeLa durante 18 h con el replicón pNL4.3-Renilla. A continuación se transfectaron los mRNAs EMC-2A^{pro} y EMC-L^{pro}, y 1 h después se incorporaron CHX, Hip o Tg, en los casos correspondientes, durante 1 h más. Finalmente, se midió la actividad de la luciferasa. En la Figura 21 se observa, a diferencia del caso anterior, una estimulación de la traducción de 2,5 veces en presencia

de FMDV L^{pro} y de 0,3 veces en presencia de PV 2A^{pro} con respecto al control (Figura 21A). Sin embargo, la adición de los inhibidores de eIF4A e iF2 por Hip y Tg dieron como resultado un bloqueo de la traducción del 84 % y 97 %, respectivamente (Figura 21B). En conjunto, estos resultados sugieren que el replicón de HIV-1 muestra diferentes requerimientos de factores para la traducción en tiempos tempranos y tardíos; mientras que a horas tempranas requiere del factor eIF4GI intacto para la síntesis de luciferasa, a tiempos tardíos es capaz de sintetizar luciferasa con eIF4GI cortado.

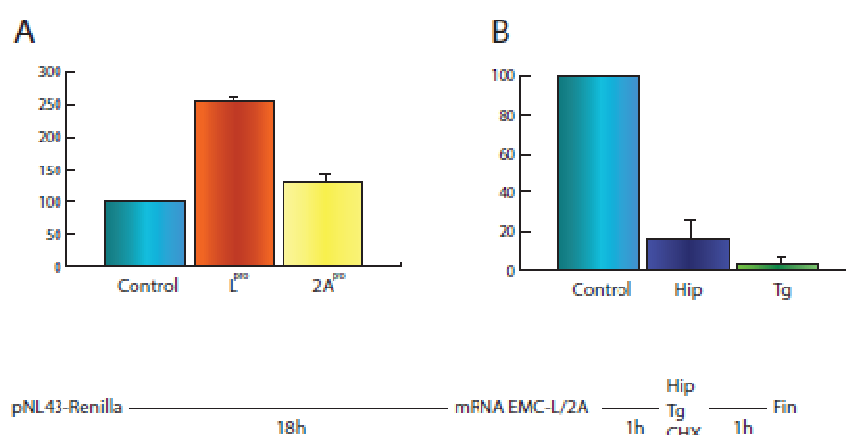


Figura 21. Efecto de proteasas de picornavirus en la traducción dirigida por el IRES de HIV-1 a tiempos largos.

A) Las células se transfectaron con el replicón pNL4.3-Renilla. A las 18 hpt, las células se retransfectaron en los casos indicados con mRNA FMDV L^{pro} o EMC PV 2A^{pro} o B) se añadió Hip o Tg. Tras 4 h de tratamiento se analizó la síntesis de luciferasa y el resultado se representó en porcentaje.

De hecho, la presencia de las proteasas parece estimular, de manera correlativa al corte de eIF4GI, la traducción del HIV-1g mRNA. No obstante, la traducción de este mRNA se muestra dependiente de los factores eIF4A y eIF2.

2.5. Efecto de las proteasas FMDV L^{pro} y HRV 2A^{pro} sobre la traducción del mRNA_g de HIV-1 en RRL

Con el fin de identificar el efecto de las proteasas sobre la traducción dirigida por el IRES de HIV-1, se emplearon RRL tratados con nucleasas y se añadieron 20 µg/ml de FMDV L^{pro} o HRV 2A^{pro}, además de una variante inactiva de FMDV L^{pro} (L^{pro} mut). Tras 20 min de incubación, se incorporó el mRNA HIV-1g-Luc-RRE

synthesized *in vitro* with *cap* and poly(A) tail, represented in Figure 22A. After 1 h of incubation, the activity of the luciferase from the extracts was analyzed.

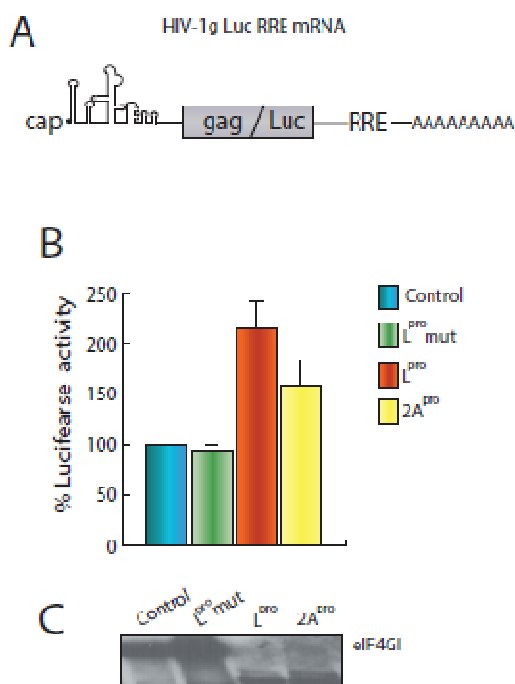


Figura 22. Efecto de proteasas de picornavirus sobre la traducción dirigida por el IRES de HIV-1 *in vitro*.

A) Representación esquemática del HIV-1g Luc RRE mRNA obtenido por transcripción *in vitro*. B) Los RRL se trataron con 20 µg/ml de HRV 2A^{pro} o 20 µg/ml de FMDV L^{pro} o de la variante inactiva FMDV L^{pro} mut, respectivamente. A los 20 min se añadieron 100 ng del mRNA a cada muestra y tras 1 h de incubación se midió la actividad de la luciferasa. El resultado se muestra como valores en porcentaje de actividad de la luciferasa con respecto al control. B) Las mismas muestras se emplearon para analizar el corte de eIF4GI mediante western blot.

In Figure 22B it can be observed that the synthesis of luciferase directed by the IRES of HIV-1 was notably stimulated in the presence of the proteases, exceeding 200% in the case of FMDV L^{pro} and around 150% in the case of HRV 2A^{pro}; however, in the presence of L^{pro} mut no significant changes were observed. The analysis of the state of the factor eIF4GI revealed a total cleavage in the presence of FMDV L^{pro} and HRV 2A^{pro}, while in the case of L^{pro} mut the factor eIF4GI remained intact (Figure 22C).

In the particular case of the picornavirus mRNAs, FMDV L^{pro} is capable of stimulating translation and conferring at the same time independence of the factor eIF2 (Moral-López et al., 2014). For this reason, after verifying that FMDV L^{pro} stimulates translation directed by the IRES of HIV-1 *in vitro* and at late times in cultured cells, it was evaluated if in this case it could also occur a translation independent of the factor eIF2. For this purpose RRL were treated with 50 µg/ml of poly(I:C) and 20 µg/ml of FMDV L^{pro} during 30 min. Subsequently the lysates were incubated for 1 h with the HIV-1g-Luc-RRE mRNA. In a similar manner to what was observed in HeLa cells, phosphorylation of eIF2α reduced translation directed by the IRES of HIV-1 by 55% (Figure 23). In this case, the addition of FMDV L^{pro} in the presence of

poli(I:C) no fue capaz de restaurar la síntesis de proteínas para que los valores de actividad de la luciferasa alcanzasen los obtenidos con la proteasa sola, manteniéndose una inhibición del 50 %.

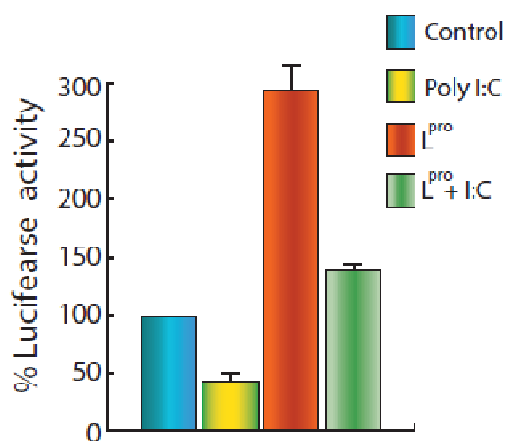


Figura 23. Efecto de FMDV L^{pro} sobre la traducción dirigida por el IRES de HIV-1 en presencia de poli(I:C).

Los RRL fueron tratados con 50 ng/ μ l de poli(I:C) y 20 μ g/ml de FMDV L^{pro} en los casos indicados durante 30 min. A continuación los RRL se programaron con 100 ng de HIV-1g-Luc-RRE mRNA y tras 1 h de incubación se midió la actividad de la luciferasa. Los valores de actividad de la luciferasa obtenidos se representan como porcentaje con respecto al control sin proteasas ni poli(I:C).

Por tanto, estos resultados nos indican que la traducción dirigida por el IRES de HIV-1 es dependiente del factor eIF2 activo y, a diferencia del caso de los IRESs de picornavirus, FMDV L^{pro} no es capaz de conferir independencia de este factor a la traducción de HIV-1.

2.6. Estudio de la proteína HIV-1 Rev sobre la traducción del mRNAg de HIV-1

Estudios previos han establecido que la proteína Rev de HIV-1 es necesaria para la regulación de la traducción de ciertos mRNAs virales de HIV-1 (Groom et al., 2009; Cullen and Malim, 1991; Perales et al., 2005) mediante la unión a la secuencia RRE (Heaphy et al., 1990). Los diferentes requerimientos de factores para la traducción a tiempos tempranos y tardíos observados en los experimentos anteriores con el replicón pNL4.3-Renilla podrían estar relacionados con la disponibilidad de esta proteína. Por ello, a continuación se estudia el papel de la proteína de HIV-1 Rev en el contexto de inicio de la traducción de los mRNAs virales.

2.6.1. Efecto de HIV-1 Rev sobre la traducción del mRNAg HIV-1

En primer lugar, nos dispusimos a evaluar el efecto de la proteína Rev sobre la traducción dirigida por el IRES de HIV-1 usando RRL tratados con nucleasas, ya que en este sistema podremos descartar el papel de Rev en la exportación de mRNAs de HIV-1

del núcleo al citoplasma. Los RRL fueron suplementados con diferentes dosis de HIV-1 Rev y fueron programados con el HIV-1g-Luc RRE-mRNA, con estructura *cap* y cola de poli(A) (Figura 24A).

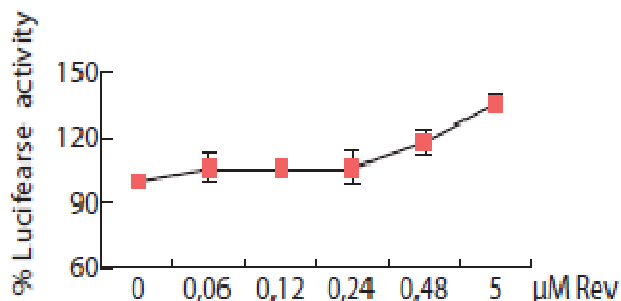


Figura 24. Estudio del efecto de HIV-1 Rev sobre la traducción dirigida por el IRES de HIV-1 *in vitro*.

Los RRL fueron tratados con dosis crecientes de HIV-1 Rev durante 20 min. A continuación se añadieron 100 ng de mRNA HIV-1g-Luc-RRE. Tras 1 h de incubación a 30 °C, se paró la reacción y se midió la actividad de la luciferasa. Los valores de actividad de la luciferasa obtenidos están representados como valores porcentuales respecto del control sin HIV-1 Rev.

Tras 1 h de incubación, se midió la actividad de la luciferasa de las muestras y se comprobó que se produjo una suave estimulación de la síntesis de luciferasa en presencia de cantidades crecientes de HIV-1 Rev (Figura 24), que llegaron a un máximo del 33 % con respecto al control. Este fenómeno ha sido descrito previamente en sistemas *in vitro* y parece indicar que Rev es capaz de estimular la traducción de los mRNAs de HIV-1 (Groom et al., 2009).

Para determinar con mayor exactitud el papel de HIV-1 Rev y de la secuencia RRE, se transfectaron células BHK-T7 con el plásmido pCMV-Rev durante 24 h para inducir la producción de Rev. A continuación las células se retransfectaron con los plásmidos pCDNA L-Gag-Luc-poli(A) o L-Gag-Luc-RRE. 16 h después, momento en el que debería haber una gran cantidad de mRNAs L-Gag-Luc-poli(A) o L-Gag-Luc-RRE en el citoplasma transcritos por la polimerasa T7, se midió la actividad de la luciferasa y se observó que en el caso del pCDNA L-Gag-Luc-poli(A) la presencia de Rev redujo la síntesis de luciferasa en un 48 % (Figura 25A), mientras que en el caso del pCDNA L-Gag-Luc-RRE la presencia de Rev estimuló la síntesis de luciferasa en un 312 % con respecto al control (Figura 25B). Estos resultados apuntan a que la presencia combinada de la secuencia RRE en el mRNA y de la proteína de HIV-1 Rev aumenta la eficiencia de la traducción de los mRNAs de HIV-1.

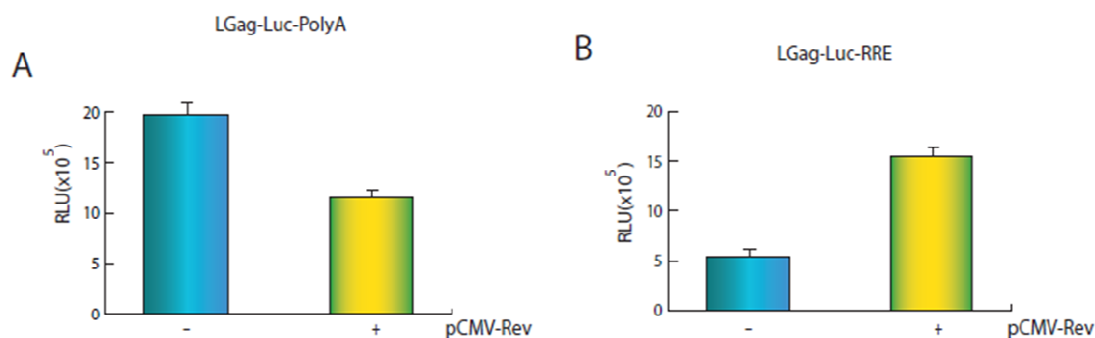


Figura 25. Estudio del efecto combinado de HIV-1 Rev/RRE sobre la traducción dirigida por el IRES de HIV-1.

El plásmido pCMV-Rev se transfectó en células BHK-T7 durante 24 h en los casos indicados. A continuación se transfectaron los plásmidos pCDNA L-Gag-Luc-poli(A) o pCDNA L-Gag-Luc-RRE (B). Tras 16 h de incubación se recogieron las células y se midió la actividad de la luciferasa; los valores obtenidos se muestran en la figura.

Por último, para determinar el efecto de HIV-1 Rev sobre la traducción eIF2 dependiente, se trataron RRL con poli(I:C) y con 5 μ M de Rev. Tras 20 min se añadió el mRNA HIV-1g-Luc-RRE con *cap* y cola de poli(A), y se incubó durante 1 h para después medir la actividad de la luciferasa generada.

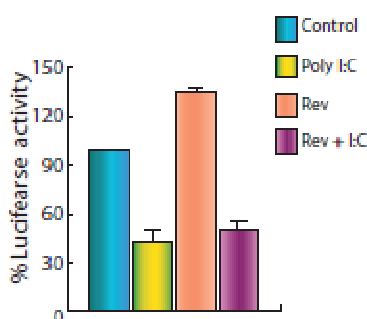


Figura 26. Efecto de HIV-1 Rev sobre la traducción dirigida por el IRES de HIV-1 inhibida por poli(I:C) *in vitro*.

Los RRL se trataron con 50 ng/ μ l de poli(I:C) o con 50 ng/ μ l de poli(I:C) y 5 μ M de HIV-1 Rev, respectivamente, durante 20 min. A continuación se añadieron 100 ng de mRNA HIV-1g-Luc-RRE y se incubaron 1 h. Finalmente, se detuvo la reacción y se midió la. En la figura están representados los valores porcentuales de actividad de la luciferasa obtenidos en relación con la muestra no tratada con poli(I:C) ni con Rev.

En la Figura 26 se puede observar que la adición de HIV-1 Rev no fue capaz de aumentar la traducción del mRNA de HIV-1 en presencia de eIF2 α fosforilado.

2.7. Interacción de HIV-1 Rev con factores de iniciación celulares

El mecanismo de regulación de la traducción por HIV-1 Rev podría residir en la interacción de esta proteína con factores del inicio de la traducción (Ruhl et al., 1993; Campbell et al., 1994) y su subsecuente unión al mRNA viral con secuencia RRE. A

continuación se estudiarán las posibles interacciones de HIV-1 Rev con factores fundamentales para el inicio de la traducción.

2.7.1. Detección de interacciones entre eIFs y HIV-1 Rev

Con el fin de determinar si existe interacción entre la proteína HIV-1 Rev y el factor de inicio de la traducción eIF4GI, se suplementaron RRL con extractos de HeLa S₁₀, de manera que se pudiese contar con proteínas humanas en el sistema, y se añadió la proteína HIV-1 Rev purificada en los casos correspondientes. Tras realizar una inmunoprecipitación mediante anticuerpos policlonales contra las regiones Ct y Nt del eIF4GI, se realizó una inmunodetección por western blot con anticuerpos anti-Rev. En la Figura 27, se puede observar una detección clara de la proteína Rev a partir del precipitado obtenido con anticuerpos anti-eIF4GI, lo que indica que, de manera directa o indirecta, Rev es capaz de unirse al eIF4GI.

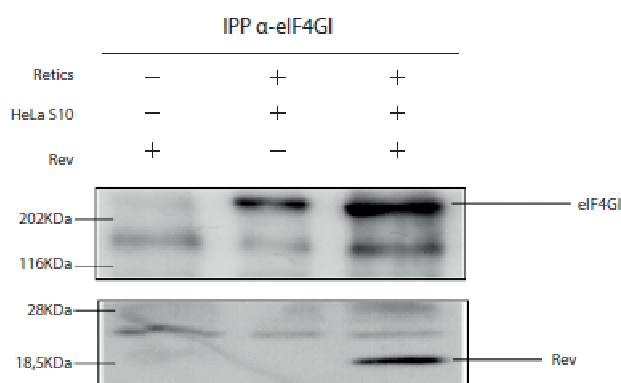


Figura 27. Coimmunoprecipitación en RRL/HeLa S10.

Se emplearon RRL suplementados con extractos de células HeLa S10 y se añadieron en los casos indicados 5 μ g de HIV-1 Rev. Se empleó un anticuerpo frente a eIF4GI para realizar la inmunoprecipitación con Dynabeads y las muestras se usaron para detectar eIF4GI y HIV-1 Rev mediante western blot con anticuerpos anti-Rev.

Paralelamente, para confirmar esta interacción y detectar otras proteínas que interaccionan con HIV-1 Rev, se realizó un análisis por cromatografía de afinidad en condiciones nativas empleando extractos de células HeLa incubados bien con la proteína de fusión GST-Rev, bien con GST sola como control. La mezcla se añadió posteriormente a una resina de glutatión-sefarosa y, tras varios lavados, se realizó una elución de las proteínas retenidas por competencia mediante glutatión reducido. Las

muestras eluidas se analizaron por western blot con anticuerpos específicos frente a los factores eIF4GI, p97, PABP y GST como control.

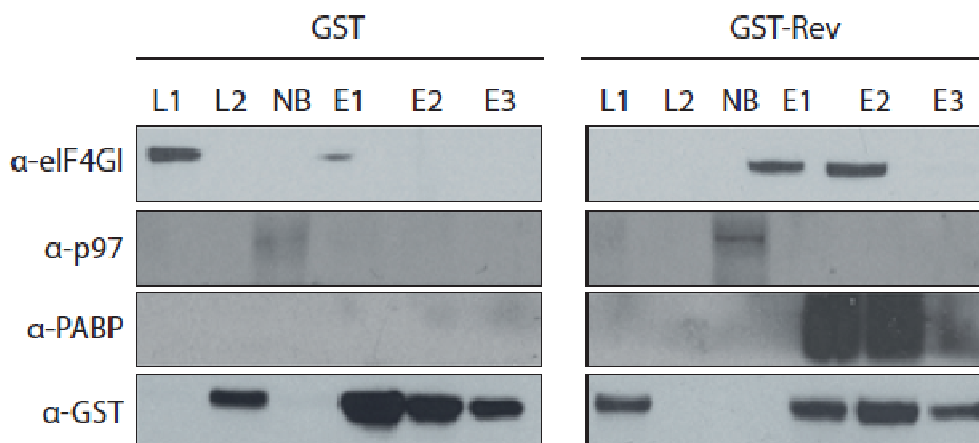


Figura 28. Identificación de eIFs que interactúan con HIV-1 Rev mediante cromatografía de afinidad.

Se incubaron extractos de células HeLa con 50 ng de GST-Rev o GST y 50 μ l de glutatión-sefarosa durante toda la noche, tras lo que se centrifugó, tomando el sobrenadante (fracción *No Binding* [NB]) y la resina se depositó en una columna de cromatografía. Se realizó un lavado del que se tomaron dos muestras (L1 y L2) para su posterior análisis. Finalmente, se eluyeron las muestras mediante glutatión reducido tomando tres muestras consecutivas (E1, E2 y E3). Posteriormente se realizó un western blot para identificarse eIF4GI, p97, PABP y GST estaban entre las proteínas eluidas.

El resultado muestra la presencia en las muestras de elución (E1, E2 y E3) de los factores eIF4GI y PABP en presencia de GST-Rev, pero no en presencia de GST (Figura 28). El factor p97 solo pudo ser detectado en las muestras correspondientes a la fracción *no binding* (NB).

2.7.2. Detección de interacciones directas entre HIV-1 Rev y eIFs

Una vez determinado que ciertos factores del inicio de la traducción interactúan con HIV-1 Rev, se quiso determinar si estas interacciones eran directas o si, en cambio, existían intermediarios, como ácidos nucleicos u otras proteínas. Con este fin se realizó un ensayo de slot blot empleando los factores purificados GST-eIF4GI, GST-PABP, His-eIF4E, además de GST y Rev como controles negativo y positivo, respectivamente. Las diferentes proteínas fueron fijadas, mediante vacío, a una membrana de nitrocelulosa que fue incubada toda la noche en presencia de HIV-1 Rev o de GST. Al día siguiente se realizó un western blot sobre la membrana para detectar la presencia de HIV-1 Rev.

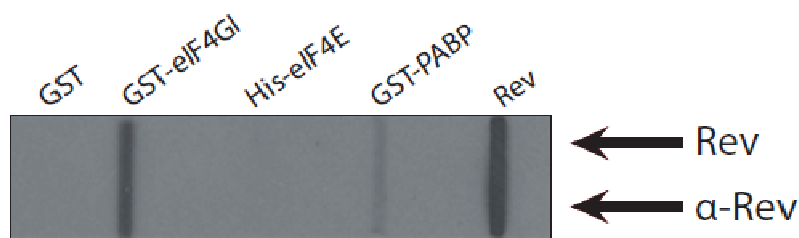


Figura 29. Identificación de interacciones directas de la proteína HIV-1 Rev con eIFs.

Mediante vacío se fijaron 5 μg de GST, GST-PABP, GST-eIF4GI, His-eIF4E y Rev a una membrana de nitrocelulosa y se incubó con 15 μg de Rev control durante toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$. Las interacciones directas se identificaron mediante western blot empleando un anticuerpo específico contra Rev. GST representa el control negativo, mientras que Rev representa el control positivo.

La señal correspondiente a la proteína Rev sobre la membrana correlacionó con las posiciones donde se habían fijado las proteínas GST-eIF4GI, GST-PABP y Rev, pero no con las correspondientes a GST o His-eIF4E (Figura 29). Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de una interacción directa de HIV-1 Rev con los factores eIF4GI y PABP.

2.7.3. Mapeo de los dominios de interacción de eIF4GI, PABP y HIV-1 Rev

Una vez establecido que los factores eIF4GI y PABP interaccionan de manera directa con HIV-1 Rev, nos propusimos describir los dominios de interacción comprendidos en las tres proteínas. Para ello se realizó un Pep Spot fijando las secuencias peptídicas completas de eIF4GI y PABP sobre una membrana de nitrocelulosa. La secuencia estaría formada por grupos consecutivos de polipéptidos de 13 aminoácidos (aa) con solapamientos entre sí de 9 aa, de manera que una interacción en una región específica de la proteína debería estar reflejada en al menos tres puntos consecutivos. Tras incubar la membrana con GST-Rev (Figura 30A) o GST (Figura 30B) y TBS (Figura 30C) como controles negativos, se realizó un western blot frente a HIV-1 Rev.

Tras discriminar las señales de interacción que no apareciesen en al menos tres puntos consecutivos y las señales comunes con los controles negativos GST o TBS (Figura 30B y 30C), se pudieron establecer dos sitios hipotéticos de interacción con Rev

para eIF4GI comprendidos entre los aa 588-604 y 825-840 (Figura 32A), y una región para el caso de PABP comprendida entre los aa 172 y 188 (Figura 32A).

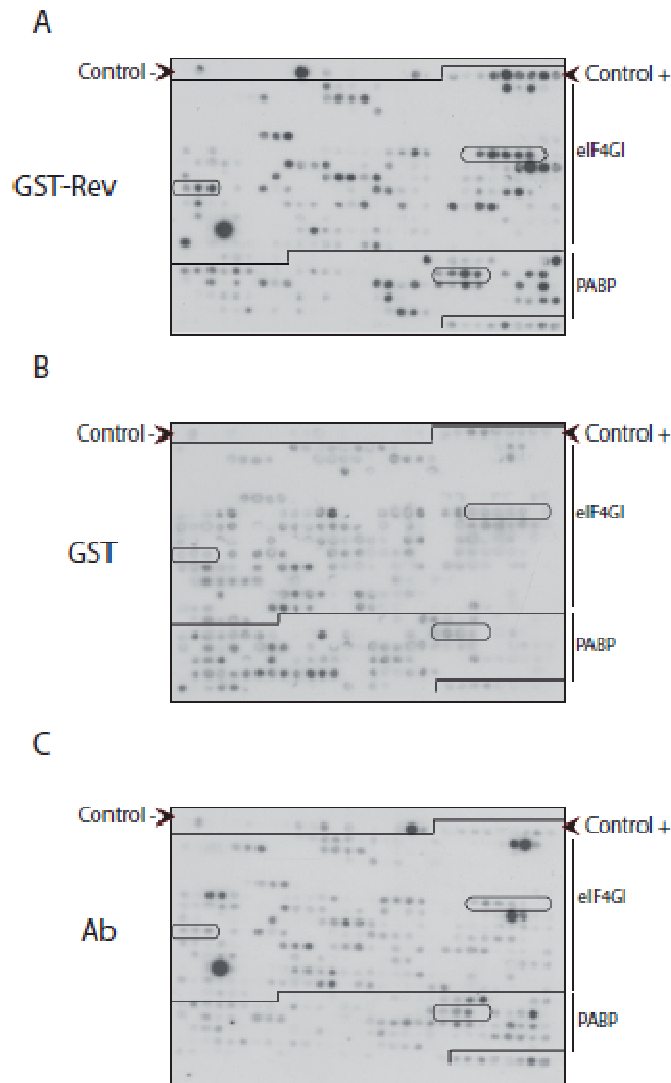


Figura 30. Identificación de las regiones de PABP y eIF4GI implicadas en la interacción con la proteína Rev.

Se reconstruyó, fijando sobre una membrana de nitrocelulosa, la secuencia peptídica derivada de los factores PABP y eIF4GI mediante secuencias consecutivas de 13 aminoácidos con solapamiento de 9 aminoácidos. Como control positivo se empleó la secuencia de multimerización de Rev. El control negativo consiste en secuencias repetidas de un mismo aminoácido. La membrana se incubó toda la noche a 4 °C con 15 µg de A) GST-Rev, B) GST como control negativo y C) TBS como control de especificidad de anticuerpo (Ab). Finalmente, se detectó la proteína GST-Rev o GST mediante western blot, al igual que se realizó un ensayo empleando únicamente los anticuerpos (Ab).

En el caso de HIV-1 Rev se reconstruyó la secuencia original mediante polipéptidos consecutivos de 21 aa con solapamientos de 11 aa entre sí sobre una

membrana de nitrocelulosa que fue incubada con GST-eIF4GI o GST-PABP. Además, se incubó con GST y TBS como controles negativos. Tras 12 h de incubación, se realizó un western blot frente a PABP (Figura 31A) o eIF4GI (Figura 31B).

Al igual que en el caso anterior, se tomaron como falsos positivos las señales que aparecían también en los controles negativos y las que no aparecían en al menos tres posiciones consecutivas. Tras esta discriminación, se identificó una señal intensa susceptible de revelar una interacción localizada entre los aa 41-60 de HIV-1 Rev, tanto para eIF4GI como para PABP, y entre los aa 51-70 en menor medida (Figura 31). Estas señales indicaron que tanto eIF4GI como PABP parecen unirse al mismo dominio de HIV-1 Rev.

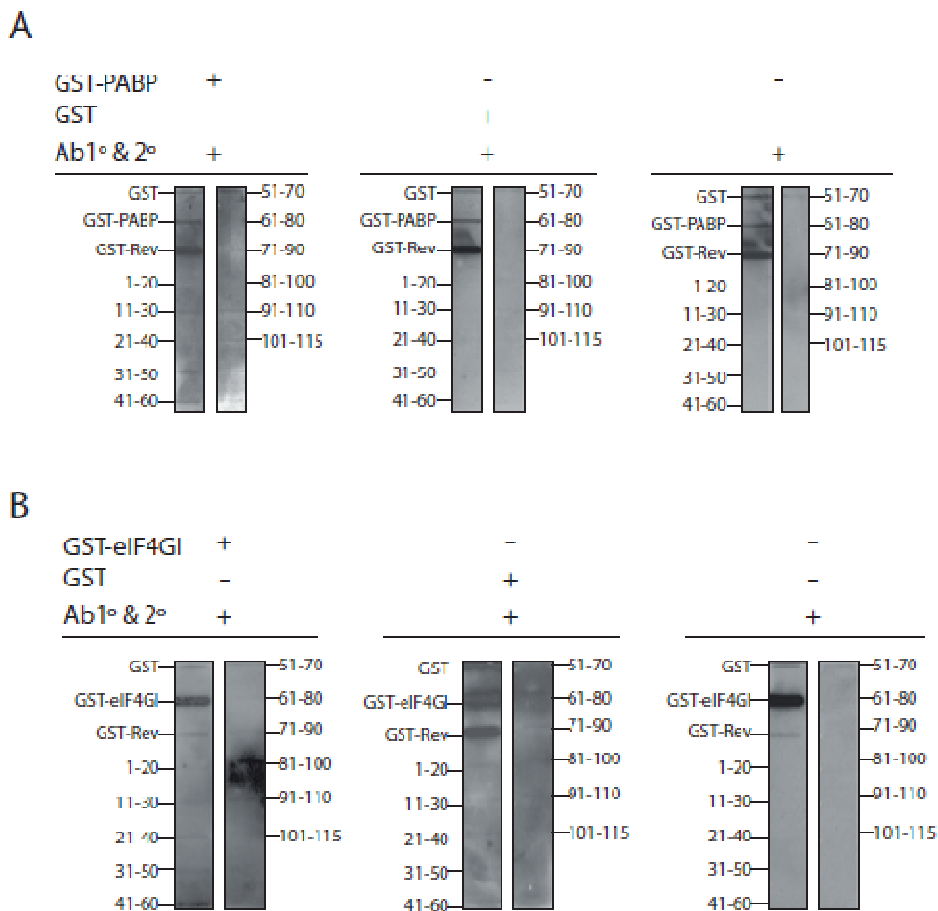


Figura 31. Identificación de las regiones de la proteína Rev implicadas en la interacción con eIF4GI y PABP.

La secuencia completa de Rev fue reconstruida sobre una membrana de nitrocelulosa empleando fragmentos consecutivos de 21 aminoácidos con un solapamiento entre sí de 11 aminoácidos. La membrana fue incubada con A) GST-PABP o B) GST-eIF4GI. Como controles negativos se emplearon GST y TBS. Tras incubar la membrana toda la noche, se realizó un western blot contra eIF4GI, PABP y GST.

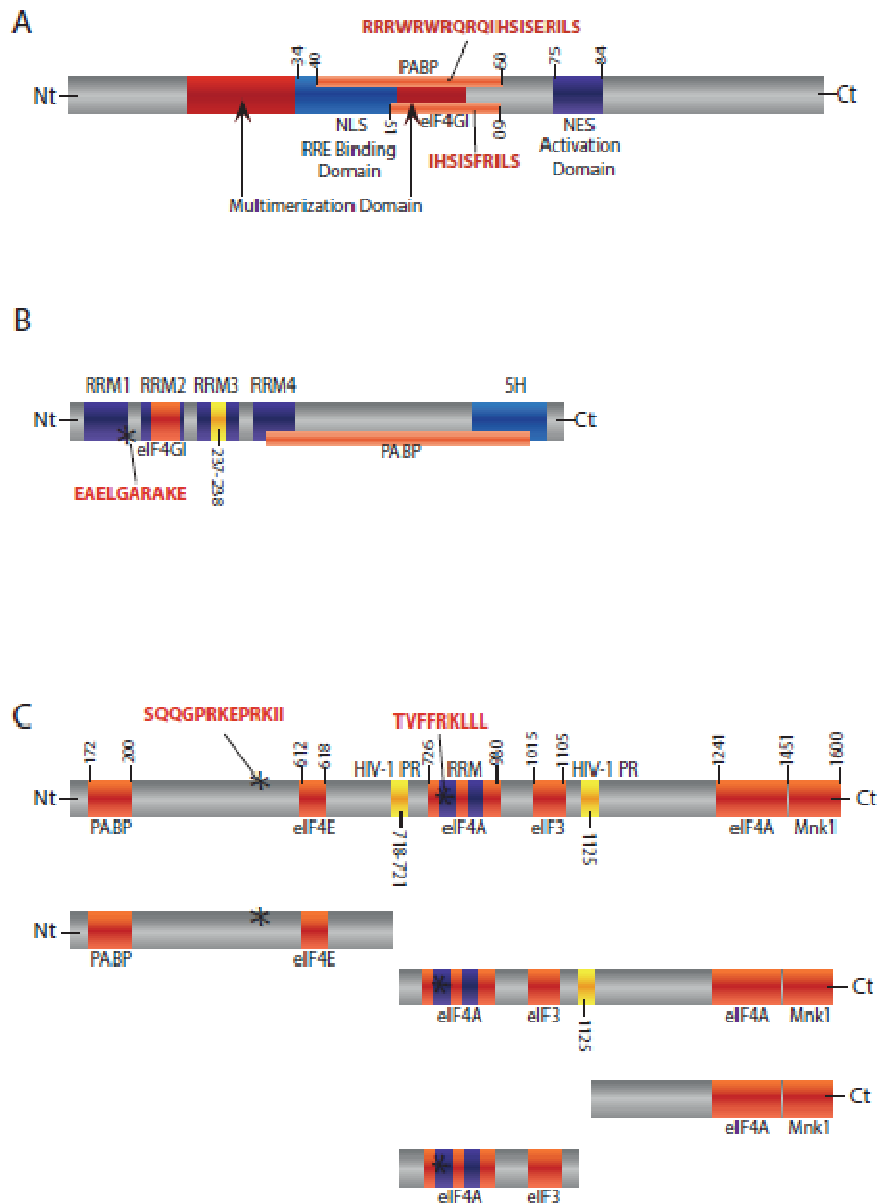


Figura 32. Esquema de sitios de unión putativos.

A) Dominios de la proteína HIV-1 Rev; en rojo se muestra el dominio de multimerización; en azul, los dominios NLS, NES y sitio de activación y sitio de unión al RRE; en naranja, predicción de dominios para unión a PABP (RRRWRERQRIHSISERILS) y eIF4GI (IHSISERILS). B) Dominios de PABP; en azul se muestran los 4 dominios de unión a RNA Recognition Motif (RRM) y el dominio helicasa; en naranja, el sitio de unión a eIF4GI; en amarillo, el sitio de corte para HIV-1 PR y * representa la predicción de sitios de unión a la proteína HIV-1 Rev (EAELGARAKE). C) Dominios para eIF4G; en naranja se muestran los diferentes sitios de unión de proteínas; en azul, el RRM, y en amarillo, el sitio proteolítico para HIV-1 PR. Las dos secuencias de predicción de unión para HIV-1 Rev se indican con * (SQQGPRKEPRKII y TVFFRKLLL).

3. EFECTO DE LA APLIDINA EN LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

La aplidina (Aplidin™) es un compuesto originalmente extraído del tunicado marino *Aplidium albicans* y actualmente sintetizado por PharmaMar. Estudios previos sugieren que la aplidina interacciona de manera selectiva con el factor de elongación eEF1A2 alterando sus funciones (Losada et al., 2015). Esto resulta de enorme interés debido a que eEF1A2 se encuentra sobre-expresado en diferentes tipos de cáncer y a que su detección suele estar asociada a un mal pronóstico de la enfermedad (Yang et al., 2015; Tomlinson et al., 2005; Pinke et al., 2008). El factor eEF1A2 es una de las isoformas del factor de elongación eIF1A, con una gran similitud con la isoforma eEF1A1, pero con una distribución en condiciones fisiológicas restringida a los tejidos cerebral, cardíaco y músculo-esquelético (Knudsen et al., 1993). En condiciones normofisiológicas, el factor eEF1A2 actúa sobre el transporte del aminoacil-RNA al sitio A del ribosoma, formando parte del proceso de elongación de la traducción. eEF1A2 está involucrado, además, en otras funciones no canónicas como respuesta al choque térmico (Shamovsky et al., 2006), la degradación de proteínas (Chuang et al., 2005), la inhibición de apoptosis (Ruest et al., 2002), la migración celular y metástasis (Xu et al., 2013). A continuación se estudiará el efecto de la aplidina sobre la traducción de diferentes mRNAs con el objetivo de determinar su rol en el mecanismo de acción del fármaco.

3.1. Efecto de la aplidina sobre la traducción en un sistema libre de células

En primer lugar, se quiso estudiar el efecto de la aplidina sobre la traducción en un sistema libre de células que permitiera aislar la traducción de otros fenómenos. Para ello, se emplearon RRL tratados con diferentes dosis de aplidina o CHX como control. Tras 20 min de tratamiento, los lisados se programaron con los mRNAs cap-Luc o EMC-Luc para observar las diferencias entre la traducción dependiente de *cap* y la dirigida por IRES. Tras 1 h de incubación se midió la actividad de la luciferasa. En la Figura 33 se puede observar cómo la CHX indujo un bloqueo total en la síntesis de luciferasa al inhibir la elongación tanto para el mRNA cap-Luc como para el mRNA EMC-Luc. En comparación, la aplidina tuvo un efecto menor sobre la síntesis de luciferasa derivada de la traducción de los dos mRNAs testados.

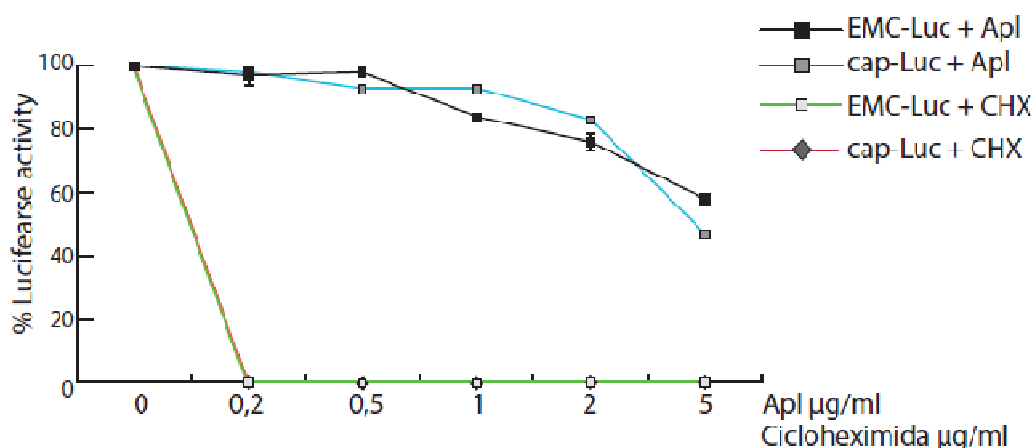


Figura 33. Efecto de la apilidina sobre la traducción *in vitro*.

Los RRL fueron tratados durante 15 min con 0,2; 0,5; 1; 2 y 5 µg/ml de apilidina o CHX. A continuación los lisados se programaron con 100 ng de mRNA cap-Luc o mRNA EMC-Luc. 1 h después se detuvo la reacción y se midió la actividad de la luciferasa.

No se pudo observar inhibición de la traducción hasta las dosis más altas de apilidina, cuando se obtuvo un bloqueo parcial de la traducción del 40 % para EMC-Luc y del 50 % para cap-Luc con 5 µg/ml de apilidina. Estos resultados indican que en sistemas libres de células la actividad de la apilidina en traducción es muy reducida.

3.2. Efecto de la apilidina sobre la traducción celular en células HeLa

A partir de los resultados anteriores, se quiso comprobar el efecto de la apilidina en un contexto celular. Para ello, se emplearon la línea celular HeLa (HeLa wt) y dos variantes que sobre-expresan de manera constitutiva el factor de elongación: eEF1A2 (HeLa wt GFP-eEF1A2) y eEF1A1 (HeLa wt GFP-eEF1A1). Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones entre 0 y 5 µg/ml de apilidina. Como control, las células fueron tratadas con DMSO. A los 15 min se realizó un marcaje metabólico con [³⁵S]Met/Cys y tras 1 h de incubación las muestras se procesaron mediante SDS-PAGE, fluorografía y autorradiografía. En el caso de las HeLa wt se observó una inhibición superior al 90 % con concentraciones de apilidina iguales o superiores a 0,5 µg/ml (Figura 34A), mientras que en las líneas HeLa que sobre-expresan el factor eEF1A1 (Figura 34B) y eEF1A2 (Figura 34C) se obtuvo ya una inhibición del 60 % y 80 %, respectivamente, para la dosis de 0,2 µg/ml de apilidina y se alcanzó prácticamente el 100 % para dosis mayores.

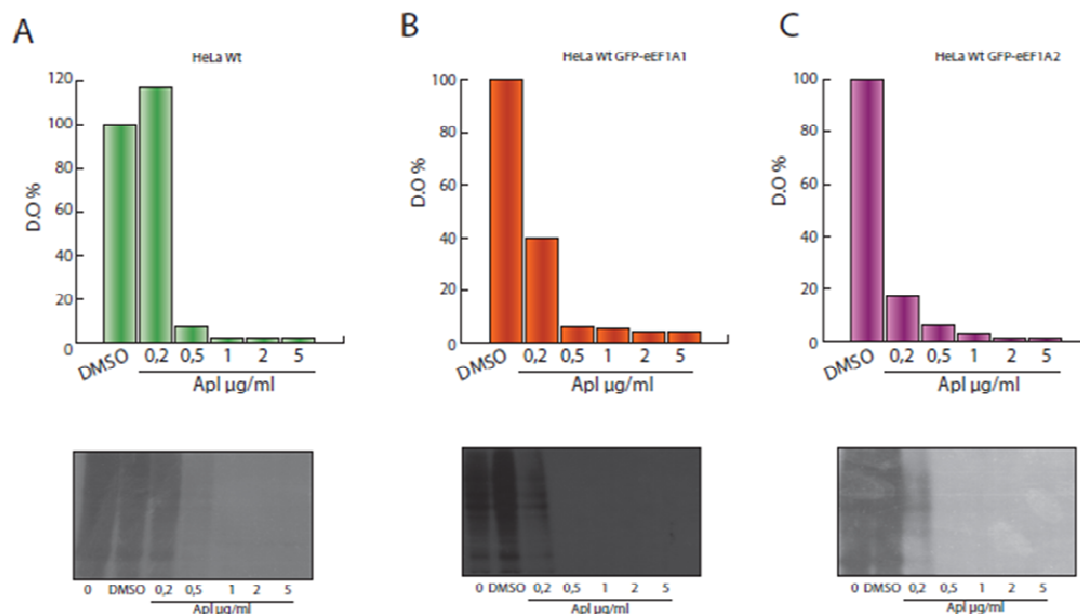


Figura 34. Efecto de la apilidina sobre la traducción celular en HeLa wt para eEF1A.

Las líneas celulares HeLa wt (A), HeLa wt GFP-eEF1A1 (B) y HeLa wt GFP-eEF1A2 (C) fueron pretratadas con 0,2; 0,5; 1, 2 y 5 µg/ml de apilidina durante 15 min. Posteriormente se realizó marcaje metabólico de 1 h con [³⁵S]Met/Cys y se procesaron las muestras para autorradiografía y posterior densitometría.

La interpretación de estos resultados indica que a altas concentraciones la apilidina tiene un fuerte efecto inhibitorio sobre la traducción celular en la línea HeLa, independientemente de que sobre-expresen o no alguna de las variantes del factor de elongación eEF1A.

3.3. Efecto de la apilidina sobre la traducción celular en líneas HeLa resistentes al compuesto

Para profundizar en el efecto de la apilidina sobre la traducción, se empleó una línea HeLa resistente a la apilidina (HeLa Apl-R). Esta línea se obtuvo mediante pases múltiples en presencia del fármaco, con lo que se obtuvo un nuevo fenotipo resistente a la apilidina que se caracteriza por presentar una concentración muy baja de eEF1A2, pero no de eEF1A1 (Losada et al., 2015). Asimismo, para evaluar la implicación de la ausencia de eEF1A2 en la resistencia a apilidina de esta línea, se empleó una variante que sobre-expresa el factor eEF1A2 (HeLa Apl-R GFP-eEF1A2) y complementariamente, como control, otra variante resistente que sobre-expresa el factor

eEF1A1 (HeLa Apl-R GFP-eEF1A1). Las tres líneas fueron tratadas con diferentes concentraciones de apilidina durante 15 min y después se realizó un marcaje radioactivo de proteínas durante 1 h en presencia de las mismas concentraciones de apilidina. Posteriormente, las células se recogieron y las proteínas se separaron por SDS-PAGE para realizar una fluorografía seguida de autorradiografía. En la Figura 35 se puede observar el efecto de la apilidina sobre la síntesis de proteínas celulares en la línea resistente a apilidina y en las variantes resistentes que sobre-expresan los factores eEF1A2 y eEF1A1.

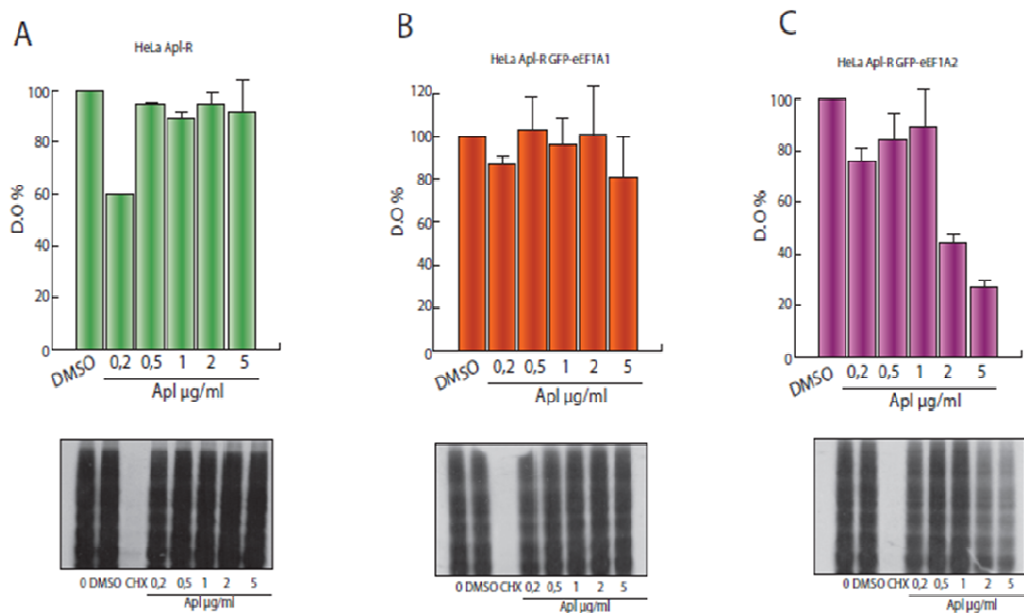


Figura 35. Efecto de la apilidina sobre la traducción celular en HeLa Apl-R y sus variantes.

Las líneas celulares HeLa Apl-R (A), HeLa Apl-R GFP-eEF1A1 (B) y HeLa Apl-R GFP-eEF1A2 (C) fueron pretratadas con 0,2 0,5; 1; 2 y 5 µg/ml de apilidina durante 15 min. Posteriormente se realizó marcaje metabólico de 1 h con [³⁵S]Met/Cys y se procesaron las muestras para autorradiografía y posterior densitometría.

Sorprendentemente el compuesto no tuvo efectos significativos sobre la síntesis de proteínas en las células HeLa Apl-R (Figura 35A); mientras que 1 µg/ml de apilidina inhibió por completo la síntesis celular en la línea HeLa wt (Figura 34A), la misma dosis no afectó a la traducción en la línea HeLa Apl-R y tampoco resultaron inhibitorias concentraciones superiores de 2 y 5 µg/ml (Figura 35A). Así mismo, la sobre-expresión del factor eEF1A1 no tuvo repercusiones sobre la resistencia al compuesto, con lo que se obtuvieron en todos los casos niveles de síntesis de proteínas similares al control (Figura 35B). Sin embargo, la sobre-expresión de eEF1A2 dio como resultado un incremento significativo de la inhibición de la traducción en presencia de

aplidina, con lo que se obtuvo un bloqueo del 55 % y 75 % para 2 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de apolidina, respectivamente (Figura 35C). El conjunto de estos datos indica que la apolidina tiene un potente efecto inhibitorio sobre la síntesis de proteínas en células HeLa; sin embargo, este efecto desaparece en las células HeLa Apl-R, las cuales presentan niveles muy reducidos del factor eEF1A2. La sobre-expresión, en esta línea, de eEF1A1 no tuvo efectos relevantes sobre la traducción en presencia del compuesto, mientras que la sobre-expresión del factor eEF1A2 indujo la inhibición de la traducción en presencia del compuesto.

3.4. Estudio de la apolidina sobre la síntesis de proteínas virales.

Para profundizar en el estudio del efecto de la apolidina sobre la traducción, se decidió emplear mRNAs con un bajo requerimiento de factores de iniciación. Se ensayó el efecto del compuesto sobre la síntesis de proteínas tardías del virus Sindbis (SV) y del virus de la estomatitis vesicular (VSV). En primer lugar, se infectaron células BHK con SV. La síntesis de proteínas tardías virales se analizó mediante marcaje metabólico con [^{35}S]Met/Cys en presencia de dosis crecientes de apolidina a las 7 h posinfección y posterior tratamiento mediante SDS-PAGE y autorradiografía (Figura 36A).

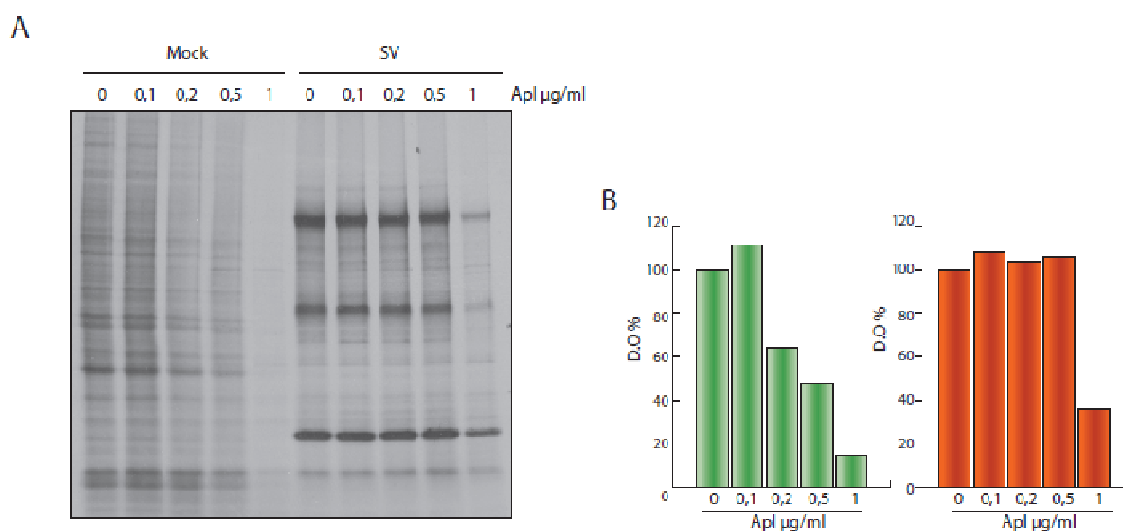


Figura 36. Efecto de la apolidina en la traducción del mRNA de SV en células BHK.

Células BHK infectadas con virus Sindbis (SV) o sin infectar fueron pretratadas durante 15 min con 0,1; 0,2; 0,5 y 1 $\mu\text{g/ml}$ de apolidina y posteriormente fueron marcadas con [^{35}S]Met/Cys durante 1 h. Las muestras se corrieron en gel SDS-PAGE y el resultado se analizó mediante autorradiografía (A) y densitometría (B).

En la Figura 36B se muestran los valores densitométricos obtenidos escaneando las señales radiográficas de los diferentes carriles de la Figura 36A y se puede observar que la traducción celular resultó fuertemente inhibida en presencia de apilidina. Se produce ya un bloqueo de la traducción del 40 % con 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de apilidina y un bloqueo del 50 % con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto. En cambio, estas mismas dosis no tuvieron ningún efecto sobre la síntesis de las proteínas virales.

A continuación, para corroborar estos resultados, se analizó también el efecto de la apilidina en células C2C12, procedentes de músculo de conejo, sin infectar e infectadas con los virus SV y VSV. Tras un marcaje con metionina radiactiva a tiempos tardíos, se procesaron las muestras para ser analizadas por autorradiografía (Figura 37A). Una vez más, se observó una fuerte inhibición en la síntesis de proteínas celulares, pero no en la de las virales.

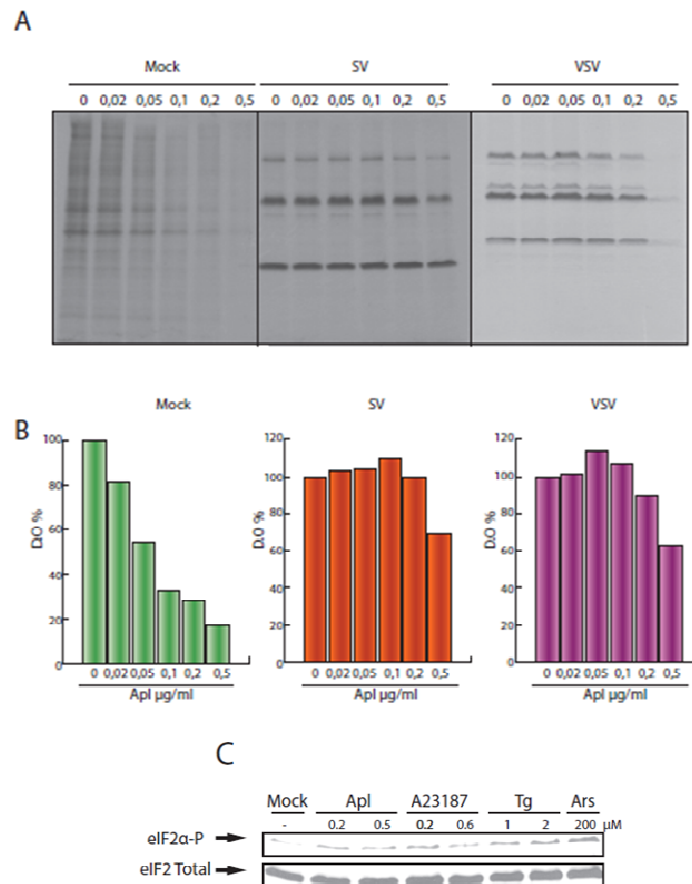


Figura 37. Efecto de la apilidina en la traducción de mRNAs de SV y VSV en células C2C12.

Células C2C12 infectadas con virus Sindbis (SV) o con el virus de la estomatitis vesicular (VSV) o sin infectar fueron pretratadas durante 15 min con 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de apilidina y posteriormente fueron marcadas con [^{35}S]Met/Cys durante 1 h. Las muestras se corrieron en gel SDS-PAGE y el resultado se analizó mediante autorradiografía (A) y densitometría (B). C) Adicionalmente se comprobó el efecto de la apilidina (Apl), el A23187, la Tg y el Ars sobre la fosforilación del factor eIF2 en las mismas células. Las células se trataron con las dosis indicadas durante 1 h. Las muestras se corrieron en gel SDS-PAGE y el resultado se analizó por western blot.

Al cuantificar el efecto de la aplidina sobre la síntesis de proteínas (Figura 37B), se observó que se indujo un bloqueo de la traducción celular del 45 % con 0,05 $\mu\text{g/ml}$ de aplidina y del 65 % para 0,1 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto. Estas mismas dosis no tuvieron efecto sobre la síntesis de las proteínas virales, lo que corrobora el resultado anterior. Teniendo en cuenta que los mRNAs virales son más resistentes que la traducción celular a la inhibición de la iniciación (Garcia-Moreno et al., 2013), estos resultados sugieren que la aplidina está afectando precisamente al evento de la iniciación y no a la elongación.

En paralelo, para determinar si la aplidina estaba induciendo fosforilación de eIF2 y por tanto, inhibiendo la traducción dependiente de este factor, la misma línea celular fue tratada con diferentes dosis de aplidina, el ionóforo A23187, Tg y Ars durante 1 h cada una y se analizó el estado de fosforilación del eIF2 α (Figura 37C). A diferencia de lo ocurrido con la Tg o el Ars, ni la aplidina ni el A23187 fueron capaces de inducir una fosforilación significativa del eIF2 α . Este resultado indica que la inhibición de la traducción en presencia de aplidina no está relacionada con la activación de quinasas que conduzcan a la fosforilación del factor eIF2.

3.5. Participación del eIF2 en la inhibición por aplidina

Para confirmar que la fosforilación de eIF2 no participa en la inhibición de la traducción por tratamiento con aplidina, se emplearon células MEFs S51A, una variante de fibroblastos de ratón que contiene una forma no fosforilable de eIF2 α debido a una mutación puntual que sustituye la serina 51 por alanina. Estas células fueron tratadas con diferentes concentraciones de aplidina y, en estas circunstancias, se analizó la síntesis de proteínas celulares mediante marcaje metabólico y posterior autorradiografía. En la Figura 38 se puede observar el efecto de las diferentes concentraciones de aplidina sobre la traducción celular.

La aplidina tuvo un potente efecto inhibitorio de la síntesis de proteínas. De hecho, con tan solo una concentración de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ de aplidina, la síntesis de proteínas celulares quedó inhibida un 70 %. Aunque en estas células, el eIF2 no puede ser fosforilado, la traducción celular resulta ser sensible a la aplidina, lo que indica que este compuesto inhibe la traducción de los mRNAs celulares por un mecanismo independiente de la inactivación de eIF2.

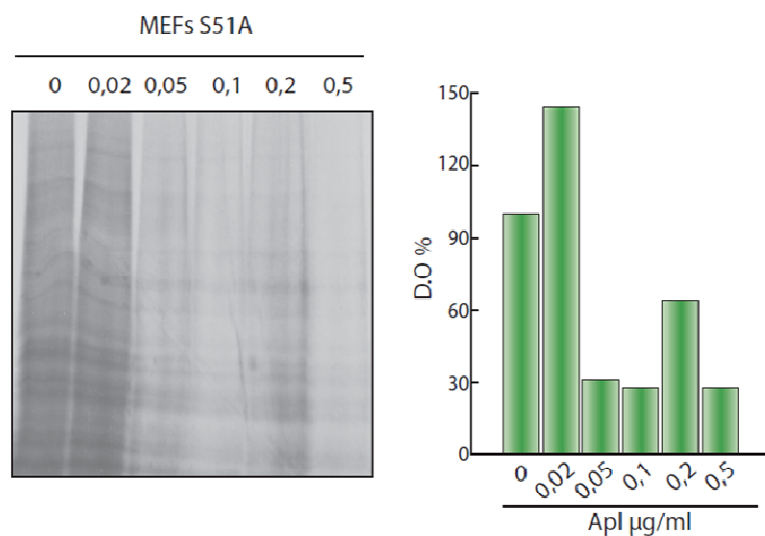


Figura 38. Efecto de la aplidina sobre la traducción en células MEFs S51A.

Tras pretratar las células con 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 y 0,5 µg/ml de aplidina, las células se marcaron con [³⁵S]Met/Cys durante 1 h. Las muestras se corrieron en gel SDS-PAGE para autorradiografía.

3.6. Efecto de la aplidina sobre la traducción de mRNAs dirigida por IRESs

Si, como sugieren los resultados anteriores, el efecto inhibitorio de la aplidina se debe al bloqueo de uno o varios factores del inicio de la traducción, se podrá evaluar con más precisión su mecanismo de acción empleando la traducción dirigida por los IRESs con diferente grado de requerimiento de factores de iniciación. Para ello, se emplean tres mRNAs, en los que la secuencia codificante para la luciferasa se encuentra bajo el control de los IRESs de EMCV (EMC-Luc), HCV (HCV-Luc) o de la región intergénica de CrPV (CrPV-Luc). Los mRNAs fueron transfectados en células BHK y a las 2 h se cambió el medio y se añadieron CHX o diferentes concentraciones de aplidina. 1 h después se midió la actividad de la luciferasa. La traducción de los mRNAs EMC-Luc (Figura 39A) o HCV-Luc (Figura 39B) resultaron ser sensibles a la aplidina, por lo que se produjo una inhibición de su traducción del 80 % y 70 %, respectivamente, para 0,2 µg/ml de aplidina. Sin embargo, el mRNA CrPV-Luc (Figura 39C) mostró una gran resistencia, por lo que se produjo únicamente un 15 % de inhibición para la misma dosis.

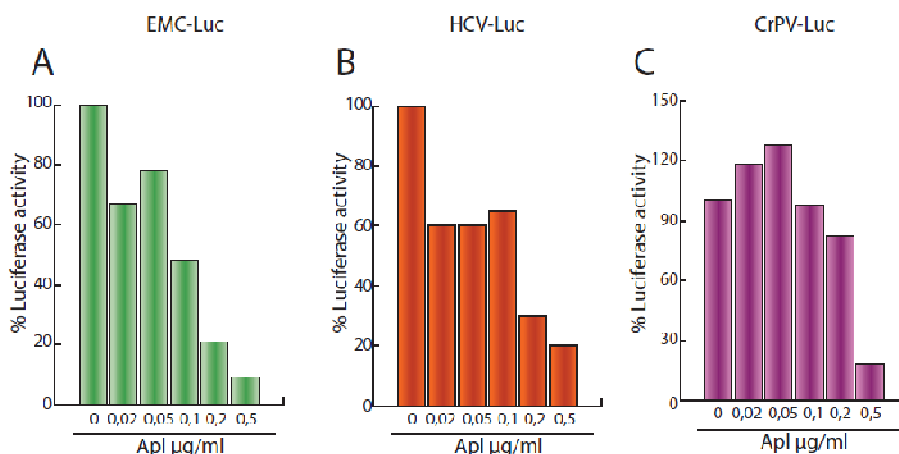


Figura 39. Efecto de la apilidina sobre la traducción dirigida por diferentes IRESs.

Mediante transcripción *in vitro* se obtuvieron tres mRNAs que contienen el gen de la luciferasa precedido por el IRES de EMCV (EMC-Luc) (A), HCV (HCV-Luc) (B) o el IRES de la región intergénica de CrPV (CrPV-Luc) (C). Cada mRNA fue transfectado según se indica y 2 h después se trataron las células con 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 y 0,5 µg/ml de apilidina. Tras 1 h de tratamiento se recogieron las muestras y se midió la actividad de la luciferasa.

Estos resultados respaldan la idea de que el mecanismo de inhibición de la traducción de la apilidina debe residir en la fase de iniciación, concretamente en alguno de los factores requeridos por los IRESs, tanto de EMCV como de HCV.

3.7. Estudio del efecto de la apilidina en células Hap-1 eEF1A2-

El empleo de células *knock-out* permite estudiar los fenómenos asociados a la expresión de un gen determinado. Para el propósito de esta tesis, resultaba interesante poder evaluar el efecto de la apilidina sobre células que carecieran completamente del factor eEF1A2 para compararlo con células wt. Por ello se emplearon las células haploides Hap-1 y Hap-1 eEF1A2-, tratadas con diferentes concentraciones de apilidina. Tras un marcaje con [³⁵S]Cys/Met de 1 h, las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE, seguido de fluorografía y autorradiografía (Figura 40). La señal procedente de la síntesis de proteínas celulares en presencia de diferentes dosis de apilidina muestra una alta sensibilidad al compuesto, muy similar entre la línea control y la *knock-out* para eEF1A2 (eEF1A2-) (Figura 40A). Al analizar la inhibición mediante cuantificación densitométrica de la señal radiográfica, se observó que los perfiles de inhibición en función de la dosis de apilidina para ambas líneas fueron prácticamente idénticos.

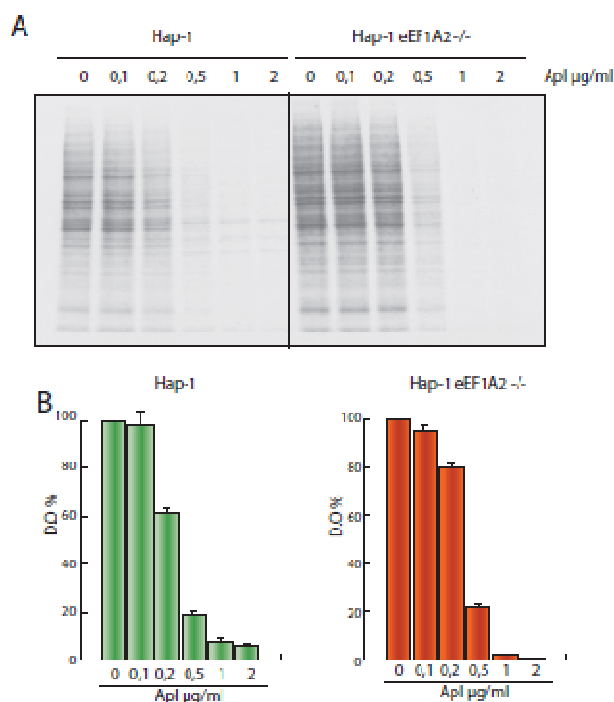


Figura 40. Efecto de la aplidina sobre la traducción celular en células Hap-1 wt o *knock-out* para eEF1A2.

Las líneas celulares Hap-1 wt (A) o Hap-1 eEF1A2^{-/-} (B) fueron pretratadas con 0,2; 0,5; 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de aplidina durante 15 min. Posteriormente se realizó marcaje metabólico de 1 h con [³⁵S]Met/Cys y se procesaron las muestras para autorradiografía y posterior densitometría

La excepción fue para la dosis de 0,2 $\mu\text{g/ml}$, donde la inhibición de la traducción en la línea control fue del 40 %, y del 20 % en la línea eEF1A2^{-/-} (Figura 40B). Pese a esta ligera diferencia, el conjunto de los datos indica que la ausencia del factor eEF1A2 no varía significativamente la sensibilidad a la aplidina en las líneas Hap-1 wt y *knock-out*.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. TRADUCCIÓN DIRIGIDA POR LOS IRESs DE PICORNAVIRUS EN AUSENCIA DE eIF2 ACTIVO

Durante las infecciones por picornavirus se produce en la célula infectada una gran cantidad de proteínas virales, especialmente en la fase tardía de las infecciones, lo que pone de manifiesto la eficacia traduccional de sus mRNAs. Al contrario de la celular, la traducción viral ha de enfrentarse a un medio hostil generado por la respuesta celular a la infección. Sin embargo, estos virus han desarrollado notables estrategias que les permiten no solo superar eficazmente las restricciones impuestas por la respuesta antiviral, sino aprovecharlas a su favor e incluso llegar a monopolizar la maquinaria de traducción. La piedra angular de esta habilidad reside en las proteasas para las que codifican, como la 2A^{pro}, presente en PV, rinovirus (HRV) y coxsackievirus B3 (CBV3), o la L^{pro} de FMDV y el virus de la rinitis equina (ERBV). Tanto 2A^{pro} como L^{pro} son capaces de hidrolizar el factor eIF4GI (Castelló et al., 2011; Devaney et al., 1988), lo que impide la formación del complejo eIF4F. Existen evidencias de que la hidrólisis de eIF4GI bloquea la traducción *cap* dependiente (Etchison and Smith, 1990; Ventoso et al., 2001) e incluso la traducción dependiente de la cola de poli(A) (Keiper and Rhoads, 1999). En los mRNAs de picornavirus, la estructura *cap* está sustituida por una secuencia altamente estructurada denominada IRES, que es capaz de dirigir la iniciación de la traducción en ausencia de eIF4GI intacto, por lo que la traducción *cap* dependiente resulta anulada y la maquinaria de traducción queda disponible en exclusiva para la traducción de los mRNAs virales.

Otro aspecto relevante del proceso de traducción viral en picornavirus reside en que sus proteasas, además de cortar factores celulares, estimulan la traducción dirigida por los IRESs de sus mRNAs. Así, por ejemplo, PV y HRV 2A^{pro} o FMDV L^{pro} estimulan la traducción de los mRNAs de PV y EMCV. Aunque se ha descrito que FMDV L^{pro} no es capaz de estimular la traducción del mRNA de FMDV (Ziegler et al., 1995b), los resultados presentados en esta tesis demuestran que en células transfectadas la traducción dirigida por el IRES de FMDV se ve fuertemente estimulada (hasta

3,5 veces) en presencia de FMDV L^{pro}. Mediante ensayos *in vitro* con RRL tratados con nucleasas comprobamos, además, que esta estimulación no se debe solo a una cuestión de eliminar la competencia por la maquinaria de traducción anulando la traducción *cap* dependiente. Además, mediante el uso de una variante inactiva de FMDV L^{pro} con una mutación puntual en la serina 51, se demuestra que esta estimulación es dependiente de la actividad catalítica de la proteasa y, por lo tanto, correlativa con el corte de eIF4GI.

El bloqueo de la traducción constituye una estrategia que también emplea la célula como defensa antiviral; la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático, el déficit de aminoácidos o la presencia de dsRNAs característicos de las infecciones virales son señales a las que la célula infectada responde inactivando por fosforilación la subunidad α del factor eIF2 (Wek et al., 2006). De esta manera se impide la formación del complejo ternario Met-tRNA_i-eIF2-GTP, bloqueando así el inicio de la traducción. En el caso concreto de PV y otros picornavirus se ha demostrado que existe una fosforilación del eIF2 progresiva a lo largo de la infección (Ransone and Dasgupta, 1988; Redondo et al., 2011). Aunque previamente se había propuesto que la traducción dirigida por los IRESs de picornavirus requiere el factor eIF2 activo (Pestova et al., 2001), recientemente se ha comprobado que es posible que los mRNAs de picornavirus se traduzcan con independencia de eIF2 a tiempos tardíos de infección. El planteamiento inicialmente propuesto para el caso de PV es que esta traducción independiente de eIF2 podría deberse al corte del factor eIF5B por la proteasa PV 3C^{pro} (White et al., 2011); sin embargo, trabajos posteriores han demostrado que PV 2A^{pro} es la única proteína no estructural de PV capaz de conferir independencia de eIF2 a la traducción dirigida por el IRES de PV y EMCV (Redondo et al., 2011). Los resultados del presente trabajo añaden a este modelo la evidencia de que en condiciones de fosforilación del eIF2, inducida por diferentes tratamientos, la presencia de FMDV L^{pro} permite mantener en un 80 % la traducción dirigida por el IRES de FMDV, mientras que en ausencia de la proteasa queda reducida a un 26 %. A partir de estos resultados, se plantea la existencia de un mecanismo dual de traducción para el mRNA de FMDV. En el inicio de la infección, cuando la proteasa no ha sido sintetizada, el mRNA viral sigue una traducción canónica dependiente de eIF2 activo, pero según avanza la infección y el factor eIF2 es fosforilado la traducción viral cambia a una traducción no canónica, que no requiere de eIF2 activo.

Los resultados obtenidos demuestran, además, que el efecto de FMDV L^{pro} no está restringido al IRES de FMDV. La fosforilación de eIF2 por tratamiento con Ars

induce una inhibición del 89 % en la traducción dirigida por el IRES de EMCV y del 88 % en el caso del IRES de PV. En estas condiciones, la presencia de FMDV L^{pro} es capaz de restaurar casi por completo la traducción del mRNA de EMCV y manteniendo en un 90 % la traducción del mRNA de PV. Aún no se ha podido determinar el mecanismo por el que FMDV L^{pro} es capaz de conferir independencia de eIF2 en la traducción dirigida por el IRES de picornavirus. Se plantean dos posibles hipótesis: la primera de ellas es que otro factor celular, como eIF5b o eIF2A, esté sustituyendo al factor eIF2, como ocurre con el virus de la hepatitis C (HCV) (Dmitriev et al., 2010; Kim et al., 2011); la segunda es que una proteína viral esté sustituyendo el complejo eIF4F completo, como en el caso del virus sin nombre (SNV) (Mir and Panganiban, 2008) o actuando como un ITAF, aumentando la afinidad del RNA por el ribosoma.

Los cambios que se generan en la permeabilidad celular y que conducen a variaciones en las concentraciones iónicas del citoplasma son otro fenómeno asociado a las infecciones virales. El propio mecanismo de entrada de los virus y diversas proteínas virales, como PV 2B y 2BC, son capaces de permeabilizar la membrana celular (Aldabe et al., 1996; Carrasco et al., 1989) modificando el gradiente iónico y, por tanto, aumentando la concentración de cationes intracelulares como el potasio (K⁺). De manera similar al efecto de las proteasas virales, se ha descrito que el aumento de cationes intracelulares inhibe la síntesis de macromoléculas celulares (Lubin, 1967) a la vez que estimula la síntesis de proteínas virales de picornavirus (Carrasco and Smith, 1976; Castrillo et al., 1987; Niepmann, 2003). Los resultados presentados en sistemas *in vitro* han contribuido a corroborar que el aumento en la concentración de K⁺ es capaz de estimular la traducción dirigida por los IRESs de diferentes picornavirus, mientras que inhibe fuertemente la traducción de un mRNA con traducción *cap* dependiente. En este contexto de alta concentración salina, la traducción dirigida por el IRES de FMDV ya no se estimula en presencia de FMDV L^{pro}, ya que el estado de la traducción, en este caso, presumiblemente no puede ser mejorado por la proteasa. Posiblemente no se vería estimulación de la traducción viral en presencia de FMDV L^{pro} si se extrapolara este fenómeno a células infectadas debido a que la proteasa no es capaz de estimular la traducción del RNA de FMDV en concentraciones altas de K⁺. También se ha podido demostrar que cuando eIF2 está fosforilado por tratamiento con poli(I:C), la adición de K⁺ extra hasta concentraciones óptimas (160 mM) es capaz de restablecer por completo la traducción dirigida por los IRESs de FMDV, Mengovirus y EMCV, mientras que en

condiciones de K^+ estándar (80 mM) la traducción se mantiene bloqueada en un 60 %, 55 % y 82 %, respectivamente.

Por otro lado, hemos comprobado que el aumento de la concentración del ion K^+ correlaciona con un aumento en el requerimiento del factor eIF4A; el ion K^+ incrementa el efecto inhibitorio de la traducción de los mRNAs con IRES de FMDV y EMCV por tratamiento con Hip. Estos resultados sugieren que el ion K^+ induce cambios conformacionales en la estructura IRES que aumentan la afinidad por el ribosoma, pero que requiere de una eficaz actividad helicasa para desestructurar el mRNA y que este pueda ser procesado por el ribosoma. En esta línea, un trabajo reciente ha demostrado que los cambios estructurales en regiones discretas de los IRESs de picornavirus, inducidos por cambios en el magnesio (Mg^{2+}), tienen un efecto considerable sobre la afinidad del RNA al factor eIF4GI (Lozano et al., 2014). Hay que tener en cuenta que el efecto del Mg^{2+} sobre la estructura del RNA requiere también de la participación de cationes monovalentes como el sodio (Na^+) o el K^+ (Tan and Chen, 2011), siendo además, el K^+ el catión monovalente más abundante en el citoplasma celular.

En conjunto, estos resultados aportan nuevos elementos relevantes para el conocimiento de la traducción de picornavirus e invitan a abrir nuevas rutas en la investigación de los mecanismos de la traducción independiente de eIF2, quizás aplicables en nuevas estrategias terapéuticas.

2. REQUERIMIENTO DE FACTORES PARA LA TRADUCCIÓN

DIRIGIDA POR EL IRES DE HIV-1

Los diferentes mRNAs de HIV-1 tienen en común una estructura *cap* en 5' y una cola de poli(A) en 3'. Al igual que en el caso de los mRNAs celulares, estas estructuras son reconocidas por los factores de iniciación eIF4E y PABP, que, junto con eIF4GI y eIF4A, componen el complejo eIF4F. Este complejo es responsable directo de la unión del mRNA a la subunidad ribosomal 43S y, por tanto, es clave en la traducción canónica. Por este motivo el complejo eIF4F resulta ser una diana relevante para ciertas proteasas virales, como las de picornavirus o calicivirus, puesto que regulan la traducción celular y promueven la expresión viral mediante un sistema de iniciación

alternativo (Lloyd, 2006). Nuestro grupo había demostrado anteriormente que la proteasa HIV-1 PR, además de procesar las poliproteínas de HIV-1, es capaz de hidrolizar eIF4GI y PABP inhibiendo tanto la traducción *cap* dependiente como la poli(A) dependiente (Ventoso et al., 2001; Castello, A., 2008). Los resultados que se presentan en este trabajo respaldan esta hipótesis. Se ha podido observar que en lisados celulares la traducción de un mRNA con estructura *cap* queda bloqueada en un 80 % en presencia de HIV-1 PR y en un 90 % en el caso de un mRNA con cola de poli(A). La influencia de HIV-1 PR sobre la traducción de un mRNA con *cap* y poli(A) fue similar al de los casos anteriores, mientras que HIV-1 PR no ejerció ningún efecto sobre la traducción de un mRNA sin *cap* ni cola de poli(A). Además, en estos mismos lisados tratados con HIV-1 PR, la adición de PABP exógeno recuperó la traducción del mRNA con cola de poli(A) en un 60 % en presencia de HIV-1 PR y Sq, pero en las mismas condiciones no fue capaz de restablecer la traducción de los mRNAs con *cap*, o sin ninguna de las dos estructuras, lo que demuestra que el corte de PABP por HIV-1 PR es el responsable de la inhibición de la traducción poli(A) dependiente.

Resulta paradójico que HIV-1 PR inhiba la traducción *cap* y poli(A) dependiente cuando estas estructuras están presentes en el mRNA de HIV-1. La presencia de una secuencia altamente estructurada en la región 5'UTR del RNAg de HIV-1 del tipo de IRES es de especial importancia en este contexto. Pese a que algunas evidencias tempranas negaban que esta secuencia funcionara como un elemento IRES (Miele et al., 1996), trabajos posteriores han sugerido que la función IRES es activa únicamente en la fase G2/M (Brasey et al., 2003b), lo que explicaría por qué los ensayos previos fallaron en detectar la actividad IRES. Actualmente existen multitud de trabajos que revelan la capacidad de esta secuencia para dirigir una traducción no canónica en diferentes sistemas y contextos. Como ejemplo, Amorim y col., describieron recientemente que en condiciones en las que la traducción *cap* dependiente está restringida por PV 2A^{pro}, los mRNAs que contienen el IRES de HIV-1 son capaces de mantener una traducción eficiente (Amorim et al., 2014). Nuestros resultados han mostrado, además, que la poliproteína Gag es capaz de sintetizarse desde el mRNA de HIV-1 en condiciones en las que HIV-1 PR ha bloqueado la traducción *cap* y poli(A) dependiente. En esas mismas condiciones, un mRNA control con traducción *cap*-poli(A) quedó completamente inhibido. Estos datos sugieren una traducción dual con diferentes requerimientos de factores para los mRNAs de HIV-1. Es posible que a tiempos tempranos la síntesis de proteínas esté regulada por el mecanismo de traducción

canónico y requiera del complejo eIF4F íntegro, pero según progresa la infección y las condiciones fisiológicas cambian, la traducción cambiaría a un mecanismo no canónico. En este sentido, Amorim y col., describieron también, mediante cotransfección del replicón pNL4.3 y el plásmido pCMV-2A^{pro}, que la síntesis de la poliproteína Gag resulta sensible a PV 2A^{pro}. Hacia las 72 hpt, esta sensibilidad revierte y se obtiene síntesis de Gag en presencia de PV 2A^{pro}. Desde nuestro punto de vista, el empleo a tiempos tan largos de una proteína que ejerce multitud de acciones relacionadas con la regulación de la expresión génica (Castelló et al., 2011), falla en aclarar si la inhibición se debe a la hidrólisis de eIF4GI o a otros efectos asociados a PV 2A^{pro}. Para aislar el efecto de la proteasa sobre el inicio de la traducción, en esta tesis se emplearon tiempos cortos de exposición a las proteasas, por lo que nuestros resultados muestran, con mayor grado de certeza, que a las 6 h de transfección del replicón pNL4.3-Renilla la adición de las proteasas FMDV L^{pro} o PV 2A^{pro} bloquea eficazmente la síntesis de la proteína reportera insertada en la secuencia gag de manera correlativa al corte total de eIF4GI. Tras 18 h de incubación del replicón, por el contrario, la incorporación de las proteasas ya no es capaz de bloquear la síntesis de la proteína reportera. Así, nuestros resultados indican que, en estas condiciones, FMDV L^{pro} estimula la producción de luciferasa 2,5 veces, mientras que PV 2A^{pro} es capaz de estimular la síntesis de la proteína 1,5 veces con respecto al replicón solo. En esta misma línea, Monette y col., han demostrado que en lisados celulares, la traducción dirigida por el IRES de HIV-1 no solo es resistente a la presencia de FMDV L^{pro}, sino que además es estimulable por la proteasa (Monette et al., 2013). En concordancia con estos resultados, se ha observado que en RRL tanto FMDV L^{pro} como HRV 2A^{pro} estimulan la traducción de un mRNA que porta el IRES de HIV-1; esta estimulación es correlativa con el corte total de eIF4GI. La ausencia de estimulación en presencia de una variante inactiva de FMDV L^{pro} nos ha permitido establecer que este incremento es dependiente de la actividad catalítica de la proteasa.

Es destacable el hecho de que durante la infección por HIV-1 se produzca una marcada fosforilación de eIF2 α (del Pino et al., 2012,). Nuestro grupo ha comprobado, mediante tratamiento con Tg en células y poli(I:C) en RRL, que la fosforilación de eIF2 α induce un profundo bloqueo de la traducción dirigida por el IRES de HIV-1. Además, esta inhibición no puede ser rescatada por el efecto estimulador de FMDV L^{pro}. Estos resultados sugieren que la traducción dirigida por el IRES de HIV-1 requiere del factor eIF2 activo. Por otro lado, existen evidencias de que HIV-1 es capaz

de regular el estado de fosforilación de eIF2 mediante la inactivación de la quinasa PKR (Clerzius et al., 2011), y más recientemente se ha demostrado que HIV-1 PR es capaz de hidrolizar la quinasa GCN2 evitando así la fosforilación de eIF2 α .

La proteína Rev de HIV-1 se sintetiza en la fase temprana de la infección y está implicada en la regulación del procesamiento del RNA viral (Kjems et al., 1991) y la exportación nuclear (Fritz and Green, 1996). Para este último cometido, la proteína Rev contiene un dominio que permite la unión a una secuencia del RNA viral muy estructurada denominada RRE (Heaphy et al., 1990; Malim and Cullen, 1991). Esta unión es necesaria para la exportación nuclear de los mRNAs virales, aunque mientras que la exportación de mRNAs virales se incrementa ligeramente en presencia de Rev, la traducción lo hace drásticamente, mostrando una discordancia entre efecto en exportación y traducción del mRNA viral (Groom et al., 2009; Perales et al., 2005). Previamente se había descrito que la interacción Rev-RRE es fundamental para el reclutamiento ribosómico del mRNA viral (Kimura et al., 1996) y, más recientemente, Groom y col., demostraron que aislando la traducción de la exportación mediante el empleo de sistemas libres de células HIV-1 Rev es capaz de estimular la traducción de los mRNAs de HIV-1, especialmente de aquellos que contienen la secuencia RRE (Groom et al., 2009). Nuestros datos corroboran que, en RRL, la traducción de un mRNA con la secuencia líder y el RRE de HIV-1 se ve estimulada de manera dependiente de dosis de Rev, alcanzando un 33 % más de síntesis que en ausencia de Rev. En células BHK-T7, la presencia de Rev es capaz de estimular 3 veces la traducción de un mRNA que contiene la secuencia 5' líder y el RRE de HIV-1. En cambio, con el mismo RNA sin la secuencia RRE, la presencia de Rev inhibe la síntesis de proteínas hasta un 45 %. Dado que HIV-1 Rev es también capaz de unirse a la región 5' líder del RNA de HIV-1 (Gallego et al., 2003), es posible que la inhibición del mRNA sin RRE se deba a una acumulación excesiva de Rev en el extremo 5' del mRNA, ya que no existe competición por la proteína disponible. El exceso de Rev asociado a la región 5' del mRNA puede generar un impedimento estérico para el procesamiento ribosómico del mRNA, lo que reduciría la eficacia de traducción.

Hasta ahora nadie ha propuesto un modelo que explique el mecanismo por el cual HIV-1 Rev estimula la traducción del RNA viral. Una de las primeras aportaciones fue el hallazgo del requerimiento de HIV-1 Rev para la unión de PABP a los RNAs dependientes de Rev (Campbell et al., 1994), aunque no se pudo establecer la naturaleza del papel de Rev en la unión de PABP al RNA. Más de dos décadas después, nuestros

resultados muestran que HIV-1 Rev interacciona con el factor eIF4GI. Usando lisados de reticulocitos de conejo suplementados con extractos de células HeLa y cromatografía de afinidad, hemos determinado que HIV-1 Rev es capaz de asociarse también con PABP, pero no con p97, una proteína homóloga de eIF4GI. Más allá de estos resultados, hemos comprobado, mediante dot blot y usando proteínas purificadas en condiciones nativas, que estas interacciones son directas, es decir, se producen sin que medien otras proteínas o ácidos nucleicos. La relevancia de estos resultados reside en que permiten explicar porqué se requiere HIV-1 Rev para la unión de PABP al RNA viral; Rev sería capaz de secuestrar el factor y unirlo, a través del RRE o del 5'UTR, al RNA viral. Además, el descubrimiento de que HIV-1 Rev interacciona con eIF4GI resulta de especial interés, ya que esta proteína a su vez interacciona con otros factores de la iniciación. También hemos podido establecer que HIV-1 Rev es capaz de unirse a las regiones comprendidas entre los aminoácidos 588-605 y 825-840 de eIF4GI, así como a la región 172-188 de PABP. Estas posiciones resultan de especial relevancia en el contexto de infección, ya que ambos factores son degradados por HIV-1 PR, generando diferentes productos de corte. En el caso de PABP, la hidrólisis por HIV-1 PR genera dos productos de corte y es en el fragmento Nt de PABP donde se localizan el dominio de interacción con eIF4GI y los motivos de reconocimiento de RNA (RRM) 1, 2 y parcialmente el 3, que es, precisamente, donde se une HIV-1 Rev. En el caso de eIF4GI, HIV-1 PR genera tres productos: el fragmento Nt, el central y el Ct. En el fragmento Nt se localizan los dominios de interacción de eIF4GI con PABP y eIF4E, y es también donde se localiza uno de los sitios de unión con HIV-1 Rev. El segundo sitio de unión a Rev se localiza en el producto central de eIF4GI, donde está presente uno de los dominios de interacción con eIF4A, el dominio de unión a eIF3 y el RRM.

En conjunto, estos resultados permiten plantear que, tras la hidrólisis de los factores por HIV-1 PR, Rev es capaz de reclutar el fragmento de PABP responsable de la unión con eIF4GI al mismo tiempo que con la cola de poli(A) y, en paralelo, serían reclutados también los fragmentos de eIF4GI responsables de las uniones al RNA, al factor eIF4E y eIF3 junto con eIF4A. Así, a partir de interacciones directas e indirectas, Rev sería capaz de recomponer el complejo eIF4F y unirlo al RNA de HIV-1. La composición de este complejo proteico resulta especialmente interesante, puesto que está involucrado en importantes aspectos; por una parte, la región 5'UTR de HIV-1 requiere de la helicasa eIF4A para el reconocimiento del AUGi original (de Breyne et

al., 2012); además, el eIF4E permitiría restablecer, junto a PABP, el modelo de circularización del mRNA, que incrementa notablemente la eficacia de traducción (Kahvejian et al., 2001) y, finalmente, la presencia de eIF3 en este complejo permitiría la unión al 43S. No se puede descartar la interacción de HIV-1 Rev con otros factores como eIF2, pese a que nuestros resultados indican que, en RRL, la proteína Rev no es capaz de rescatar la traducción tras la fosforilación de eIF2 por tratamiento con poli(I:C).

Nuestros resultados aportan nueva información en torno a las estrategias en la traducción de proteínas tardías de HIV-1, a la vez que afianzan los resultados de trabajos previos. En el futuro será necesario comprobar el papel de las interacciones de HIV-1 Rev en las condiciones restrictivas inducidas por HIV-1 PR y su papel en la síntesis tardía de proteínas virales durante la infección.

3. EFECTO DE LA APLIDINA SOBRE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

A pesar de que la aplidina tiene un potente efecto citotóxico en multitud de células tumorales (Depenbrock et al., 1998; Lobo et al., 1997; Straight et al., 2005), por lo que actualmente figura en la fase III de diferentes ensayos clínicos, aún no está claro el mecanismo por el que actúa de manera específica sobre células tumorales y no sobre células no tumorales (Gajate et al., 2003) ni el porqué de su actividad citotóxica sobre estas. Se ha trabajado sobre la hipótesis de que la aplidina se une a la membrana de manera dependiente al contenido de colesterol, translocando y activando Rac1 (Suárez et al., 2006) y a continuación JNK, hecho que a su vez dispara una compleja ruta, aún sin caracterizar, de apoptosis (Cuadrado et al., 2004). Por otro lado, datos publicados recientemente indican que la aplidina no dispara la apoptosis, sino que más bien tiene un efecto citostático inducido por la activación de p38 y no de JNK (Losada et al., 2014). También se ha trabajado en torno a la observación de que el factor de elongación eEF1A2 está sobre-expresado en multitud de células tumorales (Yang et al., 2015; Tomlinson et al., 2005; Pinke et al., 2008). En este sentido, recientemente se ha publicado que la aplidina es capaz de unirse al factor eIF1A2 inhibiendo la elongación de la traducción. En este mismo trabajo se observó que mientras que las células HeLa wt son sensibles al tratamiento con aplidina, una variante, con bajos niveles de

eIF1A2 pero no de la isoforma eIF1A1, resultó ser resistente al compuesto (Losada et al., 2015).

Nuestros datos muestran que en células HeLa wt la presencia de aplidina induce un potente bloqueo en la síntesis de proteínas celulares, mientras que el mismo tratamiento, en la variante resistente a aplidina, no tiene efectos significativos sobre la traducción celular. Pese a que los datos de Suárez y col. indican que esta resistencia se debe al contenido de colesterol en membrana (Suárez et al., 2006), nuestros resultados indican que la restitución del factor eEF1A2 es capaz de recuperar, en presencia del fármaco, el bloqueo de la traducción celular, mientras que la sobre-expresión del factor eIF1A1 no tiene efectos significativos. La traducción de mRNAs con bajos niveles de requerimientos de factores resulta muy útil en la identificación de los mecanismos de acción de compuestos experimentales. Un ejemplo es el hipuristanol, otro inhibidor de origen marino; mediante el uso de mRNAs con diferentes requerimientos de factores de la iniciación, fue descrito como un inhibidor específico del factor eIF4A (Bordeleau et al., 2006). La síntesis tardía de proteínas de SV muestra un bajo requerimiento de factores de la iniciación (Sanz et al., 2009). Nuestros resultados indican que en células BHK infectadas con SV la presencia de aplidina no afecta a la síntesis de proteínas virales tardías, mientras que las mismas dosis de aplidina inducen un potente bloqueo de la traducción celular en las mismas células sin infectar. Además, empleando mioblastos de conejo infectados con SV o VSV, se comprobó que mientras que las células no infectadas muestran una alta inhibición en la síntesis de proteína en presencia del compuesto desde dosis muy bajas, la síntesis de proteínas tardías de SV o VSV no se ve significativamente afectada por la presencia de aplidina. A partir de estos resultados, se puede plantear que la aplidina actúa, de alguna manera, sobre la iniciación y no sobre la elongación de la traducción. Además, hemos comprobado que en estas mismas células transfectadas con diferentes mRNAs la traducción dirigida por el IRES de CrPV es resistente al compuesto, mientras que el tratamiento con aplidina bloquea profundamente la síntesis dirigida por los IRESs de EMCV y HCV. Estos datos indican que el bloqueo en la síntesis de proteínas en presencia de aplidina debe residir en el mecanismo de la iniciación de la traducción que es requerido para el funcionamiento de los IRESs de HCV y EMCV.

La activación de Rac1 por la aplidina (Suárez et al., 2006) posiblemente active la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Ellenbroek and Collard, 2007), induciendo estrés del retículo endoplasmático, lo que por vía PERK activaría la

fosforilación de eIF2 α inhibiendo la traducción. No obstante, nuestros datos muestran que en células C2C12 el tratamiento con aplidina o A23187, un ionóforo, no induce fosforilación del factor en comparación con la fosforilación que induce el tratamiento con Tg o Ars. De hecho, en células MEFs S51A, que presentan una variante de eIF2 no fosforilable, la síntesis de proteínas celulares resulta inhibida en presencia de aplidina. Estos resultados demuestran que en el mecanismo de inhibición de la traducción inducido por aplidina no participa el eIF2. También hemos comprobado que la presencia de aplidina en sistemas libres de células no tiene efectos relevantes sobre la traducción de un mRNA con *cap* o un mRNA con el IRES de EMCV. Estos resultados podrían estar a favor de que la aplidina debe interaccionar inicialmente con algún receptor asociado a la membrana celular, como los propuestos por trabajos previos como Rac-1 (Suárez et al., 2006) o FasL (Gajate and Mollinedo, 2005). Por último, se ha podido determinar que en células Hap-1 *knock-out* para eEF1A2 el tratamiento con aplidina tiene un efecto inhibitorio sobre la traducción celular, similar al de las células Hap-1 wt, lo que descarta, al menos en estas células, un mecanismo de acción en el que medie el factor eEF1A2. Nuestros datos aportan evidencia por primera vez sobre la existencia de un bloqueo en la síntesis de proteínas inducido por aplidina y, en concreto, sobre que el mecanismo de inhibición reside en la fase de iniciación de la traducción. En este mecanismo debe mediar, además, alguna estructura celular, como la membrana celular. Es necesario realizar más trabajos para determinar qué factores se ven afectados en presencia de aplidina y mediante qué mecanismo tiene lugar esta inhibición.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. La proteasa L^{pro} de FMDV es capaz de estimular de manera directa la traducción dirigida por el IRES de FMDV, tanto en células como en sistemas de traducción *in vitro*.
2. La proteasa L^{pro} de FMDV es capaz de conferir independencia del factor eIF2 a la traducción dirigida por diferentes IRESs de picornavirus. Para ello es necesaria su actividad enzimática.
3. En los ensayos de traducción *in vitro* los aumentos de concentración de K⁺ inhiben fuertemente la traducción *cap* dependiente, mientras que estimulan la traducción dirigida por diferentes IRESs de picornavirus.
4. Los incrementos de concentración de K⁺ reducen la capacidad estimuladora de FMDV L^{pro} sobre la traducción dirigida por el IRES de FMDV.
5. Las traducciones *in vitro* dirigidas por diferentes IRESs de picornavirus a alta concentración de K⁺ se hacen independientes del factor eIF2, pero no del factor eIF4A.
6. La traducción de mRNAs celulares *cap* y poli(A) dependiente se bloquea en presencia de la proteasa PR de HIV-1. Esto no ocurre con el mRNA genómico de HIV-1, que también posee *cap* y poli(A). La inhibición de la traducción poli(A) dependiente por HIV-1 PR se restaura añadiendo PABP exógena, lo que demuestra que la inhibición se debe al corte directo del factor PABP por esta proteasa.
7. PV 2A^{pro} y FMDV L^{pro} inhiben la traducción del mRNA genómico de HIV-1 a tiempos de incubación cortos, mientras que a tiempos más largos estimulan la síntesis de proteínas, por lo que la traducción responde a un mecanismo dual. Sin embargo, se requieren eIF2 y eIF4A activos.
8. Tanto PV 2A^{pro} como FMDV L^{pro} estimulan la traducción *in vitro* dirigida por el IRES de HIV-1; esta estimulación es dependiente de la actividad proteolítica de

- las proteasas. No obstante, la capacidad estimuladora de FMDV L^{pro} no es capaz de conferir independencia de eIF2.
9. La proteína Rev de HIV-1 estimula la traducción de los mRNAs que contienen el IRES y la secuencia RRE de HIV-1, tanto *in vitro* como en células en cultivo, mientras que inhibe la traducción de los mRNAs que portan el IRES pero no la secuencia RRE.
 10. La proteína Rev de HIV-1 es capaz de interactuar de manera directa con los factores eIF4GI y PABP, lo que permite la reconstrucción del complejo eIF4F, aunque estos hayan sido cortados proteolíticamente por HIV-1 PR.
 11. La aplidina inhibe fuertemente la traducción celular en diferentes líneas celulares, excepto en la línea HeLa resistente a aplidina. La sobre-expresión del factor eEF1A2 en esta línea restituye de manera parcial el efecto inhibitorio de la aplidina.
 12. La síntesis de proteínas tardías de SV y VSV, al igual que la traducción dirigida por el IRES IGR de CrPV, son resistentes a la aplidina. Esto demuestra que la etapa de elongación en la traducción de estos mRNAs no está inhibida por la aplidina.
 13. La inhibición de la traducción por la aplidina tiene lugar en la etapa de iniciación, pero este compuesto no induce fosforilación del factor eIF2.
 14. En células Hap-1 *knock-out* para eEF1A2, la aplidina inhibe potentemente la traducción de mRNAs celulares. Por lo tanto, la inhibición por este compuesto no se lleva a cabo a través de eEF1A2, al menos en esta línea.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Aa	Aminoácidos
AcK	Acetato potásico
AcMg	Acetato magnésico
Ars	Arsenito sódico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHK	Célula de riñón de hámster neonato
CHX	Cicloheximida
CrPV	Virus de la parálisis del grillo
Ct	Región carboxilo terminal
D. E.	Desviación estándar
DMEM	Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
eEF	Factor de elongación de la traducción eucariótico
eIF	Factor de iniciación de la traducción eucariótico
EMCV	Virus de la encefalomiocarditis
ERBV	Virus de la rinitis equina B
FMDV	Virus de la fiebre aftosa
GDP	Guanosín difosfato
GFP	Proteína verde fluorescente
gRNA	RNA genómico
GTP	Guanosín trifosfato
HAV	Virus de la hepatitis A
HCV	Virus de la hepatitis C
h	Hora
Hpt	Horas post-transfección
IGR	Región intergénica

IRES	Sitio de entrada interna del ribosoma
Kb	Kilobase
KDa	Kilodaltons
L^{pro}	Proteasa L
LTR	Secuencia larga terminal repetida
Luc	Luciferasa
MEF	Fibroblasto de embrión de ratón
Met/Cys	Metionina/cisteína
Met-tRNA_i	tRNA iniciador unido a metionina
mRNA	RNA mensajero
Nt	Región amino terminal
ORF	Fase abierta de lectura
PABP	Proteína de unión a la cola de poli(A)
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Poli(A)	Poliadenosina
Poli(I:C)	Ácido poliinosínico:policitidílico
PV	Virus de la polio
RLU	Unidades relativas de luz
RRL	Lisados de reticulocitos de conejo
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SINV	Virus Sindbis
TBS	Tampón Tris salino
tRNA	RNA de transferencia
Tg	Tapsigargina
UTR	Región no traducida
wt	Tipo salvaje

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aldabe, R., Barco, A., Carrasco, L., 1996. Membrane permeabilization by poliovirus proteins 2B and 2BC. *J. Biol. Chem.* 271, 23134–23137.
- Aldabe, R., Feduchi, E., Novoa, I., Carrasco, L., 1995a. Expression of poliovirus 2Apro in mammalian cells: effects on translation. *FEBS Lett.* 377, 1–5.
- Aldabe, R., Feduchi, E., Novoa, I., Carrasco, L., 1995b. Efficient cleavage of p220 by poliovirus 2Apro expression in mammalian cells: effects on vaccinia virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 928–936.
- Almela, M.J., González, M.E., Carrasco, L., 1991. Inhibitors of poliovirus uncoating efficiently block the early membrane permeabilization induced by virus particles. *J. Virol.* 65, 2572–2577.
- Amiri, A., Noei, F., Jeganathan, S., Kulkarni, G., Pinke, D.E., Lee, J.M., 2006. eEF1A2 activates Akt and stimulates Akt-dependent actin remodeling, invasion and migration. *Oncogene* 26, 3027–3040.
- Amorim, R., Costa, S.M., Cavaleiro, N.P., da Silva, E.E., da Costa, L.J., 2014. HIV-1 Transcripts Use IRES-Initiation under Conditions Where Cap-Dependent Translation Is Restricted by Poliovirus 2A Protease. *PLoS ONE* 9, e88619.
- Asano, K., Sachs, M.S., 2007. Translation factor control of ribosome conformation during start codon selection. *Genes Dev.* 21, 1280–1287.
- Askjaer, P., Jensen, T.H., Nilsson, J., Englmeier, L., Kjems, J., 1998. The Specificity of the CRM1-Rev Nuclear Export Signal Interaction Is Mediated by RanGTP. *J. Biol. Chem.* 273, 33414–33422.
- Balvay, L., Soto Rifo, R., Ricci, E.P., Decimo, D., Ohlmann, T., 2009. Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim. Biophys. Acta* 1789, 542–557.
- Barco, A., Feduchi, E., Carrasco, L., 2000. A stable HeLa cell line that inducibly expresses poliovirus 2A(pro): effects on cellular and viral gene expression. *J. Virol.* 74, 2383–2392.
- Belsham, G.J., 2009. Divergent picornavirus IRES elements. *Virus Res.* 139, 183–192.
- Berkhout, B., Arts, K., Abbink, T.E.M., 2011. Ribosomal scanning on the 5'-untranslated region of the human immunodeficiency virus RNA genome. *Nucleic Acids Res.* 39, 5232–5244.

- Bordeleau, M.-E., Mori, A., Oberer, M., Lindqvist, L., Chard, L.S., Higa, T., Belsham, G.J., Wagner, G., Tanaka, J., Pelletier, J., 2006. Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nat. Chem. Biol.* 2, 213–220.
- Borman, A.M., Bailly, J.L., Girard, M., Kean, K.M., 1995. Picornavirus internal ribosome entry segments: comparison of translation efficiency and the requirements for optimal internal initiation of translation in vitro. *Nucleic Acids Res.* 23, 3656–3663.
- Borman, A.M., Kirchweger, R., Ziegler, E., Rhoads, R.E., Skern, T., Kean, K.M., 1997a. eIF4G and its proteolytic cleavage products: effect on initiation of protein synthesis from capped, uncapped, and IRES-containing mRNAs. *RNA N. Y.* N 3, 186–196.
- Borman, A.M., Le Mercier, P., Girard, M., Kean, K.M., 1997b. Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Res.* 25, 925–932.
- Brasey, A., Lopez-Lastra, M., Ohlmann, T., Beerens, N., Berkhout, B., Darlix, J.-L., Sonenberg, N., 2003a. The Leader of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomic RNA Harbors an Internal Ribosome Entry Segment That Is Active during the G2/M Phase of the Cell Cycle. *J. Virol.* 77, 3939–3949.
- Brasey, A., Lopez-Lastra, M., Ohlmann, T., Beerens, N., Berkhout, B., Darlix, J.-L., Sonenberg, N., 2003b. The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *J. Virol.* 77, 3939–3949.
- Brierley, I., 1995. Ribosomal frameshifting viral RNAs. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 8), 1885–1892.
- Buchholz, U.J., Finke, S., Conzelmann, K.K., 1999. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J. Virol.* 73, 251–259.
- Campbell, L.H., Borg, K.T., Haines, J.K., Moon, R.T., Schoenberg, D.R., Arrigo, S.J., 1994. Human immunodeficiency virus type 1 Rev is required in vivo for binding of poly(A)-binding protein to Rev-dependent RNAs. *J. Virol.* 68, 5433–5438.
- Carrasco, L., Otero, M.J., Castrillo, J.L., 1989. Modification of membrane permeability by animal viruses. *Pharmacol. Ther.* 40, 171–212.

- Carrasco, L., Smith, A.E., 1976. Sodium ions and the shut-off of host cell protein synthesis by picornaviruses. *Nature* 264, 807–809.
- Castello, A., 2008. Alteraciones de la expresión génica inducidas por proteasas virales. Tesis Doctoral: Universidad Autónoma de Madrid.
- Castelló, A., Alvarez, E., Carrasco, L., 2011. The multifaceted poliovirus 2A protease: regulation of gene expression by picornavirus proteases. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 369648.
- Castelló, A., Franco, D., Moral-López, P., Berlanga, J.J., Alvarez, E., Wimmer, E., Carrasco, L., 2009a. HIV-1 protease inhibits Cap- and poly(A)-dependent translation upon eIF4GI and PABP cleavage. *PloS One* 4, e7997.
- Castelló, A., Izquierdo, J.M., Welnowska, E., Carrasco, L., 2009b. RNA nuclear export is blocked by poliovirus 2A protease and is concomitant with nucleoporin cleavage. *J. Cell Sci.* 122, 3799–3809.
- Castelló, A., Sanz, M.A., Molina, S., Carrasco, L., 2006. Translation of Sindbis virus 26S mRNA does not require intact eukaryotic initiation factor 4G. *J. Mol. Biol.* 355, 942–956.
- Castrillo, J.L., López-Rivas, A., Carrasco, L., 1987. Effects of extracellular cations on translation in poliovirus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 68 (Pt 2), 325–333.
- Chuang, S.-M., Chen, L., Lambertson, D., Anand, M., Kinzy, T.G., Madura, K., 2005. Proteasome-mediated degradation of cotranslationally damaged proteins involves translation elongation factor 1A. *Mol. Cell. Biol.* 25, 403–413.
- Clerzius, G., Gélinas, J.-F., Gatignol, A., 2011. Multiple levels of PKR inhibition during HIV-1 replication. *Rev. Med. Virol.* 21, 42–53.
- Cuadrado, A., González, L., Suárez, Y., Martínez, T., Muñoz, A., 2004. JNK activation is critical for AplidinTM-induced apoptosis. *Oncogene* 23, 4673–4680.
- Cullen, B.R., Malim, M.H., 1991. The HIV-1 Rev protein: prototype of a novel class of eukaryotic post-transcriptional regulators. *Trends Biochem. Sci.* 16, 346–350.
- de Breyne, S., Chamond, N., Décimo, D., Trabaud, M.-A., André, P., Sargueil, B., Ohlmann, T., 2012. In vitro studies reveal that different modes of initiation on HIV-1 mRNA have different levels of requirement for eukaryotic initiation factor 4F. *FEBS J.* 279, 3098–3111.
- de Haro, C., Méndez, R., Santoyo, J., 1996. The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 10, 1378–1387.

- de Los Santos, T., de Avila Botton, S., Weiblen, R., Grubman, M.J., 2006. The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus inhibits the induction of beta interferon mRNA and blocks the host innate immune response. *J. Virol.* 80, 1906–1914.
- de Los Santos, T., Diaz-San Segundo, F., Grubman, M.J., 2007. Degradation of nuclear factor kappa B during foot-and-mouth disease virus infection. *J. Virol.* 81, 12803–12815.
- del Pino, J., Jiménez, J.L., Ventoso, I., Castelló, A., Muñoz-Fernández, M.Á., de Haro, C., Berlanga, J.J., 2012. GCN2 Has Inhibitory Effect on Human Immunodeficiency Virus-1 Protein Synthesis and Is Cleaved upon Viral Infection. *PLoS ONE* 7, e47272.
- Demetri, G.D., von Mehren, M., Jones, R.L., Hensley, M.L., Schuetze, S.M., Staddon, A., Milhem, M., Elias, A., Ganjoo, K., Tawbi, H., Van Tine, B.A., Spira, A., Dean, A., Khokhar, N.Z., Park, Y.C., Knoblauch, R.E., Parekh, T.V., Maki, R.G., Patel, S.R., 2015. Efficacy and Safety of Trabectedin or Dacarbazine for Metastatic Liposarcoma or Leiomyosarcoma After Failure of Conventional Chemotherapy: Results of a Phase III Randomized Multicenter Clinical Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*
- Depenbrock, H., Peter, R., Faircloth, G.T., Manzanares, I., Jimeno, J., Hanauske, A.R., 1998. In vitro activity of aplidine, a new marine-derived anti-cancer compound, on freshly explanted clonogenic human tumour cells and haematopoietic precursor cells. *Br. J. Cancer* 78, 739–744.
- Devaney, M.A., Vakharia, V.N., Lloyd, R.E., Ehrenfeld, E., Grubman, M.J., 1988. Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J. Virol.* 62, 4407–4409.
- Dever, T.E., Yang, W., Aström, S., Byström, A.S., Hinnebusch, A.G., 1995. Modulation of tRNA(iMet), eIF-2, and eIF-2B expression shows that GCN4 translation is inversely coupled to the level of eIF-2.GTP.Met-tRNA(iMet) ternary complexes. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6351–6363.
- D’Incalci, M., Galmarini, C.M., 2010. A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action. *Mol. Cancer Ther.* 9, 2157–2163.
- Dmitriev, S.E., Terenin, I.M., Andreev, D.E., Ivanov, P.A., Dunaevsky, J.E., Merrick, W.C., Shatsky, I.N., 2010. GTP-independent tRNA delivery to the ribosomal P-site by a novel eukaryotic translation factor. *J. Biol. Chem.* 285, 26779–26787.

- Ellenbroek, S.I.J., Collard, J.G., 2007. Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin. Exp. Metastasis* 24, 657–672.
- Etchison, D., Smith, K., 1990. Variations in cap-binding complexes from uninfected and poliovirus-infected HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 265, 7492–7500.
- Fritz, C.C., Green, M.R., 1996. HIV Rev uses a conserved cellular protein export pathway for the nucleocytoplasmic transport of viral RNAs. *Curr. Biol. CB* 6, 848–854.
- Frum, R., Busby, S.A., Ramamoorthy, M., Deb, S., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Deb, S.P., 2007. HDM2-binding partners: interaction with translation elongation factor EF1alpha. *J. Proteome Res.* 6, 1410–1417.
- Fuesetani, N., 2000. *Drugs from the sea*; Chapt. 1, Eds., Basel: Karger. ed.
- Gajate, C., An, F., Mollinedo, F., 2003. Rapid and selective apoptosis in human leukemic cells induced by Aplidine through a Fas/CD95- and mitochondrial-mediated mechanism. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 9, 1535–1545.
- Gajate, C., Mollinedo, F., 2005. Cytoskeleton-mediated death receptor and ligand concentration in lipid rafts forms apoptosis-promoting clusters in cancer chemotherapy. *J. Biol. Chem.* 280, 11641–11647.
- Gajula, P.K., Asthana, J., Panda, D., Chakraborty, T.K., 2013. A synthetic dolastatin 10 analogue suppresses microtubule dynamics, inhibits cell proliferation, and induces apoptotic cell death. *J. Med. Chem.* 56, 2235–2245.
- Gallego, J., Greatorex, J., Zhang, H., Yang, B., Arunachalam, S., Fang, J., Seamons, J., Lea, S., Pomerantz, R.J., Lever, A.M.L., 2003. Rev binds specifically to a purine loop in the SL1 region of the HIV-1 leader RNA. *J. Biol. Chem.* 278, 40385–40391.
- Garcia-Moreno, M., Sanz, M.A., Carrasco, L., 2015. Initiation codon selection is accomplished by a scanning mechanism without crucial initiation factors in Sindbis virus subgenomic mRNA. *RNA N. Y. N* 21, 93–112.
- Garcia-Moreno, M., Sanz, M.A., Pelletier, J., Carrasco, L., 2013. Requirements for eIF4A and eIF2 during translation of Sindbis virus subgenomic mRNA in vertebrate and invertebrate host cells. *Cell. Microbiol.* 15, 823–840.
- Garrey, J.L., Lee, Y.-Y., Au, H.H.T., Bushell, M., Jan, E., 2010a. Host and viral translational mechanisms during cricket paralysis virus infection. *J. Virol.* 84, 1124–1138.

- Garrey, J.L., Lee, Y.-Y., Au, H.H.T., Bushell, M., Jan, E., 2010b. Host and viral translational mechanisms during cricket paralysis virus infection. *J. Virol.* 84, 1124–1138.
- Glaser, W., Skern, T., 2000. Extremely efficient cleavage of eIF4G by picornaviral proteinases L and 2A in vitro. *FEBS Lett.* 480, 151–155.
- Groom, H.C.T., Anderson, E.C., Dangerfield, J.A., Lever, A.M.L., 2009. Rev regulates translation of human immunodeficiency virus type 1 RNAs. *J. Gen. Virol.* 90, 1141–1147.
- Harlow, E., Lane, D., 1988. *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Press, New York, NY.
- Heaphy, S., Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M.J., Green, S.M., Karn, J., Lowe, A.D., Singh, M., Skinner, M.A., 1990. HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem-loop structure located within the Rev response element region. *Cell* 60, 685–693.
- Hellen, C.U., Sarnow, P., 2001. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.* 15, 1593–1612.
- Hertz, M.I., Thompson, S.R., 2011. Mechanism of translation initiation by Dicistroviridae IGR IRESs. *Virology* 411, 355–361.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 113–127.
- Jonckheere, H., Anné, J., De Clercq, E., 2000. The HIV-1 reverse transcription (RT) process as target for RT inhibitors. *Med. Res. Rev.* 20, 129–154.
- Jünemann, C., Song, Y., Bassili, G., Goergen, D., Henke, J., Niepmann, M., 2007. Picornavirus internal ribosome entry site elements can stimulate translation of upstream genes. *J. Biol. Chem.* 282, 132–141.
- Kahvejian, A., Roy, G., Sonenberg, N., 2001. The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 66, 293–300.
- Keiper, B.D., Rhoads, R.E., 1999. Translational recruitment of *Xenopus* maternal mRNAs in response to poly(A) elongation requires initiation factor eIF4G-1. *Dev. Biol.* 206, 1–14.

- Khaleghpour, K., Svitkin, Y.V., Craig, A.W., DeMaria, C.T., Deo, R.C., Burley, S.K., Sonenberg, N., 2001. Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. *Mol. Cell* 7, 205–216.
- Kim, J.H., Park, S.M., Park, J.H., Keum, S.J., Jang, S.K., 2011. eIF2A mediates translation of hepatitis C viral mRNA under stress conditions. *EMBO J.* 30, 2454–2464.
- Kimura, T., Hashimoto, I., Nishikawa, M., Fujisawa, J.I., 1996. A role for Rev in the association of HIV-1 gag mRNA with cytoskeletal beta-actin and viral protein expression. *Biochimie* 78, 1075–1080.
- Kjems, J., Frankel, A.D., Sharp, P.A., 1991. Specific regulation of mRNA splicing in vitro by a peptide from HIV-1 Rev. *Cell* 67, 169–178.
- Knudsen, S.M., Frydenberg, J., Clark, B.F., Leffers, H., 1993. Tissue-dependent variation in the expression of elongation factor-1 alpha isoforms: isolation and characterisation of a cDNA encoding a novel variant of human elongation-factor 1 alpha. *Eur. J. Biochem. FEBS* 215, 549–554.
- Kuyumcu-Martinez, N.M., Joachims, M., Lloyd, R.E., 2002. Efficient cleavage of ribosome-associated poly(A)-binding protein by enterovirus 3C protease. *J. Virol.* 76, 2062–2074.
- Kuyumcu-Martinez, N.M., Van Eden, M.E., Younan, P., Lloyd, R.E., 2004. Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol. Cell. Biol.* 24, 1779–1790.
- Lindqvist, L., Oberer, M., Reibarkh, M., Cencic, R., Bordeleau, M.-E., Vogt, E., Marintchev, A., Tanaka, J., Fagotto, F., Altmann, M., Wagner, G., Pelletier, J., 2008. Selective pharmacological targeting of a DEAD box RNA helicase. *PloS One* 3, e1583.
- Lin, J.-Y., Brewer, G., Li, M.-L., 2015. HuR and Ago2 Bind the Internal Ribosome Entry Site of Enterovirus 71 and Promote Virus Translation and Replication. *PloS One* 10, e0140291.
- Lloyd, R.E., 2006. Translational control by viral proteinases. *Virus Res.* 119, 76–88.
- Lobo, C., García-Pozo, S.G., Núñez de Castro, I., Alonso, F.J., 1997. Effect of dehydrodidemnin B on human colon carcinoma cell lines. *Anticancer Res.* 17, 333–336.

- Lorsch, J.R., Dever, T.E., 2010. Molecular view of 43 S complex formation and start site selection in eukaryotic translation initiation. *J. Biol. Chem.* 285, 21203–21207.
- Losada, A., Martínez-Leal, J.F., Gago, F., Cuevas, C., Garcia-Fernández, L.F., Galmarini, C.M., 2014. Role of the eukaryotic elongation factor eEF1A in the mechanism of action of Aplidin. *Cancer Res.* 74, 5467–5467.
- Losada, A., Muñoz, M.J., Garcia, C., Martínez-Leal, J.F., Gago, F., Cuevas, C., Garcia-Fernández, L.F., Dominguez, J.M., Lillo, P., Galmarini, C.M., 2015. eEF1A2 is a new target for anticancer therapy. *Cancer Res.* 75, 5430–5430.
- Lozano, G., Fernandez, N., Martinez-Salas, E., 2014. Magnesium-dependent folding of a picornavirus IRES element modulates RNA conformation and eIF4G interaction. *FEBS J.* 281, 3685–3700.
- Lubin, M., 1967. Intracellular potassium and macromolecular synthesis in mammalian cells. *Nature* 213, 451–453.
- Malim, M.H., Cullen, B.R., 1991. HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell* 65, 241–248.
- McEwen, E., Kedersha, N., Song, B., Scheuner, D., Gilks, N., Han, A., Chen, J.-J., Anderson, P., Kaufman, R.J., 2005. Heme-regulated inhibitor kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 inhibits translation, induces stress granule formation, and mediates survival upon arsenite exposure. *J. Biol. Chem.* 280, 16925–16933.
- Michel, Y.M., Poncet, D., Piron, M., Kean, K.M., Borman, A.M., 2000. Cap-Poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation. *J. Biol. Chem.* 275, 32268–32276.
- Miele, G., Mouland, A., Harrison, G.P., Cohen, E., Lever, A.M., 1996. The human immunodeficiency virus type 1 5' packaging signal structure affects translation but does not function as an internal ribosome entry site structure. *J. Virol.* 70, 944–951.
- Mir, M.A., Panganiban, A.T., 2008. A protein that replaces the entire cellular eIF4F complex. *EMBO J.* 27, 3129–3139.
- Molla, A., Paul, A.V., Wimmer, E., 1991. Cell-free, de novo synthesis of poliovirus. *Science* 254, 1647–1651.

- Monette, A., Valiente-Echeverría, F., Rivero, M., Cohen, É.A., Lopez-Lastra, M., Mouland, A.J., 2013. Dual Mechanisms of Translation Initiation of the Full-Length HIV-1 mRNA Contribute to Gag Synthesis. *PLoS ONE* 8, e68108.
- Moral-López, P., Alvarez, E., Redondo, N., Skern, T., Carrasco, L., 2014. L protease from foot and mouth disease virus confers eIF2-independent translation for mRNAs bearing picornavirus IRES. *FEBS Lett.* 588, 4053–4059.
- Morrison, J.M., Racaniello, V.R., 2009. Proteinase 2Apro is essential for enterovirus replication in type I interferon-treated cells. *J. Virol.* 83, 4412–4422.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2014. Marine-Sourced Anti-Cancer and Cancer Pain Control Agents in Clinical and Late Preclinical Development †. *Mar. Drugs* 12, 255–278.
- Niepmann, M., 2009. Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus. *Biochim. Biophys. Acta* 1789, 529–541.
- Niepmann, M., 2003. Effects of potassium and chloride on ribosome association with the RNA of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.* 93, 71–78.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., Ron, D., 2001. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *J. Cell Biol.* 153, 1011–1022.
- Ohlmann, T., Lopez-Lastra, M., Darlix, J.-L., 2000. An Internal Ribosome Entry Segment Promotes Translation of the Simian Immunodeficiency Virus Genomic RNA. *J. Biol. Chem.* 275, 11899–11906.
- Pelletier, J., Sonenberg, N., 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, 320–325.
- Perales, C., Carrasco, L., González, M.E., 2005. Regulation of HIV-1 env mRNA translation by Rev protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1743, 169–175.
- Pestova, T.V., Hellen, C.U., Shatsky, I.N., 1996. Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Mol. Cell. Biol.*
- Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Lomakin, I.B., Pilipenko, E.V., Shatsky, I.N., Agol, V.I., Hellen, C.U., 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7029–7036.
- Pestova, T.V., Lomakin, I.B., Lee, J.H., Choi, S.K., Dever, T.E., Hellen, C.U., 2000. The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* 403, 332–335.

- Pilipenko, E.V., Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Khitrina, E.V., Poperechnaya, A.N., Agol, V.I., Hellen, C.U.T., 2000. A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor. *Genes Dev.* 14, 2028–2045.
- Pinke, D.E., Kalloger, S.E., Francetic, T., Huntsman, D.G., Lee, J.M., 2008. The prognostic significance of elongation factor eEF1A2 in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 108, 561–568.
- Pisarev, A.V., Chard, L.S., Kaku, Y., Johns, H.L., Shatsky, I.N., Belsham, G.J., 2004. Functional and structural similarities between the internal ribosome entry sites of hepatitis C virus and porcine teschovirus, a picornavirus. *J. Virol.* 78, 4487–4497.
- Pisarev, A.V., Shirokikh, N.E., Hellen, C.U.T., 2005. Translation initiation by factor-independent binding of eukaryotic ribosomes to internal ribosomal entry sites. *C. R. Biol.* 328, 589–605.
- Plank, T.-D.M., Whitehurst, J.T., Cencic, R., Pelletier, J., Kieft, J.S., 2014. Internal translation initiation from HIV-1 transcripts is conferred by a common RNA structure. *Translation* 2, e27694.
- Preiss, T., W Hentze, M., 2003. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 25, 1201–1211.
- Prostko, C.R., Brostrom, M.A., Malara, E.M., Brostrom, C.O., 1992. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 alpha and inhibition of eIF-2B in GH3 pituitary cells by perturbants of early protein processing that induce GRP78. *J. Biol. Chem.* 267, 16751–16754.
- Ransone, L.J., Dasgupta, A., 1988. A heat-sensitive inhibitor in poliovirus-infected cells which selectively blocks phosphorylation of the alpha subunit of eucaryotic initiation factor 2 by the double-stranded RNA-activated protein kinase. *J. Virol.* 62, 3551–3557.
- Redondo, N., 2012. Requerimiento de factores de iniciación de la traducción en mRNAs de picornavirus. Madrid.
- Redondo, N., Sanz, M.A., Welnowska, E., Carrasco, L., 2011. Translation without eIF2 promoted by poliovirus 2A protease. *PloS One* 6, e25699.
- Roberts, L.O., Seamons, R.A., Belsham, G.J., 1998. Recognition of picornavirus internal ribosome entry sites within cells; influence of cellular and viral proteins. *RNA N. Y. N* 4, 520–529.

- Robey, W.G., Safai, B., Oroszlan, S., Arthur, L.O., Gonda, M.A., Gallo, R.C., Fischinger, P.J., 1985. Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients. *Science* 228, 593–595.
- Rodríguez Pulido, M., Serrano, P., Sáiz, M., Martínez-Salas, E., 2007. Foot-and-mouth disease virus infection induces proteolytic cleavage of PTB, eIF3a,b, and PABP RNA-binding proteins. *Virology* 364, 466–474.
- Rogers, G.W., Komar, A.A., Merrick, W.C., 2002. eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72, 307–331.
- Ruest, L.-B., Marcotte, R., Wang, E., 2002. Peptide elongation factor eEF1A-2/S1 expression in cultured differentiated myotubes and its protective effect against caspase-3-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 5418–5425.
- Ruhl, M., Himmelsbach, M., Bahr, G.M., Hammerschmid, F., Jaksche, H., Wolff, B., Aschauer, H., Farrington, G.K., Probst, H., Bevec, D., 1993. Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *J. Cell Biol.* 123, 1309–1320.
- Ryabova, L.A., Pooggin, M.M., Hohn, T., 2006. Translation reinitiation and leaky scanning in plant viruses. *Virus Res.* 119, 52–62.
- Sambrook, J., Fritsher, E.R., Maniatis, T., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
- Sanz, M.A., 1998. Caracterización funcional de la proteína 6K de alfavirus. El virus Sindbis como vector de expresión. Tesis Doctoral: Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Sanz, M.A., Carrasco, L., 2001. Sindbis virus variant with a deletion in the 6K gene shows defects in glycoprotein processing and trafficking: lack of complementation by a wild-type 6K gene in trans. *J. Virol.* 75, 7778–7784.
- Sanz, M.A., Castelló, A., Ventoso, I., Berlanga, J.J., Carrasco, L., 2009. Dual mechanism for the translation of subgenomic mRNA from Sindbis virus in infected and uninfected cells. *PloS One* 4, e4772.
- Sanz, M.A., Welnowska, E., Redondo, N., Carrasco, L., 2010. Translation driven by picornavirus IRES is hampered from Sindbis virus replicons: rescue by poliovirus 2A protease. *J. Mol. Biol.* 402, 101–117.
- Scofield, V.L., Schlumpberger, J.M., West, L.A., Weissman, I.L., 1982. Protochordate allorecognition is controlled by a MHC-like gene system. *Nature* 295, 499–502.

- Seelamgari, A., Maddukuri, A., Berro, R., de la Fuente, C., Kehn, K., Deng, L., Dadgar, S., Bottazzi, M.E., Ghedin, E., Pumfery, A., Kashanchi, F., 2004. Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 9, 2388–2413.
- Shabman, R.S., Hoenen, T., Groseth, A., Jabado, O., Binning, J.M., Amarasinghe, G.K., Feldmann, H., Basler, C.F., 2013. An Upstream Open Reading Frame Modulates Ebola Virus Polymerase Translation and Virus Replication. *PLoS Pathog* 9, e1003147.
- Shamovsky, I., Ivannikov, M., Kandel, E.S., Gershon, D., Nudler, E., 2006. RNA-mediated response to heat shock in mammalian cells. *Nature* 440, 556–560.
- Simon, A.E., Miller, W.A., 2013. 3' cap-independent translation enhancers of plant viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 21–42.
- Sonenberg, N., Gingras, A.C., 1998. The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 268–275.
- Sonenberg, N., Hinnebusch, A.G., 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731–745.
- Soto-Rifo, R., Rubilar, P.S., Limousin, T., de Breyne, S., Décimo, D., Ohlmann, T., 2012. DEAD-box protein DDX3 associates with eIF4F to promote translation of selected mRNAs: Translation initiation mediated by DDX3. *EMBO J.* 31, 3745–3756.
- Straight, A.M., Oakley, K., Moores, R., Bauer, A.J., Patel, A., Tuttle, R.M., Jimeno, J., Francis, G.L., 2005. Aplidin reduces growth of anaplastic thyroid cancer xenografts and the expression of several angiogenic genes. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 57, 7–14.
- Suárez, Y., González-Santiago, L., Zarich, N., Dávalos, A., Aranda, J.F., Alonso, M.A., Lasunción, M.A., Rojas, J.M., Muñoz, A., 2006. Plitidepsin Cellular Binding and Rac1/JNK Pathway Activation Depend on Membrane Cholesterol Content. *Mol. Pharmacol.* 70, 1654–1663.
- Sweeney, T.R., Abaeva, I.S., Pestova, T.V., Hellen, C.U.T., 2014. The mechanism of translation initiation on Type 1 picornavirus IRESs. *EMBO J.* 33, 76–92.
- Tan, Z.-J., Chen, S.-J., 2011. Importance of diffuse metal ion binding to RNA. *Met. Ions Life Sci.* 9, 101–124.
- Tomlinson, V.A.L., Newbery, H.J., Wray, N.R., Jackson, J., Larionov, A., Miller, W.R., Dixon, J.M., Abbott, C.M., 2005. Translation elongation factor eEF1A2 is a

- potential oncoprotein that is overexpressed in two-thirds of breast tumours. *BMC Cancer* 5, 113.
- Ventoso, I., Blanco, R., Perales, C., Carrasco, L., 2001. HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12966–12971.
- Wek, R.C., Jiang, H.-Y., Anthony, T.G., 2006. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 7–11.
- Welnowska, E., Sanz, M.A., Redondo, N., Carrasco, L., 2011. Translation of viral mRNA without active eIF2: the case of picornaviruses. *PloS One* 6, e22230.
- White, J.P., Reineke, L.C., Lloyd, R.E., 2011. Poliovirus switches to an eIF2-independent mode of translation during infection. *J. Virol.* 85, 8884–8893.
- Xu, C., Hu, D., Zhu, Q., 2013. eEF1A2 promotes cell migration, invasion and metastasis in pancreatic cancer by upregulating MMP-9 expression through Akt activation. *Clin. Exp. Metastasis* 30, 933–944.
- Yang, S., Lu, M., Chen, Y., Meng, D., Sun, R., Yun, D., Zhao, Z., Lu, D., Li, Y., 2015. Overexpression of eukaryotic elongation factor 1 alpha-2 is associated with poorer prognosis in patients with gastric cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 141, 1265–1275.
- Ziegler, E., Borman, A.M., Deliat, F.G., Liebig, H.D., Jugovic, D., Kean, K.M., Skern, T., Kuechler, E., 1995a. Picornavirus 2A proteinase-mediated stimulation of internal initiation of translation is dependent on enzymatic activity and the cleavage products of cellular proteins. *Virology* 213, 549–557.
- Ziegler, E., Borman, A.M., Kirchwegger, R., Skern, T., Kean, K.M., 1995b. Foot-and-mouth disease virus 2A proteinase can stimulate rhinovirus and enterovirus IRES-driven translation and cleave several proteins of cellular and viral origin. *J. Virol.* 69, 3465–3474.

ANEXO



