
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA hCLE EN
LA EXPRESIÓN GÉNICA CELULAR.
IMPLICACIONES EN LA INFECCIÓN POR EL
VIRUS DE LA GRIPE**

TESIS DOCTORAL

ALICIA PÉREZ GONZÁLEZ
Madrid, 2007



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA hCLE EN
LA EXPRESIÓN GÉNICA CELULAR.
IMPLICACIONES EN LA INFECCIÓN POR EL
VIRUS DE LA GRIPE**

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada por
Alicia Pérez González
para optar al título de Doctor
Madrid, Junio 2007



El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), bajo la dirección de la Dra. Amelia Nieto Martín.

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias al disfrute de una Beca de Formación en Investigación del Fondo de Investigación Sanitaria, del Ministerio de Sanidad y Consumo.



A mis padres

A Luis



AGRADECIMIENTOS

Bueno, pues por fin ha llegado el momento de escribir la única parte de la tesis que todos os vais a leer....

La verdad es que llegado este punto, tengo muchísimo que agradecer a mucha gente. Gracias a todos vosotros, hacer esta tesis ha sido un lujo, por el trabajo, por la gente y por lo bien que lo he pasado. ¿Cómo era eso de que hacemos lo que nos gusta y encima nos pagan? Pues un poco esa es la sensación.

En orden cronológico, me gustaría agradecer al laboratorio de Isabel Correas porque allí di mis primeros pasos. A Carlos por enseñarme a trabajar con rigor y a Carmen por ser mi amiga. En el laboratorio de Miguel, gracias a Maica, Fernando, Jaime, Ali-2, Sergio y Juanfra, por el apoyo y los buenos ratos.

Cuando decidí venirme al CNB, todo fue fácil. Juan me recibió al momento, y me abrió la puerta del laboratorio sin pedirme ni el currículum!!! Además me tuvo de “ocupa” durante los tres primeros años en el 116, donde en seguida me sentí como en casa. Gracias Juan por mil cosas, por ejemplo por la confianza en mí, por el cariño desde el principio, por ser serio unas veces y no serio otras, por ser fan de mi guacamole.... Pero acabé trabajando con Amelia, que al minuto de conocerme ya me cogió del hombro y me llamó “chiquitina” y conectamos. Qué suerte, jefa, entendernos tan bien y tan pronto y casi no tener que negociar nada. Muchas gracias por hacerme el día a día tan agradable, por contar conmigo y por saber cuándo hablar de trabajo y cuándo no.

En estos años ha pasado mucha gente por el laboratorio, pero Yolanda es la que nos ve pasar a todos, gracias por ser tan profesional y a la vez tan amiga y tan “mari”. De la gente de los primeros tiempos, gracias a todos. Pablo con sus piropos, Eva con su mesa llena de capas de trastos, Estela con sus historias fantásticas, Ana, de la que aprendí que se puede ser a la vez una gran científica y una “maripuri”, y mi Patri, que nos entendíamos como si nos conociéramos de toda la vida. Al otro lado de la pared estaba Maite, gracias por compartir conmigo a hCE y muchas otras cosas, e Idoia, que sin ella esto no hubiera sido lo mismo. Luego llegó Iñigo, gracias por las veces que la montábamos “pardísima”, y un poco después Urtzi, que ha sido un ejemplo de trabajo y constancia. También llegaron Rocío y Alex. Roci, quién me iba a decir con lo distintas que somos, que luego seamos tan parecidas! Gracias por estar ahí, por venirme a ver por las mañanas... Alex nos revolucionó el laboratorio y dejó alguna frase memorable. Por aquella época también estaba Sandra, cuánto echaba de menos su Zamora natal!

Un día llegó “el argentino” que llevaba un año amenazando con venir, y nadie dábamos un duro. Era Ariel, y resulta que se convirtió en mi co-worker, con quien he compartido cinéticas, negociaciones con la jefa y madrugones. Gracias por hacerme de tu equipo y por ser un amigo.

Después llegó Tom, a quien no dimos elección de venir al laboratorio, después de su entrevista triunfal. Y luego Nuria, que con tanto darle al coco no te acuerdas de que vales mucho! Y Susana, qué suerte haber coincidido! Gracias por entenderme con mirarme, por las horas coca-cola light y por ser tan buena compañera de cuarto en los congresos. También adoptamos a Noe, tan todoterreno que da gusto tenerla cerca. En algún momento llegó Emilio, que ha traído de todo: buen humor,

recetas, un nuevo lenguaje que evoluciona al minuto y que, en resumen, es la alegría de la huerta. Gracias, che-pibe.

En los últimos años, ha llegado aún más gente con la que he compartido cosas. Roberto, tan callado, pero que luego es una caja de sorpresas, Merche, que me daba los buenos días con un achuchón, Patricia, que nos ha enseñado la tortilla de morcilla y que existe gente a la que le gusta la cristalografía, y Maite, que espero que nunca pierda las ganas de dar ideas. También Claudia, que se ha venido desde Alemania para trabajar con nosotros y Sara que es un terremoto y a la que espero conocer más. Gracias a Vero por estos meses que hemos compartido en los que me has enseñado a enseñar.

Gracias a la otra mitad del laboratorio 118, por saber estar cerca y disponibles, pero sin que se os eche de más. Os agradezco vuestro interés por la escritura de esta tesis.

A Silvia no sé dónde clasificarla, porque es compañera de carrera y amiga. Gracias porque estés como estés siempre tienes esa sonrisa para mí y porque eres incondicional. Además, lo bonita que haya podido quedar esta tesis, es en gran medida culpa tuya.

No me puedo olvidar de la gente que en el CNB nos facilita la vida, como Carlos, Jacinta y Pepa de cocinas, Socorro que nos lo tiene todo limpio y además nos trata como a sus hijos y demás gente que trabaja para que nuestra labor sea posible. Gracias en especial a Sylvia del confocal, que siempre está dispuesta a ayudar y a Silvia de proteómica por tener siempre un ratito para mis dudas.

A la gente de fuera del trabajo le debo mucho también, porque gracias a ellos tengo fuerzas y alegría para trabajar.

A mi amiga Bego, por estar para todo, a las duras y a las maduras, a Juanmi y Mari Ángeles, por tantísimos ratos y vacaciones y por compartir a Martina con nosotros.

A mi segunda familia, Maribel, José y Domi. Maribel por preguntarme siempre y por interesarse por lo que hago, además de quererme como a una hija. José y Domi, porque me habéis dado la oportunidad de volver a tener abuelos aunque los míos ya no estén. Gracias.

Gracias a mi familia, sobre todo a mi tía Meles y a Paloma, que me preguntan muy en serio, y a los demás por vuestro interés.

A mis hermanos Jorge y Javi, porque aunque no os cuente mis rollos sé que os importan. A Roci porque le gusta que le cuente “de mis celulitas” y porque cuando era pequeña quería ser de mayor “lióloga” como yo.

A mis padres, gracias por enseñarme a querer hacerlo todo lo mejor posible, a perseverar, a tomarme las cosas en serio... También por estar siempre pendientes de mis virus, de mis proteínas o de mis “papers”, muchísimas gracias. Por cierto, papá, al final no voy a ser médico, pero voy a ser doctora...

A Luis, no sé ni cómo darte las gracias. Has estado ahí desde antes de decidir que me quería dedicar a esto... así que eres mi compañero de viaje. Gracias por todo, pero sobre todo por quererme tanto, tal y como soy, y por hacerme reír.







ÍNDICE

ABREVIATURAS	19
SUMMARY	23
INTRODUCCIÓN	27
EL VIRUS DE LA GRIPE	27
1. HISTORIA	
2. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA	
3. LA PARTÍCULA VIRAL	
4. LOS RNAs VIRALES	
4.1. vRNAs o RNAs genómicos	
4.2. cRNAs o RNAs complementarios	
4.3. mRNAs o RNAs mensajeros	
5. LA RNP VIRAL	
5.1. La polimerasa	
PB1 es responsable de la actividad polimerizante	
PB2 es la proteína de unión a cap	
PA es responsable de la actividad proteolítica	
5.2. La nucleoproteína o NP	
EL CICLO DE INFECCIÓN VIRAL	33
1. ENTRADA DE LAS PARTÍCULAS VIRALES	
2. TRANSCRIPCIÓN Y REPLICACIÓN	
2.1. La transcripción	
2.2. La replicación	
3. PROCESAMIENTO DE RNAs Y SÍNTESIS DE PROTEÍNAS VIRALES	
4. FORMACIÓN Y SALIDA DE NUEVAS PARTÍCULAS VIRALES	
FACTORES CELULARES ASOCIADOS AL VIRUS DE LA GRIPE	35
1. FACTORES CELULARES QUE INTERACCIONAN CON EL VIRUS DE LA GRIPE AFECTANDO SUS FUNCIONES NUCLEARES	
1.1. Proteínas que forman parte de estructuras nucleares	
1.2. Factores implicados en transcripción celular	
1.3. Factores implicados en el tráfico entre núcleo y citosol	

2. FACTORES CELULARES QUE INTERVIENEN EN LAS ETAPAS CITOSÓLICAS DE LA INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE
 - 2.1. Factores implicados en traducción celular
 - 2.2. Proteínas con actividad chaperona
 - 2.3. Proteínas del citoesqueleto
 - 2.4. Proteínas con otras funciones

BÚSQUEDA DE FACTORES CELULARES QUE INTERACCIONARAN CON PA..... 38

LA TRANSCRIPCIÓN CELULAR 39

1. EL CTD DE LA RNAP II DESEMPEÑA UN PAPEL FUNDAMENTAL
2. EL PROBLEMA QUE SUPONE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA
 - 2.1. Remodelación de cromatina
 - 2.2. Desensamblaje y reensamblaje de histonas
3. ETAPAS DE LA TRANSCRIPCIÓN CELULAR
 - 3.1. Iniciación de la transcripción
 - 3.2. Elongación de la transcripción
 - 3.3. *Capping* del mRNA
 - 3.4. *Splicing*
 - 3.5. Poliadenilación
 - 3.6. Terminación de la transcripción
 - 3.7. Reciclaje
4. FACTORES QUE AFECTAN A LA ELONGACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

LA TRADUCCIÓN CELULAR 47

1. LA TRADUCCIÓN GENERAL
 - 1.1. Iniciación de la traducción
 - 1.2. Elongación de la traducción
 - 1.3. Terminación de la traducción
2. SÍNTESIS LOCALIZADA DE PROTEÍNAS

OBJETIVOS 51

MATERIALES Y MÉTODOS 55

MATERIALES BIOLÓGICOS 55

LÍNEAS CELULARES

BACTERIAS

VIRUS

PLÁSMIDOS

ANTICUERPOS

MÉTODOS 56

MANIPULACIÓN DE DNA Y CLONAJES 56

1. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pCDNA-3-hCLE-TAP

MANIPULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES 56

1. CRECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES
2. TRANSFECCIONES
3. INFECCIONES
4. AISLAMIENTO DE NÚCLEOS

5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES Y CITOSÓLICOS
 - 5.1. Extractos nucleares para ensayos de inmunoprecipitación
 - 5.2. Extractos nucleares y citosólicos para purificación de proteína hCLE-TAP

MANIPULACIÓN DE RNA 58

1. SÍNTESIS DE RNA
 - 1.1. Síntesis de RNA *in situ* y marcaje con anticuerpos
 - 1.2. Síntesis de RNA *in situ* y marcaje radiactivo
 - 1.3. Síntesis de RNA *in vitro* en núcleos aislados
2. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE RNA
 - 2.1. Aislamiento de RNA total celular para análisis por Northern blot
 - 2.2. Aislamiento de RNA total para análisis por *microarray*
3. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RNAs
 - 3.1. Northern blot
 - 3.2. *Microarray*
 - 3.3. RT-PCR semicuantitativa

PREPARACIÓN DE SONDAS PARA HIBRIDACIÓN 60

1. SONDAS DE RNA
 - 1.1. Molde para la ribsonda de hCLE
 - 1.2. Transcripción *in vitro* de la ribsonda de hCLE

MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS 61

1. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS
 - 1.1. Purificación de PB2-His y PB2-256-His
 - 1.2. Purificación de His-PA Δ 1-464
 - 1.3. Purificación de His-4GI157-550
2. TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS *IN VITRO*
3. INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A RESINAS DE NTA-Ni²⁺-AGAROSA
4. INTERACCIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD DE PROTEÍNAS PROVENIENTES DE EXTRACTOS CELULARES A RESINAS DE ANÁLOGOS DE CAP
5. COINMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS
 - 5.1. hCLE y PB2 en extractos nucleares
 - 5.2. hCLE y RNAP II en extractos nucleares
6. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA hCLE-TAP RECOMBINANTE
7. WESTERN BLOT
8. INMUNOFLUORESCENCIA
9. TINCIÓN DE GELES CON NITRATO DE PLATA
10. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

RESULTADOS 69

CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE hCLE CON LA POLIMERASA VIRAL 69

1. hCLE Y PB2 INTERACCIONAN *IN VIVO*
 - 1.1. hCLE se nucleariza en células que expresan PB2
 - 1.2. Las RNPs del virus colocalizan con la RNAP II en el núcleo de células infectadas
 - 1.3. hCLE colocaliza con las RNPs nucleares en células infectadas
 - 1.4. PB2 coinmunoprecipita con hCLE en extractos nucleares

- 1.5. PB2 copurifica con hCLE en cromatografías de afinidad con análogos de cap
2. hCLE Y PB2 INTERACCIONAN *IN VITRO*
 - 2.1. Interacción entre PB2-His y HA-hCLE mediante cromatografía de afinidad
 - 2.2. El tercio amino-terminal de PB2 es suficiente para interactuar con hCLE

CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN CELULAR DE hCLE 74

1. FUNCIÓN NUCLEAR DE hCLE 75
 - 1.1. hCLE colocaliza con los complejos de la RNAP II
 - 1.2. hCLE coimmunoprecipita con la subunidad mayor de la RNAP II
 - 1.3. hCLE está presente en sitios de transcripción activa
 - 1.4. La asociación entre hCLE y la RNAP II es independiente de la actividad transcripcional
 - 1.5. La transfección de la construcción pSUPER-hCLE induce el silenciamiento de la hCLE endógena
 - 1.6. La construcción pSUPER-hCLE también induce el silenciamiento de la proteína HA-hCLE sobreexpresada
 - 1.7. El silenciamiento de hCLE produce una importante disminución en la transcripción celular
 - 1.8. Efecto del silenciamiento de hCLE en la expresión génica global
 - 1.9. Estudio de las proteínas que se encuentran asociadas a hCLE en complejos nucleares
2. FUNCIÓN CITOSÓLICA DE hCLE 90
 - 2.1. hCLE proveniente de extractos citosólicos se retiene en resinas de análogos de cap
 - 2.2. Estudio de las proteínas que se encuentran asociadas a hCLE en complejos citosólicos

DISCUSIÓN 97

LA FUNCIÓN CELULAR DE hCLE CONECTA EL NÚCLEO Y EL CITOSOL 97

1. LA PROTEÍNA hCLE ESTÁ FUNCIONALMENTE ASOCIADA A LA RNA POLIMERASA II EN EL NÚCLEO
2. hCLE LLEVA A CABO SU FUNCIÓN ACOMPAÑADA DE OTRAS PROTEÍNAS
3. LA PROTEÍNA hCLE CITOSÓLICA FORMA PARTE DE GRÁNULOS DE TRANSPORTE DE RNA
4. hCLE PODRÍA SER UN COMPONENTE DE COMPLEJOS IMPLICADOS EN TRADUCCIÓN
5. hCLE SE ENCUENTRA FORMANDO RNPs QUE CONECTAN EL NÚCLEO CON EL CITOSOL

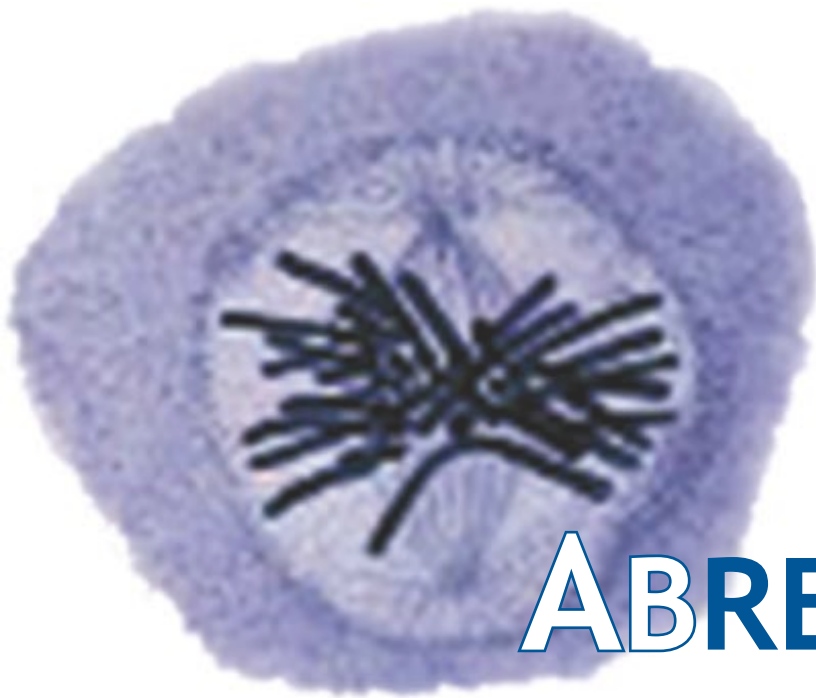
hCLE INTERACCIONA CON LA POLIMERASA DEL VIRUS DE LA GRIPE 104

1. hCLE PODRÍA FUNCIONAR COMO VÍNCULO ENTRE LA POLIMERASA VIRAL Y LA RNA POLIMERASA II CELULAR
2. LA INTERACCIÓN DE hCLE CON PB2 PUEDE SER IMPORTANTE PARA EL *CAP SNATCHING*
3. LA POLIMERASA VIRAL DEGRADA LA RNA POLIMERASA II A TIEMPOS TARDÍOS DE INFECCIÓN
4. hCLE PODRÍA ENCONTRARSE EN LOS COMPLEJOS DE TRADUCCIÓN DE LOS MENSAJEROS VIRALES

POSIBLE PAPEL DE hCLE EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE 107

CONCLUSIONES	111
BIBLIOGRAFÍA	113
ANEXO	135





ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS

A	Adenina		
ANT3	Translocador de nucleótidos de adenina 3	cRNA	corte y poliadenilación
ATP	Adenina-trifosfato	cRNP	RNA complementario
ATPasa	Enzima que hidroliza ATP	Cross-linking	Ribonucleoproteína viral que contiene cRNA
Backtracking	Marcha atrás en la transcripción mediante la cual la RNAP II rompe enlaces erróneos con su actividad exonucleasa	CstF	Entrecruzamiento
BrdU	Bromo-deoxiuridina	CTD	Factor de estimulación del corte
BrUTP	Bromo-uridina trifosfato	C-terminal	Dominio carboxilo terminal
BSA	Seroalbúmina bovina	CTP	Carboxilo terminal
C	Citosina	Cys	Citidina-trifosfato
CaMKII	Kinasa de calmodulina II	DDB1	Cisteína
Capping	Proceso de síntesis de la estructura cap de los mRNAs	DDX	Proteína de unión a DNA dañado-1
Cap snatching	Proceso mediante el cual la polimerasa viral roba los cap de los mensajeros celulares	DEPC	Proteína tipo DEAD box
CDK	Kinasa dependiente de ciclina	DFFA	Dietil pirocarbonato
cDNA	DNA codificante	Dgkα	Factor de fragmentación de DNA A
CHD	Familia de remodeladores de cromatina que contienen cromodominios	DMEM	Diacilglicerol kinasa α
CLASP2	<i>Cytoplasmic linker associated protein 2</i>	DNA	<i>Dulbecco modified Eagle medium</i>
CMV	Citomegalovirus	D.O.	Ácido desoxirribonucleico
cpm	Cuentas por minuto	DYNLRB1	Densidad óptica
CPSF	Factor de especificidad del	Ebp-1	Cadena ligera 2 ^a de la dineína
		eIF	Proteína de unión a Erb-B3, 1
		eRF	Factor de iniciación de la traducción de eucariotas
		FACT	Factor de liberación de la traducción de eucariotas
			<i>Facilitates chromatin transcription</i>

FBS	Suero fetal bovino	mRNA	RNA mensajero
Fold change	Parámetro no lineal utilizado para indicar cambios en la expresión de un gen	mRNP	Complejo de proteínas asociadas a un mRNA
G	Guanina	NA	Neuraminidasa
GAPDH	Gliceraldehído-fosfato deshidrogenasa	NELF	Factor negativo de elongación
GDP	Guanina-difosfato	NEP	Proteína de exportación nuclear
GMP	Guanina-monofosfato	NES	Señal de exportación nuclear
GRSF-1	Factor de secuencia rico en guanina-1	NLS	Señal de localización nuclear
GTFs	Factores generales de transcripción	NP	Nucleoproteína
GTP	Guanina-trifosfato	NPM	Nucleofosmina
H1	Histona 1	NS1	Proteína no estructural 1
H2A	Histona 2A	N-terminal	Amino terminal
H2B	Histona 2B	Nuclear bodies	Subestructuras nucleares que se encuentran en eucariotas superiores
H3	Histona 3	ORF	Fase abierta de lectura
H4	Histona 4	PA	Proteína ácida
HA	Hemaglutinina	PABP1	Proteína de unión a poli A-1
hCLE/CGI-99	Proteína celular objeto de estudio en esta tesis	Panhandle	Estructura en mango de sartén
HEK293T	Tipo celular de riñón embrionario humano que expresa el antígeno T del virus SV-40	PARP-1	Poli-adenil-ribosil polimerasa-1
HeLa	Tipo celular de cuello de útero humano	PB1	Proteína básica 1
HAT	Acetil-transferasa de histonas	PB2	Proteína básica 2
hMSC	Tipo celular de estroma mesenquimal humano	PBS	Tampón fosfato salino
hnRNP	Partículas ribonucleoproteicas heterogéneas nucleares	PFU	Unidad formadora de placa
hpi	Horas post infección	PIC	Complejo de preiniciación de la transcripción
HPRI	Inhibidor de RNAsa de placenta humana	PKR	Proteína kinasa activada por RNA de doble banda
HSP	Proteína de choque térmico	PML	Proteína de leucemia promielocítica
HYPK	Proteína K que interacciona con la Huntingtina	Poli A	Secuencia formada por varias adeninas
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido	PMSF	Phenylmethylsulphonyl fluoride
kb	Kilobases	PPlasa	Peptidil fosfoisomerasa
kDa	Kilodaltons	Pre-mRNA	Precursor del RNA mensajero
Lipid raft	Balsa lipídica	Promoter clearance	Evacuación del promotor
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight</i>	PSF/SFPQ	Factor de <i>splicing</i> asociado a PTB
MDCK	<i>Madin Darbey canine kidney</i> , tipo celular de riñón de perro	P-TEFb	Factor positivo de elongación de la transcripción
Mediator	Complejo adaptador de factores de transcripción que interviene en las etapas iniciales de la transcripción celular	RNA	Acido ribonucleico
Met	Metionina	RNAi	RNA interferente
Met-tRNA_{Met}	Metionil-tRNA iniciador	RNAP I	RNA polimerasa I
MHC7B	Cadena pesada de la miosina 7B	RNAP II	RNA polimerasa II
		RNAP IIA	RNA polimerasa II defosforilada
		RNAP IIO	RNA polimerasa II hiperfosforilada
		RNAP III	RNA polimerasa III
		RNP	Ribonucleoproteína
		Rpb1	Subunidad mayor del complejo de la RNAP II
		rpm	Revoluciones por minuto
		rRNA	RNA ribosómico
		RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa precedida de una

SAM	reacción de retrotranscripción		
SCAF	<i>Sterile alpha motif</i> Factor asociado al CTD similar a SR	UTP	la cadena molde del DNA que otra cosa
SCP	Fosfatasa del CTD pequeña	UTR	Uridina-trifosfato
SDS	Dodecil sulfato sódico	VDAC-1	Región no traducida
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS	Vic	Canal aniónico dependiente de voltaje-1
Ser	Serina	vRNA	Cepa A/Victoria/3/75
shRNA	Horquilla corta de RNA de doble cadena	vRNP	RNA genómico viral
Shut-off	Proceso por el cual se inhibe la expresión de los mRNAs celulares durante la infección viral	WSN	Ribonucleoproteína viral que contiene el vRNA
Shuttling protein	Proteína lanzadera	wt	Cepa A/WSN/33
Speckles	Estructuras subnucleares ricas en factores de <i>splicing</i>	yFACT	Tipo silvestre
Spliceosoma	Complejo macromolecular que contiene la maquinaria de <i>splicing</i>	μCi	FACT de levadura
Splicing	Procesamiento del pre-mRNA por el que se eliminan secuencias intrónicas por corte y empalme	μg	Microcurio
snRNA	RNA pequeño nuclear	μl	Microgramo
snRNPs	Partículas ribonucleoproteicas pequeñas nucleares		Microlitro
SR	Proteínas ricas en serina y arginina		
STAT5	Transductor de señales y activador de transcripción 5		
Surveillance	Control de calidad del RNA mensajero durante la transcripción		
TAP	Purificación por afinidad en tándem		
TBP	Proteína de unión a la TATA-box		
TGFBR1	Receptor β1 del factor transformante de crecimiento		
TLCK	Tosyl-L-lysine-chloromethyl ketone		
TPCK	Tosyl-L-phenilalanine chloromethyl ketone		
Transcript slippage	Proceso por el cual la RNAP II "patina" antes de elongar de manera procesiva		
Transcriptional arrest	Parada larga de la RNAP II tras superar el promotor		
tRNA	RNA de transferencia		
ts	Termosensible		
U	Uridina		
Upstream	Término relativo de lugar que indica que algo se encuentra más cercano al extremo 3' de		





SUMMARY

Influenza virus polymerase is an heterotrimeric complex consisting of three subunits PB1, PB2 and PA. In a previous search of cellular associated factors with a two-hybrid system using PA as bait, two proteins were identified: CHD6 and hCLE. hCLE shares sequence homology with the central region of the *Saccharomyces cerevisiae* protein Spt16 (Cdc68), which is a transcriptional coactivator essential in yeast. This prompted us to study the possible role of hCLE protein in cellular transcription. With this aim, we have carried out different assays, in which we show the physical interaction between hCLE and the RNA polymerase II (RNAP II) complex. Moreover, hCLE was found to be present in active sites of RNA synthesis carried out by RNAP II. In order to determine if hCLE was functionally important for cellular transcription, we silenced its expression by RNAi and carried out run-off experiments, in which we see a decrease of about 50% in RNAP II-mediated RNA synthesis in silenced cells. Microarray analysis of gene expression in hCLE silencing conditions shows a decrease in the expression of an important number of genes, belonging to different functional categories. Put together, these results indicate that hCLE is an important RNAP II transcriptional modulator, that it is rather general and that it could be considered as a novel transcription factor.

Recently, hCLE has been found as part of cytoplasmic mRNA transporting granules in neurons, in two independent studies using a proteomic

approach^{81, 155}. We have purified nuclear and cytoplasmic hCLE complexes with a recombinant hCLE-TAP protein, and the associated proteins have been identified by MALDI-TOF. Some of the identified proteins are common to the ones found in the previously mentioned studies (DDX1, HSP70, HSPC117, PSF/SFPQ, NonO) and in other known mRNA transporting granules^{38, 338} (RNA helicase A, myosin). Taken together, our results suggest that hCLE has an additional function taking part in this kind of ribonucleoparticles, and that it could be implicated in some way in the selection, transport and translation of the transported mRNAs.

Regarding the implication of hCLE in the influenza virus infection, here we show an additional interaction between hCLE and the PB2 subunit of the viral polymerase. PB2 is responsible for the recognition of cap structures in cellular mRNAs for the viral polymerase to scavenge cellular cap oligonucleotides, which it uses as primers for its transcription. Considering that hCLE is able to bind cap structures and that hCLE and PB2 co-purify in chromatography assays using cap analogs, hCLE could be the link between the viral polymerase and the cellular mRNAs synthesized by RNAP II. Additionally, since it seems that hCLE could travel to the cytoplasm together with mRNAs and other proteins mentioned above, it could play a role in the following events of viral gene expression.





INTRODUCCIÓN



EL VIRUS DE LA GRIPE

1 HISTORIA

La gripe es una enfermedad respiratoria aguda, altamente contagiosa, que ha afectado al ser humano desde tiempos inmemoriales. Existen documentos históricos en los que se hace referencia a la aparición repentina de enfermedades respiratorias que persisten durante días o semanas y desaparecen tan repentinamente como aparecieron. En el texto más antiguo, que data del año 412 a.C., Hipócrates describe una posible epidemia gripal ²³². Desde entonces se conocen numerosos episodios de gripe de distinta virulencia y repercusión en la población. Algunos de estos episodios han alcanzado el grado de pandemia, la más grave de las cuales sucedió en 1918, conocida también como Gripe Española, que causó entre 20 y 40 millones de muertos en todo el mundo.

El agente causal de esta enfermedad permaneció desconocido hasta principios de los años 1930, cuando Richard E. Shope sugirió que éste debía ser un virus, ya que podía transmitirse a través de filtros ³⁰¹. En 1933 Wilson Smith, Sir Christopher Andrews y Sir Patrick Laidlaw, del National Institute for Medical Research de Londres, realizaron el primer aislamiento de un virus de la gripe a partir de una persona infectada ³⁰⁸. Desde entonces hasta nuestros días han sido numerosísimos los esfuerzos realizados para profundizar en el entendimiento de la biología del virus y lograr un antiviral o vacuna eficaces contra el mismo. Todos estos trabajos han contribuido en mayor o menor medida al conocimiento de la enfermedad y de su agente etiológico.

La principal dificultad que presenta el control eficaz de la infección por el virus de la gripe, y que es la causa de su peculiar epidemiología, es la enorme capacidad de variación de los virus que causan la enfermedad, por lo que surgen continuamente nuevas variantes antigénicas capaces de eludir la respuesta inmune del hospedador. También es importante la capacidad del virus de salto "interespecie" desde el reservorio de gripe en aves. La gran variabilidad está asociada a sus características genéticas: tener un genoma segmentado y poseer 16 tipos de glicoproteínas de membrana HA y 9 tipos de NA, lo que le permite una modificación muy rápida, y a la ausencia de actividad correctora de errores de su polimerasa, que causa una alta tasa de mutación. Esto da lugar a epidemias anuales y pandemias mucho más graves cada varios años. Todos estos hechos hacen que tanto el estudio a nivel molecular como el control epidemiológico del virus sean de una gran importancia e interés.

2 CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA

El virus de la gripe pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, cuyo nombre hace referencia a su capacidad hemaglutinante o de unión a mucus (del griego *myxo*). Esta familia se caracteriza por ser virus con envuelta lipídica y poseer un genoma segmentado de moléculas de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa. El nombre del género se originó en el Renacimiento, ya que el hecho sorprendente de que la enfermedad afectara de forma indiscriminada a los distintos estamentos sociales hizo que este mal transitorio se atribuyera a la influencia (en italiano, *influenza*) de una conjunción de astros ³¹⁶.

La familia *Orthomyxoviridae* incluye varios géneros: *Influenzavirus A*, que infecta humanos, otros mamíferos y una gran variedad de aves; *influenzavirus B*, que únicamente infecta humanos; *influenzavirus C*, que infecta humanos, perros y cerdos; *Thogoto-like virus* que incluye los virus Thogoto y Dhori; y el género *Isavirus*, cuyo componente más importante es el virus de la anemia del salmón.

A lo largo de esta tesis se va a hacer referencia únicamente al género *influenzavirus A*, ya que es el que más severamente afecta a humanos y, por lo tanto, el que más se ha estudiado y mejor se conoce.

3 LA PARTÍCULA VIRAL

Los viriones presentan una morfología pleiomórfica y heterogénea aunque con tendencia a adquirir formas esféricas o filamentosas dependiendo de la cepa y el tipo de célula hospedadora ^{139, 141}. Su diámetro está comprendido entre 80 y 120 nm y poseen una envuelta lipídica derivada de la membrana plasmática de las células infectadas ⁵¹, en la que se insertan las glicoproteínas de membrana HA y NA y en menor número de moléculas, la proteína M2. La glicoproteína NA (neuraminidasa) forma un homotetrámero ^{49, 337} y presenta forma de bastón, mientras que la HA (hemaglutinina) forma un homotrímero ³⁴⁴ y su estructura termina en una forma globular. La proteína M2 está presente en forma de homotetrámero ¹³³ y forma canales iónicos ²⁶⁸ de gran importancia para la correcta infectividad de las partículas virales.

Bajo la envuelta se encuentra el armazón proteico del virus, compuesto principalmente por la proteína M1, a la que se asocia la proteína NEP ^{275, 354}, antes llamada NS2. M1 es la proteína más

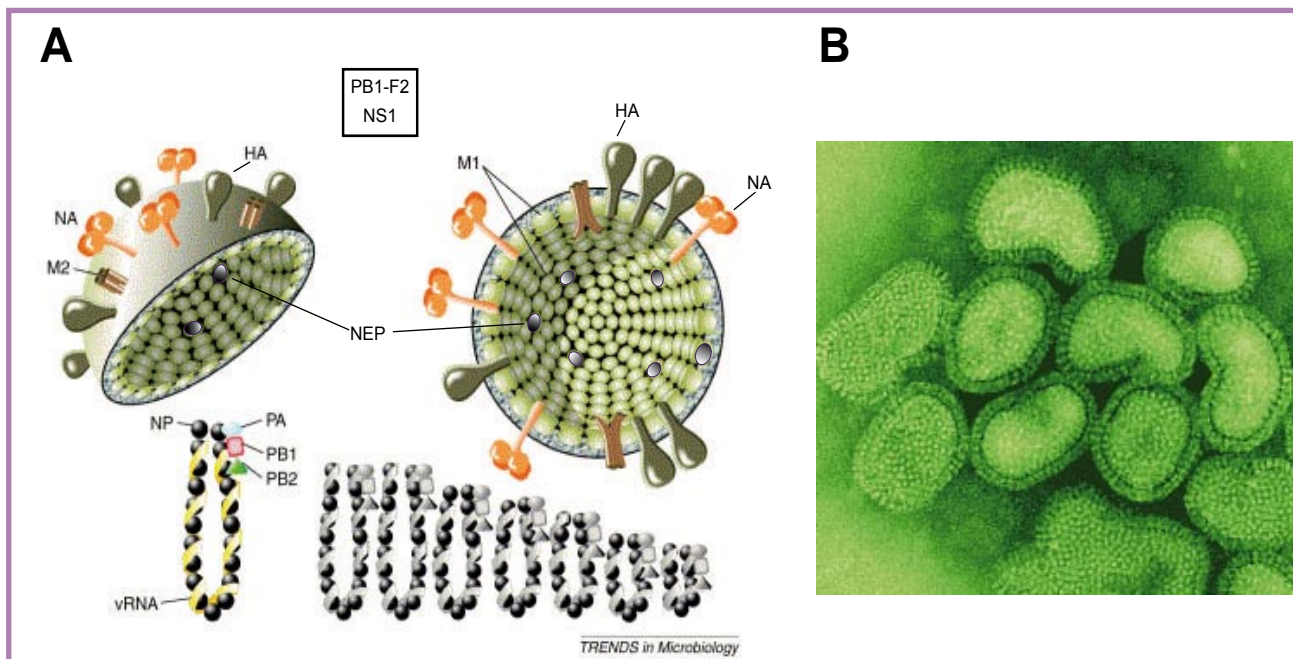


Figura 11. La partícula viral.

A. Representación de la partícula viral en la que se indican las proteínas estructurales del virus. Las proteínas no estructurales se muestran en un recuadro en la parte superior. Adaptado de Hatta et. al., 2002.
 B. Micrografía de viriones purificados obtenida por microscopía electrónica.

abundante en el virión y presenta interacción tanto con los tallos citoplásmicos de las proteínas de la envuelta como con las RNPs^{84 215 355}. La proteína NEP (*Nuclear Export Protein*) es la proteína estructural menos abundante en el virión y está implicada en la exportación de las RNPs al citoplasma²⁴⁵.

En el interior de la partícula viral se encuentra el genoma segmentado del virus compuesto por ocho ribonucleoproteínas (RNPs), que contienen un total de aproximadamente 13500 nucleótidos. Estas ocho moléculas de RNA genómico codifican once proteínas, gracias a mecanismos de procesamiento (*splicing*) alternativo de los segmentos 7 y 8^{188, 190} y a la utilización de una fase de lectura abierta (ORF) alternativa del mRNA del segmento 2⁵⁸. Las RNPs están compuestas por un segmento de RNA genómico superenrollado¹⁴² tapizado en toda su longitud por la nucleoproteína (NP)¹⁷² y un complejo de polimerasa viral, que tiene tres subunidades: PB1, PB2 y PA. En la estructura y función de las RNPs nos centraremos más adelante, en el apartado 1.5.

Hay dos proteínas no estructurales del virus y que, por tanto, no están presentes en la partícula viral. Estas dos proteínas son NS1 y PB1-F2. NS1 se sintetiza a partir del transcrito colineal del segmento 8 y se le atribuyen un gran número de funciones en distintas etapas de la infección, sobre todo relacionadas con la evasión de la respuesta inmune celular y con la regulación de procesos que llevan a optimizar la expresión de las proteínas virales. La proteína PB1-F2 se ha descubierto recientemente

y se sabe muy poco de ella. Se ha descrito su localización preferencial en las mitocondrias de la célula infectada y se le ha relacionado con procesos de apoptosis durante la infección^{58, 360, 361}. En la Figura 11 se muestra un esquema de la partícula viral.

4 LOS RNAs VIRALES

Durante la infección por el virus de la gripe, dentro de la célula infectada, se pueden encontrar tres tipos de RNAs virales distintos, todos ellos generados por el complejo de la polimerasa viral. En la Figura 12 se muestran en un esquema.

4.1. vRNAs o RNAs genómicos

Son los RNAs que proceden inicialmente de las RNPs parentales y también los que se encapsidan para dar lugar a las RNPs de la nueva progenie viral. Por lo tanto, es un RNA de cadena sencilla y polaridad negativa. Los extremos del vRNA son 5' -pppN y 3' -OH³⁵⁸ y cerca del extremo 5' tiene un tramo corto de entre 5 y 7 uridinas, que constituyen la señal de poliadenilación. Los 13 primeros nucleótidos del extremo 5' y los 12 últimos del extremo 3' son idénticos en todos los segmentos y permanecen invariables en todas las cepas de tipo A⁶⁹, excepto en la posición 4, en la que puede haber un cambio de uridina (U) a citosina (C). Estas

secuencias presentan complementariedad parcial e invertida ^{276, 304}, lo que les permite aparearse y formar una estructura de *panhandle* o mango de sartén, que conforma el promotor para los procesos de replicación y transcripción viral ¹⁴² y es la región del RNA a la que se une la polimerasa. El vRNA siempre se encuentra encapsidado por la proteína NP formando vRNPs.

El vRNA se genera durante la infección a partir de un molde de cRNA o RNA complementario mediante el proceso de replicación, para encapsidarse en las vRNPs y empaquetarse en los nuevos viriones.

en su extremo 3' que se genera como consecuencia de la copia reiterada por parte de la polimerasa de un tramo de uridinas cercano al extremo 5' del molde vRNA. En su extremo 5' presenta un oligonucleótido heterogéneo de entre 10 y 13 nucleótidos de longitud que presenta estructura cap tipo I (m⁷GpppN) procedente de pre-mRNAs celulares transcritos por la RNA polimerasa II celular ¹⁸⁵. Estos oligonucleótidos con estructura cap los "roba" la polimerasa viral gracias a su actividad endonucleolítica ^{73, 269} para

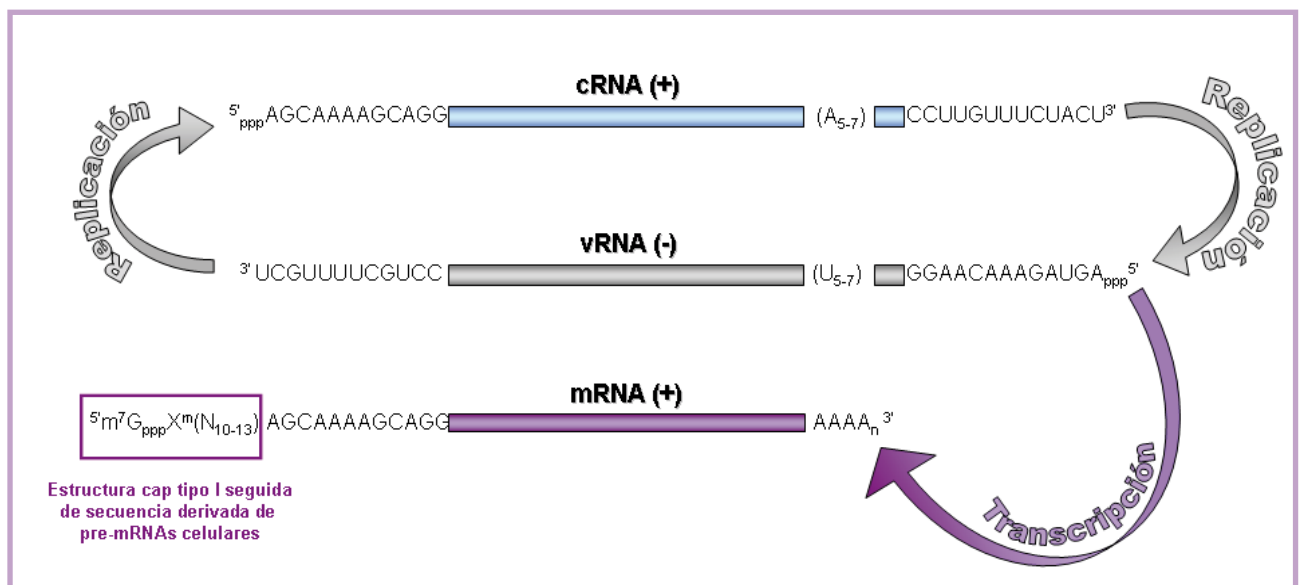


Figura I2. Tipos de RNA presentes en una célula infectada por el virus de la gripe.

Se representan esquemáticamente los tres tipos de moléculas de RNA viral que se pueden encontrar en una célula infectada: vRNA, cRNA y mRNA.

4.2. cRNAs o RNAs complementarios

Son una copia completa y de polaridad positiva del vRNA que se genera mediante el proceso de replicación. Los cRNAs son RNAs intermedios de la replicación viral, ya que se utilizan como molde para generar copias de vRNA que serán incorporadas a la progenie viral. Al igual que el vRNA, en todo momento se encuentra formando cRNPs, pero éstas nunca salen del núcleo de la célula infectada ²⁹⁷.

4.3. mRNAs o RNAs mensajeros

Son el producto de la transcripción del vRNA llevada a cabo por la polimerasa viral, y por lo tanto, de polaridad positiva. Son copias incompletas ya que carecen de la zona complementaria al extremo 5' del vRNA. En su lugar, poseen una cola de poli (A)

utilizarlos como cebadores en la transcripción. Debido a las modificaciones de ambos extremos, los mRNAs virales y celulares son estructuralmente indistinguibles.

5 LA RNP VIRAL

La forma activa en transcripción y replicación del genoma viral es la ribonucleoproteína (RNP), en la que cada segmento de vRNA o cRNA se encuentra individualmente encapsidado por la nucleoproteína (NP) y asociado a una copia de la RNA polimerasa RNA dependiente del virus formada por las subunidades PB1, PB2 y PA. Esta estructura de las RNPs ha sido confirmada por microscopía

electrónica ^{211, 252}. La proteína NP interacciona con el RNA viral de manera independiente de secuencia, y juega un papel esencial en el mantenimiento de la estructura de las RNPs, pero también interviene en la regulación de la replicación. La polimerasa es un complejo heterotrimérico que se une a la región del *panhandle* del vRNA o cRNA y presenta múltiples funciones, entre las que se incluyen las actividades de unión a estructuras cap, endonucleasa de RNA, RNA polimerasa y de poliadenilación ⁷⁸.

5.1. La polimerasa

La enzima responsable de la síntesis de RNA en el virus, tanto a través de la transcripción como de la replicación, es el complejo de la polimerasa viral. Este heterotrimero está compuesto por las subunidades PB1, PB2 y PA, que están codificadas por los tres segmentos mayores del genoma del virus.

En el heterotrimero, PB1 es la subunidad central ⁷⁰ a la que se unen PB2 y PA. Esfuerzos de muchos grupos en los últimos años se han dirigido al estudio de las regiones de cada subunidad implicadas en la formación del complejo, utilizando técnicas muy variadas, como análisis de doble-

híbrido y coimmunoprecipitación, ensayos de cromatografía de afinidad y de competición *in vivo* ^{28, 115, 247, 266, 271, 328, 366}. En conjunto, estos experimentos indican que la región N-terminal de PB1 interacciona con la región C-terminal de PA y con el C-terminal de PB2 y que la región C-terminal de PB1 interacciona con la región N-terminal de PB2. No se ha descrito interacción entre PB2 y PA por el momento. El mapa de interacciones entre las tres subunidades se muestra en la Figura I3A.

El conocimiento que se tiene acerca de la estructura de la polimerasa viral se debe a un modelo tridimensional obtenido por reconstrucción de imágenes de microscopía electrónica de la polimerasa que se encuentra formando RNPs ¹¹ (Figura I3B). A diferencia de la disposición aparentemente lineal que sugieren los datos bioquímicos de interacción, la estructura tridimensional es muy compacta y no permite la asignación de volúmenes a ninguna subunidad en concreto. La posición de dominios específicos de cada una de las tres proteínas se ha determinado por la reconstrucción tridimensional de RNPs a complejadas a anticuerpos monoclonales o con alguna etiqueta ¹¹ (Figura I3B). Estos datos indican que se encuentran expuestas la región N-

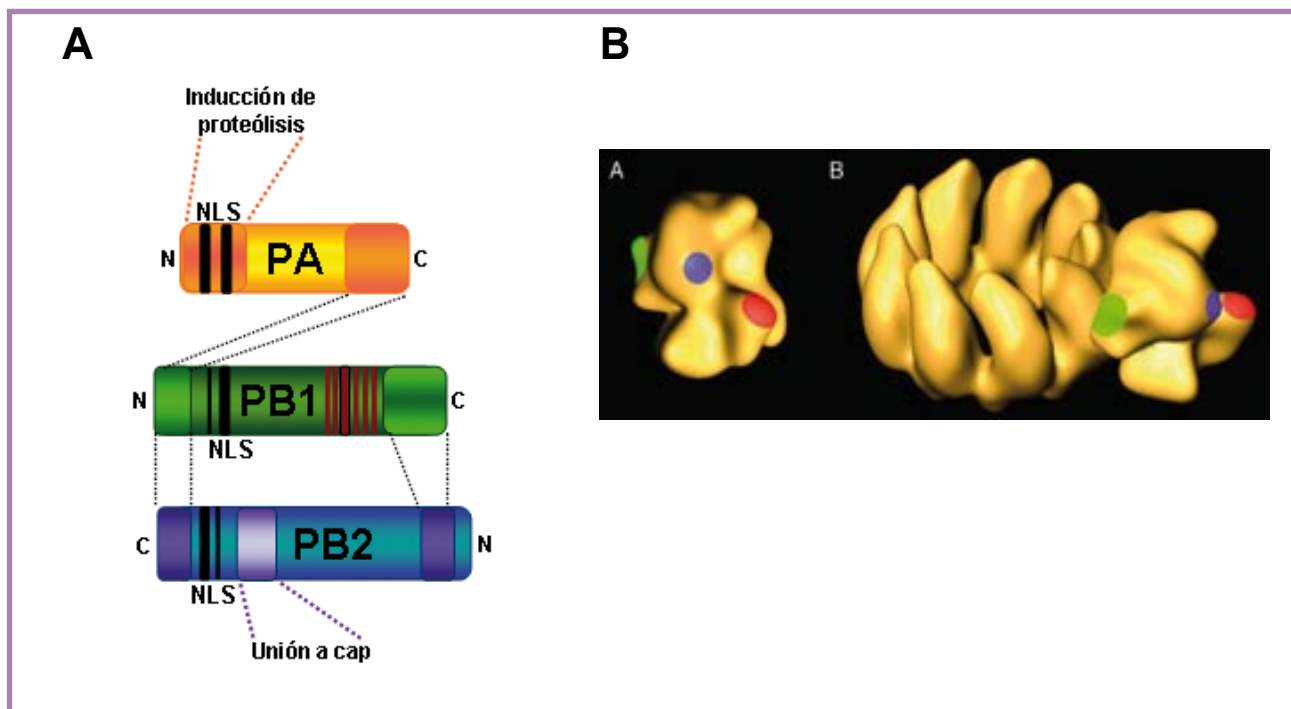


Figura I3. La polimerasa del virus de la gripe: esquema de sus subunidades y en el contexto de la RNP.

A. Representación esquemática de la polimerasa del virus de la gripe en la que se indican las regiones de interacción entre las subunidades mediante líneas punteadas y se muestran las señales de localización nuclear (NLS) de cada subunidad. Los motivos dentro de PB1 relacionados con su actividad polimerasa se muestran con líneas rojas.

B. Modelo tridimensional de la polimerasa viral aislada (izquierda) o en el contexto de la RNP (derecha). Las áreas coloreadas indican la localización de dominios específicos de las subunidades: rojo, región N-terminal de PB2; azul, región C-terminal de PA; verde, región C-terminal de PB1. Tomado de Area et. al., 2004.

terminal de PB2, la región C-terminal de PA y la región C-terminal de PB1.

En cuanto a la interacción de la polimerasa con el RNA viral, se sabe que reconoce los extremos apareados del *panhandle* gracias a un conjunto de interacciones en las que intervienen tanto la estructura como la secuencia. Esta interacción con los extremos del RNA ayuda al mantenimiento de la estructura de la RNP, ya que la disociación del complejo por tratamiento con detergente provoca la pérdida de la estructura de *panhandle* y hace que el RNA se linearice ¹⁷². Mediante experimentos de *cross-linking* con luz ultravioleta se ha demostrado el contacto directo de PB1 y PB2 con el extremo 3' del vRNA así como la unión de las tres subunidades al extremo 5' ^{95, 96} y ensayos *in vitro* han revelado las zonas de PB1 que están implicadas en la unión a vRNA y cRNA ^{113, 114}.

La función del complejo formado por PB1, PB2 y PA como RNA polimerasa RNA dependiente es llevar a cabo la transcripción y la replicación del RNA genómico viral. Experimentos de reconstitución de vRNPs y cRNPs activas *in vivo* a partir de cDNAs transfectados que expresan PB1, PB2 y PA indican que las tres subunidades son necesarias tanto para la transcripción como para la replicación, ya que la omisión de cualquiera de ellas elimina la actividad ²⁶². No obstante, experimentos *in vitro* muestran que PB1 aislada presenta cierta actividad polimerasa ^{175, 235}. También se ha descrito que PB1 junto con PB2 son suficientes para llevar a cabo transcripción *in vitro*, mientras que el dímero PB1-PA puede sintetizar RNA sin necesidad de un oligonucleótido cebador ¹³⁵. Sin embargo, la relevancia de dichas actividades en el contexto de la célula infectada está aun por aclarar. La naturaleza exacta de los complejos de polimerasa implicados en la síntesis de cada especie de RNA todavía se desconoce.

Durante la infección, las tres subunidades de la polimerasa se acumulan en el núcleo de la célula infectada, pero no se conoce bien el modo en el que se transportan, ya que se ha observado que PA se nucleariza con retraso respecto a PB1 y PB2 ^{4, 40, 242}. Cada una de las tres subunidades posee sus propias señales de localización nuclear y son capaces de transportarse al núcleo cuando se expresan de manera independiente ^{4, 152, 228, 237, 241, 307}. Por lo tanto, es posible que no entren al núcleo en forma de complejo, aunque será precisa una mejor caracterización para poder determinar el mecanismo de transporte al núcleo de la polimerasa.

A pesar de que las tres subunidades son necesarias para que el complejo sea activo tanto en replicación como en transcripción, se han asignado funciones específicas a cada una de las subunidades.

- **PB1 es responsable de la actividad polimerizante**

PB1 es la mayor de las dos proteínas básicas del complejo y es la polimerasa propiamente dicha ^{36, 333}. Actúa como núcleo del complejo, interaccionando de manera independiente con PB2 y PA ^{28, 70} y uniendo también NP ^{27, 217}. PB1 presenta homología de secuencia con otras DNA y RNA polimerasas y contiene cuatro motivos proteicos conservados en las RNA polimerasas dependientes de RNA ^{229, 270}. Mutagénesis de estas regiones en PB1 confirmaron que son necesarias para la actividad transcripcional ^{29, 196}. Ensayos de *cross-linking* de RNPs con sustratos marcados radiactivamente, mostraron que sólo PB1 resultaba marcada ^{12, 278}, sugiriendo que el sitio de unión al sustrato estaba localizado en esta subunidad. En conjunto, todos estos datos aportan fuertes evidencias de que PB1 es efectivamente responsable de la adición de nucleótidos durante la síntesis del RNA.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la polimerasa se une a los promotores constituidos por los extremos conservados de cada segmento de vRNA y cRNA de manera específica de secuencia ^{95, 113, 114, 195, 327} y los sitios de unión para los extremos 5' y 3' de las vRNPs y de las cRNPs se encuentran en PB1 ^{113, 114, 195}.

Además de la actividad polimerizante, se ha sugerido que PB1 también es la subunidad que contiene la actividad endonucleasa ¹⁹⁶, que permite el corte en el extremo 5' de los pre-mRNAs celulares para ser utilizados como iniciadores de la transcripción viral, y que antes se había atribuido a PB2. Los autores definen una región de PB1 como sitio activo y mediante ensayos de mutagénesis identifican tres aminoácidos ácidos que son esenciales para la actividad, que son análogos a otros pertenecientes a endonucleasas mejor caracterizadas ¹⁹⁶.

- **PB2 es la proteína de unión a cap**

La subunidad PB2 tiene un papel fundamental en la transcripción del mRNA, ya que es capaz de unir las estructuras cap metiladas en su extremo 5' de los pre-mRNAs de la célula hospedadora, para que sean posteriormente cortadas y utilizadas como cebadores para la síntesis de los mRNAs virales ^{30, 36, 299, 333}. PB2 se recluta al complejo de la polimerasa por interacciones proteína-proteína con la subunidad PB1 ^{70, 271} y también interacciona directamente con NP, pero no se ha descrito interacción con PA ^{27, 217, 271, 366}.

PB2 comparte una cierta homología de secuencia con proteínas celulares que reconocen y unen estructuras cap ^{67, 136, 196} y ensayos de *cross-linking* con luz ultravioleta utilizando RNAs con cap, muestran que se asocia a estas estructuras durante la iniciación de la transcripción del mRNA ^{36, 333}. De acuerdo con esto, se ha visto que análogos de 5'

cap fotoactivables se unen específicamente a PB2^{30 194, 261} y que algunos mutantes termosensibles (ts) de PB2 presentan defectos en el reconocimiento del cap *in vitro*³³². A pesar de que la presencia de PB2 es imprescindible para el reconocimiento del cap, las tres subunidades del complejo de la polimerasa son necesarias para llevar a cabo esta interacción^{31 34, 333}. Recientemente se ha descrito mediante ensayos de *cross-linking* con luz ultravioleta que PB1 es necesaria, además de PB2, para unir eficazmente oligonucleótidos con cap de más de cuatro nucleótidos de longitud. Estos datos sugieren que existe una estrecha cooperación entre PB1 y PB2 para la unión de estas estructuras⁹¹.

Numerosos estudios han pretendido determinar la región de PB2 implicada en su unión a cap, pero los resultados son controvertidos y no permiten extraer conclusiones claras. A pesar de estas dificultades, los diferentes datos están de acuerdo en que el mecanismo mediante el cual PB2 reconoce el cap podría implicar un dominio de "sándwich aromático", similar al que poseen otras proteínas de unión a cap⁴¹. También se sabe que es crítica la presencia de un grupo 2'-O-metilo en el cap, característico de las estructuras cap tipo I y II, ya que la ausencia de este grupo produce una drástica disminución en la interacción^{35, 42}. Diversos estudios han mostrado que la longitud del RNA con cap al que se une la polimerasa influye en la eficacia de la interacción, determinando que 4 nucleótidos es la longitud mínima para que se de la unión⁶², pero la eficiencia de dicha interacción aumenta sustancialmente si se utilizan oligonucleótidos con cap de entre 12 y 15 residuos^{62, 91}.

- **PA es responsable de la actividad proteolítica**

La subunidad PA es la peor caracterizada de las proteínas del complejo en cuanto a función. No se le ha podido atribuir un papel concreto ni en replicación ni en transcripción, aunque estudios con virus mutantes termosensibles (ts) sugirieron una implicación en replicación de vRNA²⁰⁸. Recientemente, otros estudios han relacionado la función de PA con transcripción⁹³.

PA interacciona con PB1 pero no con PB2⁷⁰. En el laboratorio mostramos que PA se fosforila *in vivo* en residuos de serina y treonina²⁸⁷ y se cree que la kinasa que lleva a cabo su fosforilación es la caseína kinasa II²⁸⁷. A lo largo de la secuencia aminoacídica de PA existen múltiples sitios potenciales de fosforilación por esta kinasa y al menos uno de ellos, T157, parece importante puesto que su mutación reduce el estado de fosforilación de la proteína²⁶³. No obstante, está por aclarar la relevancia de esta fosforilación para la función biológica de la proteína.

El fenotipo de algunos mutantes ts en el

segmento que codifica PA sugirieron la implicación de PA en la replicación del vRNA^{119, 183, 208, 227, 324}, no obstante trabajos recientes indican la importancia de PA tanto en replicación como en transcripción⁹³, e incluso en la elongación del RNA⁹⁴.

La función mejor caracterizada de PA es su actividad proteasa. El análisis de mutantes de delección en PA, mostró que presenta una actividad inductora de proteólisis generalizada *in vivo* que reside en el tercio N-terminal de la proteína²⁸⁸, mientras que posee una actividad serín proteasa detectada *in vitro* localizada entre la serina 624 y su extremo C-terminal¹²¹. En cuanto a la relevancia biológica de la actividad serín proteasa de PA, esta no parece vital para el desarrollo del ciclo de infección del virus^{93 329}. Los estudios realizados en nuestro laboratorio centrados en la actividad proteolítica de PA inducida por su región N-terminal²⁸⁸ mostraron que dicha actividad era relevante para la replicación llevada a cabo por la polimerasa^{143 263}.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, parece probable que las actividades proteolíticas centradas en el residuo 624 y en la región N-terminal sean diferentes. La actividad serín proteasa no parece tener importancia en la replicación del RNA ni en el crecimiento del virus, mientras que la actividad proteolítica inducida por el tercio N-terminal de PA parece relevante. No obstante, queda por demostrar si esta importancia está ligada a la actividad proteasa, a la fosforilación o a alguna función todavía no descrita de PA.

5.2. La nucleoproteína o NP

El cuarto componente proteico de las RNPs necesario para la síntesis del RNA es la NP o nucleoproteína, proteína muy básica que une RNA de cadena sencilla de manera independiente de secuencia^{22, 169, 292, 352}. A pesar de que la región imprescindible para la unión a RNA se mapeó en el tercio C-terminal de la proteína^{7, 174}, esta unión es de baja afinidad y se ha mostrado que aminoácidos repartidos por toda su secuencia son importantes para que esta unión sea óptima⁷⁹. La interacción de NP con el RNA es de una molécula de NP por entre 24 y 25 nucleótidos^{50, 252}, y es una unión que no protege al RNA de la degradación por RNAsas^{22, 74}, ya que la NP se une al esqueleto de azúcar-fosfato del RNA dejando las bases nitrogenadas expuestas²².

La proteína NP es capaz de oligomerizar consigo misma^{78, 284} y también interacciona con PB1 y PB2 dentro de las RNPs^{27, 217, 271} y con la proteína M1. La interacción de M1 con NP tiene importancia en el control de la transcripción llevada a cabo por las RNPs^{267, 367} y en su tráfico intracelular.

La proteína NP desempeña un papel esencial en la organización estructural de las RNPs y es necesaria para la transcripción y replicación del

genoma viral, ya que la polimerasa no es capaz de utilizar un RNA desnudo como molde ¹³⁸. Además, se ha implicado a la proteína NP como un posible

regulador del cambio de actividad de la polimerasa de transcriptasa a replicasa del genoma viral.

EL CICLO DE INFECCIÓN VIRAL

1 ENTRADA DE LAS PARTÍCULAS VIRALES

El virus de la gripe infecta principalmente células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior de vertebrados. La infección comienza con la adsorción de las partículas virales a su receptor celular, el ácido siálico ³⁴⁴, que es reconocido por la hemaglutinina presente en la envuelta del virión (Figura I4, 1). La entrada se da por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor y una vez formada la vesícula (Figura I4, 2), se fusiona con lisosomas, acidificándose su interior y dando lugar a endolisosomas (Figura I4, 3). El bajo pH de las vesículas llega al interior del virión gracias al canal iónico formado por la proteína M2 ^{126, 268}. El pH ácido produce en el virión una desestabilización de la interacción de las RNPs con la proteína M1 y un cambio conformacional en la hemaglutinina ^{314, 315}, que favorece la fusión de la envuelta del virión y la membrana endolisosomal ³⁰³. Todos estos eventos permiten la liberación de las RNPs al citoplasma (Figura I4, 4), desde donde se dirigen al núcleo ³³⁹, donde tienen lugar los procesos de transcripción y replicación del genoma viral.

2 TRANSCRIPCIÓN Y REPLICACIÓN

Tras la entrada de las RNPs al núcleo de la célula infectada, tiene lugar un primer paso de transcripción (Figura I4, 5), que se conoce como transcripción primaria y en el que se sintetizan cantidades similares de todos los mRNAs virales a partir de las vRNPs entrantes ²⁹⁷. Este paso no precisa la síntesis de nuevas proteínas virales, y los mRNAs generados en la transcripción primaria, al ser exportados al citosol (Figura I4, 6) y traducidos, darán lugar a las proteínas PB1, PB2, PA y NP (Figura I4, 7), que intervendrán a continuación en la replicación de los vRNAs. También las proteínas NS1, NEP y M1 recién sintetizadas entrarán al núcleo para desempeñar sus funciones nucleares (Figura I4, 7). En una primera ronda de replicación (Figura I4, 8) se producen cantidades equivalentes de los cRNAs de cada segmento, sin embargo la amplificación de los vRNAs a partir de estos moldes de cRNA ocurre de manera diferencial en cada segmento. Así, en la fase temprana de la infección, hasta aproximadamente 3 hpi, se sintetizan grandes cantidades de vRNA de

los genes NP y NS, mientras que en la fase tardía se amplifica predominantemente el vRNA de los genes M, NA y HA. La generación de los mRNAs a partir de estos vRNAs diferencialmente amplificados se da mediante la transcripción secundaria (Figura I4, 9), y se cree que su acumulación y la síntesis de las proteínas correspondientes son correlativas a la acumulación del vRNA del que proceden ^{125, 184, 306}.

A pesar de que todavía no se comprende completamente, los procesos de transcripción y replicación viral están mecanísticamente bien diferenciados, ya que son capaces de dar lugar a productos diferentes, llevándose ambos a cabo por la polimerasa viral y a partir del mismo molde de vRNA.

2.1. La transcripción

Para que tenga lugar la iniciación de la transcripción o síntesis de mRNA, es necesario que la polimerasa esté uniendo ambos extremos del vRNA molde. En este proceso se utilizan como cebadores fragmentos de RNA con estructura 5' cap derivados del corte endonucleolítico de los pre-mRNAs producidos por la RNA polimerasa II celular (RNAP II). Por este motivo, la transcripción viral requiere de una transcripción celular activa, y drogas que inhiben la RNAP II, como la α -amanitina o la actinomicina D ²⁸¹ inhiben también la transcripción viral.

El inicio de la transcripción requiere ATP, probablemente para que la polimerasa pueda realizar la transición entre la iniciación y la elongación de la transcripción ¹⁷¹. La elongación de los transcritos de mRNA continúa hasta que la polimerasa alcanza una secuencia corta, de entre 5 y 7 residuos de U situada a unos 15 nucleótidos del extremo del vRNA. La polimerasa copia reiteradamente esta secuencia, generándose una cola de poli A ^{272, 273}.

2.2. La replicación

El primer paso de la replicación consiste en la síntesis de moléculas de cRNA, que son copias completas y complementarias al vRNA. La replicación se da en ausencia de cebador, y además la síntesis no se detiene en la secuencia de uridinas, sino que continúa hasta el final del molde de vRNA, mediante un evento denominado *antiterminación* ¹²⁴. Por lo tanto, deben de ocurrir cambios en la polimerasa para que ésta cambie de actividad transcritiva a

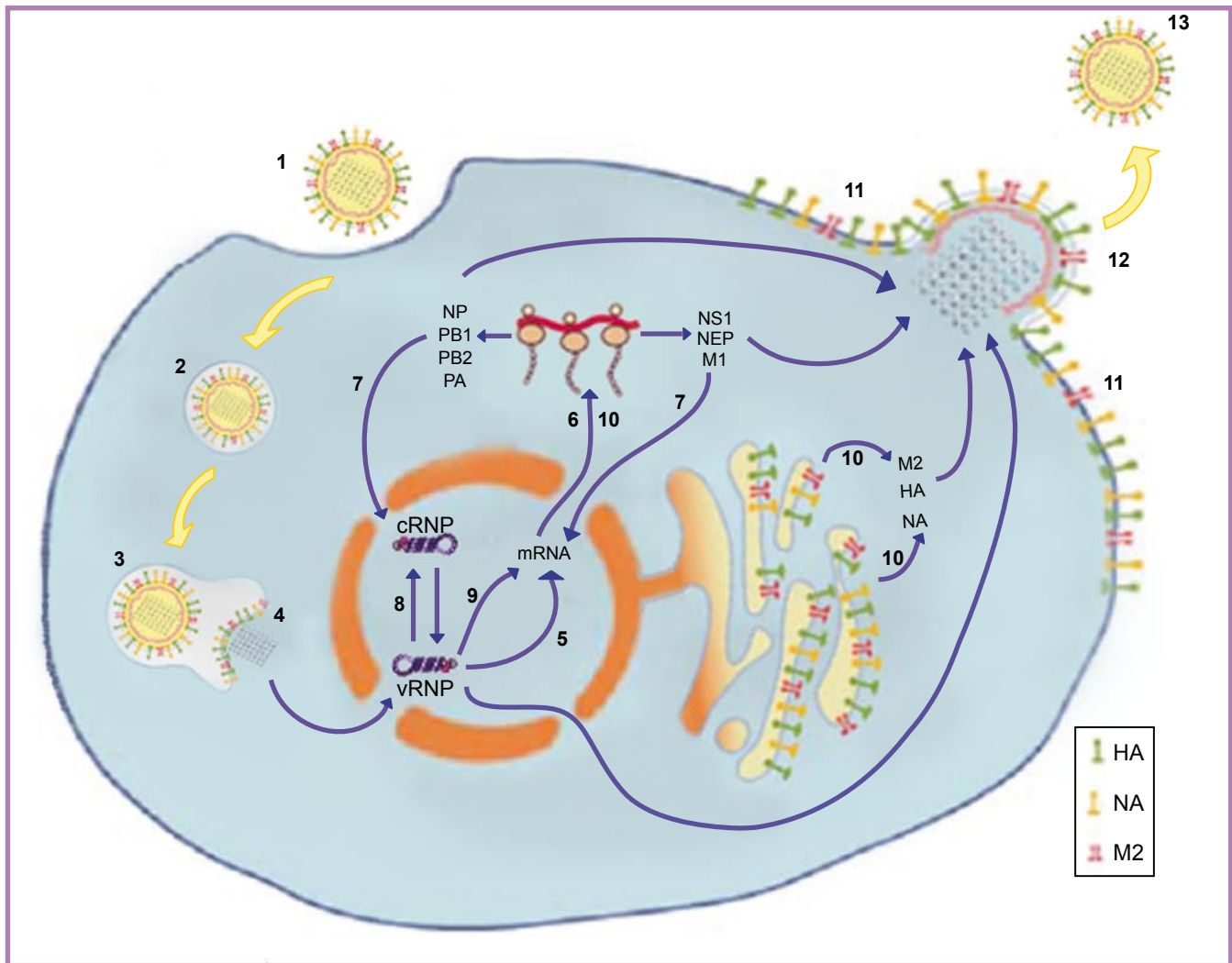


Figura 14. Esquema del ciclo infeccioso del virus de la gripe.

Representación de las principales fases del ciclo viral. 1. Las partículas infecciosas entran en contacto con la membrana celular a través del ácido siálico que es reconocido por la hemaglutinina. 2. La internalización se hace mediante endocitosis y se forma una vesícula. 3. El endosoma se fusiona con lisosomas y se acidifica. 4. El bajo pH provoca la liberación de las vRNPs al citosol. 5. Una vez en el núcleo, el vRNA sirve de molde para la síntesis de mRNA mediante la transcripción primaria. 6. Los mRNAs virales son transportados al citosol. 7. Se da un primer ciclo de traducción de proteínas virales, algunas de las cuales entran al núcleo para desempeñar sus funciones. 8. La presencia de NP, PB1, PB2 y PA en el núcleo es necesaria para que comience la replicación. 9. La transcripción secundaria da lugar a nuevos mRNAs virales. 10. Estos mRNAs son transportados al citosol y su traducción produce las proteínas virales que van a ser empaquetadas en los nuevos viriones, incluidas las glicoproteínas de membrana que se modifican post-traduccionalmente en el aparato de Golgi. 11. Las regiones de la membrana plasmática en las que ocurre el ensamblaje de los viriones se denominan *lipid rafts*, y en ellos se anclan las proteínas de membrana HA, NA y M2. 12. La salida de las partículas virales se da por gemación o *budding*. 13. Una vez liberadas las partículas, la proteína NA degrada los receptores celulares para permitir la dispersión de los nuevos virus. Adaptado de Pinto y Lamb, 2007.

replicativa, pero todavía no se conocen.

El cambio de transcripción a replicación requiere de la síntesis de proteínas virales^{18, 124}, en concreto se ha estudiado en detalle el requerimiento de moléculas de NP libre para que ocurra esta transición^{23, 183, 217, 293, 298}, aunque la presencia de la proteína NP no parece ser suficiente para esta regulación. No se descarta la implicación de la proteína PA en la regulación de la transición de una polimerasa activa en transcripción a activa en

replicación, y también existe la posibilidad de que factores celulares que interaccionan con las RNPs desempeñen un papel importante en este proceso.

3 PROCESAMIENTO DE RNAs Y SÍNTESIS DE PROTEÍNAS VIRALES

Los productos de transcripción colineales al vRNA de los segmentos M y NS codifican las

proteínas M1 y NS1 respectivamente. Estos transcritos pueden sufrir procesamiento alternativo o *splicing* ^{146, 147, 187, 189, 190} para dar lugar a los mRNAs que codifican las proteínas M2 y NEP. Es la maquinaria de *splicing* de la célula hospedadora la que elimina los intrones correspondientes en estos segmentos. En el segmento M existe un segundo sitio de *splicing* que genera el mRNA3, con una escasa capacidad codificante de sólo 9 aminoácidos, y cuyo producto de traducción no ha sido identificado por el momento.

El proceso de *splicing* se encuentra regulado de manera que la relación de acumulación de los mRNAs NS1/NEP y M1/M2 varía a lo largo de la infección, (revisado en ²⁵⁵). Se ha visto que la proteína NS1 interviene como reguladora en el *splicing* de los transcritos virales ^{105, 334}.

Los mRNAs virales son transportados al citosol de la célula infectada (Figura I4, 10), donde son traducidos para dar lugar a las proteínas del virus. La traducción la lleva a cabo la maquinaria celular, y parece que el virus toma el control traduccional estimulando la traducción de los mRNAs virales e inhibiendo la expresión de los mRNAs celulares, en un proceso conocido como *shut off* ^{107, 160, 184}. Se ha propuesto que en esta estimulación traduccional intervenga la proteína NS1, ya que se sabe que se une a la región 5' no codificante de los mRNAs virales ⁶⁶ e interacciona con los factores de traducción eIF4G1 ¹⁰ y PABP1 ⁴⁶.

4 FORMACIÓN Y SALIDA DE NUEVAS PARTÍCULAS VIRALES

En la fase tardía del ciclo de infección, entre 5 y 6 hpi, comienza la formación de nuevas partículas virales. Para ello, las vRNPs que van

a formar parte de la progenie viral y que han sido acumuladas en el núcleo deben ser transportadas al citosol a través del poro nuclear. En este proceso intervienen la proteína M1, que hace de puente entre las vRNPs y la proteína NEP ²¹², y la proteína NEP y la proteína NP presentes en las vRNPs, que interaccionan con componentes del poro nuclear ^{80, 245}. Una vez en el citoplasma, las vRNPs viajan a la membrana plasmática celular a través de microfilamentos de actina ¹³ y llegan a regiones concretas ricas en colesterol denominadas *lipid rafts* ⁸ en las que previamente se han anclado las proteínas HA y NA y en menor medida M2 (Figura I4, 11) ^{238, 290, 302}. Se ha propuesto que la proteína M1 es el principal organizador del ensamblaje de los nuevos viriones ^{111, 112}, aunque trabajos recientes también implican a M2 en este proceso ^{149 215}. Las partículas virales salen de la célula por gemación o *budding*, mecanismo mediante el cual el virus adquiere su envuelta lipídica en la que se encontraban ancladas las proteínas virales de membrana (Figura I4, 12). Por último, la proteína NA degrada los receptores de ácido siálico que el virus ha arrastrado de la membrana celular, lo cual evita que se agreguen y permite su dispersión (Figura I4, 13) ^{201, 256}.

El empaquetamiento del genoma viral requiere de la incorporación de al menos una vRNP de cada segmento para que los viriones resultantes sean infectivos. Existen numerosas evidencias que permiten la aceptación de un modelo de empaquetamiento dirigido que propone la selección de las 8 vRNPs que se incorporan a las nuevas partículas virales ^{75, 99, 101, 198, 231, 239, 243, 306, 342}. Todos estos resultados indican que el mecanismo de empaquetamiento selectivo de las 8 vRNPs vendría dirigido por señales en *cis* presentes tanto en las regiones no codificantes de los vRNAs como en las secuencias 3' y 5' codificantes adyacentes a ellas.

FACTORES CELULARES ASOCIADOS AL VIRUS DE LA GRIPE

Debido a la carencia de componentes para completar su ciclo vital de manera independiente, los virus son obligadamente dependientes de sus células hospedadoras. El virus de la gripe lleva a cabo numerosos procesos dentro de la célula infectada que implican poner a su servicio la maquinaria celular, y todo esto lo realiza de manera rápida y eficaz, gracias a lo cual puede propagarse mediante sucesivos ciclos de infección y competir con la resistencia que ofrece el individuo infectado. Para todo ello, necesita establecer interacciones con muchísimos factores celulares, de muy distinta naturaleza y función, de los cuales todavía se sabe

muy poco. Los primeros estudios que buscaron proteínas celulares que interaccionaran con el virus de la gripe, utilizaron técnicas de doble híbrido en levaduras o coimmunoprecipitaciones con anticuerpos específicos dirigidos contra un factor celular que se pensaba que podía interaccionar ^{71, 86, 144, 224, 339}. Recientemente se han empleado abordajes de tipo proteómico para identificar factores celulares asociados a las RNPs o a la polimerasa viral ²¹⁴.

A continuación se citan los factores conocidos hasta el momento que interaccionan con el virus de la gripe. La forma de clasificación utilizada pretende ser coherente con la línea que se

ha seguido en la escritura de esta tesis, en la que conceptualmente se han separado las funciones nucleares y citosólicas de la proteína en estudio. Esta separación es sólo formal, ya que cada vez existen más indicios de que las actividades de las proteínas están relacionadas y que pueden empezar en un compartimiento de la célula y mantenerse aunque su localización cambie.

1 FACTORES CELULARES QUE INTERACIONAN CON EL VIRUS DE LA GRIPE AFECTANDO SUS FUNCIONES NUCLEARES

El núcleo es el escenario de reacciones tan importantes para el virus como la replicación y la transcripción, y es también en el núcleo donde comienza a interferir con procesos celulares como el procesamiento de los pre-mRNAs y su exportación, que contribuyen al *shut off* celular producido por la infección.

1.1. Proteínas que forman parte de estructuras nucleares

Estudios provenientes de diferentes grupos han descrito interacciones de proteínas virales con estructuras nucleares, como los nucleolos, los *speckles* o los PMLs. Así, se ha visto que las proteínas M1, NS1 y NEP interaccionan con ND10/PMLs²⁸⁹, y NS1 con NS1-BP, que localiza junto con SC-35 en *speckles*³⁴⁹, aunque la utilidad de estas interacciones para el virus se desconoce. Recientemente se ha descrito la interacción de las RNPs con la proteína NPM (*nucleophosmin*)²¹⁴, que es una proteína de tipo *shuttling*, aunque con localización nucleolar, y con actividad chaperona, que podría participar en la correcta formación de las vRNPs.

1.2. Factores implicados en transcripción celular

En cuanto a factores celulares que puedan regular de alguna manera la síntesis de los RNAs virales, se han descrito proteínas que intervienen en procesos variados de la transcripción celular. Una interacción detectada recientemente, pero que con seguridad se demostrará como importante es la de la polimerasa viral con el dominio carboxilo-terminal (CTD) hiperfosforilado en Ser5 de la RNAP II⁸⁶. También se han descrito interacciones con proteínas relacionadas con la transcripción general, como PA con hCLE¹⁴⁴, PB1 con Ebp-1 (*Erb-B3 binding protein 1*)¹³⁷, la RNP con PARP-1 (*poly-adenyl-ribosyl-polymerase 1*) y DDB1 (*DNA-damage binding protein 1*)²¹⁴, y de la polimerasa con NXP-2 y DDX5 (resultados no publicados de Jorba y colaboradores), ambas implicadas en la activación y

represión de la transcripción en distintas situaciones^{21, 167, 280, 341}.

Algunos trabajos han mostrado interacciones de proteínas virales con la cromatina, como M1 con histonas^{106, 365}, y PA con CHD6, proteína perteneciente a una familia de remodeladores de cromatina¹⁴⁴ y de las RNPs, probablemente a través de NP, con el nucleosoma a través de las colas N-terminales de las histonas¹⁰⁶.

También se han descrito asociaciones del virus con la maquinaria de *splicing* celular, como la interacción entre NP y UAP56 (también llamada BAT1, NPI-5 o RAF2p48)²²³, entre NS1 y U6 snRNAs²⁰³, y las recientemente identificadas de la polimerasa con SFPQ/PSF, hnRNP M y hnRNP H1 (resultados no publicados de Jorba y colaboradores), implicadas en la formación del *spliceosoma* o en las etapas tempranas del *splicing*^{61, 154, 199, 202}. Algunas de las interacciones con la maquinaria de *splicing* celular podrían servir al virus para procesar sus propios pre-mRNAs, mientras que otras de estas interacciones podrían cumplir la función de bloquear el procesamiento de los pre-mRNAs celulares y contribuirían así al *shut off*.

El virus también establece interacciones con algunas proteínas implicadas en el corte y poliadenilación y en la exportación de los mRNAs, como NS1, que interacciona con la subunidad de 30 kDa del factor CPSF (*cleavage/polyadenylation specificity factor*)²⁴⁰ y con PABP-N1 (PAB-II)⁵⁹, inhibiendo la formación del extremo 3' de los mRNAs celulares.

1.3. Factores implicados en el tráfico entre núcleo y citosol

Algunas proteínas que se ha descrito que interaccionan con el virus tienen funciones relacionadas con la importación y exportación de factores al núcleo. Muchas de ellas son *shuttling proteins*, es decir, proteínas que tienen señales de localización nuclear (NLS) y de exportación nuclear (NES) en su secuencia, y cuya interacción con el virus podría intervenir en el tráfico de componentes virales a lo largo de la infección. Se han identificado la importina- α 1 (NPI-1)²⁴⁴ y la importina- α 2 (NPI-3)³³⁹ que interaccionan con NP, y que participan en el transporte al núcleo de las RNPs, la importina- β 3 (RanBP5) se ha visto que interacciona con PB1⁶⁸, y que interviene en su localización nuclear en los primeros estadios de la infección. También se han descrito interacciones de la RNP viral con estructuras de la periferia nuclear y componentes de la vía de exportación de CRM1, como la propia CRM1, importina- α , fibras de actina y proteínas Mx^{71, 80, 85, 207}, éstas últimas probablemente a través de NP^{177, 331, 343}. Recientemente, Jorba y colaboradores han identificado mediante técnicas de proteómica la interacción entre la polimerasa viral y la RNA

helicasa DDX3 (resultados no publicados), que está implicada en la vía de exportación de CRM1³⁵⁶, y se piensa que estos factores pueden participar en el transporte de los mRNAs virales al citoplasma para su traducción.

2 FACTORES CELULARES QUE INTERVIENEN EN LAS ETAPAS CITOSÓLICAS DE LA INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE

Las etapas de la infección que el virus de la gripe realiza en el citosol celular son de dos naturalezas muy distintas. Por una parte, se produce el desensamblaje de las partículas virales infectivas recién entradas en la célula al inicio del ciclo viral y el ensamblaje y empaquetamiento de los nuevos viriones al final de la infección. Por otra parte, es en el citosol donde se lleva a cabo de manera muy activa la traducción de los mRNAs del virus, para sintetizar la totalidad de las proteínas virales.

2.1. Factores implicados en traducción celular

Durante la infección por el virus de la gripe, se produce una fuerte inhibición de la síntesis de proteínas celulares, y una traducción selectiva de mRNAs virales. Se ha identificado la región 5' no traducida (5' UTR) de los mensajeros virales como importante para la ventaja traducional de estos mRNAs¹⁰⁸, y se ha descrito la interacción de estas secuencias con el autoantígeno La y con la proteína celular GRSF-1 (*G-rich sequence factor 1*). Mientras que no existen datos que permitan relacionar la interacción de La con ninguna función del virus, sí se ha visto que la unión de GRSF-1 aumenta la traducibilidad al menos del mRNA de NP²⁵⁸.

Otros factores relacionados con traducción que establecen interacciones con proteínas virales son PABP1 y eIF4G-I, que son capaces de unir NS1^{10,46}, estimulando la traducción de los mensajeros del virus, así como la proteína S3 de la subunidad 40S del ribosoma, que interacciona con la polimerasa viral (Jorba y colaboradores, resultados no publicados).

También se ha descrito la interacción de NS1 con Staufen²¹⁰, que es una proteína cuya actividad se relaciona con el transporte de mRNAs que van a sufrir traducción localizada, especialmente en células nerviosas.

La célula desarrolla mecanismos antivirales en respuesta a la infección, como la activación de la enzima PKR por RNA de doble banda, que reduce la capacidad traducional de la célula dificultando la síntesis de proteínas. El virus, a su vez, pone en marcha sus propios mecanismos para contrarrestar

la defensa de la célula. El factor viral más importante para este cometido es NS1, que interacciona directamente con PKR³²⁰ e impide que se una a su activador¹⁹⁷ y también es capaz de unir RNA de doble banda y así impedir la activación de PKR²⁰⁴.

2.2. Proteínas con actividad chaperona

Se han descrito interacciones entre proteínas virales y proteínas de la familia de las *heat shock proteins* (HSP), en concreto con HSP90, que interacciona con PB2 y PB1²²⁴ y HSP70, que lo hace con las RNPs a través de NP y posiblemente sea también capaz de unir PB1 y PB2¹²⁸. La interacción con HSP90 parece estar implicada en el transporte al núcleo de las subunidades de la polimerasa al comienzo de la infección²³⁴, mientras que se ha mostrado que HSP70 es capaz de inhibir la exportación de vRNPs al citosol a temperaturas elevadas, porque es capaz de disociar la unión entre las vRNPs y M1¹²⁸.

2.3. Proteínas del citoesqueleto

Los componentes que forman parte del virus necesitan dirigirse a diferentes localizaciones celulares a lo largo de la infección. Varios estudios han documentado interacciones de proteínas virales con componentes del citoesqueleto celular, y se piensa que estas interacciones pueden facilitar el transporte de proteínas y RNPs en distintos momentos del ciclo viral. Así, se ha descrito la interacción entre NP y filamentos de F-actina⁷¹, que participan en el tráfico de RNPs en el citosol. También se ha comunicado la interacción entre la β -tubulina y la polimerasa viral (Jorba y colaboradores, resultados no publicados), así como con la proteína PB1-F2³⁶⁰, pero por el momento no está claro en qué momento del ciclo de infección están implicadas.

2.4. Proteínas con otras funciones

Se ha descrito la interacción de NS1 con un factor celular llamado NS1-I³⁴⁸, que es el homólogo humano del precursor de la 17 β -estradiol deshidrogenasa porcina, y hasta el momento se desconoce de qué manera puede esta interacción participar en el ciclo de infección viral.

Recientemente se ha descrito la interacción de la proteína viral PB1-F2 con ANT3 (*adenine nucleotide translocator 3*) y VDAC-1 (*voltage-dependent anion channel 1*)³⁶⁰, dos componentes del complejo del poro mitocondrial, imprescindible para mantener el potencial de membrana en la mitocondria. Se piensa que a través de estas interacciones, el virus induce la permeabilización mitocondrial y así provoca la activación de la apoptosis celular.

BÚSQUEDA DE FACTORES CELULARES QUE INTERACCIONARAN CON PA

En nuestro laboratorio se han estudiado y caracterizado varios aspectos de la función de la subunidad PA de la polimerasa viral, y como parte de este estudio, se llevó a cabo un ensayo de doble híbrido en levaduras, con el objetivo de encontrar nuevos factores que pudieran interactuar con ella y posiblemente ejercer algún efecto en sus actividades. De esta búsqueda se aislaron dos clones: PAi1, que resultó ser la proteína CHD6 (antes conocida como CHD5)²⁹⁵, que pertenece a la familia CHD de remodeladores de cromatina dependientes de ATP y que podría estar implicada en transcripción²⁰⁶ y PAi13, que es la proteína hCLE/CGI-99, cuyo estudio es el objeto de esta tesis.

La proteína identificada como PAi13 compartía un alto grado de homología con la proteína CLE7 de *Gallus gallus*, por lo que se la llamó hCLE, y su secuencia coincidía con la publicada para el mRNA CGI-99¹⁸⁶. hCLE es una proteína de 244 aminoácidos, cuya secuencia es idéntica en un 81% a CLE7 de *Gallus gallus* (Figura 15A). Se estudió el tamaño y el grado de expresión de su mRNA y se comprobó que el tamaño de su mensajero procesado se correspondía con el descrito para CGI-99, y se expresaba en todos los tejidos analizados. En cuanto a su caracterización, se prepararon anticuerpos específicos y se mostró que presenta localización nuclear y citosólica y que en separaciones por SDS-PAGE se comporta como una proteína de 32

kDa. Se estudió la interacción entre hCLE y PA, y se demostró que ambas proteínas interactúan también *in vitro* y que los últimos 252 aminoácidos de PA son necesarios y suficientes para la interacción. Además, se vio que hCLE copurificaba con RNPs virales activas reconstituídas *in vivo*, lo cual sugiere una relevancia funcional de la interacción¹⁴⁴.

Con la intención de recabar información acerca de la función del factor celular hCLE, se realizaron comparaciones de secuencia y se encontró que hCLE presenta un 38% de homología con la región central de la proteína Spt16 (Cdc68) de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 15B), que es una proteína esencial en levadura implicada en la transactivación de muchos genes y en el mantenimiento de la represión mediada por la cromatina en ausencia de transactivadores⁸⁷. Spt16 se encuentra asociada a Pob3 formando el complejo CP³⁹ y existen homólogos suyos en muchas especies: DUF en *Xenopus laevis*²⁴⁸, Dre4 en *Drosophila melanogaster*³⁰⁵ y SPT16 en humanos²⁵¹. La proteína humana SPT16 también se asocia a otra proteína, SSRP1, que es homóloga a Pob3, y juntas forman el complejo homólogo a CP, denominado FACT (*facilitates chromatin transcription*). Todos los homólogos de Spt16 y los complejos que forman están implicados en diferentes aspectos de la transcripción celular, y fue este dato el que dio lugar a la hipótesis de que la función de

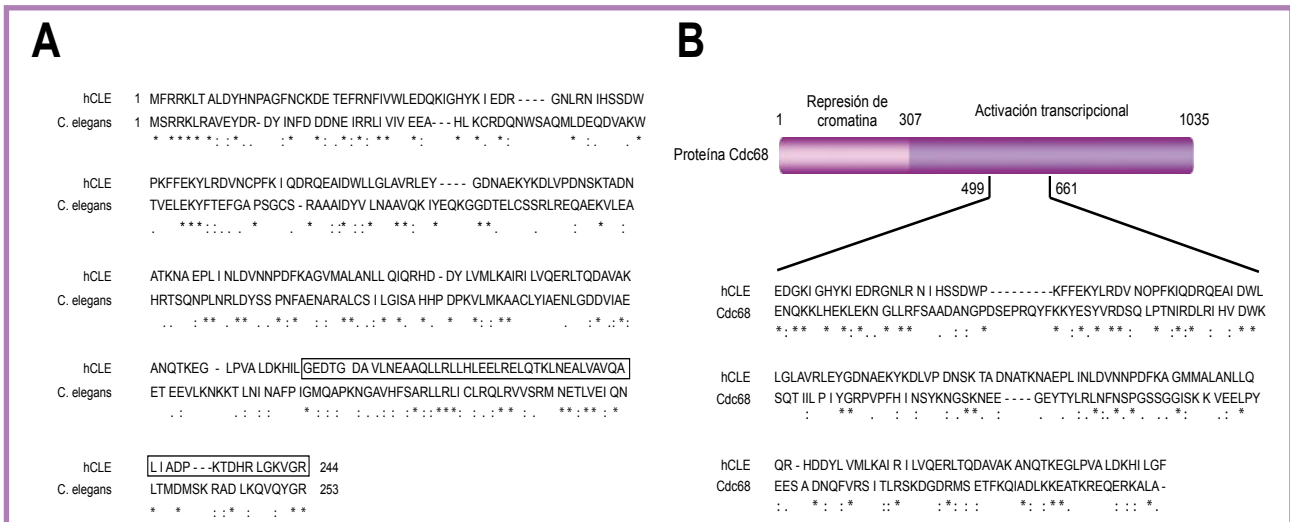


Figura 15. Comparación de la secuencia de hCLE con las secuencias de su ortólogo en *C. elegans* y de Cdc68 de *S. cerevisiae*.

A. Comparación de la secuencia de hCLE con la secuencia de su proteína ortóloga en *C. elegans*. La secuencia dentro del recuadro representa la parte de la proteína que interactúa con PA en el ensayo de doble híbrido.
 B. Representación esquemática de Cdc68 en la que se muestra la región que es homóloga a hCLE y la comparación de las secuencias de ambas proteínas. También se indica en Cdc68 la región implicada en represión de cromatina y la implicada en activación transcripcional.

hCLE pudiera estar relacionada de alguna manera con la transcripción.

Por otra parte y de manera totalmente independiente, trabajos de otros grupos que estudiaban la composición proteica de gránulos de transporte de mRNAs en células nerviosas, identificaron a hCLE/CGI-99 como factor integrante de estos macrocomplejos ^{81, 155}. No se conoce nada acerca de la función que puede desempeñar hCLE en estos gránulos, cuyo objetivo es el transporte de mRNAs a lugares concretos dentro de las células nerviosas para ser traducidos de manera localizada. Uno de los objetivos de esta tesis es arrojar algo de luz en este sentido.

Las diferentes funciones celulares con las que aparentemente está relacionada hCLE, además de su interacción física y funcional con la polimerasa del virus de la gripe, hacen del estudio funcional de hCLE un tema clave para profundizar en el estudio de los mecanismos de interacción entre el virus de la gripe y la célula infectada, que es lo que hemos pretendido abordar en la realización de esta tesis. Estos estudios nos han llevado a analizar aspectos de la célula huésped necesarios para la infección, como son los procesos de transcripción y traducción de los mRNAs celulares, por lo que describiremos a continuación algunas características de estos procesos.

LA TRANSCRIPCIÓN CELULAR

La síntesis de un RNA mensajero en el núcleo de una célula eucariota es una tarea inmensamente compleja. Cada paso del recorrido requiere un número enorme de factores proteicos, e identificarlos y dilucidar su funcionamiento ha supuesto un objetivo fundamental de la biología molecular en las últimas décadas. Basándose en ensayos *in vitro* que mostraban que cada una de

las etapas fundamentales, que son transcripción, *capping*, *splicing* y poliadenilación, podían llevarse a cabo de forma aislada, y porque intuitivamente cada una de estas reacciones parecía bastante distinta de las demás, se había supuesto que la maquinaria responsable de cada etapa era diferente y funcionaba esencialmente de manera independiente. Sin embargo, numerosos estudios en los últimos años

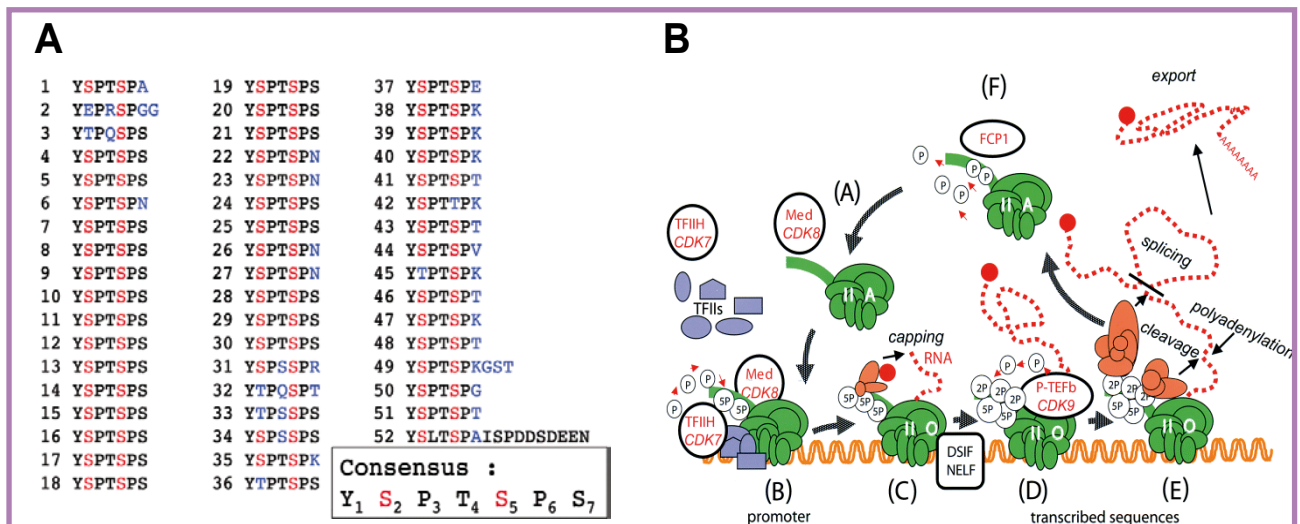


Figura 16. La transcripción celular.

A. Alineamiento de los 52 heptapéptidos que componen el dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mayor de la RNAP II humana. Se puede ver que la serina en posición 7 del heptapéptido no está conservada en la región C-terminal del CTD. Las serinas 2 y 5, los residuos preferentemente fosforilados, se muestran en rojo. Los aminoácidos no conservados se muestran en azul.

B. Representación esquemática de las etapas de la transcripción celular en la que se muestran los ciclos de fosforilación/defosforilación del CTD de la RNAP II y los principales factores que participan en cada fase. (A) Reciclaje. (B) Preiniciación. (C) Iniciación. (D) Elongación. (E) Procesamiento del RNA y terminación de la transcripción. (F) Defosforilación del CTD para su posterior reciclaje.

A y B se tomaron de Palancade y Bensaude, 2003.

han aportado evidencias suficientes que indican que este no es el caso. Avances recientes en el campo de la regulación de la expresión génica indican que la transcripción está acoplada al procesamiento del mRNA, al “control de calidad” o *surveillance* del RNA y a su exportación, y la RNAP II aparece como un elemento integrador de todos estos procesos.

1 EL CTD DE LA RNAP II DESEMPEÑA UN PAPEL FUNDAMENTAL

La subunidad mayor de la RNA polimerasa II (RNAPII) es la proteína Rpb1 y posee un dominio único, sin relación con otras regiones de proteínas conocidas, en su extremo carboxilo, denominado CTD (*carboxy-terminal domain*). El CTD consta de múltiples repeticiones de un heptapéptido evolutivamente conservado cuya secuencia consenso es Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. El número de repeticiones varía entre los distintos organismos, desde 26-27 en levaduras hasta 52 en mamíferos (Figura 16A). Existe una degeneración significativa en algunas posiciones del CTD, siendo en mamíferos más aparente en las repeticiones más cercanas al extremo carboxilo. El CTD interacciona físicamente con un enorme número de proteínas y puede actuar de plataforma para la unión de factores necesarios en distintas etapas de la maduración del mRNA que tienen lugar asociadas a la elongación de la transcripción. EL CTD podría reclutar estos factores de manera que se unieran a héptadas específicas, lo cual implicaría un “código” en la secuencia degenerada de sus repeticiones ⁴⁴.

El CTD es rico en aminoácidos susceptibles de ser fosforilados, y está sujeto a fosforilación y defosforilación a lo largo del ciclo de transcripción. La RNAP II cuyo CTD está defosforilado se denomina RNAP IIA, y se encuentra incluida en el complejo de preiniciación formado en el promotor, mientras que la RNAP II hiperfosforilada en su CTD se denomina RNAP IIO y se asocia a complejos de iniciación y elongación. Otras modificaciones que puede sufrir el CTD son glicosilaciones e isomerización cis-trans de las prolinas ²¹⁸.

La resolución de la estructura cristalográfica de la RNAP II ha aportado gran detalle al entendimiento de cuál es la estructura de una RNAP II catalíticamente activa y ha revelado aspectos importantes acerca de su función ^{161, 350}. Se ha visto que existe una gran homología entre las RNA polimerasas eucariotas y de bacterias en su estructura global ⁷⁷, sugiriendo un mecanismo evolutivamente conservado de síntesis de RNA durante la transcripción.

2 EL PROBLEMA QUE SUPONE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA

La necesidad de compactar aproximadamente dos metros de DNA en el núcleo de una célula eucariota conlleva serias consecuencias para los procesos que requieren el acceso al DNA. Este empaquetamiento se consigue mediante la unión de proteínas que intervienen en sucesivos órdenes de plegamiento del DNA: dos copias del heterodímero de histonas H2A/H2B y un tetrámero compuesto por las histonas H3 y H4 forman un núcleo proteico en el que se enrollan 147 pares de bases de DNA para formar un nucleosoma ¹⁷⁹. Con la ayuda de la histona H1 y proteínas adicionales, los nucleosomas se compactan aún más para dar lugar a la cromatina, una estructura altamente ordenada que es inaccesible a las proteínas de unión a DNA ³³⁶ (Figura 17A). El desempaquetamiento de la cromatina para facilitar la accesibilidad al DNA se ha estudiado sobre todo para la transcripción de genes que codifican proteínas, llevada a cabo por la RNAP II. Este proceso tiene la particularidad de que requiere un acceso rápido a ciertos genes para poder responder a señales ambientales y sucesos celulares programados.

La célula debe alcanzar un compromiso entre ser capaz de llegar a la información genética codificada en el DNA y preservar esta información lo más intacta posible. La compactación del DNA y su protección son dos propiedades esenciales de la cromatina, y el desmantelamiento de esta estructura por las DNA o RNA polimerasas debe ser contrarrestado. Las propias histonas contienen información relevante para la expresión génica en forma de modificaciones covalentes post-transcripcionales. Junto con la metilación del DNA, la metilación de las lisinas de las histonas supone la base de la identidad celular y la especificidad de los tipos celulares. El deterioro de este sistema de información grabado en la cromatina, también llamado “código de histonas”, acarrearía consecuencias muy negativas. Por lo tanto, debe emplearse un sistema que mantenga la estructura de la cromatina mientras que permite la transcripción del DNA.

Como es de imaginar, ocurre un conflicto cuando la RNAP II tropieza con un nucleosoma durante la transcripción, y muchos grupos han estudiado la suerte que corren estos nucleosomas ^{57, 150, 170, 317}. La RNA polimerasa II altamente procesiva necesita elongar transcribiendo secuencias incluidas en los nucleosomas, que bloquean su paso. Esfuerzos conjuntos de varios grupos han aportado datos que indican la existencia de mecanismos que desalojan total o parcialmente los nucleosomas situados delante de la RNAP II que elonga y de otros mecanismos que coordinan el posterior

reemplazo de estos nucleosomas (Figura I7B). Para facilitar la transcripción, los nucleosomas pueden desensamblarse parcialmente o desplazarse del camino de la RNAP II, o se pueden alterar sus propiedades por la modificación covalente de las histonas que los componen. Las modificaciones de histonas que pueden afectar a la transcripción incluyen la acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación. La modificación de histonas puede cambiar las propiedades físicas y químicas de la cromatina, alterar la capacidad de otros factores de acceder a la cromatina e influenciar el reclutamiento de factores a los genes. La localización dentro del gen de las modificaciones de histonas está sujeta a una estrecha regulación, ya que ejerce un efecto crucial en la transcripción. La mayoría de las histonas modificadas se encuentran en la región activadora no codificante cercana al promotor, y en los extremos tanto 5' como 3' de las regiones codificantes de los genes ¹⁹².

2.1. Remodelación de la cromatina

Se entiende por remodeladores de cromatina aquellos factores o complejos que

modifican de alguna manera la estructura de la cromatina mediante reacciones dependientes de la hidrólisis de ATP. Se conocen cuatro familias principales de remodeladores de cromatina, y tienen en común que presentan un dominio ATPasa muy conservado, mientras que difieren en el resto de sus características. Las familias son: ISWI, SNF2, CHD e INO80/SWR ²⁰⁵. Los remodeladores de cromatina pueden cambiar nucleosomas de sitio en *trans*, transfiriéndolos a una molécula diferente de DNA, o en *cis*, deslizándolos dentro de la misma molécula de DNA.

2.2. Desensamblaje y reensamblaje de histonas

Se han relacionado principalmente dos factores con el desensamblaje y reensamblaje de las histonas: FACT (*facilitates chromatin transcription*), compuesto por SPT16 y SSRP1 (Spt16 y Pob3 en levaduras) y SPT6. Bioquímicamente, ambos factores actúan como chaperonas de histonas. SPT6 colocaliza con la RNAP II implicada en elongación ^{123, 157}, interacciona directamente con histonas, preferentemente con H3, y se ha visto que puede

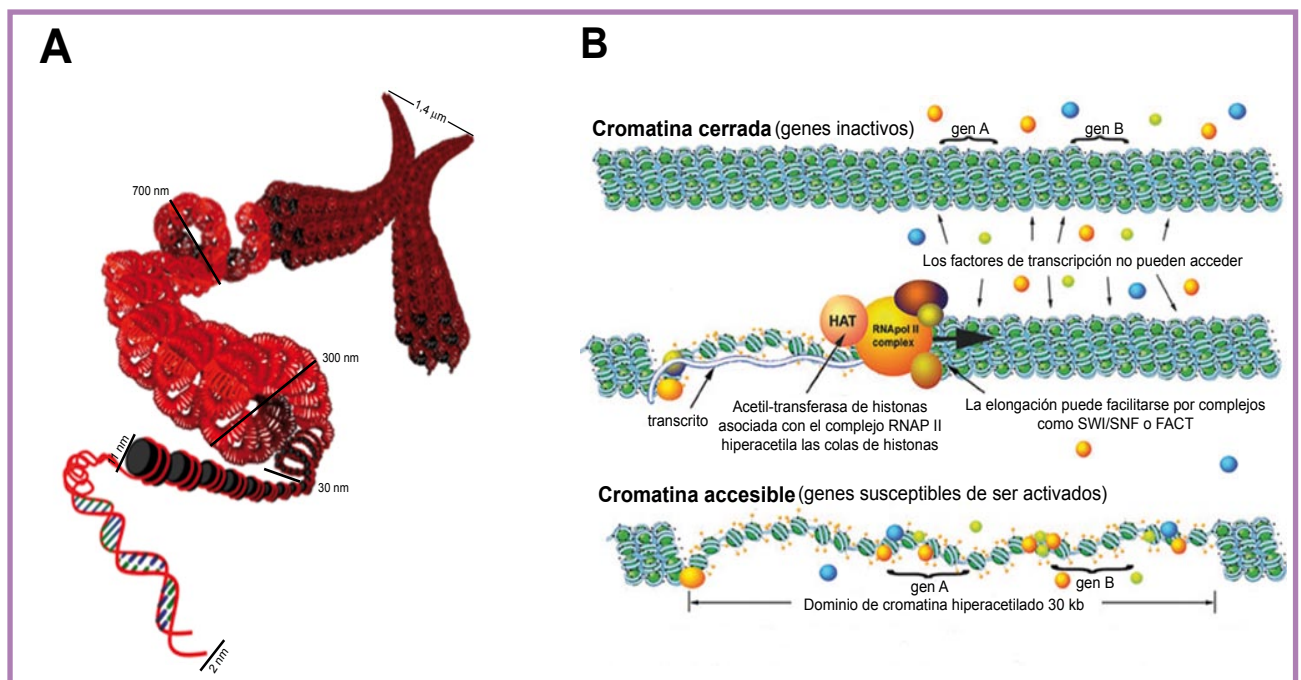


Figura I7. La cromatina.

A. Representación esquemática de los sucesivos órdenes de plegamiento que sufre el DNA para empaquetarse en los cromosomas. La hebra de 11 nm de grosor corresponde a los nucleosomas engarzados en el DNA en forma de "collar de cuentas". El siguiente nivel de compactación es la hebra de 30nm, en el que intervienen la histona H1 y otras proteínas. Las hebras de 300 nm y 700 nm corresponden a una cromátida de un cromosoma en forma extendida o condensada, respectivamente. Un cromosoma metafásico completo tiene un grosor de 1,4 μm. Adaptado de la página web del Max Planck Institute for Dynamics and Self-Organization.

B. Representación de la cromatina en su forma inaccesible a la maquinaria de transcripción y de los cambios necesarios que permiten la unión de los factores de transcripción y del paso del complejo de la RNA polimerasa II. Adaptado de la página web de Peter Glazer lab, Yale University School of Medicine.

ensamblar nucleosomas *in vitro*³³. FACT estimula la elongación de la transcripción a través de los nucleosomas e interacciona con los dímeros H2A/H2B²⁵¹. Se ha descrito que esta función de FACT tiene lugar retirando un dímero H2A/H2B, lo cual desestabiliza al nucleosoma durante el paso de la RNAP II²⁵.

El reensamblaje de los nucleosomas tras el paso de la RNAP II es esencial para que se mantenga la fidelidad de la iniciación de la transcripción, y tanto SPT6 como FACT son importantes evitando que ocurran iniciaciones aberrantes desde promotores crípticos^{156, 213}.

Estudios recientes han identificado a Asf1 como un nuevo factor implicado en el desensamblaje y reensamblaje de histonas a lo largo de la elongación de la transcripción²⁹⁶.

3 ETAPAS DE LA TRANSCRIPCIÓN CELULAR

3.1. Iniciación de la transcripción

El ciclo de la transcripción comienza con la unión de activadores a la región *upstream* del promotor básico. Este suceso desencadena el reclutamiento de los complejos adaptadores, como SAGA¹¹⁷ o *mediator*, que a su vez facilitan la unión de los factores de transcripción generales, o GTFs (TFIID, TFIIB, TFIIE, TFIIIF y TFIIH) y otros cofactores^{249, 326}. La RNAP IIA se posiciona en el promotor principal mediante la participación de TFIID, TFIIA y TFIIB, para dar lugar a la forma cerrada del complejo de preiniciación (PIC, *Preinitiation Complex*) (Figura I6B(B)). TFIIH tiene una subunidad con actividad helicasa de DNA dependiente de ATP que, con la participación de TFIIE, es capaz de desenrollar entre 11 y 15 pares de bases del DNA para poder introducir el molde de cadena sencilla en el centro activo de la RNAP II, formando así la forma abierta del complejo y dando lugar al comienzo de la síntesis del RNA (Figura I6B(C))^{116, 134, 165}. El CTD de la RNAPII es fosforilado por la subunidad CDK7 de TFIIH y por CDK8 del complejo *mediator* en las Ser5 del heptapéptido repetido, durante la transcripción de los primeros 30 nucleótidos, y pierde así las interacciones con los GTFs antes de proceder a la fase de elongación. Mientras tanto, el CTD fosforilado comienza a reclutar los factores que van a participar en la elongación y en el procesamiento del mRNA.

3.2. Elongación de la transcripción

Durante años se había considerado la elongación de la transcripción como la simple adición de nucleótidos a la cadena creciente del mRNA. Ahora resulta evidente que se trata de una

etapa dinámica y altamente regulada del ciclo de transcripción, capaz de coordinar eventos venideros dentro del proceso de la síntesis del mRNA maduro. Muchos pasos en la maduración del mRNA, incluidos *capping*, *splicing*, procesamiento del extremo 3', "control de calidad" o *surveillance* y exportación, se modulan mediante interacciones con el complejo de elongación de la transcripción. A diferencia de los factores de iniciación, los factores de elongación se unen a la maquinaria de transcripción a través de interacciones directas o indirectas con el CTD de la RNAP II⁴⁴.

El CTD sufre una fosforilación adicional en las Ser2 en la etapa de elongación llevada a cabo por CDK9, que forma parte del complejo P-TEFb junto con la ciclina T (Figura I6B(D)).

3.3. Capping del mRNA

La estructura cap que se encuentra en el extremo 5' de todos los mRNAs eucariotas se forma muy poco después de la iniciación de la transcripción, cuando las cadenas nacientes de mRNA tienen una longitud de entre 25 y 30 nucleótidos^{52, 153}.

Datos aportados por estudios estructurales muestran que una vez que el RNA naciente tiene una longitud de aproximadamente 18 nucleótidos, se hace accesible a la maquinaria de procesamiento. Estas observaciones son coherentes con el acoplamiento del *capping* a las etapas tempranas de la transcripción^{63, 161}.

Posteriormente a la iniciación, los complejos DSIF (formado por SPT4 y SPT5) y NELF (*Negative Elongation Factor*) inducen el *transcriptional arrest*, permitiendo el reclutamiento de la maquinaria de *capping* por parte de la RNAP II fosforilada en Ser5^{200, 259, 260, 345}. El factor P-TEFb (*Positive Transcription Elongation Factor*) actúa entonces para liberar a la RNAP II de los efectos de DSIF y NELF, fosforilando a estos dos factores negativos y también la Ser2 del CTD^{102, 351} gracias a su subunidad CDK9. Se ha visto que la fosfatasa FCP1 es necesaria para que la maquinaria de *capping* pueda abandonar el complejo de transcripción una vez finalizada su función²⁹⁴. La actividad de TFIIIS también es importante para que la RNAP II supere esta pausa, ya que estimula la actividad exonucleasa de la RNAP II, que rompe los enlaces erróneos que dan lugar a alineamientos incorrectos entre el mRNA y el molde en un proceso llamado *backtracking*¹. Superada la pausa, se da la transición a la elongación productiva, y NELF se libera del complejo de elongación mientras que DSIF permanece unido, pudiendo ejercer alguna función posterior en transcripción¹²³.

3.4. Splicing

El *splicing* de los precursores del mRNA tiene lugar en un gran complejo macromolecular denominado *spliceosoma*, compuesto por snRNPs

(*small nuclear ribonucleoprotein particles*) y proteínas que no son de esta categoría, incluidas algunas de la familia de proteínas ricas en serina/arginina (SR)^{180, 209, 225}.

De la misma manera que se ha visto con el *capping*, trabajos recientes han sugerido que el *splicing* ocurre cotranscripcionalmente. Estudios *in vitro* e *in vivo* han apoyado la existencia de interacciones funcionales entre el CTD de la RNAP II y la maquinaria de *splicing*. La forma hiperfosforilada, RNAP IIO, se ha encontrado asociada a factores de *splicing* y está presente en *spliceosomas* activos^{55, 164, 226, 359}. Estos y otros trabajos más recientes¹³¹, no sólo aportan evidencias de que la RNAP II controla la distribución espacial de los factores de procesamiento del pre-mRNA y acopla el procesamiento a la transcripción, sino que ésta interacciona directamente con factores de *splicing* para que éste tenga lugar de manera más eficaz. Más aun, estos estudios también sugieren que el diferente estado de fosforilación del CTD puede tener un papel significativo en la regulación del *splicing*.

Se han descrito proteínas con diferentes características cuya función parece ser la de acoplar la transcripción con el *splicing*. Se pueden dividir en dos familias principales: las SCAFs (SR-like CTD-associated factors) y las proteínas relacionadas con el factor TLS/FUS, que incluyen a EWS y TAF_{II}68.

3.5. Poliadenilación

La poliadenilación del mRNA tiene lugar en dos etapas: el corte endonucleolítico del pre-mRNA y la adición de poliadeninas al extremo 3' del mRNA cortado (Figura 16B(E)). La poliadenilación del mRNA requiere múltiples factores proteicos, siendo los principales en mamíferos el factor CPSF (*cleavage/polyadenylation specificity factor*), el CstF (*cleavage stimulation factor*), dos factores de corte, CFI y CFII, y la poli(A) polimerasa^{48, 364}. Inesperadamente, varios estudios coinciden^{65, 216} en que al menos algunos factores de procesamiento del mRNA, como es el caso de CPSF, se reclutan al complejo de transcripción desde el promotor y viajan acoplados a él desde la iniciación hasta después del corte y poliadenilación.

En la correcta formación del extremo 3' del mRNA participa el factor Pin1, que es una proteína del tipo PPIasa (peptidil fosfoisomerasa). Pin1 se une con gran afinidad al CTD de la forma hiperfosforilada RNAP IIO⁶, y parece que induce cambios conformacionales en el CTD fosforilado que aumentan la eficiencia de la formación del extremo 3'.

3.6. Terminación de la transcripción

La terminación del mRNA es un proceso distinto del corte y la poliadenilación, y supone la

liberación del producto de la transcripción. Se ha descrito que la RNAP II puede continuar transcribiendo hasta 2 kb después del paso de corte, aunque se sabe que tanto el corte como una correcta señal de poliadenilación son necesarios para que tenga lugar la terminación²⁷⁴. No se conoce el mecanismo preciso que sigue la RNAP II en esta etapa, y se ha propuesto que la polimerasa es modificada de alguna manera cuando pasa la señal de poliadenilación, y esto hace que sea menos procesiva y, como consecuencia, más propensa a terminar¹³⁰. A pesar de que posiblemente intervengan numerosos factores en esta etapa, sólo se ha descrito un factor específico de terminación, TTF2¹⁵¹. Además, algunos estudios relacionan la actividad isomerasa de Pin1 con cambios conformacionales en el CTD necesarios para la terminación.

3.7. Reciclaje

A fin de que la RNAP II pueda volver a transcribir, es necesario su reciclaje (Figura 16B(F)) a la forma hipofosforilada RNAP IIA, capaz de interactuar con las secuencias cercanas al promotor y así poder reiniciar un nuevo ciclo de transcripción (Figura 16B(A)). Este reciclaje lo llevan a cabo diversas fosfatasas. Se ha descrito que la fosfatasa FCP1 defosforila las Ser2⁶⁰ del CTD, y hasta recientemente era la única actividad fosfatasa conocida para el reciclaje de la RNAP II. Ahora se conocen fosfatasas específicas de la Ser5, como son las SCPs (*small CTD phosphatases*) y SSU72^{104, 219, 357}. Las SCPs conservan un alto grado de homología con FCP1 en sus dominios catalíticos y, al igual que FCP1, están reguladas por TFIIF³⁵⁷. SSU72 presenta interacciones genéticas con TFIIB y se asocia con subunidades de la maquinaria de procesamiento del extremo 3'^{110, 318}. Se piensa que FCP1 defosforila las Ser2 del CTD, y SSU72 hará lo mismo con las Ser5 a medida que la RNAP II alcanza el final del gen. Las SCPs podrían tener un papel en la transición de iniciación a elongación, defosforilando Ser5 en una manera dependiente de regulación por TFIIF.

4 FACTORES QUE AFECTAN A LA ELONGACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

Los numerosísimos factores que intervienen en la elongación de la transcripción se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios. La clasificación aquí expuesta (Tabla I1) sólo pretende citarlos de una manera ordenada, pretendiendo ser coherentes con la estructuración que se ha hecho de la transcripción y de los procesos que implican a la cromatina. No se han mencionado aquí los factores de iniciación ni los específicos de procesamiento

Nombre del factor	Subunidades que lo componen	Complejo en que se encuentra	Función que desempeña
<u>Factores generales (GTFs)</u>			
TFIIA		PIC	Posiciona a RNAP II en el promotor
TFIID		PIC	Posiciona a RNAP II en el promotor
TFIIB		PIC	Posiciona a RNAP II en el promotor
TFIIH		PIC	1. Actividad helicasa que desenrolla el DNA para que pueda entrar el complejo de RNAP II 2. Su subunidad CDK7 fosforila el CTD en Ser5
TFIIE		PIC	Ayuda a la función 1 de TFIIH
<u>Factores de elongación activos: Modifican la actividad catalítica de la RNAP II</u>			
TFIIF	RAP30, RAP74	PIC	1. Estimula elongación 2. Modula TFIIIS
Elongina A (familia Elonginas)			Aumentan la procesividad
Elongina B (familia Elonginas)			Aumentan la procesividad
Elongina C (familia Elonginas)			Aumentan la procesividad
EAP 20 (familia ELL)			Aumentan la procesividad
EAP 30 (familia ELL)			Aumentan la procesividad
EAP 45 (familia ELL)			Aumentan la procesividad
DSIF	SPT4, SPT5		1. Estimula el <i>capping</i> 2. Suprime la terminación temprana

Nombre del factor	Subunidades que lo componen	Complejo en que se encuentra	Función que desempeña
NELF	NELF-A, NELF-B, NELF-C NELF-D, NELF-E		Induce parada de la RNAP II para permitir el <i>capping</i>
CSB			Modula TFIIIS
FCP1			<ol style="list-style-type: none"> 1. Fosfatasa que estimula elongación 2. Defosforila el CTD en el reciclaje de la RNAP II
TFIIIS			Estimula la actividad exonucleasa de RNAP II para corregir alineamientos erróneos
SPT6			Chaperona de histonas que afecta a la estructura de la cromatina
HDAG			Desplaza a NELF para estimular la elongación
Complejo regulador 19S del proteosoma			Implicado en metilación de H3-K4
<u>Factores de elongación pasivos:</u> No afectan a la actividad catalítica de la RNAP II			
P-TEFb	CDK9, ciclina T		<ol style="list-style-type: none"> 1. Ayuda a superar la pausa inducida por NELF 2. Fosforila al CTD en Ser2 3. Fosforila a DSIF en SPT5
Ssu72			<ol style="list-style-type: none"> 1. Defosforila las Ser5 del CTD 2. Implicada en el procesamiento del extremo 3'
SWI/SNF			Complejo remodelador de cromatina dependiente de la hidrólisis de ATP
Isw1p	loc2p, loc4p		<ol style="list-style-type: none"> 1. Regula la fosforilación del CTD en Ser2 y Ser5 2. Regula la metilación en H3-K4 y H3-K36 3. Recluta factores al extremo 3' del mRNA

Nombre del factor	Subunidades que lo componen	Complejo en que se encuentra	Función que desempeña
Chd1			Remodelador de cromatina dependiente de ATP
FACT	SPT16, SSRP-1		1. Facilita la elongación a través de la cromatina 2. Modula la estructura de la cromatina 3. Chaperona de histonas
Set1			Metila H3-K4
Set2			Metila H3-K6
Paf1	Paf1, Cdc73, Ctr9, Leo		1. Modula modificaciones de histonas 2. Recluta Set1 y Set2 3. Participa en la maduración del mRNA
Rtf1		Paf	Ayuda a las funciones de Paf
THO	Hpr1, Tho2, Mtf1, Thp2	TREX	Necesario para la transcripción de transcritos largos y ricos en G y C
TREX	THO, UAP56		Ayuda a las funciones de THO
ALY/REF			Vincula la elongación con splicing, exporte del mRNA y <i>surveillance</i>
Iws/Spn1			Se localiza en las regiones codificantes junto con SPT6

Tabla 11. Factores de elongación de la transcripción.

Se citan los principales factores de elongación de la transcripción, nombrando las subunidades que los componen, el complejo al que pertenecen y la función que desempeñan.

del mRNA (*capping*, *splicing*, corte y poliadenilación y terminación), ya que no forman un grupo tan complejo y numeroso como los de elongación y ya se han mencionado al hablar del proceso en el que intervienen.

Cabe resaltar que, a pesar de que se conoce un gran número de factores que afectan la transcripción a través de la cromatina, los mecanismos por los que estos factores ejercen su

función se desconocen en su mayoría. Además, aunque algunos de estos factores pueden permitir el paso de la RNAP II por el molde de cromatina, la tasa de elongación *in vitro* que se ha conseguido con todos los factores conocidos es mucho menor que la elongación observada *in vivo*, lo cual sugiere que deben existir otros factores claves que aún están por descubrir.

LA TRADUCCIÓN CELULAR

La traducción del mRNA a proteínas es el paso final de la expresión génica y ocurre en el citoplasma, donde el ribosoma proporciona un entorno idóneo para el correcto funcionamiento del engranaje de factores proteicos y rRNAs que participan en ella. Esta etapa de la expresión génica consiste en la decodificación del mensaje contenido en los transcritos de mRNA para dar lugar a las proteínas correspondientes, y consta de tres fases: iniciación, elongación y terminación.

El control traduccional es la modulación de la

eficacia de la traducción de mRNAs y de la estabilidad de éstos y supone un punto clave en la regulación de la expresión génica. El control a nivel de síntesis de proteínas le permite a la célula una respuesta rápida a cambios en condiciones fisiológicas, ya que la activación o represión de los mRNAs puede ocurrir prácticamente de forma instantánea, mientras que la regulación a nivel de transcripción implica un lapso de tiempo considerable hasta que el pre-mRNA se procesa y puede acumularse en el citoplasma.

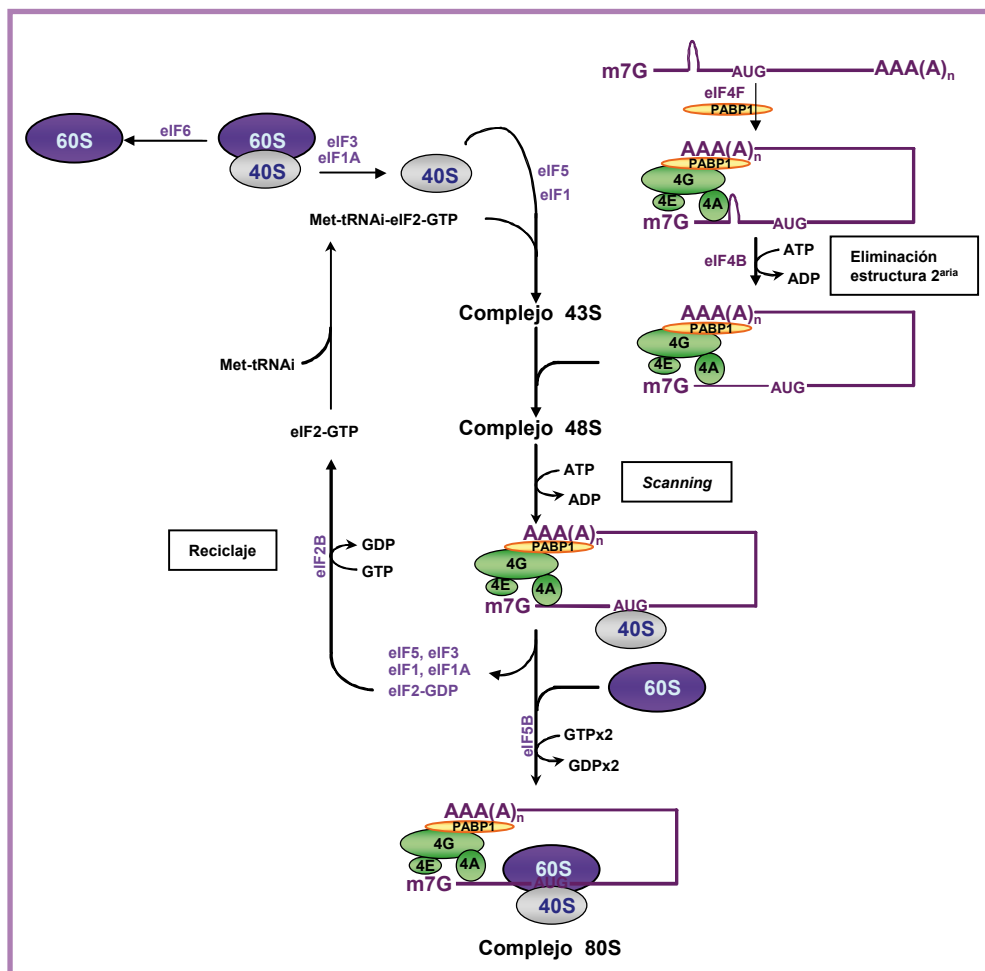


Figura 18. La iniciación de la traducción celular.

Representación esquemática de los pasos principales de la etapa de iniciación de la traducción en eucariotas, en la que se indican las principales proteínas implicadas.

1 LA TRADUCCIÓN GENERAL

1.1. Iniciación de la traducción

Durante esta etapa, los mRNAs entran en contacto con el ribosoma para formar el complejo de iniciación en el que el codón de iniciación del mensajero interactúa con el metionil-tRNA iniciador (Met-tRNA_i^{Met}). Esta interacción define la fase de lectura del mRNA. La unión del Met-tRNA_i^{Met} y el mRNA con el ribosoma está favorecida por la actuación de numerosos factores de iniciación, eIFs (*eukaryotic initiation factors*), y en este proceso se consume energía proveniente de la hidrólisis de ATP y GTP. La iniciación de la traducción es la más complicada de las tres fases de la traducción, y en ella intervienen numerosos factores sujetos a una estrecha regulación. Esta etapa implica la sucesión de los siguientes pasos: disociación del ribosoma en sus dos subunidades 40S y 60S, unión del Met-tRNA_i^{Met} a la subunidad ribosomal 40S, unión del mRNA a través del reconocimiento del cap, reconocimiento del codón de iniciación y acoplamiento de la subunidad 60S del ribosoma para dar lugar al complejo 80S (Figura I8).

En la iniciación de la traducción es fundamental la participación del factor eIF4F, que es un heterotrímero formado por eIF4E, eIF4A y eIF4G. eIF4E es la proteína de unión a cap citosólica, eIF4A es una helicasa de RNA responsable de la eliminación de estructuras secundarias cercanas al cap de forma dependiente de ATP, y eIF4G es el factor que ancla los dos factores anteriores y permite el reclutamiento del complejo 43S, formado por la subunidad 40S del ribosoma y el Met-tRNA_i^{Met}.

1.2. Elongación de la traducción

La fase de elongación implica la adición secuencial de aminoácidos al extremo carboxilo-terminal del péptido naciente. Consta de cuatro etapas principales: unión del aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma, hidrólisis de GTP e intercambio de GTP por GDP con la participación del factor eEF-1, formación del enlace peptídico y translocación del peptidil-tRNA al sitio P del ribosoma y del tRNA vacío al sitio E.

El ribosoma tiene tres sitios de unión a tRNA: el sitio A (*aminoacil*), donde se incorpora en aminoacil-tRNA, el sitio P (*peptidil*), donde el peptidil-tRNA se une tras la translocación y el sitio E (*exit*), donde se une el tRNA vacío antes de ser expulsado del ribosoma.

1.3. Terminación de la traducción

Cuando se expone un codón de terminación al sitio A, no hay ningún complejo con tRNA que lo pueda reconocer. En su lugar, los factores de liberación, eRFs (*eukaryotic release factors*) se unen y promueven la hidrólisis del enlace éster del peptidil-

tRNA de forma dependiente de GTP, y se produce la liberación del polipéptido recién sintetizado ^{220, 310}.

2 SÍNTESIS LOCALIZADA DE PROTEÍNAS

Por último, vamos a hacer mención a la síntesis localizada de proteínas, un mecanismo adicional de control traduccional en el que, como veremos más adelante, hCLE/CGI-99 parece estar involucrada.

El control traduccional de los mRNAs localizados es un mecanismo común de regulación de la expresión de proteínas en dominios específicos dentro de una célula. El transporte de mRNAs es un evento fundamental para que pueda tener lugar la síntesis localizada de proteínas, que está implicada en procesos tales como la formación del eje celular, la división asimétrica y la movilidad celular ³¹³. En neuronas, tras la formación de las sinápsis nerviosas, los mRNAs se transportan a las dendritas como mecanismo de localización de proteínas en compartimentos específicos y para su regulación traduccional localizada necesaria para la plasticidad neuronal ³¹¹.

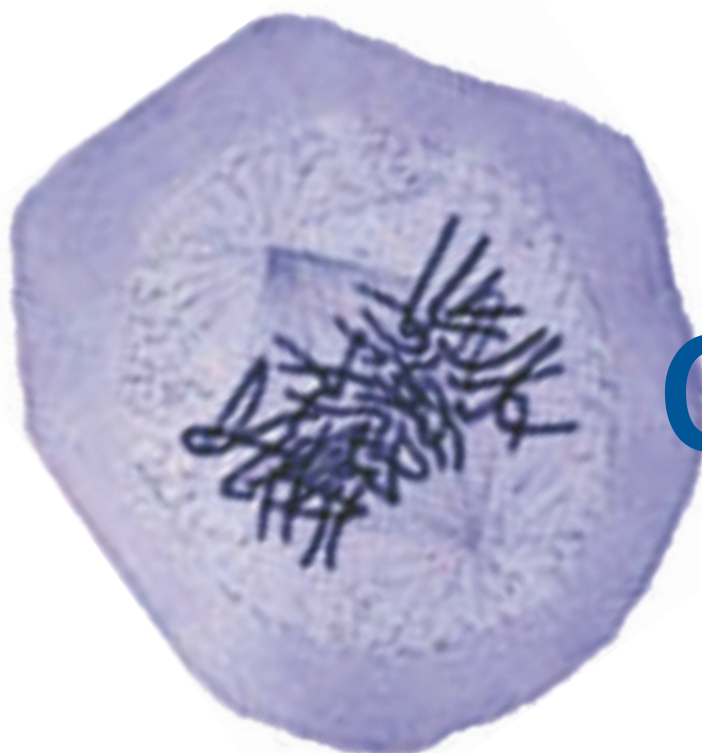
Cómo los mRNAs son transportados y traducidos específicamente es una gran pregunta que permanece sin resolver, pero sí está comúnmente aceptado que existen mRNAs que suelen transportarse formando parte de grandes partículas ribonucleoproteicas, que en un principio fueron denominadas gránulos de RNA ^{3, 162, 173, 178}. Posteriormente, se distinguieron dos tipos de estructuras de transporte de RNA en neuronas según la presencia o ausencia en ellas de ribosomas. Así, se pasó a llamar *partículas de transporte* a aquellas estructuras de transporte de mRNAs que carecían de ribosomas, y se llamaron *gránulos de RNA* exclusivamente a aquellas partículas que transportaban mRNAs junto con los ribosomas que los van a traducir ³¹¹. Un factor común en estos dos tipos de estructura es que los mRNAs deben transportarse de forma que su traducción esté reprimida, ya que las proteínas que codifican no deben expresarse hasta alcanzar su destino. La diferencia radica en el tipo de represión traduccional que sufren: los mRNAs en las partículas de transporte están reprimidos a nivel de iniciación de la traducción, mientras que los mRNAs de los gránulos ya viajan acoplados al ribosoma, y por lo tanto están reprimidos a nivel de elongación de la traducción.

Los componentes que forman parte tanto de una partícula de transporte como de un gránulo de RNA son: mRNAs, proteínas específicas de unión a RNA, adaptadores que conectan las proteínas de unión a RNA con el complejo motor, motores

moleculares y otras proteínas de unión a RNA con función en la represión de la traducción del mRNA.

En los últimos años se han caracterizado dos estructuras de transporte de mRNAs aisladas en tejido nervioso mediante un abordaje proteómico^{81, 155}. Algunas diferencias entre las dos estructuras eran importantes, como que sólo el gránulo aislado por Elvira y colaboradores contenía ribosomas y que muchas de las proteínas eran diferentes, incluidos los motores moleculares, que un caso era kinesina¹⁵⁵ y en otro era dineína⁸¹. También eran distintos los mRNAs que transportaban. A pesar de las diferencias entre ambas estructuras, muchos de los componentes eran comunes, sugiriendo que el núcleo del gránulo puede ser común en ambos tipos de partículas. Una característica llamativa de ambos estudios es la abundancia de hnRNPs y otras proteínas nucleares y la presencia de varios tipos de proteínas del tipo DEAD box (DDX) en los gránulos. La proteína humana hCLE/CGI-99, cuyo estudio es el objeto de esta tesis, se identificó en los dos estudios anteriores como parte integrante de ambos tipos de partículas.





OBJETIVOS

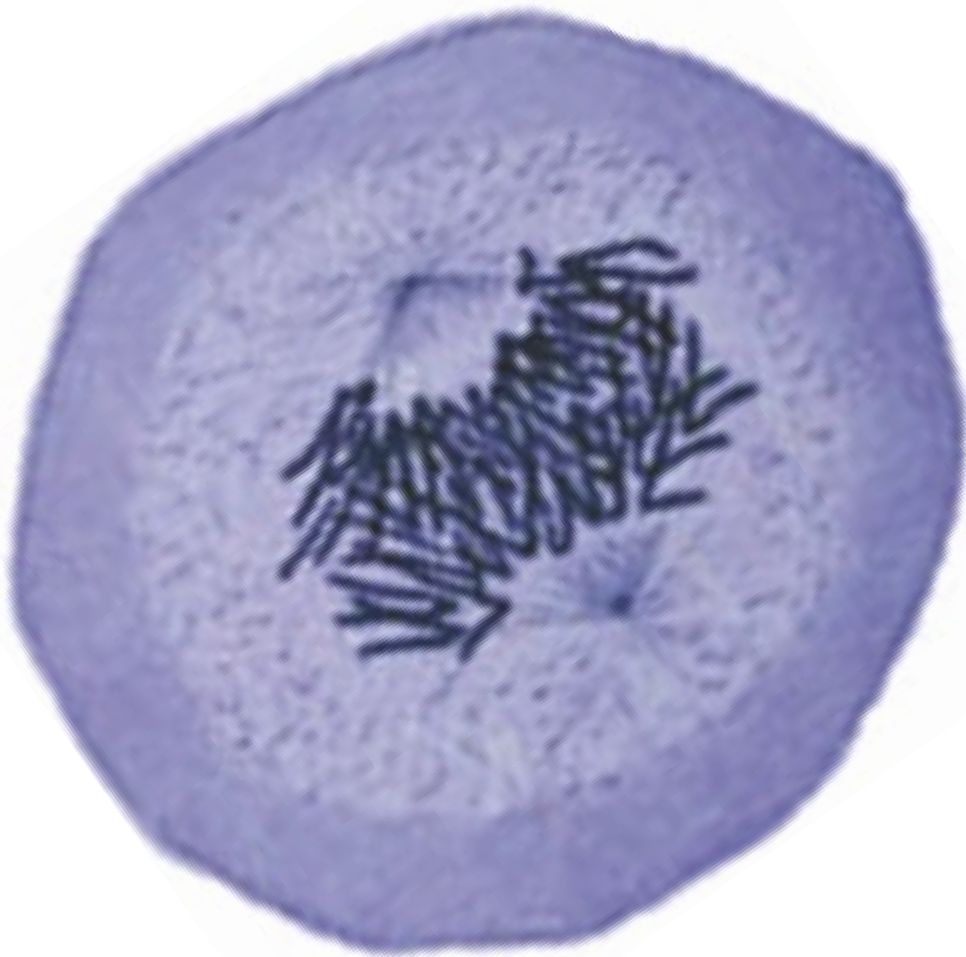
Estudios previos en nuestro laboratorio habían identificado a la proteína celular hCLE como un factor asociado a la polimerasa del virus de la gripe a través de la interacción con una de sus subunidades, la proteína PA. hCLE era una proteína de función desconocida, sin embargo presentaba una cierta homología de secuencia con la región central de Spt16 (Cdc68), un factor de transcripción de *Sacharomyces cerevisiae*, dato que nos permitió evaluar una posible función de hCLE relacionada con la transcripción.

A lo largo del desarrollo de esta tesis, se ha descrito la caracterización proteómica de dos complejos ribonucleoproteicos de transporte de mensajeros en neuronas, implicados en la síntesis localizada de proteínas^{81, 155}. La proteína hCLE ha sido identificada como componente de ambos complejos, sugiriendo una función de hCLE relacionada con la traducción localizada o con el transporte de mRNA.

Con estos antecedentes, los objetivos generales de esta tesis son caracterizar la función celular de hCLE y profundizar en su asociación con la polimerasa viral. En este contexto, nos propusimos los siguientes objetivos concretos:

- 1 Analizar las interacciones que pudiera establecer hCLE con las demás proteínas que forman parte de las RNPs virales.
- 2 Estudiar la función nuclear de hCLE como posible factor de transcripción.
- 3 Estudiar la función citosólica de hCLE en células no neuronales.





MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES BIOLÓGICOS

LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares COS-1, HEK293T y MDCK fueron cedidas por Y. Gluzman, J.C. de la Torre y T. Zürcher, respectivamente.

BACTERIAS

La cepa bacteriana utilizada para la amplificación de todos los plásmidos fue *E. coli* DH5 α . La cepa bacteriana utilizada para la expresión y purificación de proteínas fue *E. coli* BL21 DE3 pLys S.

VIRUS

La cepa del virus de la gripe utilizada fue A/Victoria/3/75, cepa humana de campo (Vic).

PLÁSMIDOS

Los plásmidos pCDNA-3-HA-hCLE y pRSET-hCLE que expresan la proteína hCLE con la etiqueta del epítipo de hemaglutinina (HA) o una etiqueta de poli-Histidinas respectivamente fueron construidos y cedidos por M. Huarte ¹⁴⁴.

Los plásmidos pSUPER-hCLE y pSUPER-Dgk α que expresan el RNA interferente (RNAi) para el silenciamiento génico de hCLE o un RNAi control, fueron construidos y cedidos por A. Rodríguez ²⁶⁵ (Figura M1). La secuencia de silenciamiento para hCLE comprende los nucleótidos del 121 al 143 de la secuencia de su mRNA. El plásmido pSUPER original procede de Oligoengine.

Los plásmidos pCMV-PB1, pCMV-PB2 y pCMV-NP, que expresan las subunidades de la polimerasa viral o la proteína NP de la cepa Vic bajo el promotor de citomegalovirus fueron construidos y cedidos por A. Falcón ⁸⁹.

El plásmido pTrc-PB2 fue construido y cedido por E. Area ¹¹.

El plásmido pTrc-PB2-256 fue construido y cedido por E. Torreira.

El plásmido pRSET Δ 1-464 PA, que expresa una forma delecionada de la subunidad PA de la polimerasa viral de la cepa Vic fusionada a una etiqueta de poli-Histidinas, así como el plásmido pRSET-4GI157-550, que expresa una forma delecionada del factor de traducción eIF4GI fusionado a una etiqueta de poli-Histidinas, fueron construidos y cedidos por T. Aragón ¹⁰.

ANTICUERPOS

El suero de conejo específico contra la proteína hCLE fue generado por M. Huarte y su caracterización ha sido descrita ¹⁴⁴.

Las caracterizaciones de los anticuerpos específicos contra las proteínas PA y PB2 han sido descritas previamente ^{16, 246}.

El suero policlonal de rata que reconoce la proteína PB1 fue generado por I. J. Salanueva en el laboratorio de J. Ortín.

Los anticuerpos específicos contra la RNAPII (8WG16, H5 y H14) fueron adquiridos a Covance. Estos tres anticuerpos reconocen diferentes formas de fosforilación del dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mayor de la RNAPII. El anticuerpo 8WG16 reconoce la forma defosforilada en Ser2, el anticuerpo H5 reconoce la forma fosforilada en Ser2 y el anticuerpo H14 reconoce la forma fosforilada en Ser5.

El anticuerpo específico contra la bromo-deoxiuridina (BrdU) se obtuvo de Abcam.

El anticuerpo específico contra la β -tubulina se adquirió a Sigma.

El anticuerpo monoclonal que reconoce el epítipo de hemaglutinina (HA) se adquirió de Covance y el suero de conejo que reconoce este mismo epítipo se adquirió de Santa Cruz.

El anticuerpo monoclonal dirigido contra el factor de traducción eIF4E se se adquirió de Transduction Laboratories.

El suero de rata específico contra la proteína NP fue generado en el laboratorio de J. Ortín por hiperinmunización de ratas con la proteína purificada His-NP.

MÉTODOS

MANIPULACIÓN DE DNA Y CLONAJES

1 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pCDNA-3-hCLE-TAP

El plásmido pCDNA-3-hCLE-TAP se construyó amplificando la secuencia de hCLE a partir del plásmido pGEM-hCLE¹⁴⁴ utilizando el sistema Expand Long Template™ PCR de Roche y clonándolo en el plásmido pCDNA-3-TAP³³⁸ digerido con KpnI

y NotI. La secuencia de hCLE se amplificó con un oligo en el extremo 5' que introduce la diana KpnI y con un oligo en el extremo 3' que introduce la diana NotI (5'-CCGGTAGGTACCATGTTCCGCCGC-3' y 5'-GGGAAAAGTTGGAAGAGGCCGCCGC-3', respectivamente).

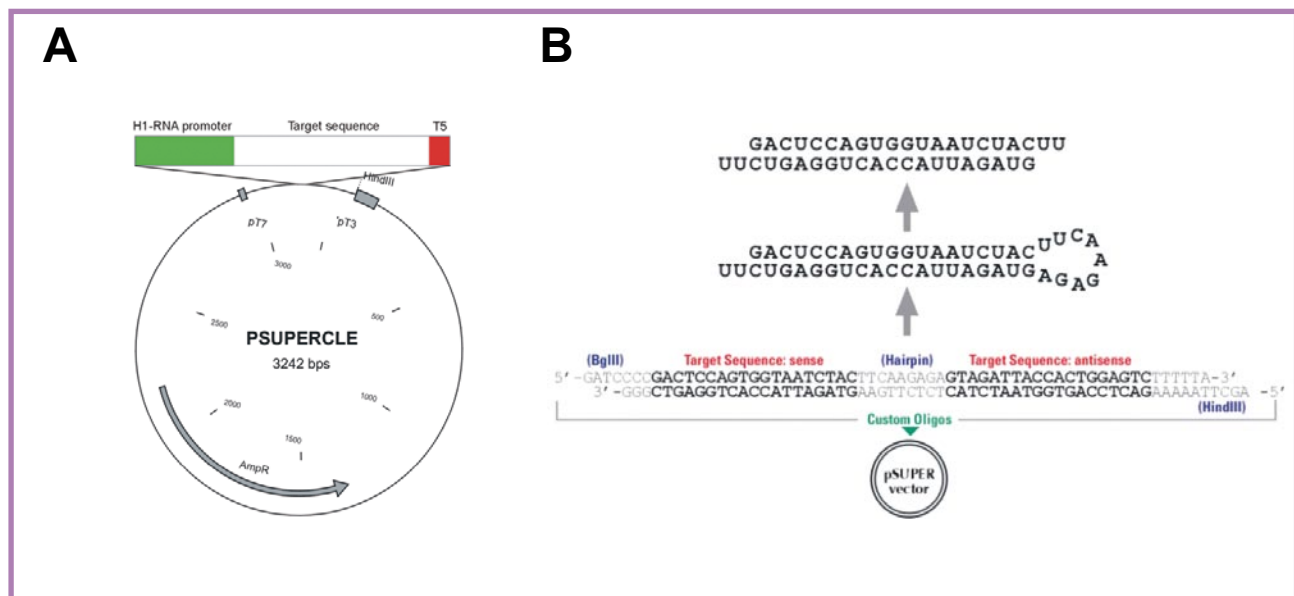


Figura M1. Clonaje del plásmido de silenciamiento pSUPER-hCLE.

A. Mapa del plásmido pSUPER-hCLE en el que se muestra en verde el promotor de la histona H1.

B. Esquema que muestra la formación de la horquilla de RNA de doble banda o *short-hairpin RNA* (shRNA), estructura que induce el silenciamiento génico.

MANIPULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

1 CRECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares COS-1 y MDCK se cultivaron en *Dulbecco modified Eagle medium* (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 5%, según un protocolo descrito con anterioridad²⁵³. La línea celular HEK293T se cultivó en medio

DMEM suplementado con FBS al 10%, tal y como se describe en el protocolo citado anteriormente, pero utilizando tripsina-EDTA al 10% en PBS.

2 TRANSFECCIONES

Las transfecciones de cultivos subconfluentes de células COS-1 se llevaron a cabo utilizando una mezcla de liposomas catiónicos (2µg/µl de DNA)²⁷⁹ en DMEM sin suero. Se transfectaron 4µg de DNA por 1.25×10^6 células.

Las transfecciones de cultivos subconfluentes de células HEK293T se llevaron a cabo utilizando el método del fosfato cálcico³⁴⁶. Las placas de cultivo o los cubreobjetos donde se cultivaron estas células fueron tratados durante 30 minutos a 37°C con poli-L-lisina (Sigma) a 1mg/ml, y posteriormente lavados dos veces con PBS antes de entrar en contacto con las células. Se transfectaron 4µg de DNA por 1.25×10^6 células.

Las transfecciones de células COS-1 para su posterior infección con el virus de la gripe se hicieron en suspensión según una adaptación de un protocolo anterior¹⁹. Para ello, 6µg de DNA se llevaron a un volumen de 100µl en una solución 150mM de NaCl. Por cada transfección (1.25×10^6 células), se mezclaron 8µl de jetPEITM (Genycell Biotech) con 100µl de NaCl 150mM, con agitación suave. Cada mezcla de jetPEITM se añadió sobre la mezcla de DNA correspondiente, se mezcló suavemente y se incubó durante 20min a temperatura ambiente. Se recogieron las células de una placa p100 confluyente (aproximadamente 10^7 células) con tripsina. Las células se llevaron a 12ml de DMEM con 10% FBS, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5min y se resuspendieron en 2.5ml de DMEM con 10% FBS. Se alicuotearon 250µl de suspensión de células en placas de cultivo de 35mm. Tras el periodo de incubación de 20min, la mezcla de DNA y jetPEITM se añadió suavemente gota a gota sobre las células. Tras agitar suavemente, las células se mantuvieron en un incubador a 37°C durante 24h. Pasado ese tiempo, se infectaron las células con la cepa Vic del virus de la gripe, a una multiplicidad de infección de 5 PFU (*plaque forming unit*) por célula, tal y como se indica en el apartado siguiente.

3 INFECCIONES

Todas las infecciones con virus de la gripe se llevaron a cabo a alta multiplicidad de infección, en concreto a 5 PFUs por célula. Para ello, las células se lavaron una vez con PBS completo y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con la dilución del virus correspondiente en DMEM. Tras la hora de adsorción, se retiró el inóculo del virus y se lavaron las células dos veces con DMEM. Posteriormente, se incubaron las células con medio

DMEM a 37°C durante el tiempo indicado en cada experimento.

4 AISLAMIENTO DE NÚCLEOS

Los núcleos de células HEK293T que posteriormente fueron utilizados para ensayos de síntesis de RNA *in vitro* (explicado en el apartado 3.1.3.) se aislaron según una adaptación de un protocolo anterior²⁸⁶. Todo el proceso fue llevado a cabo en frío y las cantidades se refieren a una cantidad de células de 1.25×10^6 . Las placas de cultivo se pusieron en hielo, se retiró el medio y se recogieron las células en PBS a 4°C. Las células se centrifugaron a 1200 rpm a 4°C durante 5min y se lavaron dos veces con 1ml de PBS frío, repitiendo la centrifugación de la misma manera. Las células lavadas y centrifugadas se incubaron durante 15min en hielo en 400µl de tampón de lisis (10mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM NaCl, 3mM MgCl₂ y 0.1% NP-40), agitando ocasionalmente. Tras la lisis, las células se centrifugaron como anteriormente y se descartó la fracción citosólica soluble. La fracción restante son los núcleos, que se resuspendieron en 20µl de tampón de congelación (50mM Tris-HCl pH 8.3, 40% glicerol, 5mM MgCl₂ y 0.1mM EDTA) y se congelaron rápidamente en N₂ líquido, para después guardarse a -80°C hasta el momento de su utilización.

5 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES Y CITOSÓLICOS

5.1. Extractos nucleares para ensayos de inmunoprecipitación

Los extractos nucleares de células HEK293T utilizados para inmunoprecipitar se obtuvieron siguiendo una adaptación de un protocolo descrito anteriormente⁷². Para preparar los extractos nucleares, se partió de 1.5×10^8 células HEK293T. Las células se recogieron y lavaron dos veces en PBS a 4°C, centrifugando cada vez a 1200 rpm durante 5min a 4°C. Las células se resuspendieron en 18ml de la solución de lisis del protocolo de aislamiento de núcleos (apartado 2.4.) y se incubaron en hielo durante 15min agitando ocasionalmente. Tras la incubación, las células se centrifugaron como se hizo anteriormente y se descartó la fracción citosólica soluble. La fracción restante son los núcleos crudos, que se resuspendieron en 2.5ml de tampón C⁷² 20mM HEPES pH 7.9, 25% glicerol, 0.42M NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA,

0.5mM PMSF y 0.5mM DTT y se lisaron haciendo 10 pasadas en un homogenizador Dounce vidrio/ vidrio utilizando un pistilo tipo B. El homogenado se dejó 2h a 4°C en agitación suave y posteriormente se centrifugó a 2500g durante 30min (rotor Sorvall SS-34) a 4°C, para obtener el sobrenadante nuclear, el cual se dializó 2 veces frente a 500 volúmenes de buffer D⁷² 20mM HEPES pH 7.9, 20% glicerol, 0.1M KCl, 0.2mM EDTA, 0.5mM PMSF y 0.5mM DTT, durante 1h a 4 °C. El dializado se centrifugó a 25000g durante 20min (rotor Sorvall SS-34) a 4°C y se descartó el precipitado. El sobrenadante es el extracto nuclear, y se congeló en alícuotas en N₂ líquido y se guardó a -80°C hasta su utilización.

5.2. Extractos nucleares y citosólicos para purificación de proteína hCLE-TAP

Las células HEK293T se recogieron en PBS y se lavaron 2 veces con PBS centrifugando a 1200 rpm a 4°C durante 5min. Las células se resuspendieron en una solución 10mM Tris-HCl pH8, 10mM KCl, 0.1% NP-40, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF y se incubaron 5min en hielo. Tras

centrifugar 5min a 3000 rpm a 4°C, se recogió el sobrenadante, que son los extractos citosólicos. Estos extractos se suplementaron con NaCl de manera que su concentración final quedara 150mM, para dejarlos en las condiciones óptimas del protocolo de purificación por TAP (explicado en el apartado 5.6.) y se utilizaron para el protocolo de purificación.

El *pellet* de la centrifugación anterior son los núcleos, que se resuspendieron en tampón C: 20mM Tris-HCl pH8, 0.4M NaCl, 10% glicerol, 1.5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM DTT y 0.5mM PMSF, previamente enfriado a 4°C, se incubaron en hielo durante 30min agitando ocasionalmente y se centrifugaron a 15000 rpm durante 15min a 4°C. El sobrenadante de esta centrifugación son los extractos nucleares, que se adaptaron a las condiciones de la purificación por TAP por dilución hasta alcanzar una concentración 150mM de NaCl y suplementando con los demás reactivos hasta llegar a las condiciones 10mM Tris-HCl pH8 y 0.1% NP-40. En estas condiciones, los extractos nucleares se utilizaron para el protocolo de purificación (apartado 5.6.).

MANIPULACIÓN DE RNA

1 SÍNTESIS DE RNA

1.1. Síntesis de RNA *in situ* y marcaje con anticuerpos

Para la síntesis *in situ* de RNA seguida de ensayos de inmunofluorescencia, se siguió un protocolo adaptado de uno anterior³⁴⁰. Se utilizaron células MDCK crecidas sobre cubreobjetos, que se lavaron con TBS a 4°C y posteriormente durante 10 min a 4°C con tampón glicerol 20mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM MgCl₂, 25% glicerol, 0.5mM PMSF y 0.5mM EGTA. Entonces, se sometió a las células a una permeabilización suave durante 3min a 4°C con tampón glicerol suplementado con 1mM DTT, 25 unidades/ml HPRI (*Human Placental Ribonuclease Inhibitor*, de Amersham), y 0.05% Tritón X-100. Tras lavar las células con TBS para retirar todo el detergente, éstas se incubaron a temperatura ambiente durante 1h con tampón de transcripción 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 0.5mM EGTA, 25% glicerol, 1mM DTT, 25 unidades/ml HPRI, 0.5mM PMSF, 1.8mM ATP, 0.5mM CTP, 0.5mM GTP y 1mM Br-UTP. Esta reacción se llevó a cabo en ausencia o en presencia de 5µg/ml α-amanitina, según las condiciones del experimento. Tras el tiempo de síntesis, las células se lavaron

dos veces con TBS suplementado con 25 unidades/ml de HPRI y 1mM DTT. Por último, las células se fijaron con 3.7% formalina (Sigma) durante 20min a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS y se procesaron para inmunofluorescencia, como se indica en el apartado 5.8.

1.2. Síntesis de RNA *in situ* y marcaje radiactivo

Este ensayo se utilizó para medir actividad de la RNAPII en distintas condiciones experimentales. Para poder distinguir la marca de síntesis correspondiente a la RNAPII de la correspondiente a las RNAPI y RNAPIII, la síntesis se llevó en paralelo en presencia y ausencia de la droga α-amanitina (Sigma) a una concentración de 5µg/ml, que es suficiente para inhibir a la RNAPII pero no a la RNAPIII ni a la RNAPI (la RNAPI es insensible a este inhibidor). Así, la síntesis de RNA debida a la actividad de la RNAPII vendrá dada como la diferencia entre la marca medida en las muestras sin tratar con α-amanitina (RNAPI+II+III) y la marca de las muestras tratadas con la droga (RNAPI+III).

Para la síntesis *in situ* de RNA marcado radiactivamente se utilizaron células HEK293T y se siguió un protocolo prácticamente idéntico al descrito en el apartado anterior, con algunos cambios: la permeabilización se llevó a cabo con saponina 0.12mg/ml y los nucleótidos que se añadieron al tampón de transcripción fueron 1.8mM ATP, 0.5mM CTP, 1mM UTP, 0.01mM GTP y 1.3mM [α - 32 P]GTP (3000Ci/mmol, 10mCi/ml). Tras el tiempo de síntesis, las células se lavaron dos veces con TBS suplementado con 25 unidades/ml de HPRI y 1mM DTT.

El RNA total celular se aisló con ULTRASPEC™ RNA Isolation Reagent (Biotecx) siguiendo las indicaciones del fabricante y posteriormente se trató con 40 μ g/ml DNasa I en tampón HSB durante 45min a 37°C y con 40 μ g/ml proteinasa K en TNE (100mM NaCl, 50mM Tris-hCl pH 7.5, 5mM EDTA) con 0.4% SDS durante 30min a 37°C. Las muestras se fenolizaron y el RNA se precipitó con etanol. La cantidad de radiactividad incorporada se midió en un contador de centelleo Wallac 1410, y posteriormente, el RNA se analizó por electroforesis en geles de agarosa en MOPS (20mM MOPS sodium salt pH7, 5mM acetato sódico y 0.5mM EDTA) con 4% formaldehído y 1 μ g/ml bromuro de etidio, para normalizar las cuentas radiactivas obtenidas con la cantidad de RNA total aislado de cada muestra.

1.3. Síntesis de RNA *in vitro* en núcleos aislados

Para llevar a cabo la síntesis de RNA *in vitro*, se aislaron los núcleos de células HEK293T como se indica en el apartado 2.4. y la síntesis se realizó siguiendo una adaptación de un protocolo descrito anteriormente ²⁸⁶. Al igual que en el apartado anterior, la síntesis se llevó en paralelo en presencia y ausencia de α -amanitina (Sigma) a una concentración de 5 μ g/ml. Así, la síntesis de RNA debida a la actividad de la RNAPII vendrá dada como la diferencia entre la marca medida en las muestras sin tratar con α -amanitina (RNAPI+II+III) y la marca de las muestras tratadas con la droga (RNAPI+III). Con el objetivo de que los resultados obtenidos fueran estadísticamente fiables, cada muestra se llevó por triplicado y el resultado mostrado es una media de la síntesis de los tres puntos. Además, el experimento completo se repitió tres veces, por lo que cada dato en el resultado refleja los triplicados de tres experimentos independientes.

Los núcleos se descongelaron en hielo y se les añadió un volumen de tampón de transcripción sin nucleótidos: 10mM Tris-HCl pH 8, 5mM MgCl₂ y 0.3M KCl, suplementado en el momento con 5mM DTT y α -amanitina 5 μ g/ml, en las muestras que lo requirieran. Los núcleos entonces se preincubaron 5min a 30°C y se les añadió la mezcla de nucleótidos

de manera que sus concentraciones finales quedaran a 0.5mM ATP, 0.5mM CTP, 0.5mM UTP y 2.25mM [α - 32 P]GTP (3000Ci/mmol, 10mCi/ml), tras lo cual se incubaron 10min a 30°C. Pasado el pulso de síntesis, los núcleos se trataron con 40 μ g/ml DNasa I en tampón HSB durante 30min a 30°C y con 40 μ g/ml proteinasa K en TNE (100mM NaCl, 50mM Tris-hCl pH 7.5, 5mM EDTA) con 0.4% SDS durante 30min a 42°C. Las muestras se fenolizaron y el RNA se precipitó con etanol. Posteriormente, el RNA se analizó por electroforesis en geles de agarosa en MOPS (20mM MOPS sodium salt pH7, 5mM acetato sódico y 0.5mM EDTA) con 4% formaldehído y 1 μ g/ml bromuro de etidio. Finalmente, los geles se transfirieron a membranas de naylor Biotex® (Pall Corporation) y la radiactividad se cuantificó en un Phosphorimager utilizando el programa ImageQuant.

2 MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE RNA

2.1. Aislamiento de RNA total celular para análisis por Northern blot

Para los ensayos de análisis del mRNA de hCLE en células silenciadas, se aisló el RNA total celular de células HEK293T previamente transfectadas con el plásmido de silenciamiento o su plásmido control con ULTRASPEC™ RNA Isolation Reagent (Biotecx) siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.2. Aislamiento de RNA total para análisis de *microarray*

El aislamiento del RNA total de células HEK293T previamente silenciadas o no para su posterior análisis mediante la técnica de *microarray*, se llevó a cabo con TRIzol® Reagent (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Después el RNA aislado se pasó por columnas RNeasy RNA Cleanup (QIAGEN) para retirar cualquier resto del protocolo anterior.

3 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RNAs

3.1. Northern blot

El RNA total celular procedente de células HEK293T silenciadas o control se separó en geles de MOPS 1.4% agarosa con 4% formaldehído y 1 μ g/ml bromuro de etidio y se transfirió a membranas de naylor Biotex® (Pall Corporation) en condiciones estándar ²⁸⁶. Las membranas se prehibridaron 2h a 65°C con una solución 6X SSC, 5X Denhards, 0.5%

SDS, 50µg/ml DNA espermato de salmón sonificado y 100µg/ml RNA levadura y posteriormente se hibridaron 16h a 65°C en la misma solución a la que se añadió la sonda específica marcada radiactivamente como se detalla en el apartado 4.1.2. a una concentración de 10⁶ cpm/ml. Tras la hibridación, las membranas se lavaron 1h a 65°C con una solución 1X SSC y 0.1% SDS en agitación y se expusieron a pantallas de detección en Phosphorimager y la radiactividad detectada se cuantificó con el programa ImageQuant.

3.2. Microarray

El RNA total celular procedente de células HEK293T silenciadas o control se cuantificó y su integridad fue analizada en un Bioanalyzer 2100 (Agilent). Se utilizaron tres *pools* diferentes de 10µg de RNA procedentes de tres experimentos realizados por triplicado cada uno, tanto para las células silenciadas como para las células control. Se adquirieron cristales cubiertos por aminosilano de la Universidad de Cincinnati, www.microarray.uc.edu/Resources/genelist.htm, que contenían 32,256 *spots* (correspondientes a 22,264 unigenes) representando el Human oligo set de Qiagen-Operon, y se hibridaron en condiciones estándar con sondas de RNA generadas a partir del RNA total celular obtenido anteriormente y marcadas o bien con Cy3 o Cy5 Mono NHS Esters (CyTMDye *Post-labelling Reactive Dye Pack*, Amersham). Se llevaron a cabo tres réplicas distintas, y en la mitad de las hibridaciones se realizó “*Dye-swap*” para corregir desviaciones causadas por la posible unión específica de un gen a los agentes de tinción. Las imágenes de los canales Cy3 y Cy5 fueron capturadas y equilibradas con un escáner GenePix 4000B (Axon) y los *spots* se cuantificaron utilizando el software GenePix (Axon).

La normalización y análisis estadístico de los datos de expresión se realizó utilizando el paquete de software LIMMA (*Linear Models for Microarray Data*)³⁰⁹. Para estimar la expresión diferencial en condiciones de silenciamiento de hCLE, se aplicó un modelo lineal. Se comprobó el cambio de expresión que experimentaba cada sonda en las distintas réplicas utilizando una estadística *t* moderada³⁰⁹. Para controlar el parámetro FDR (*False Discovery Rate*), los p-valores se corrigieron usando el método de Benjamini y Hochberg²⁶. Se

tuvieron en cuenta dos criterios para seleccionar los genes con expresión diferencial en condiciones de silenciamiento de hCLE: un parámetro FDR < 10% y un valor de *fold change* mayor que 1.0. Considerando como significativos aquellos valores cuyo *p*-valor corregido era < 0.1, se obtuvieron 2,322 genes cuya expresión cambiaba al silenciar hCLE. Finalmente, se estableció el criterio más restrictivo de un valor de *fold change* mayor que 1.5, y así se obtuvieron 290 genes diferencialmente expresados en condiciones de silenciamiento de hCLE.

3.3. RT-PCR semicuantitativa

Esta técnica se utilizó para validar los resultados del *microarray*. Se escogieron cuatro genes cuya expresión, según los resultados del *microarray*, está regulada por hCLE y se amplificó su RNA para comprobarlo mediante otra técnica. Los RNAs que se utilizaron para la RT-PCR fueron alícuotas del RNA celular total empleado para el *microarray*. Se llevó a cabo una reacción de transcripción reversa del RNA celular total a cDNA con la transcriptasa reversa AMV (Promega) durante 1h a 45°C, siguiendo las instrucciones del fabricante. La enzima se inactivó por temperatura, durante 10min a 75°C, y los cDNAs se amplificaron con Taq polimerasa en las siguientes condiciones: (10 segundos a 94°C, 30 segundos a 54°C y 60 segundos a 68°C) entre 25 y 35 ciclos, con una extensión final de 2min a 68°C. Para asegurarnos de que la amplificación se encontraba dentro del rango lineal, se llevaron a cabo diluciones seriadas 1:2 del cDNA. Como control de cantidad de mRNA, se llevó en paralelo una RT-PCR del gen GAPDH (25 ciclos) de cada alícuota de RNA total empleado. Se hicieron varias RT-PCR para cada gen utilizando diferentes muestras de cDNA.

Los genes escogidos y los nucleótidos correspondientes a los oligonucleótidos utilizados para este estudio son: TGFBR1 (*Transforming growth factor, receptor β1*), 737-751 y 1288-1304 NM_004612; DYNLRB1 (*Dynein Light chain 2A*), 63-78 y 297-315 NM_014183; HYPK (*Huntingtin interacting protein K*), 221-237 y 513-530 NM_016400 y DFFA (*DNA fragmentation factor*), 695-711 y 1071-1088 NM_004401. Los productos de la amplificación se analizaron en un gel 2% agarosa con tinción con bromuro de etidio, y se comprobó que sus tamaños se ajustaban a lo esperado para cada fragmento.

PREPARACIÓN DE SONDAS PARA HIBRIDACIÓN

1 SONDAS DE RNA

1.1. Molde para la ribosonda de hCLE

Se linearizó el plásmido pCDNA-3-HA-hCLE¹⁴⁴ por digestión con la enzima de restricción Hind III y se purificó el DNA digerido extrayendo del

gel de agarosa utilizando QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

1.2. Transcripción *in vitro* de la ribosonda de hCLE

La síntesis de ribosondas marcadas radiactivamente se llevó a cabo en presencia de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ (3000Ci/pmol). Se utilizó el molde descrito

en el apartado anterior y se transcribió con Sp6 RNA polimerasa. La cantidad de radiactividad incorporada se midió en un contador de centelleo Wallac 1410, y se confirmó la integridad y tamaño de la sonda por electroforesis en geles de acrilamida 4%-6M urea. Finalmente, se hibridó la sonda a una concentración aproximada de 10^6 cpm/ml, en las condiciones que se detallan en el apartado 3.3.1.

MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

1 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

1.1. Purificación de PB2-His y PB2-256-His

Las proteínas PB2-His y PB2-256-His se expresaron en bacterias *E. coli* BL21 DE3 pLys S transformadas previamente con los plásmidos pTrc-PB2 o pTrc-PB2-256. Las bacterias transformadas crecieron a 37°C en medio LB suplementado con cloranfenicol (35µg/ml) y ampicilina (25µg/ml) hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de entre 0.6 y 0.8. La expresión de la proteína recombinante se indujo mediante la adición de IPTG a una concentración final de 10µM durante 27h a 16°C. Tras la inducción, las bacterias se sedimentaron por centrifugación y fueron resuspendidas y sonicadas en la solución 50mM Tris-HCl pH8, 500mM NaCl, 5mM MgCl₂, 10% glicerol y 0.1% Nonidet P-40 (NP-40) y 100mM Imidazol pH8, suplementada en el momento de su utilización con los inhibidores de proteasas PMSF, TPCK, TLCK y benzamidina, cada uno a una concentración final de 1mM. Tras la sonicación, la fracción soluble se separó de los restos celulares por centrifugación y se incubó con resina de NTA-Ni²⁺-agarosa (Invitrogen) en la misma solución, durante 12-14h a 4°C con agitación suave. Finalmente, la resina se lavó exhaustivamente con solución de lavado 20mM Tris-HCl pH8, 1M KCl, 5mM MgCl₂, 10% glicerol, 0.1% NP-40, 100mM Imidazol pH8 e inhibidores de proteasas (PMSF, TPCK, TLCK y benzamidina) 1mM cada uno. La proteína purificada se analizó por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y se cuantificaron su cantidad y pureza por tinción de los geles con azul Coomassie.

1.2. Purificación de His-PAΔ1-464

La proteína His-PAΔ1-464 se expresó en bacterias *E. coli* BL21 DE3 pLys S transformadas previamente con el plásmido pRSET-His-PAΔ1-464¹⁴⁴. Las bacterias transformadas crecieron a 30°C en medio LB, suplementado con cloranfenicol

(35µg/ml) y ampicilina (25µg/ml), hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de entre 0.6 y 0.8. La expresión de la proteína recombinante se indujo mediante la adición de IPTG a una concentración final de 10µM durante 2h a 30°C. A partir de este punto, el proceso es exactamente igual al descrito en el apartado anterior para la proteína PB2-His.

1.3. Purificación de His-4GI157-550

La proteína His-4GI157-550 se expresó en bacterias *E. coli* BL21 DE3 pLys S transformadas previamente con el plásmido pRSET-4GI157-550¹⁰, y se purificó como se detalla en el apartado anterior para la proteína His-PAΔ1-464, excepto en la concentración de Imidazol de las soluciones. En este caso, la solución de sonicación lleva 50mM Imidazol pH8 y la solución de lavado lleva 150mM Imidazol pH 8.

2 TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS IN VITRO

Se utilizó el plásmido pCDNA-3-HA-hCLE¹⁴⁴, que codifica HA-hCLE para su expresión en el sistema de transcripción-traducción acoplado TNT (Promega). El gen se expresó como un producto marcado con ³⁵S-Met/Cys bajo el control de la RNA polimerasa del fago T7. La reacción de transcripción-traducción se incubó durante 2h a 30°C. Las mezclas de traducción se utilizaron para los ensayos de cromatografía de afinidad.

3 INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRFÍA DE AFINIDAD A RESINAS DE NTA-Ni²⁺-AGAROSA

La proteína HA-hCLE expresada en un

sistema de transcripción-traducción acopladas *in vitro* se incubó con matrices de NTA-Ni²⁺-agarosa en las que se habían purificado las proteínas PB2-His, PB2-256-His, His-PAΔ1-464 o His-4GI157-550 como se indica en el apartado 5.1. Esta incubación se llevó a cabo en una solución con 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH8.5, 1.5mM MgCl₂, 50mM Imidazol pH8 y 0.01% NP-40. Tras incubarse durante 2h a temperatura ambiente, las matrices se lavaron extensivamente con la misma solución y la proteína retenida se analizó mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y posterior autorradiografía.

4 INTERACCIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD DE PROTEÍNAS PROVENIENTES DE EXTRACTOS CELULARES A RESINAS DE ANÁLOGOS DE CAP

Se utilizaron extractos citosólicos preparados como se explica en el apartado 2.5.2., de células HEK293T transfectadas o no con el plásmido pCMV-PB2. Los extractos citosólicos se preclarearon centrifugando 15min a 13000 rpm a 4°C, se suplementaron con KCl hasta alcanzar una concentración final de 100mM y se incubaron con resina Met⁷GTP-Sepharosa 4B (GE Healthcare) o resina Sepharosa 4B (GE Healthcare) control durante 16h a 4°C en agitación suave. Tras lavar las resinas extensivamente con la solución 10mM Tris-HCl pH8, 100mM NaCl, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 0.5% Tritón X-100, la proteína retenida se analizó mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y posterior Western blot.

5 CO-INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

5.1. hCLE y PB2 en extractos nucleares

Los extractos nucleares de células HEK293T transfectadas con pCMV-PB2 se diluyeron de manera que quedaron en una solución 50mM Tris-HCl pH7.8, 100mM KCl, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF y se incubaron 2h a 4°C en agitación suave con el anticuerpo anti-hCLE o con un suero irrelevante como control. Posteriormente, se incubaron con proteína A-Sepharosa durante 3h en las mismas condiciones. Después de lavar extensivamente con la solución 10mM Tris-HCl pH8, 100mM NaCl, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT y 0.5% Tritón X-100, el material unido se eluyó hirviendo la

matriz en tampón Laemmli y se procesó por Western blot.

5.2. hCLE y RNAPII en extractos nucleares

Los extractos nucleares de células HEK293T se diluyeron de manera que quedaron en una solución 50mM Tris-HCl pH7.8, 100mM KCl, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF y se incubaron 2h a 4°C en agitación suave con el anticuerpo anti-hCLE o con un suero irrelevante como control. A continuación, se incubaron con proteína A-Sepharosa durante 3h en las mismas condiciones. Después de lavar extensivamente con la solución 10mM Tris-HCl pH8, 100mM NaCl, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT y 0.5% Tritón X-100, el material unido se eluyó hirviendo la matriz en tampón Laemmli y se procesó por Western blot.

6 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA hCLE-TAP RECOMBINANTE

Para la obtención de los complejos que contienen la proteína hCLE expresada como proteína de fusión con la etiqueta TAP, los extractos nucleares o citosólicos (preparados como se explica en el apartado 2.5.2.) se incubaron con resina IgG Sepharosa Fast Flow (GE Healthcare) durante 16h a 4°C. La resina se lavó 10 veces con 10 volúmenes de una solución 10mM Tris-HCl pH8, 150mM NaCl, 0.1% NP-40 y después 5 veces con 10 volúmenes de una solución 10mM Tris-HCl pH8, 150mM NaCl, 0.1% NP-40, 0.5mM EDTA, 1mM DTT. El material unido a la resina se digirió con la proteasa TEV durante 2h a temperatura ambiente en la misma solución. El sobrenadante resultante del corte con la proteasa TEV se mezcló con 5 lavados sucesivos de la resina con una solución compuesta por 10mM Tris-HCl pH8, 150mM NaCl, 10mM β-mercaptoetanol, 1mM Mg(AcO)₂, 1mM imidazol, 2mM CaCl₂, 0.1% NP-40 y se incubó durante 16h a 4°C con resina de calmodulina-agarosa (Stratagene). La resina de calmodulina-agarosa se lavó 10 veces con 10 volúmenes de la misma solución, y el material retenido en ella se eluyó con una solución 10mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, 10mM β-mercaptoetanol, 1mM Mg(AcO)₂, 1mM imidazol, 0.1% NP-40 y 3mM EGTA. Se hicieron 7 eluciones consecutivas y se juntaron para su posterior análisis.

Las proteínas componentes de los complejos de hCLE-TAP se separaron por electroforesis en geles SDS-poliacrilamida. Para poder detectar las bandas correspondientes a las proteínas formadoras de los complejos, estos geles se tiñeron con nitrato de plata como se indica en el apartado 5.9.

7 WESTERN BLOT

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y se transfirieron a membranas de Immobilon (Millipore). Los filtros se saturaron con una solución de seroalbúmina bovina (BSA) al 3% en PBS, previamente a su incubación con anticuerpos primarios específicos (Tabla M1).

Después de lavar con PBS-0.25% Tween 20, los filtros se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes, conjugados a peroxidasa. Tanto los anticuerpos primarios como los secundarios se prepararon en una solución 0.05% Tween 20-0.3% BSA en PBS. Los filtros se volvieron a lavar con PBS-0.25% Tween 20 y el análisis de la señal se detectó por quimioluminiscencia (Amersham).

Anticuerpo	Naturaleza	Carácter	Dilución
α -hCLE	Policlonal (conejo)	Primario	1:1000
α -PB2 (8, 28)	Monoclonal	Primario	1:20 cada uno
α -RNAPII 8WG16	Monoclonal	Primario	1:500
α -RNAPII H5	Monoclonal	Primario	1:500
α -RNAPII H14	Monoclonal	Primario	1:500
α - β -tubulina	Monoclonal	Primario	1:15000
α -eIF4E	Monoclonal	Primario	1:2000
Cabra- α -ratón	Policlonal	Secundario	1:3000
Cabra- α -conejo	Policlonal	Secundario	1:10000

Tabla M1. Anticuerpos para Western blot.

Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la detección de proteínas por Western blot. Se indica el origen del anticuerpo y la dilución a la que se han utilizado.

Anticuerpo	Naturaleza	Carácter	Dilución
α -hCLE	Policlonal (conejo)	Primario	1:1000
α -PB2 28	Monoclonal	Primario	1:3
α -PA 12	Monoclonal	Primario	1:3
α -PB1	Policlonal (rata)	Primario	1:1000
α -His-NP	Policlonal	Primario	1:2000
α -RNAPII 8WG16	Monoclonal	Primario	1:500
α -RNAPII H5	Monoclonal	Primario	1:500
α -RNAPII H14	Monoclonal	Primario	1:500
α -BrdU	Monoclonal	Primario	1:500
Cabra- α -ratón	Policlonal	Secundario	1:400
Cabra- α -conejo	Policlonal	Secundario	1:400
Cabra- α -rata	Policlonal	Secundario	1:400
DAPI			1:1000

Tabla M2. Anticuerpos para inmunofluorescencia.

Relación de los anticuerpos que se han utilizado a lo largo de esta tesis para detección por inmunofluorescencia y las diluciones empleadas. Los anticuerpos secundarios van acoplados a un fluoróforo de la serie Alexa que no se ha indicado en la tabla. El fluoróforo Alexa 488 emite luz verde, el Alexa 594 emite luz roja y el Alexa 647 emite luz azul.

8 INMUNOFLUORESCENCIA

Las células se fijaron durante 20min a temperatura ambiente con 3.7% formaldehído en PBS. Tras 2 lavados con PBS, las células se permeabilizaron por tratamiento con 0.5% Tritón X-100 en PBS durante 5min. Las preparaciones se saturaron con PBS-1% BSA durante 30min y se incubaron durante 45min con los anticuerpos primarios correspondientes en cada caso a la dilución detallada en la Tabla M2, preparados en PBS-0.1% BSA. Tras lavar varias veces con PBS, se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos preparados en la misma solución y se añadió a la mezcla el reactivo DAPI, para detectar el DNA celular. Finalmente, las preparaciones se montaron sobre portaobjetos con ProLong (Invitrogen). Las inmunofluorescencias se analizaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioptot 200 equipado con una unidad confocal BioRad Radiance 2100. Se obtuvieron secciones ópticas de entre 0.2 y 0.3 μ m utilizando el *software* LaserSharp v5.0 (BioRad) y las imágenes se procesaron con el programa LaserPix v4 (BioRad).

9 TINCIÓN DE GELES CON NITRATO DE PLATA

Se fijaron los geles durante 30min en una solución de 40% etanol y 10% ácido acético en agitación suave. Tras la fijación, los geles se incubaron durante 30min en una solución sensibilizante (30% etanol, 0.2% tiosulfato sódico, 0.5M acetato sódico) y se lavaron tres veces durante 3min con agua destilada. Entonces, se incubaron con una solución de nitrato de plata 0.25% durante 20min y se hicieron dos lavados de 30sg con agua destilada. La tinción se reveló incubando los geles en solución de revelado (2.96% carbonato sódico y 0.015% formaldehído) entre 2 y 5min, hasta que las bandas fueron claramente visibles. Entonces, se desechó la solución de revelado y se incubaron los geles durante 10min en solución de parada (40mM EDTA). Los geles se guardaron en agua destilada hasta el momento de cortar las bandas.

10 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Las bandas proteicas se recortaron manualmente del gel previamente teñido con nitrato de plata y procesadas de forma automática en una estación de digestión y preparación Proteineer DP (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) ¹⁴⁰. Se

empleó el protocolo de digestión de Schevchenko ²⁹¹ con ligeras variaciones: las bandas fueron lavadas con 25 μ l de bicarbonato amónico 50mM y luego con 25 μ l acetonitrilo. Se procedió entonces a la reducción con ditiotreitól 10mM en bicarbonato amónico 25 mM a 56°C durante 20min y la alquilación con iodoacetamida 50mM en bicarbonato amónico 50mM a temperatura ambiente durante 15min. A continuación las bandas fueron lavadas con bicarbonato amónico 50mM y acetonitrilo y se secaron a 40°C. Se añadió a las bandas secas tripsina porcina modificada para secuenciación (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.), a una concentración final de 15ng/ μ l en bicarbonato amónico 25mM, 50% acetonitrilo y se dejó una primera etapa de digestión durante 45min a 4 °C. Se añadió bicarbonato amónico 50mM para que prosiguiese la segunda etapa de digestión durante 4h más a 37°C. Se procedió a la extracción de los péptidos tripticos con TFA 0.5% durante 15min. La muestra se secó con calor en una centrifuga de vacío y posteriormente se reconstituyó en 4 μ l de TA (solución de acetonitrilo acuoso al 33% con ácido trifluoroacético al 0.1%) sonicando la muestras durante 3min.

Para la obtención de la huella peptídica mediante MALDI, se depositó manualmente una alícuota de 0,7 μ l de solución matriz (ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico 1g/L en acetonitrilo acuoso al 33% con ácido trifluoroacético al 0.1%) en un portamuestras MALDI AnchorChip™ de 600 μ m que se dejó secar a temperatura ambiente; a continuación se añadieron 0,7 μ l de la mezcla de péptidos eluidos y se dejó secar de nuevo a temperatura ambiente.

Las muestras fueron analizadas de manera automática en un espectrómetro de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight*) Bruker Reflex™ IV (Bruker-Franzen Analytic GmbH, Bremen, Alemania), equipado con fuente de iones SCOUT™, en modo reflector positivo empleando extracción retardada de iones. El voltaje de aceleración de los iones fue de 23 kV.

Cada espectro fue calibrado internamente empleando determinadas señales provenientes de la autoproteólisis de la tripsina. De esta forma la precisión en la medida de las masas se situó típicamente en \pm 30 ppm.

Las masas correspondientes a péptidos tripticos registradas fueron enviadas automáticamente a través del programa MS BioTools™ al programa Mascot™ (Matrix Science, Londres, Reino Unido) para efectuar la búsqueda en la base de datos NCBIInr (<http://www.matrixscience.com>). Respecto a la búsqueda en las bases de datos del NCBIInr, no se establecieron restricciones de taxonomía debidas a la especie de origen, se permitió la pérdida de un corte triptico y la tolerancia se fijó en 100 ppm. El número mínimo de péptidos tripticos necesarios

para el ajuste fue de 4, siendo el p-valor en todo caso inferior al fijado como significativo.

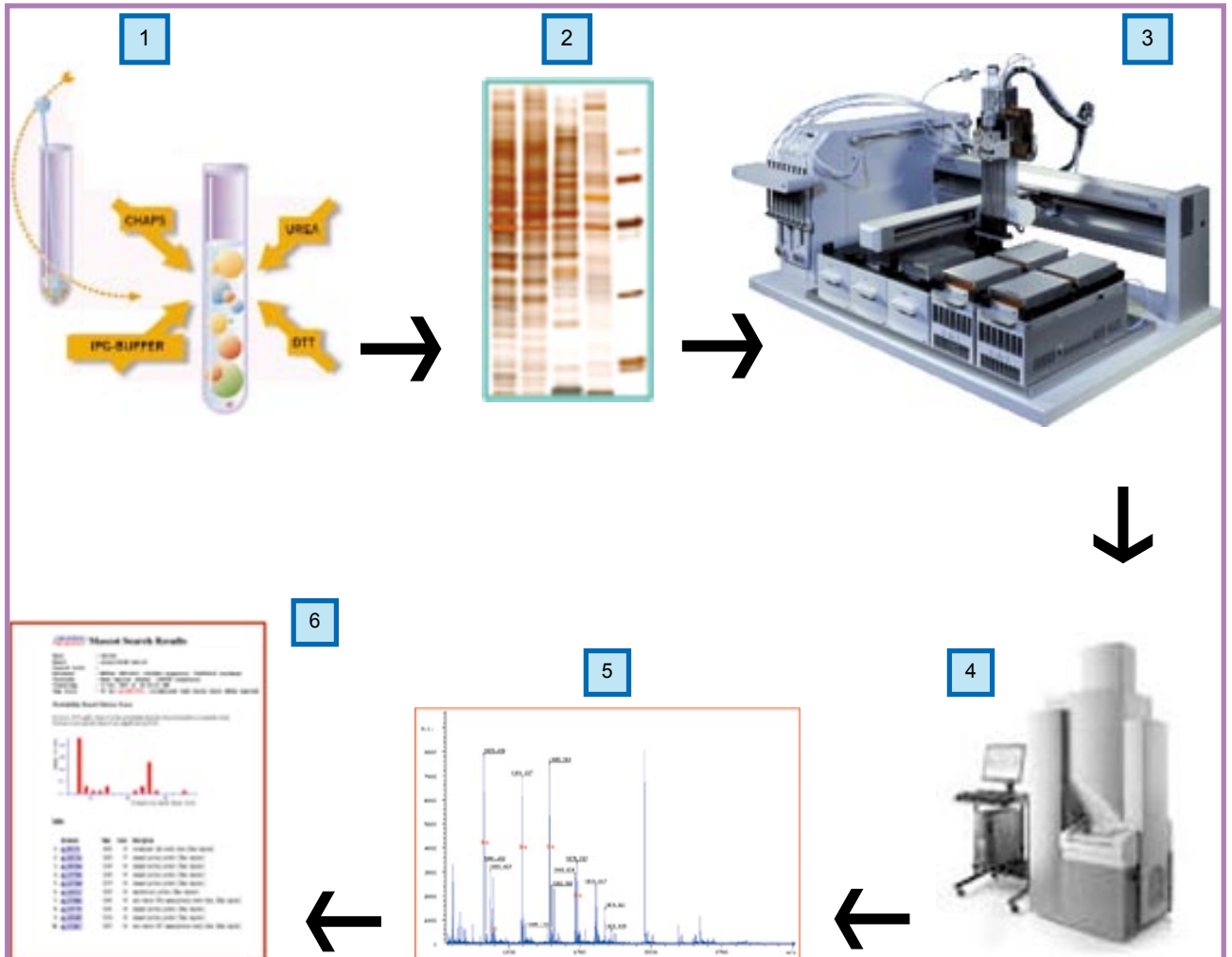


Figura M2. Proceso de identificación de proteínas por MALDI-TOF.

Esquema que representa los diferentes pasos necesarios para la identificación de proteínas a partir de una muestra biológica. 1. Purificación del complejo de proteínas a partir de un extracto celular. 2. Resolución de las bandas correspondientes a las proteínas del complejo por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y detección de las bandas por tinción con nitrato de plata. 3. Procesamiento de las bandas aisladas del gel en una estación de digestión y preparación Proteineer DP. 4. Análisis de las muestras digeridas en un espectrómetro de masas MALDI-TOF. 5. Obtención de la huella peptídica característica y envío de las masas de los péptidos trípticos al programa Mascot™. 6. Búsqueda en las bases de datos del NCBI/nr e identificación de las proteínas.





RESULTADOS



CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE hCLE CON LA POLIMERASA VIRAL

El virus de la gripe se caracteriza por ser un virus de tamaño pequeño y con una muy limitada capacidad codificante. Es general entre los virus la utilización de la maquinaria celular en su propio beneficio, pero esto es más acusado cuanto menor es el tamaño y el número de genes del virus. Por este motivo, el virus de la gripe está obligado a establecer numerosas interacciones con factores de la célula hospedadora que compensen sus carencias funcionales para poder desarrollar su ciclo de infección. Un ejemplo de esta dependencia es la que se da entre la transcripción viral y la transcripción celular, llevada a cabo por el complejo de la RNAPII, pero existen muchas otras etapas a lo largo del ciclo de infección en las que el virus necesita la maquinaria celular, como el transporte de los mensajeros virales del núcleo al citosol y su traducción, el transporte de las RNPs virales para ser empaquetadas en los nuevos viriones y un largo etcétera.

A lo largo del tiempo de duración de esta tesis, en nuestro grupo y en otros⁸⁶ se han encontrado evidencias de asociación física entre la polimerasa viral y el complejo de la RNAPII. Esta asociación parece necesaria para que el virus pueda “robar” las estructuras cap de los premensajeros celulares y utilizarlas como iniciadores para la transcripción viral, pero puede estar implicada en muchos otros procesos que aún no conocemos.

1 hCLE Y PB2 INTERACCIONAN IN VIVO

Datos previos del laboratorio habían caracterizado la interacción de hCLE con la subunidad PA de la polimerasa viral. hCLE se identificó por un ensayo de doble híbrido usando PA como cebo, se había caracterizado la interacción tanto *in vivo* como *in vitro* entre PA y hCLE y se había detectado la presencia de hCLE en RNPs activas purificadas¹⁴⁴.

La polimerasa viral participa en un gran número de procesos complejos, como son la replicación y la transcripción, y no se conocen bien los mecanismos que modulan su actividad, pero dada la gran cantidad de actividades enzimáticas que realiza, parece muy probable la intervención de factores celulares en dicha regulación. Gracias a la información obtenida de la reconstrucción tridimensional a partir de imágenes de microscopía electrónica¹¹, sabemos que la polimerasa se encuentra plegada formando una estructura muy compacta en la que sería posible que un mismo

factor pudiera establecer interacciones con más de una subunidad a la vez. Esto nos llevó a interesarnos por las posibles interacciones adicionales a la de PA que hCLE podría establecer con alguna otra subunidad de este heterotrímero.

1.1. hCLE se nucleariza en células que expresan PB2

La proteína hCLE endógena, así como la proteína HA-hCLE sobreexpresada, presentan una distribución subcelular nuclear y citosólica¹⁴⁴. Datos previos habían mostrado que la sobreexpresión de PA producía un consistente aunque moderado aumento en la localización nuclear de hCLE¹⁴⁴. Por ello decidimos evaluar la nuclearización de hCLE en condiciones de sobreexpresión de las otras subunidades de la polimerasa, como medida de posibles interacciones adicionales entre hCLE y los otros componentes del complejo heterotrímérico. Analizamos también el efecto de la sobreexpresión de la proteína NP, componente de las ribonucleoproteínas. Con este fin, realizamos estudios de inmunofluorescencia para comprobar si la localización subcelular de hCLE era diferente en células que expresaban las proteínas PB1, PB2 y NP individualmente.

Para ello, se transfectaron células COS-1 con el plásmido pCDNA-3-HA-hCLE, junto con uno de los plásmidos pCMV-PB1, pCMV-PB2, pCMV-PA o pCMV-NP, y a las 24 horas post transfección, se fijaron y se hicieron dobles inmunofluorescencias con los anticuerpos anti-HA y uno de los siguientes anti-PB1, anti-PB2, anti-PA o anti-NP. Como se puede ver en la Figura R1A, la proteína HA-hCLE presentaba su distribución normal nuclear y citosólica en las células transfectadas con PB1 y NP, mientras que su localización cambiaba a nuclear cuando se coexpresaba con PB2. La expresión de PA causaba una ligera nuclearización de HA-hCLE, pero mucho menos acusada que el efecto producido por PB2. Tomando el cambio de localización subcelular como indicador de una posible interacción, tendríamos indicios de una interacción adicional entre hCLE y PB2, además de la ya descrita interacción con PA.

Para obtener más datos respecto a esta posible interacción, quisimos comprobar si PB2 era también capaz de nuclearizar a la proteína hCLE endógena. Para ello, se transfectaron células COS-1 con los plásmidos pCMV-PB2 o pCMV-NP, como control de una proteína componente de la RNP viral que no nucleariza a hCLE. Las células fueron tratadas como se ha descrito más arriba. La doble inmunofluorescencia se realizó esta vez con los anticuerpos anti-NP o anti-PB2 y anti-hCLE, que detecta la proteína endógena. Como se muestra en

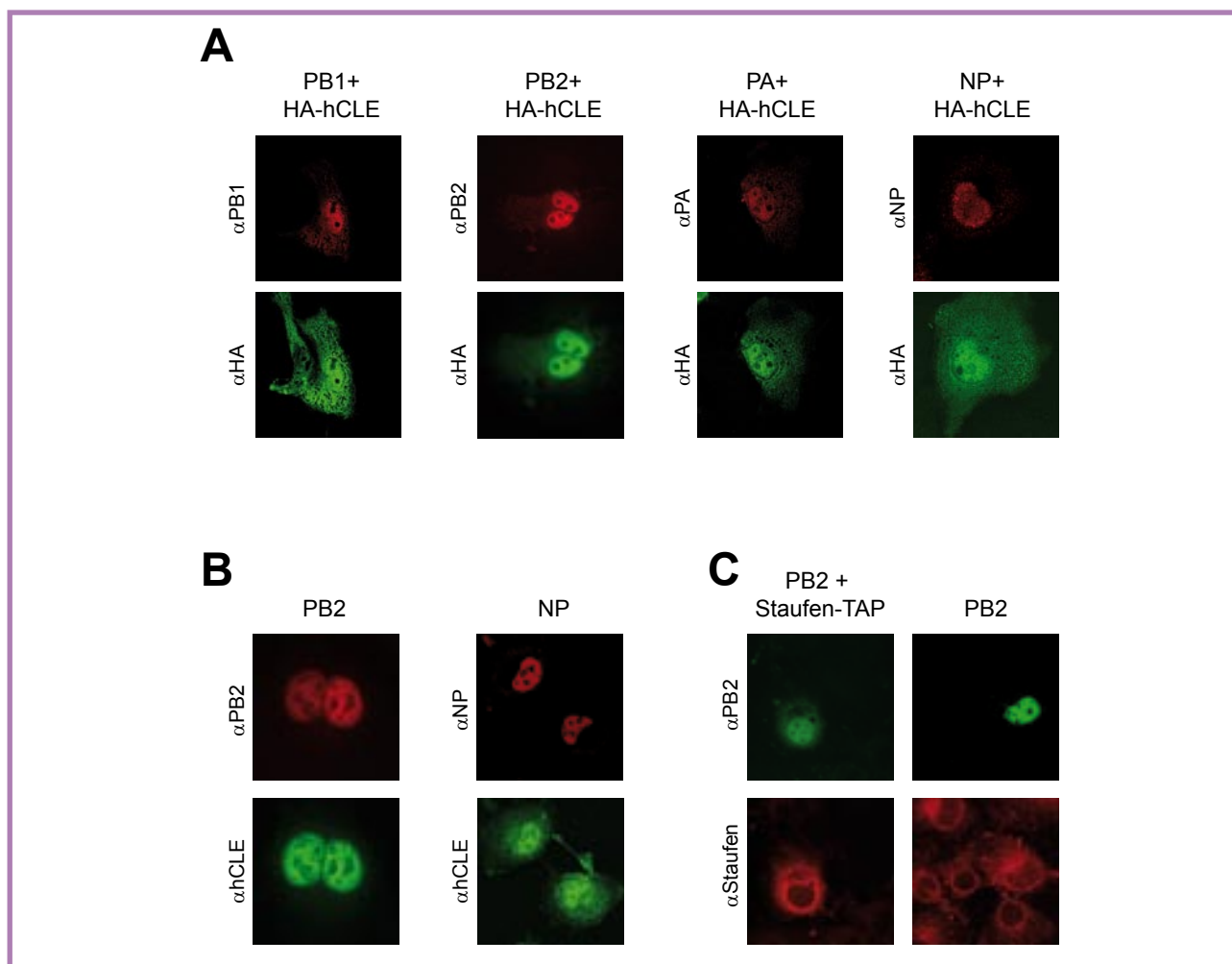


Figura R1. Nuclearización de hCLE al coexpresarse con PB2.

A. Se cotransfectaron células COS-1 con el plásmido que expresa HA-hCLE junto con el que expresa PB1, PB2, PA o NP, en cada caso. 24 horas después de la transfección las células se fijaron y se procesaron para inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo α -HA en todos los casos, junto con el anticuerpo α -PB1, α -PB2, α -PA o α -NP, como se indica en la figura. Las muestras se analizaron por microscopía de fluorescencia. Las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados en cada condición.

B. Se procedió como en el apartado A, excepto que las células se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas virales PB2 o NP, y la proteína hCLE que se detectó fue la endógena. Los anticuerpos utilizados fueron el α -PB2, α -NP o α -hCLE, como se indica en la figura. Las muestras se analizaron por microscopía de fluorescencia. Las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados en cada condición.

C. Se procedió como en los apartados A y B, transfectando el plásmido que expresa PB2 o bien cotransfectando los plásmidos que expresan PB2 y Stauf-TAP. Los anticuerpos que se utilizaron fueron el α -PB2 o α -Staufen. Las muestras se analizaron por microscopía de fluorescencia. Las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados en cada condición.

la Figura R1B, PB2 es capaz de nuclearizar a hCLE endógena de la misma manera que nucleariza la HA-hCLE sobreexpresada, mientras que la expresión de NP no afecta a la distribución de hCLE.

Con el fin de asegurarnos de que la nuclearización de hCLE al coexpresarse con PB2 era específica, realizamos el control de coexpresar PB2 junto con la proteína Stauf-TAP, que se localiza predominantemente en el citosol, y pudimos comprobar que ni la proteína Stauf-TAP endógena ni Stauf-TAP sobreexpresada cambiaban su

distribución subcelular al coexpresarse con PB2 (Figura R1C).

Dados estos resultados, intentamos estudiar el patrón de distribución de hCLE durante la infección. Aunque en algunas ocasiones pudimos observar una clara nuclearización durante la infección, este efecto no ocurría de una manera consistente y repetitiva. Es posible que la infección modifique el patrón de distribución de hCLE, pero al tratarse de un modelo mucho más complejo, dicha modificación podría ser transitoria o tener una regulación temporal

que dificulte la observación de un cambio claro de distribución de hCLE.

1.2. Las RNPs del virus colocalizan con la RNAPII en el núcleo de células infectadas

En una primera aproximación para estudiar la posible asociación entre la RNAPII y la polimerasa viral, realizamos estudios de microscopía confocal en células infectadas para determinar si las RNPs virales compartían puntos de localización intranuclear con los complejos de la RNAPII. Se infectaron células MDCK con el virus de la gripe y a las 3h post infección se fijaron las células y se procesaron para

inmunofluorescencia doble con anticuerpos anti-RNAPII y anti-NP y posterior microscopía confocal. El panel de colocalización de la figura muestra una imagen calculada por el programa Laserpixon, en la que solamente se muestran los puntos en los que coinciden ambas señales y por lo tanto representan puntos exclusivos de colocalización. Como se observa en la Figura R2A, el patrón nuclear punteado que presentan las RNPs virales colocaliza con la distribución nuclear característica de los complejos de la RNAPII. Estos resultados confirman la hipótesis de que las RNPs virales se encuentran en sitios comunes con las factorías de mRNAs celulares y están de acuerdo con los datos

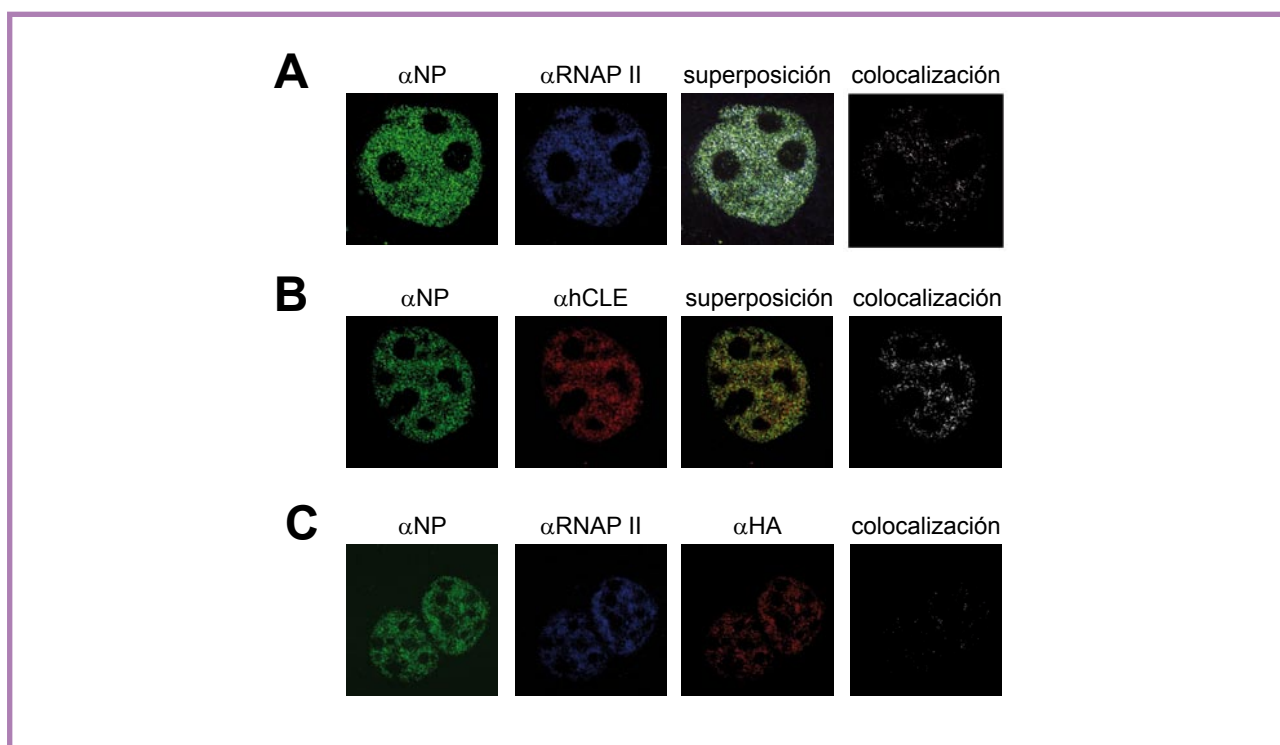


Figura R2. Colocalización de RNAP II, RNPs virales y HA-CLE en el núcleo de células infectadas.

Se infectaron células MDCK con el virus de la gripe (A y B) o se transfectaron células MDCK en suspensión con el plásmido que expresa HA-hCLE y 24 horas después se infectaron con el virus de la gripe (C). A las 3 horas post infección las células se fijaron y se procesaron para inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos α -NP, α -RNAP II (8WG16), α -hCLE o α -HA. Las muestras se analizaron por microscopía confocal y se tomaron cortes focales cada 0.2-0.3 μ m. El panel de colocalización muestra los puntos en los que están presentes ambas (A y B) o las tres señales (C) simultáneamente. Las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados en cada condición.

bioquímicos de asociación de la polimerasa viral con la RNAPII celular ⁸⁶.

1.3. hCLE colocaliza con las vRNPs nucleares en células infectadas

Teniendo en cuenta que se ha descrito la asociación entre la polimerasa viral y la RNAPII por

métodos bioquímicos ⁸⁶ y que hCLE interacciona con PB2, y que podría ser una proteína relacionada con transcripción, nos propusimos estudiar si en el núcleo de células infectadas hCLE se encuentra junto a las RNPs virales. Para ello, infectamos células MDCK con el virus de la gripe y a las 3h post infección las fijamos y las procesamos para

inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal. Las inmunofluorescencias se hicieron utilizando los anticuerpos anti-hCLE y anti-NP y, como se puede observar en la Figura R2B, una gran proporción de la proteína hCLE nuclear se encuentra colocalizando con las RNPs del virus.

Para caracterizar esta asociación más exhaustivamente, quisimos estudiar si había puntos en los que estuvieran simultáneamente la RNAPII, las RNPs virales y hCLE. Para ello, transfectamos células MDCK en suspensión con el plásmido pCDNA-3-HA-hCLE y 24h post transfección las infectamos con el virus de la gripe. A las 3h post infección, fijamos las células y las procesamos para inmunofluorescencia triple con los anticuerpos anti-HA, anti-RNAPII y anti-NP y análisis por microscopía confocal. El resultado se puede ver en la Figura R2C, donde se muestra que existen sitios nucleares donde se detectan las tres señales simultáneamente.

1.4. PB2 co-inmunoprecipita con hCLE en extractos nucleares

Para estudiar más directamente la interacción entre hCLE y PB2, se llevaron a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación. Para ello, se transfectaron células HEK293T con el plásmido pCMV-PB2, y 24h post transfección se prepararon extractos nucleares que se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-hCLE o bien con un anticuerpo irrelevante como control. La fracción inmunoprecipitada de los extractos se analizó por electroforesis en gels de SDS-poliacrilamida 15% y 5M urea y posterior Western blot. La adición de urea a los gels de SDS-poliacrilamida permite la separación de hCLE de la inmunoglobulina ligera perteneciente al anticuerpo utilizado para inmunoprecipitar. Como se puede ver en la Figura R3, la proteína hCLE endógena inmunoprecipita con

el anticuerpo anti-hCLE y no con el suero control. Por otra parte, la proteína PB2 aparece claramente en los inmunoprecipitados de hCLE y está ausente en los inmunoprecipitados control.

1.5. PB2 co-purifica con hCLE en cromatografías de afinidad de análogos de cap

Con la información que se puede desprender de los resultados anteriores, se plantea un escenario en el que, en células infectadas por gripe, las RNPs virales se encuentran asociadas a los complejos de transcripción de la RNAPII y en una proporción importante de esos sitios se localiza hCLE. Por otra parte, tenemos evidencias de que hCLE y PB2 tienen una interacción *in vivo*, y se ha descrito que PB2 es la subunidad que reconoce las estructuras cap para que se lleve a cabo el “robo de cap”, o *cap snatching* por parte de la polimerasa viral ^{31 36, 299, 333}. Hasta el momento no se ha demostrado la capacidad de PB2 por sí sola de unirse a estas estructuras, por lo que se piensa que puede necesitar a las otras subunidades de la polimerasa o a algún factor celular para llevar a cabo esta interacción. Además, como veremos más adelante (apartado 2.2.1. y Figura R14), hCLE se asocia a estructuras cap en extractos de células no infectadas. Teniendo en cuenta este escenario, quisimos comprobar si hCLE podría jugar un papel en la interacción de PB2 con el cap de los pre-mRNAs celulares. Para investigar esta hipótesis, llevamos a cabo ensayos de cromatografía de afinidad con resinas acopladas a análogos de cap en extractos de células que sobreexpresan PB2. Como control del buen funcionamiento de la cromatografía con resinas de Met⁷GTP-Sepharosa 4B, se analizó la purificación del factor de traducción eIF4E, que es la proteína de unión a cap de la maquinaria de traducción celular.

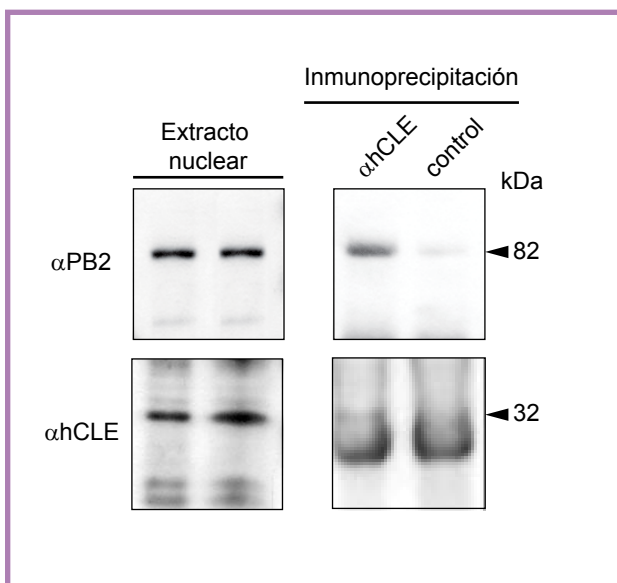


Figura R3. Inmunoprecipitación de PB2 con hCLE en extractos nucleares.

Se transfectaron células HEK293T con el plásmido que expresa PB2 y 24 horas después de la transfección se recogieron las células y se prepararon extractos nucleares. Estos extractos se utilizaron en ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo α -hCLE o un suero irrelevante como control. Tanto los extractos nucleares de partida como la fracción inmunoprecipitada se resolvieron por electroforesis en gels de SDS-poliacrilamida y se analizaron por Western blot utilizando los anticuerpos α -PB2 o α -hCLE para la parte superior o inferior del gel respectivamente.

Como se muestra en la Figura R4, PB2 y hCLE co-purifican en las cromatografías con las resinas de Met⁷GTP-Sepharosa 4B, pero ninguna de las dos se purifica con la resina control. Datos no publicados del

laboratorio de Juan Ortín indican que PB2 expresada individualmente y purificada presenta muy poca afinidad por las resinas de análogos de cap. Estos datos indican que hCLE y PB2 se mantienen unidas

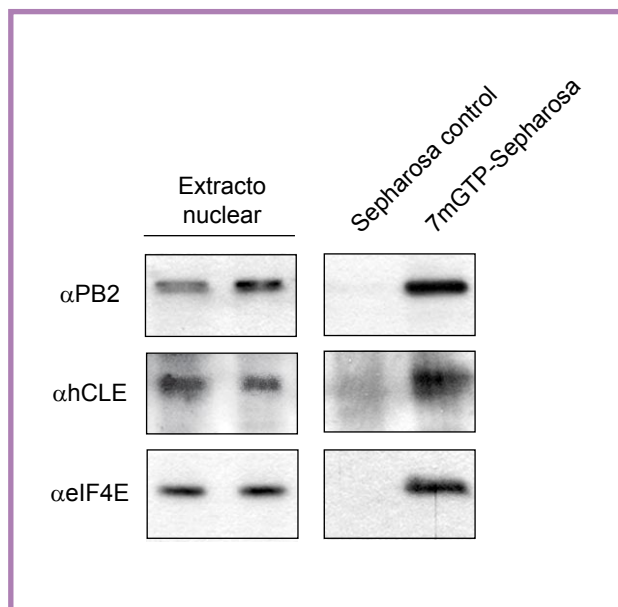


Figura R4. Copurificación de hCLE y PB2 en resinas de análogos de cap.

Se transfectaron células HEK293T con el plásmido que expresa PB2 y 24 horas después de la transfección se recogieron las células y se prepararon extractos nucleares. Los extractos nucleares se utilizaron para realizar ensayos de cromatografía de afinidad con resina m⁷GTP-Sepharosa o Sepharosa control. Tanto los extractos nucleares de partida como la fracción retenida en las resinas se resolvieron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y se analizaron por Western blot utilizando los anticuerpos α-PB2 o α-hCLE para la parte superior o inferior del gel respectivamente y el anticuerpo α-eIF4E como control del funcionamiento de la resina m⁷GTP-Sepharosa.

e interaccionan con estructuras cap, posiblemente a través de hCLE, aunque no podemos descartar que hCLE o PB2 tengan capacidad para unirse a estas estructuras individualmente.

2 hCLE Y PB2 INTERACCIONAN IN VITRO

Una vez mostrada la interacción entre hCLE y PB2 en diferentes sistemas *in vivo*, quisimos comprobar si estas dos proteínas eran capaces de interaccionar *in vitro*.

2.1. Interacción entre PB2-His y HA-hCLE mediante cromatografía de afinidad

Con este propósito realizamos ensayos de cromatografía de afinidad entre PB2 y hCLE. Para ello, se utilizó la proteína PB2-His, la cual se expresó en bacterias y purificó mediante cromatografía en resinas de Ni²⁺. Como controles positivo y negativo, se purificaron de la misma manera las proteínas His-PAΔ1-464 e His-4GI157-550, respectivamente (Figura R5A). Elegimos His-PAΔ1-464 como control positivo porque fue la proteína utilizada para demostrar la interacción *in vitro* entre hCLE y PA¹⁴⁴. Es un mutante de delección de PA que se utiliza debido a que la proteína PA entera no se puede expresar en bacterias, ya que resulta muy tóxica para ellas, y este mutante sí es capaz de acumularse de manera apreciable. Por otra parte, elegimos

His-4GI157-559 como control negativo porque se había visto previamente que es una proteína que no interacciona *in vitro* con hCLE¹⁴⁴. Las resinas con sus correspondientes proteínas unidas se incubaron con proteína HA-hCLE expresada en un sistema de transcripción-traducción acopladas *in vitro* y marcada con ³⁵S-Met/Cys. Tras lavar extensivamente, se analizó la proteína HA-hCLE retenida en las resinas por electroforesis en geles de poliácridamida y autorradiografía. Como se muestra en la Figura R5B, HA-hCLE se retiene en la resina que contiene PB2-His, incluso mostrando una mejor interacción que con His-PA, y no se retiene en la resina que contiene His-4GI.

2.2. El tercio amino terminal de PB2 es suficiente para interaccionar con hCLE

Con el objetivo de detallar un poco más la región de PB2 implicada en la interacción, se llevó a cabo un ensayo de cromatografía de afinidad similar al anterior, pero utilizando la proteína PB2-256-His, que se muestra purificada en la Figura R5A. Esta proteína es un mutante de delección de PB2 que contiene sus 256 aminoácidos amino terminales con una cola de histidinas unida en su extremo carboxilo. En la Figura R5B se puede ver que la retención de HA-hCLE en esta resina es de una afinidad similar a la que presenta con la proteína PB2 completa.

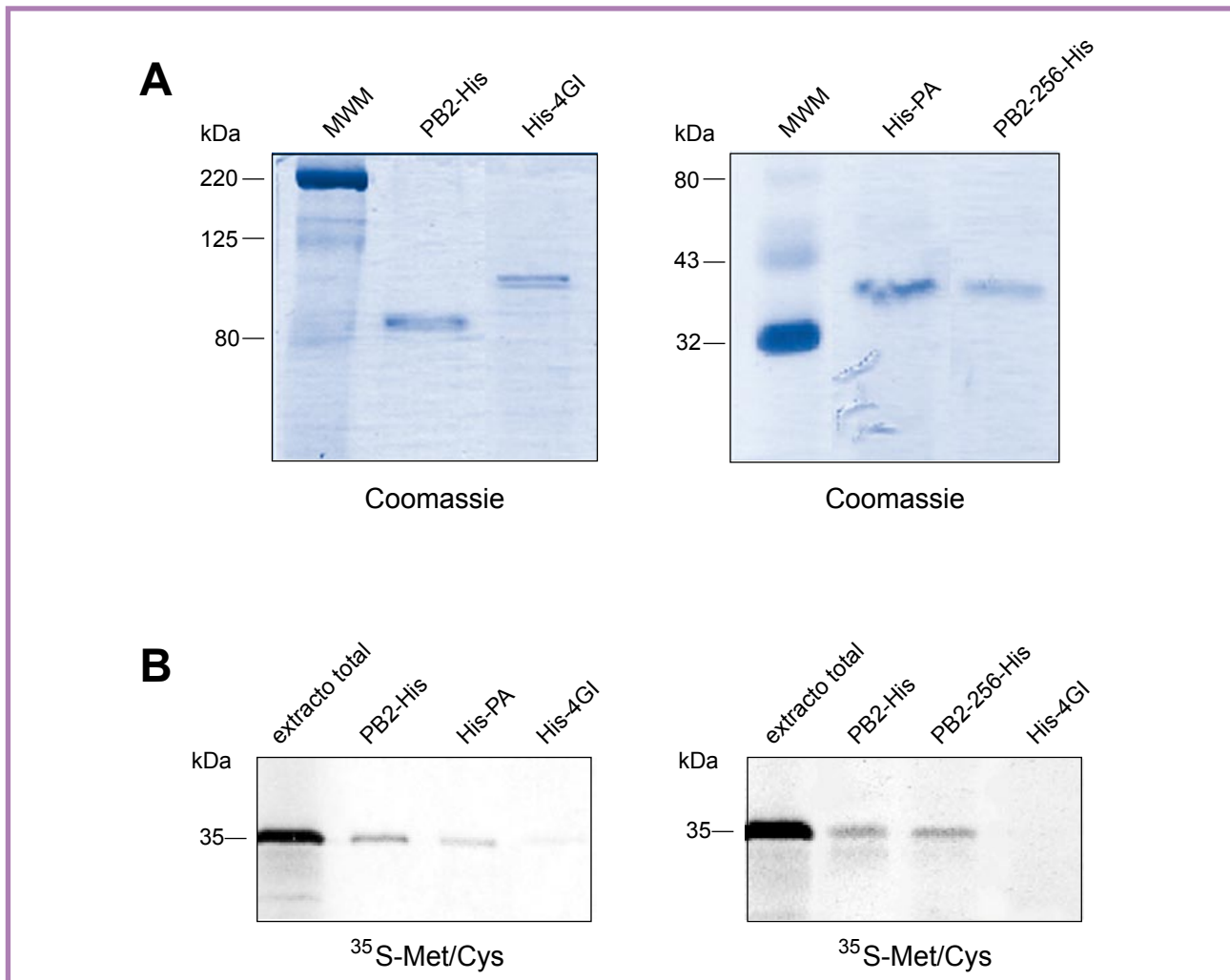


Figura R5. Interacción *in vitro* de PB2 con HA-hCLE.

A. Se expresaron en bacterias las proteínas PB2-His, PB2-256-His, His-PA e His-4GI y se purificaron por cromatografía de afinidad en resinas de Ni²⁺. Las proteínas purificadas se resolvieron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y se visualizaron mediante tinción con Coomassie, para comprobar el rendimiento y pureza de la purificación.

B. Las proteínas purificadas anteriormente se utilizaron para ensayos de cromatografía de afinidad incubándose con un extracto de transcripción-traducción acopladas *in vitro* en el que se había expresado y marcado con ³⁵S-Met/Cys la proteína HA-hCLE. Tanto el extracto total en el que se expresó HA-hCLE como las fracciones retenidas en las resinas se resolvieron por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida y se analizaron por autorradiografía.

CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN CELULAR DE hCLE

Cuando hCLE fue identificada en nuestro laboratorio, su secuencia se contrastó con las secuencias existentes en las bases de datos. El resultado más llamativo de esta búsqueda fue la altísima homología que presentaba con la proteína CLE7 de *Gallus gallus* (81% de identidad), y que dio pie a llamar a la proteína recién identificada hCLE (*human CLE*). Además, se encontraron homólogos en otras especies más alejadas evolutivamente de

la humana, como *Caenorhabditis elegans* (31,2% de identidad) (Figura I5A), lo cual indicaba que se trataba de una proteína altamente conservada. Todos los anteriores resultados mostraban proteínas cuya función era hasta ese momento desconocida. Por último, se encontró que hCLE presentaba un 38% de homología de secuencia con la parte central de una proteína de *Saccharomyces cerevisiae* llamada Spt16 o Cdc68 (Figura I5B).

Spt16 es una proteína de 1053 aminoácidos esencial para la levadura, con distribución nuclear y que es necesaria para la transactivación de numerosos genes, así como para la represión de otros, función que desempeña manteniendo la estructura de la cromatina.

1 FUNCIÓN NUCLEAR DE hCLE

La proteína de levadura Spt16 se asocia a la proteína Pob3, para formar el complejo CP, o yFACT (*yeast FACT*)³⁹. Este complejo tiene análogos en otras especies, como DUF en *Xenopus laevis*²⁴⁸, DRE en *Drosophila melanogaster*³⁰⁵, FACT en humanos²⁵¹, y otros. Dada la función reguladora de la transcripción que tienen estos complejos^{182, 250} y la similitud de secuencia de hCLE como único dato que nos pudiera acercar a su función, decidimos explorar la posibilidad de que la función de hCLE en el núcleo estuviera relacionada con la transcripción.

A) ASOCIACIÓN FÍSICA DE hCLE A LOS COMPLEJOS DE RNAPII

1.1. hCLE colocaliza con los complejos de la RNAPII

Para comprobar si hCLE se asociaba a la maquinaria de síntesis de mRNA, se llevaron a cabo estudios de doble inmunofluorescencia y posterior análisis por microscopía confocal en células MDCK. Los dobles marcajes se realizaron con un anticuerpo anti-hCLE en todos los casos junto con uno de tres anticuerpos que reconocen diferentes estados de fosforilación de la subunidad mayor de la RNAPII. Estos anticuerpos son: 8WG16, que reconoce la forma hipofosforilada y parcialmente fosforilada en Ser5; H14, que reconoce la forma hiperfosforilada en Ser5 y H5, que reconoce la forma hiperfosforilada en Ser2 del dominio CTD²⁵⁴. Se utilizó el tipo celular MDCK, a pesar de no tratarse de células humanas, por ser células que presentan gran adherencia y esto las hace idóneas para la técnica utilizada más adelante en el apartado 2.1.3.

Como se puede apreciar en la Figura R6A, existe una buena colocalización entre la proteína hCLE nuclear y las tres formas de fosforilación de la RNAPII.

1.2. hCLE coimmunoprecipita con la subunidad mayor de la RNAPII

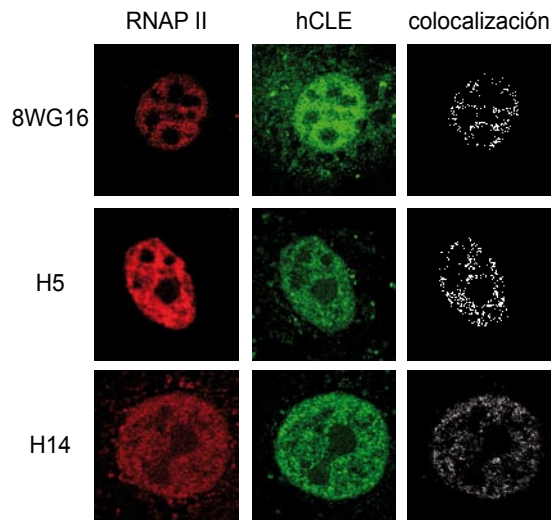
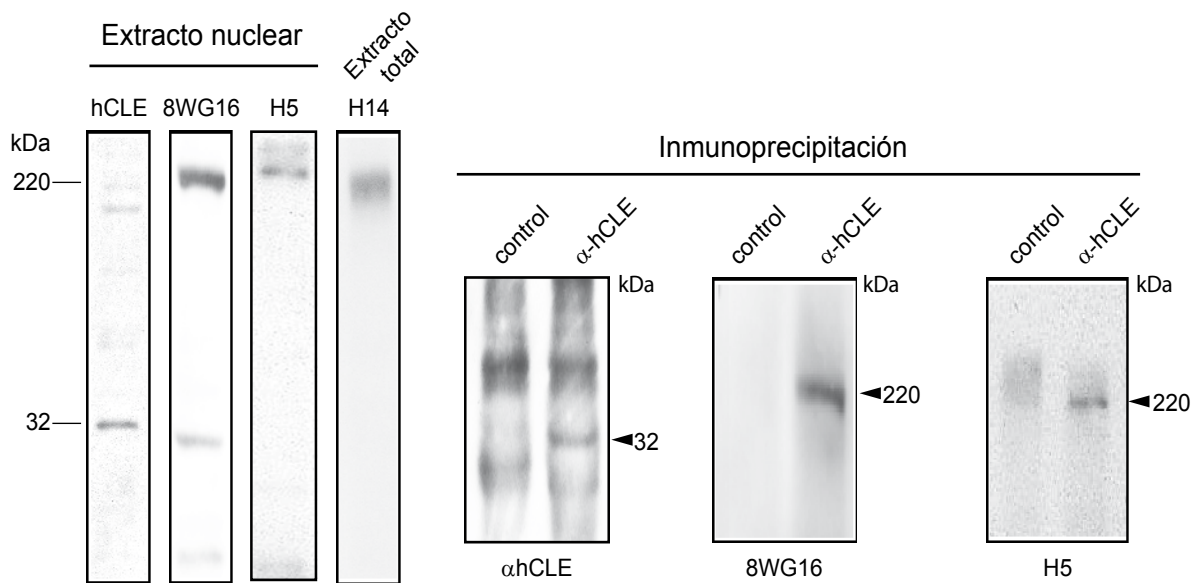
Continuando con la caracterización de la asociación entre hCLE y los complejos de transcripción de la RNAPII, llevamos a cabo

ensayos de inmunoprecipitación con un anticuerpo específico anti-hCLE en extractos nucleares de células HEK293T. Como se muestra en la Figura R6B, la proteína hCLE inmunoprecipita con el anticuerpo anti-hCLE y no con un anticuerpo control, y al inmunoprecipitar hCLE, coimmunoprecipitan dos de las tres formas de fosforilación de la RNAPII, las reconocidas por los anticuerpos 8WG16 y H5. Estos resultados muestran que tanto la forma hipofosforilada como la hiperfosforilada en Ser2, se encuentran físicamente asociadas a hCLE. También se intentó co-inmunoprecipitar la forma hiperfosforilada en Ser5, pero a pesar de que esta isoforma se detecta en el extracto total, por razones que desconocemos no pudimos detectarla en los extractos nucleares, por lo que no fue posible evaluar su capacidad de asociación con hCLE.

1.3. hCLE está presente en sitios de transcripción activa

Puesto que hCLE se asocia físicamente a la RNAPII, quisimos comprobar si los sitios de colocalización eran puntos de transcripción activa, o si por el contrario eran reservorios de complejos inactivos. Para ello, realizamos ensayos de marcaje *in situ* de la síntesis de RNA en células MDCK, como se detalla en el apartado 3.1.1. de Materiales y Métodos. El ensayo consistió básicamente en permeabilizar células vivas que previamente habían sido sembradas sobre cubreobjetos y ponerlas en contacto con una solución que contiene los componentes necesarios para la reacción de transcripción y un nucleótido marcado con bromo (Br-UTP), durante una hora. Tras el pulso de síntesis de RNA, las células se fijaron y se procesaron para inmunofluorescencia. El RNA sintetizado durante el pulso se detectó con un anticuerpo anti-bromodeoxiuridina (anti-BrdU) y hCLE se detectó con el anticuerpo anti-hCLE. Comprobamos que la marca obtenida era realmente síntesis de RNA porque su aparición era dependiente de la presencia en la mezcla de los cuatro ribonucleótidos (ATP, CTP, GTP y Br-UTP, resultados no mostrados). Como se muestra en la Figura R7, la síntesis de RNA presentaba un patrón punteado y hCLE estaba presente en una fracción importante de los sitios de transcripción.

Para asegurarnos de que la colocalización ocurría entre hCLE y sitios de transcripción mediada por RNAPII, llevamos a cabo el mismo experimento en presencia de α -amanitina a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. A esta concentración de dicha droga se inhiben tanto la RNAPII como la RNAPIII, por lo que la única síntesis será la mediada por la RNAPI y, por lo tanto, de localización nucleolar. Como esperábamos, hCLE no colocaliza con los sitios de transcripción de la RNAPI (Figura R7). También se llevó a cabo este experimento a una concentración de α -amanitina de 5 $\mu\text{g/ml}$, para inhibir la actividad

A**B****Figura R6. Asociación física de hCLE a la RNAP II.**

A. Se procesaron células MDCK para doble inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo α -hCLE en todos los casos en combinación con uno de los tres anticuerpos α -RNAP II, que reconocen distintas formas de fosforilación de su dominio CTD, como se explica en el texto. Las muestras se analizaron por microscopía confocal, tomándose secciones focales cada 0.2-0.3 μ m. El panel de colocalización muestra aquellos puntos en los que coinciden ambas señales.

B. Se prepararon extractos nucleares de células HEK293T y se utilizaron para ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo α -hCLE o un suero irrelevante como control. Tanto los extractos nucleares como la fracción inmunoprecipitada se resolvieron por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida y se analizaron por Western blot con los anticuerpos α -hCLE, 8WG16 o H5. Se incluye un Western blot de un extracto total de células HEK293T utilizando el anticuerpo H14, ya que no fue posible detectar esta forma de fosforilación de la RNAP II en los extractos nucleares.

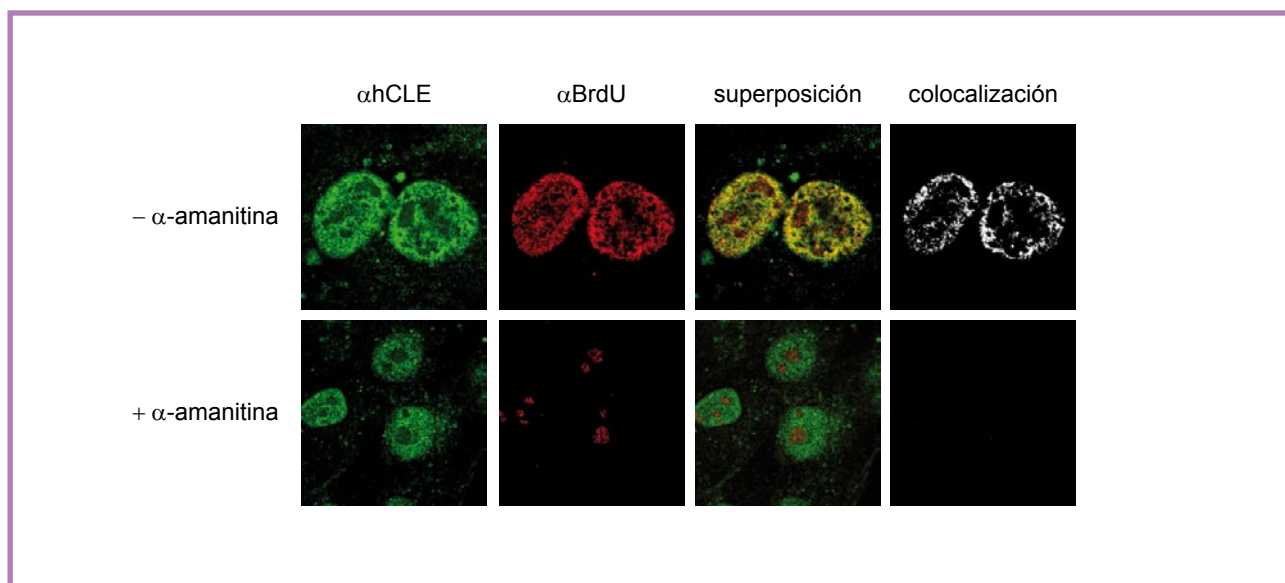


Figura R7. Colocalización de hCLE con sitios de transcripción activa de RNAP II.

Se crecieron células MDCK sobre cubreobjetos y se permeabilizaron suavemente. Se incubaron durante 1 hora con una mezcla con los componentes necesarios para la reacción de transcripción en la que se incluyó un nucleótido marcado con bromo (Br-UTP). La transcripción se llevó a cabo en presencia (parte inferior) o ausencia (parte superior) de α -amanitina a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ para inhibir la RNAP II. Tras la reacción, las células se fijaron y se procesaron para doble inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos α -hCLE y α -BrdU, que detecta el Br-UTP incorporado al RNA sintetizado durante el pulso. Las muestras se analizaron por microscopía confocal, tomándose secciones focales cada 0.2-0.3 μm . El panel de colocalización muestra los puntos en los que coinciden ambas señales. Las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados en cada condición.

de la RNAPII pero mantener activas la RNAPI y RNAPIII. En estas condiciones, la señal de síntesis no nucleolar debida a RNAPIII que obtuvimos fue tan débil, que no nos permitió el análisis de su colocalización con hCLE (resultados no mostrados). Por lo tanto, podemos afirmar que la síntesis no nucleolar detectada en ausencia de la droga se debe en su inmensa mayoría a la actividad de la RNAPII.

1.4. La asociación entre hCLE y la RNAPII es independiente de la actividad transcripcional

Ya que habíamos visto que hCLE está presente en sitios de síntesis activa de mRNA, quisimos estudiar si la asociación física con los complejos de la RNAPII estaría supeditada a que dichos complejos fueran activos. Con este objetivo, realizamos un pulso de síntesis de RNA durante una hora en presencia de α -amanitina a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. Tras el pulso, las células se fijaron y procesaron para triple inmunofluorescencia y posterior microscopía confocal, utilizando los siguientes anticuerpos: anti-hCLE, anti-BrdU y el anti-RNAPII correspondiente (8WG16, H5 o H14). El pulso de síntesis de RNA y el marcaje con el anticuerpo anti-BrdU se hicieron

como control de que la transcripción mediada por RNAPII estaba completamente inhibida. En estas condiciones, la localización subcelular de hCLE no experimentó cambios, como ya se había visto con anterioridad en el apartado 2.1.3, y tampoco lo hizo la distribución de las formas hipofosforilada (Figura R8A, panel 8WG16) e hiperfosforilada en Ser2 (Figura R8A, panel H5) de la RNAPII. La forma hiperfosforilada en Ser5, que está implicada en la iniciación de la transcripción¹⁷⁶, sí cambió ligeramente su localización (comparar el panel H14 con los paneles 8WG16 y H5 de la Figura R8A), aunque en estas condiciones aún existe colocalización con hCLE. Por otra parte, la inhibición de la transcripción durante 1h con α -amanitina no afecta a los niveles de acumulación de las tres formas de fosforilación de la RNAPII, como pudimos ver por Western blot de extractos celulares de células HEK293T sometidas a las mismas condiciones (Figura R8B).

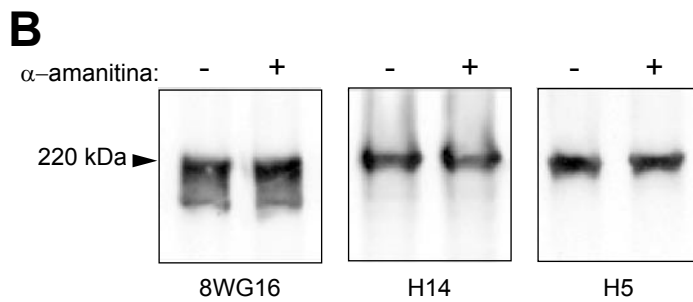
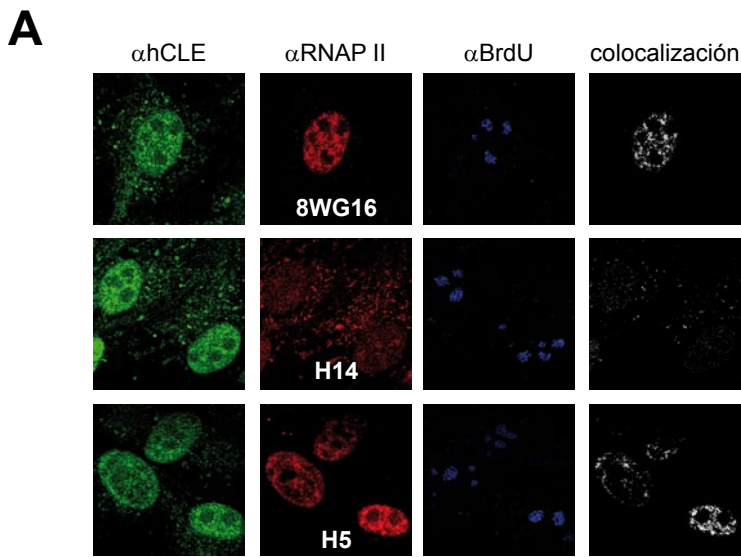


Figura R8. Asociación entre hCLE y RNAP II en condiciones de inhibición de la transcripción.

A. Se crecieron células MDCK sobre cubreobjetos y se permeabilizaron suavemente. Se incubaron durante 1 hora con una mezcla con los componentes necesarios para la reacción de transcripción en la que se incluyó un nucleótido marcado con bromo (Br-UTP) y α -amanitina a una concentración de 100 μ g/ml. Tras la reacción, las células se fijaron y se procesaron para triple inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos α -hCLE, α -BrdU, que detecta el Br-UTP incorporado al RNA sintetizado durante el pulso, y el anticuerpo correspondiente α -RNAP II (8WG16, H14 o H5). Las muestras se analizaron por microscopía confocal, tomándose secciones focales cada 0.2-0.3 μ m. El panel de colocalización muestra los puntos en los que coinciden las señales provenientes de hCLE y de la forma de fosforilación de la RNAP II correspondiente en cada caso. Las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados en cada condición.

B. Se trataron células HEK293T con α -amanitina a una concentración de 100 μ g/ml durante 1 hora y se llevaron células sin tratar como control. Después del tratamiento, se recogieron y se prepararon extractos totales. Los extractos se resolvieron por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida y se analizaron por Western blot con los anticuerpos 8WG16, H5 y H14, que reconocen diferentes formas de fosforilación de la RNAP II.

B) RELACIÓN FUNCIONAL DE hCLE CON LA TRANSCRIPCIÓN MEDIADA POR RNAPII

A continuación, quisimos profundizar en el estudio de la función de hCLE y en su posible papel en la transcripción celular. Para estos estudios nos servimos de una herramienta de gran utilidad que es el silenciamiento génico mediante RNA interferente (RNAi). En el laboratorio se había puesto a punto un sistema de silenciamiento de hCLE para el que se había generado una construcción con una secuencia de 23 nucleótidos, que comprende los nucleótidos 121 a 143 de la secuencia codificante de hCLE, en el plásmido pSUPER⁴³. Este plásmido expresa un transcrito de RNA capaz de formar una horquilla de RNA de doble cadena (shRNA, *short-hairpin RNA*). La expresión de este RNA se hace bajo el control

del promotor de la histona H1, del tipo RNAPIII (ilustrado en Figura M1). Como control negativo de silenciamiento utilizamos una construcción pSUPER-DgK α ¹⁴, que expresa un RNAi que induce el silenciamiento de la proteína DgK α , que no se expresa en el tipo celular utilizado (HEK293T)¹⁴.

1.5. La transfección de la construcción pSUPER-hCLE induce el silenciamiento de hCLE endógena

Para poder estudiar el efecto que producía la ausencia de hCLE, primero pusimos a punto las condiciones de silenciamiento. Para ello, se transfectaron células HEK293T con las

construcciones pSUPER-hCLE o pSUPER-DgK α . 48h post transfección, se aisló el RNA total y la expresión del gen de hCLE se analizó por Northern blot con una ribosonda complementaria al mRNA. Como se muestra en la Figura R9A, se detectan dos especies de RNA de hCLE, una de aproximadamente 4,4kb, correspondiente al mRNA no procesado y otra de menor movilidad. La acumulación de ambas formas disminuyó en las células transfectadas con pSUPER-hCLE.

También analizamos los niveles de proteína hCLE presente en las células transfectadas con cada una de las construcciones. Se transfectaron células

HEK293T con las construcciones pSUPER-hCLE o pSUPER-DgK α y se llevaron en paralelo células sin transfectar (control). 48h post-transfección, se aislaron los núcleos y las muestras se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo anti-hCLE. La misma membrana se utilizó con un anticuerpo anti- β -tubulina, como control de carga. Como se puede ver en la Figura R9B, los niveles de la proteína hCLE disminuyeron de manera importante en las células transfectadas con la construcción pSUPER-hCLE en comparación con las células sin transfectar (control), y no se vieron afectados por la transfección de la construcción pSUPER-DgK α .

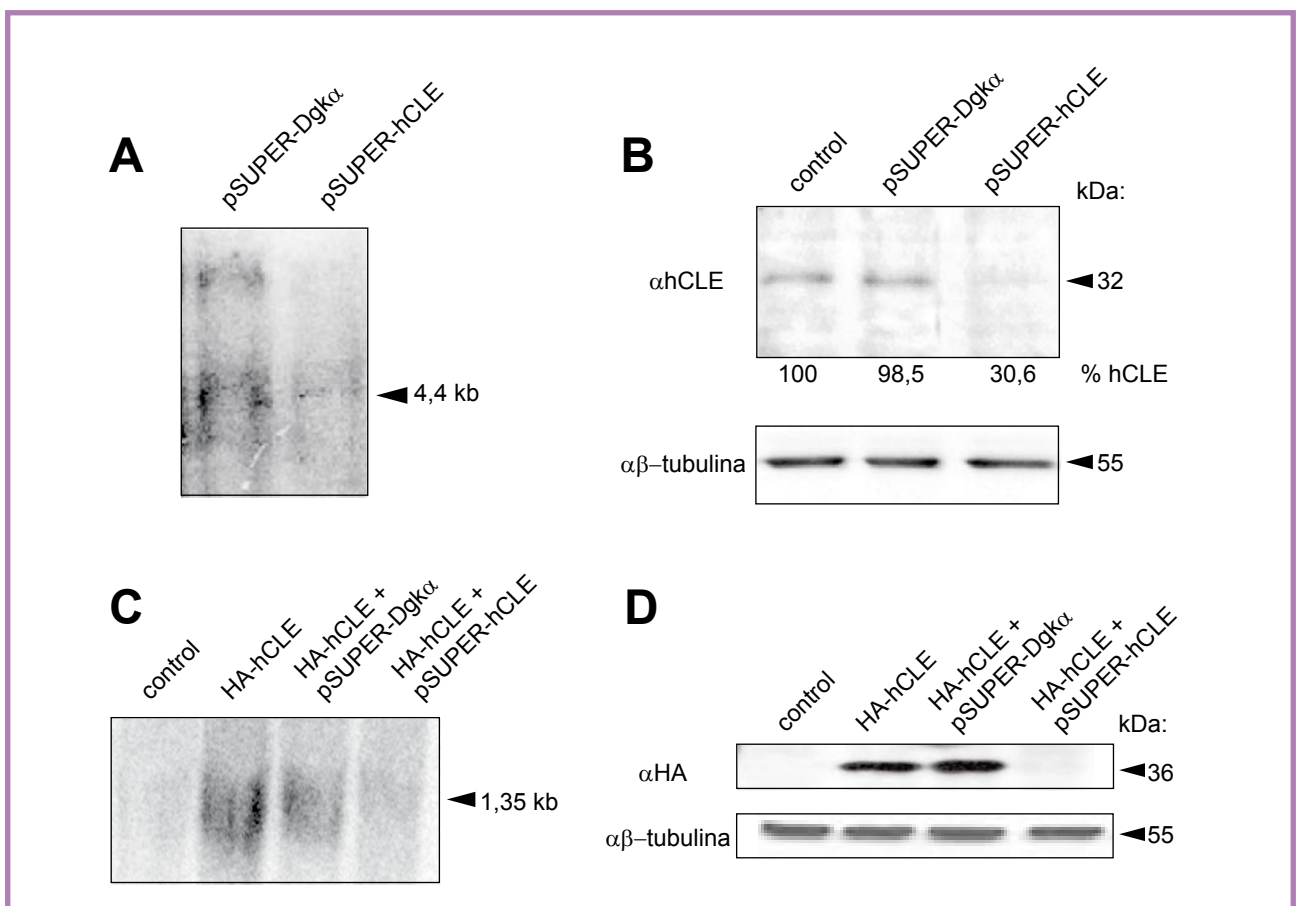


Figura R9. Silenciamiento génico de hCLE con RNAi.

A y B. Se utilizaron células HEK293T sin transfectar o transfectadas con el plásmido de silenciamiento pSUPER-hCLE o con el plásmido control pSUPER-Dgk α . 48 horas después de la transfección se aisló RNA total celular y se analizó por Northern blot con una ribosonda complementaria al mRNA de hCLE (A), o se aislaron los núcleos de las células y se analizaron por Western blot utilizando los anticuerpos α -hCLE y α - β -tubulina (B). Los niveles de β -tubulina se analizaron como control de carga.

C y D. Se utilizaron células HEK293T sin transfectar, transfectadas con el plásmido que expresa HA-hCLE, o cotransfectadas con este plásmido junto con las construcciones de silenciamiento (pSUPER-hCLE y su control pSUPER-Dgk α). 48 horas después de la transfección se aisló RNA total celular y se analizó por Northern blot con una ribosonda complementaria al mRNA de hCLE (C) o se aislaron los núcleos de las células y se analizaron por Western blot utilizando los anticuerpos α -HA y α - β -tubulina (D). Los niveles de β -tubulina se analizaron como control de carga.

1.6. La construcción pSUPER-hCLE también induce el silenciamiento de la proteína HA-hCLE sobreexpresada

Como muestra de la especificidad del silenciamiento de hCLE con este sistema, llevamos a cabo los mismos ensayos que en el apartado anterior, pero co-transfectando la construcción pCDNA-3-HA-hCLE junto con las construcciones de silenciamiento (pSUPER-hCLE) y su control (pSUPER-DgK α). También se llevaron en paralelo células transfectadas solamente con pCDNA-3-HA-hCLE.

Como se puede ver en la Figura R9, paneles C y D, tanto los niveles de acumulación de la proteína HA-hCLE sobreexpresada como de su mRNA disminuyen en las células transfectadas con el plásmido de silenciamiento. Por lo tanto, el silenciamiento de hCLE es eficaz tanto con la proteína endógena como con una proteína HA-hCLE sobreexpresada.

1.7. El silenciamiento de hCLE produce una importante disminución en la transcripción celular

Una vez puestas a punto las condiciones de silenciamiento de hCLE, procedimos al estudio de su efecto en la transcripción celular. Para ello, se transfectaron células HEK293T con el plásmido de silenciamiento o con el plásmido control y 48h post transfección se aislaron los núcleos y se conservaron de manera que permanecieran activos. Estos núcleos fueron utilizados para ensayar la actividad de la RNAPII mediante reacciones de síntesis de RNA *in vitro* con un nucleótido marcado radiativamente en presencia o ausencia de α -amanitina a una concentración de 5 μ g/ml. Las muestras se procesaron como se detalla en el apartado 3.1.3. de Materiales y Métodos y la síntesis de RNA se analizó por Northern blot y se cuantificó en un Phosphorimager utilizando el

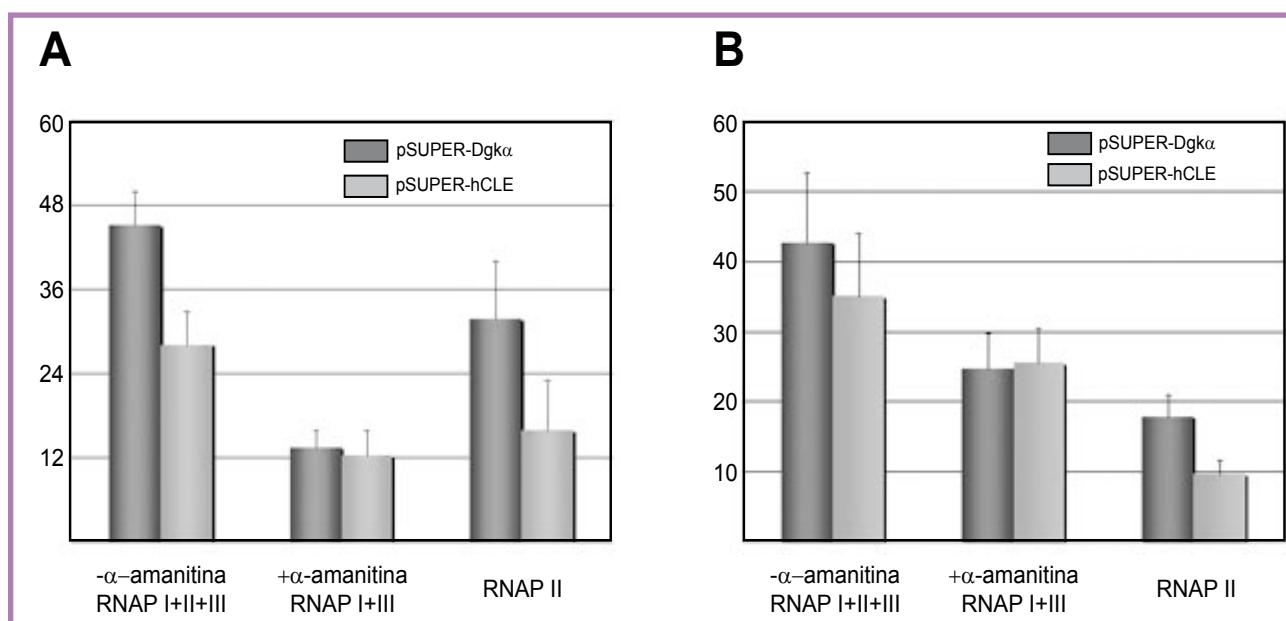


Figura R10. Efecto del silenciamiento de hCLE en la actividad de la RNAP II.

Se transfectaron células HEK293T con el plásmido de silenciamiento pSUPER-hCLE o con el plásmido control pSUPER-Dgk α .

A. 48 horas después de la transfección se aislaron los núcleos y se conservaron de manera que permanecieran activos. Estos núcleos fueron utilizados para llevar a cabo ensayos de síntesis de RNA *in vitro* con un nucleótido marcado radiativamente y en presencia o ausencia de α -amanitina. Tras el pulso de síntesis, se aisló el RNA y se analizó por Northern blot. La cuantificación se realizó en un Phosphorimager, y en la gráfica se muestra la media de cinco experimentos por triplicado, en unidades arbitrarias.

B. 48 horas después de la transfección se permeabilizaron las células y se llevó a cabo un ensayo de transcripción *in situ* con un nucleótido marcado radiativamente, en presencia o ausencia de α -amanitina. Tras la síntesis, se aisló el RNA y se cuantificó la radiactividad incorporada. Los datos se normalizaron por cantidad de RNA total aislado de cada muestra. Cada punto se llevó por triplicado, y la gráfica representa la media en unidades arbitrarias.

En ambos casos, la síntesis debida a RNAP II se calcula como la diferencia de la síntesis obtenida en ausencia de α -amanitina (RNAP I+II+III) y la síntesis obtenida en presencia de α -amanitina (RNAP I+III).

programa ImageQuant. Este experimento se repitió cinco veces por triplicado, y en la Figura R10A se muestra una media de todos los experimentos con desviaciones estándar. La síntesis debida a la actividad de la RNAPII se calculó como la diferencia entre la síntesis sin α -amanitina (RNAP I+II+III) y con α -amanitina (RNAP I+III). Como se puede ver en la Figura R10A, la síntesis mediada por RNAPII disminuyó alrededor de un 50% al silenciar hCLE, mientras que la síntesis mediada por RNAPI y RNAPIII no se vio afectada.

Se llevaron a cabo ensayos similares a éstos en los que medimos síntesis de RNA *in situ* en células silenciadas (detallado en el apartado 3.1.2. de Materiales y Métodos). La disminución de la síntesis de RNA mediada por RNAPII observada en estos ensayos de transcripción *in situ* fue similar a la detectada mediante transcripción *in vitro* en núcleos aislados, como se muestra en la Figura R10B.

1.8. Efecto del silenciamiento de hCLE en la expresión génica global

Los resultados anteriores en los que se observaba un importante descenso (50%) en la actividad de RNAPII al silenciar hCLE se podían explicar de maneras alternativas. El silenciamiento de hCLE podía estar afectando la transcripción de una o unas pocas familias de genes transcripcionalmente muy activos o que regularan muchas cascadas de genes, o bien podría afectar de manera más moderada a la transcripción de un gran número de genes. Para discernir entre estas posibilidades, estudiamos la expresión global de los genes celulares en condiciones de silenciamiento de hCLE mediante un ensayo de *microarray*. Para ello, se aisló el RNA total de células transfectadas con pSUPER-hCLE o con pSUPER-DgK α 48h post transfección, y se procesó para su análisis.

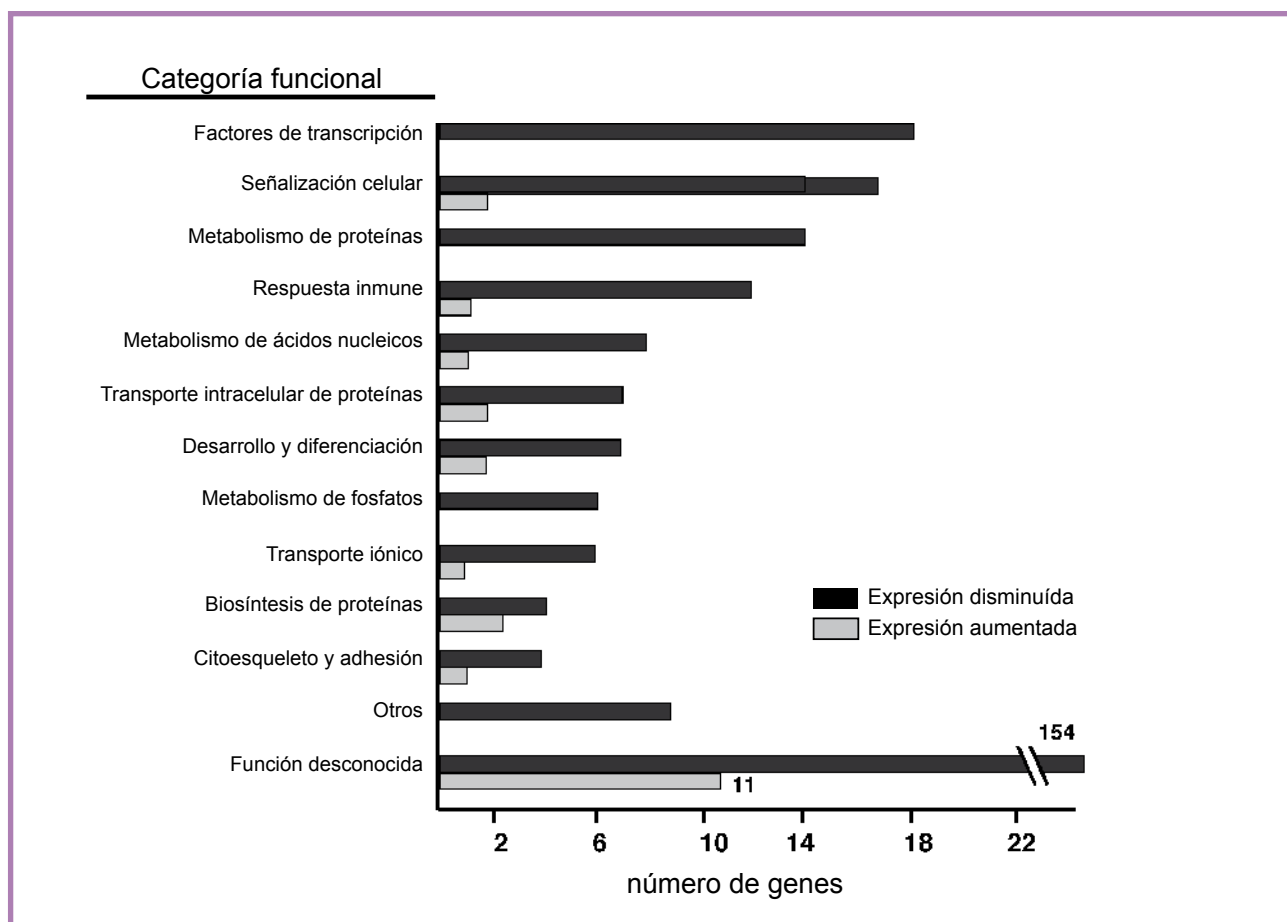


Figura R11. Clasificación funcional de los genes diferencialmente expresados en condiciones de silenciamiento de hCLE.

Los genes que presentaron cambios significativos en sus niveles de expresión al silenciar hCLE fueron clasificados en categorías de Gene Ontology con ayuda de la base de datos fatiGo. Las barras negras representan genes que disminuyen su expresión y las barras grises representan genes que aumentan su expresión con el silenciamiento de hCLE.

El valor del parámetro *fold change* se usó para distinguir los cambios de expresión

estadísticamente significativos. Los genes con valores absolutos de *fold change* de 1.5 o mayores

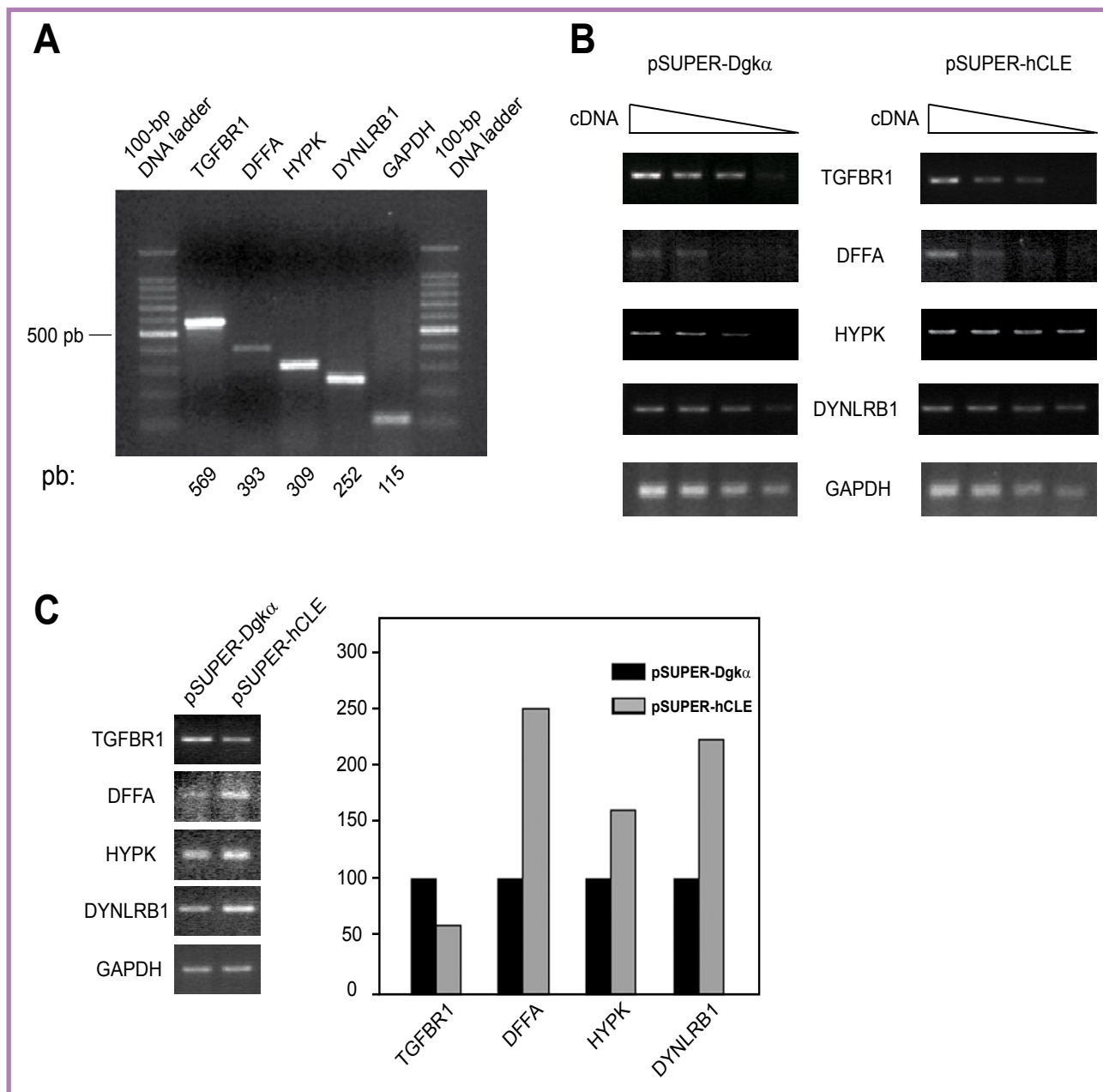


Figura R12. Validación de los resultados del *microarray* por RT-PCR semicuantitativa.

Se analizó la expresión de los genes TGFBFR1, DFFA, HYPK, DYNLRB1 Y GAPDH por RT-PCR semicuantitativa como se indica en Materiales y Métodos. Para este análisis se utilizó una alícuota del mismo RNA aislado para el ensayo de *microarray*.

A. Gel representativo que muestra los productos de amplificación de la RT-PCR, y en el que se puede comprobar que tienen el tamaño esperado.

B. Productos de RT-PCR de los genes correspondientes utilizando las mismas muestras de RNA de células HEK293T transfectadas con los plásmidos pSUPER-Dgk α o pSUPER-hCLE que se usaron para el ensayo de *microarray*. Se realizaron diluciones 1:2 seriadas de la muestra de RNA de partida, como indica el ángulo descendente, y después se llevó a cabo la reacción de PCR con las mismas condiciones para todas las muestras.

C. Cuantificación de la expresión de cada uno de los genes tras normalizar cada muestra con el gen control GAPDH. En la representación gráfica, se tomó la expresión de cada gen en condiciones de transfección con pSUPER-Dgk α como 100%.

se consideraron diferencialmente expresados. Valores de *fold change* positivos indican aumento de expresión, mientras que valores negativos de *fold change* indican disminución de expresión. Este parámetro no es lineal, por lo que genes que se diferencien poco en el valor de *fold change* pueden tener niveles muy distintos de mRNA. El análisis de los resultados de este estudio identificó 290 genes cuya expresión cambiaba al silenciar hCLE respecto a las condiciones de silenciamiento control. El 91.7% de éstos (266 genes) disminuía su expresión y sólo el 8.3% (24 genes) aumentaba su expresión al silenciar hCLE. Para comprender mejor el significado de estos resultados, se agruparon los genes identificados según su función celular con ayuda de la base de datos *fatiGo*⁵. 125 genes de los 290 identificados tenían función celular conocida, y se muestran en la Tabla R1. En la Figura R11 se muestra un gráfico que representa los cambios de expresión al silenciar hCLE en los distintos grupos funcionales. Como se puede observar, la variedad de familias representadas es muy grande, pero dentro de éstas, las familias con un mayor número de genes regulados por hCLE son las de factores de transcripción, señalización celular, metabolismo de proteínas y respuesta inmune. El análisis del *microarray* desveló también que del total de los 22,264 genes representados en el *chip*, un 10% (2,322 genes) disminuía su expresión en condiciones de silenciamiento de hCLE.

Con el fin de validar los resultados del *microarray*, se realizaron ensayos de RT-PCR semicuantitativa. Para ello, se escogieron cuatro genes que mostraban expresión diferencial en condiciones de silenciamiento de hCLE (TGFBR1, DFFA, HYPK y DYNLRB1) y GAPDH como control de un gen cuya expresión no cambiaba y se midieron los niveles de sus mRNAs haciendo diluciones seriadas de los mismos extractos utilizados para el *microarray*, y posterior amplificación por PCR, como se muestra en la Figura R12A y R12B.

1.9. Estudio de las proteínas que se encuentran asociadas a hCLE en complejos nucleares

Llegados a este punto de la caracterización de hCLE como factor nuclear de transcripción, nos pareció de gran interés conocer qué otras proteínas se encuentran asociadas a ella y pueden de una u otra manera contribuir al desempeño de su función. Con este objetivo, se preparó una construcción que expresara la proteína hCLE fusionada a una etiqueta TAP (*Tandem Affinity Purification*), en su extremo carboxilo terminal. Esta etiqueta permite una doble purificación por afinidad y se lleva a cabo en condiciones muy suaves, por lo que los complejos obtenidos se aíslan intactos y muy puros. El ensayo de purificación de complejos nucleares

que contuvieran hCLE-TAP consistió en transfectar células HEK293T con la construcción pCDNA-3-hCLE-TAP o pCDNA-3-TAP como control, ya que sólo expresa la etiqueta TAP. A las 24h post transfección se separaron los núcleos, se prepararon extractos nucleares y se procedió al protocolo de purificación. Los complejos purificados se analizaron en geles de SDS-poliacrilamida y la presencia de diferentes bandas proteicas se detectó por tinción con plata (Figura R13). Las bandas se cortaron manualmente del gel, se digirieron con tripsina y se obtuvieron huellas tripticas de cada una por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se detalla en el apartado 5.10. de Materiales y Métodos y se ilustra en la Figura M2. Las proteínas identificadas de esta manera se muestran en la Tabla R2.

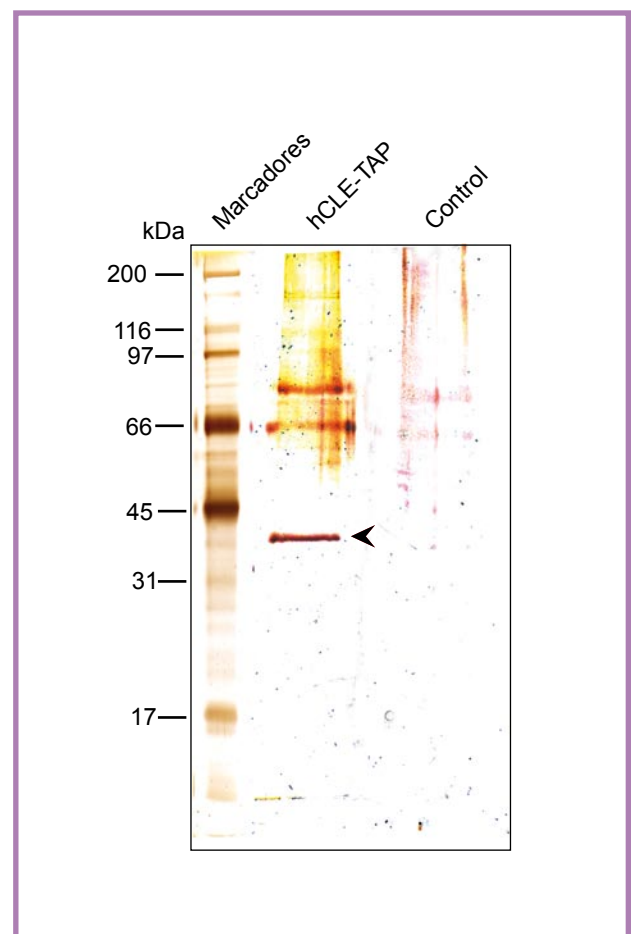


Figura R13. Purificación de los complejos nucleares que contienen hCLE.

Se transfectaron células HEK293T con el plásmido pCDNA-3-hCLE-TAP o el plásmido control pCDNA-3-TAP y 24 horas después de la transfección se separaron los núcleos, se prepararon extractos nucleares y se llevó a cabo la purificación por TAP. El eluido final se resolvió por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida y las proteínas purificadas se detectaron por tinción del gel con nitrato de plata. La punta de flecha indica la banda correspondiente a hCLE-TAP

Nombre del gen	Acceso al GenBank	Fold change
NM23-H6	NM_005793	-1,59
PKIA	NM_006823	-1,58
PRKAR2B	NM_002736	-1,56
RGS5	NM_003617	-1,55
FLJ10461	NM_018098	-1,54
GNGT2	NM_031498	-1,53
GNG2	AK026424	-1,53
PTPRR	NM_002849	-1,52
DKFZP564D0462	AK027843	-1,51
IMAGE:3888869	BC016839	-1,51
C6orf5	AF136407	-1,50
DMPK	NM_004409	1,62
CSK	NM_004383	1,51
Metabolismo de proteínas		
PPT2	AF020544	-1,95
STRIN	NM_016271	-1,84
MMP8	NM_002424	-1,77
HP43.8KD	AB067478	-1,73
FLJ25267	AK057996	-1,73
FLJ21343	NM_022781	-1,71
DPEP1	NM_004413	-1,65
TRAF1	NM_005658	-1,59
FBXL3A	NM_012158	-1,56
FLJ13255	AK023317	-1,54
PTPRR	NM_002849	-1,52
FLJ23560	NM_024685	-1,52
1810055D05	BC009702	-1,51
ADAMTS3	AB002364	-1,51
Nucleoside diphosphate kinase type 6 (inhibitor of p53-induced apoptosis-alpha)		
Protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha		
Protein kinase, cAMP-dependent regulatory, type II, beta		
Regulator of G-protein signalling 5		
Hypothetical protein FLJ10461		
Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma transducing activity, polypeptide 2		
Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2		
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, R		
Hypothetical protein DKFZp564D0462		
Homo sapiens, clone, mRNA, partial cds		
Chromosome 6 open reading frame 5		
Dystrophia myotonic-protein kinase		
C-src tyrosine kinase		
Palmitoyl-protein thioesterase 2		
STRIN protein		
Matrix metalloproteinase 8		
HP43.8KD protein		
Homo sapiens cDNA fis, clone STM05473		
Hypothetical protein FLJ21343		
Dipeptidase 1 (renal)		
TNF receptor-associated factor 1		
F-box and leucine-rich repeat protein 3A		
Homo sapiens cDNA fis, clone OVARC1000800		
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, R		
Hypothetical protein FLJ23560		
Homo sapiens, similar to RIKEN cDNA		
A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, 3		

Nombre del gen	Acceso al GenBank	Fold change
Respuesta inmune y apoptosis		
PF4	NM_002619	-2,37
IL1A	NM_000575	-1,82
KLRC1	NM_002259	-1,69
SEMA7A	NM_003612	-1,69
HLA-DPB1	NM_002121	-1,66
SEMA3C	NM_006379	-1,63
NM23-H6	NM_005793	-1,59
ADORA3	NM_000677	-1,57
BDKRB1	NM_000710	-1,55
TLR10	NM_030956	-1,53
TNFRSF10A	NM_003844	-1,51
CEACAM1	X16354	-1,51
DFFA	NM_004401	1,62
Diferenciación y Desarrollo		
DKK3	NM_013253	-2,18
KIAA1813	AB058716	-1,76
CA10	AF288385	-1,72
GDF9	NM_005260	-1,60
FLJ13057	NM_022471	-1,57
KERA	NM_007035	-1,56
ROD1	AK001685	-1,53
CD2AP	NM_012120	1,52
SPARC	NM_003118	1,51
Platelet factor 4		
Interleukin 1, alpha		
Killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1		
Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), and GPI membrane anchor, (semaphorin) 7a		
Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1		
Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C		
Nucleoside diphosphate kinase type 6 (inhibitor of p53-induced apoptosis-alpha)		
Adenosine A3 receptor		
Bradykinin receptor B1		
Toll-like receptor 10		
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a		
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)		
DNA fragmentation factor, 45 kD, alpha polypeptide		
Dickkopf homolog 3 (<i>Xenopus laevis</i>)		
KIAA1813 protein		
Carbonic anhydrase X		
Growth differentiation factor 9		
Hypothetical protein FLJ1305757 similar to germ cell-less Keratocan		
ROD1 regulator of differentiation 1 (<i>S. pombe</i>)		
CD2-associated protein		
Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)		

Nombre del gen	Acceso al GenBank	Fold change
Transporte intracelular de proteínas		
LOC50988	BC016556	-1,82
KIAA0660	AB014560	-1,82
NFKBIL2	NM_013432	-1,64
Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 2		
G3BP	BC006697	-1,62
SEC24B	NM_006323	-1,62
SEC24A	AJ131244	-1,61
XPO1	NM_003400	-1,55
TOMM34	NM_006809	1,52
FLJ20695	NM_017929	1,52
Hypothetical protein FLJ20695		
Biosíntesis de proteínas		
SIAT8A	NM_003034	-1,67
MRPL49	NM_004927	-1,61
PRKRIR	AF081567	-1,51
Protein-kinase, interferon-inducible double stranded RNAdependent inhibitor		
EIF4A2	NM_001967	-1,51
MGC2744	NM_025267	1,54
JTV1	NM_006303	1,52
RPL36A	NM_021029	1,51
Hypothetical protein MGC2744		
Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2		
JTV1 gene		
Ribosomal protein L36a		
Metabolismo del fosfato		
UMP-CMPK	NM_016308	-1,91
FLJ31077	AK055639	-1,68
IMPA1	NM_005536	-1,66
TDPGD	NM_014305	-1,58
DKFZp588G2222	AL080111	-1,56
KIAA0630	AB014530	-1,52
PKM2	NM_002654	1,52
UMP-CMP kinase		
HSYRA2001574, highly similar to glucosamine-6-phosphate isomer		
Inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1		
DTDP-D-glucose 4,6-dehydratase		
Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp588G2222		
KIAA0630 protein		
Pyruvate kinase, muscle		

Nombre del gen		Acceso al GenBank	Fold change
Transporte de iones			
CSN2	Casein, beta	NM_001891	-1,73
SLC4A7	Solute carrier family 4 member, sodium bicarbonate cotransporter	AF047033	-1,68
ATP2B1	Homo sapiens clone 24411 mRNA sequence	AF070606	-1,63
CLIC4	Chloride intracellular channel 4	NM_013943	-1,61
COL10A1	Collagen, type X, alpha 1(Schmid metaphyseal chondrodysplasia)	NM_000493	-1,54
ATP1B2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 2 polypeptide	NM_001678	-1,51
KCNE1	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1	NM_000219	1,53
Metabolismo de ácidos nucleicos			
KIAA0111	KIAA0111 gene product	NM_014740	-1,68
G3BP	Ras-GTPase-activating protein, SH3-domain-binding protein	BC006997	-1,62
H4FH	H4 histone family, member H	NM_003543	-1,61
RBM7	RNA binding motif protein 7	NM_018090	-1,57
H4FA	H4 histone family, member A	NM_003538	-1,55
H2BFD	H2B histone family, member D	BC011372	-1,53
MGEA6	Meningioma expressed antigen 6	NM_005930	-1,53
RAD21	RAD21 homolog (<i>S. pombe</i>)	NM_006265	-1,50
MGC2744	Hypothetical protein MGC2744	NM_025267	1,54
Citoesqueleto y adhesión			
CDH2	Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	NM_001792	-1,61
MRAS	Muscle RAS oncogene homolog	AK056337	-1,56
FLJ25193	Homo sapiens cDNA fis, clone JTH00761	AK057922	-1,54
MIG2	Mitogen inducible 2	Z24725	-1,50
DNLC2A	Dynein light chain 2A	NM_014183	1,75

Nombre del gen	Acceso al GenBank	Fold change
Otros		
FLJ11149	BC007089	-1,95
LY75	NM_002349	-1,73
LYPLA1	NM_006330	-1,71
SEC15B	AB023136	-1,71
ITGAV	NM_002210	-1,70
FLJ23282	NM_024816	-1,66
CPOX	NM_000097	-1,60
CCNE2	NM_057749	-1,60
GCLC	NM_001498	-1,54
Hypothetical protein FLJ11149		
Lymphocyte antigen 75		
Lysophospholipase I		
Sec15B protein		
Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)		
Hypothetical protein FLJ23282		
Coproporphyrinogen oxidase (coproporphyrin, hemoerythropoetry)		
Cyclin E2		
Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit		

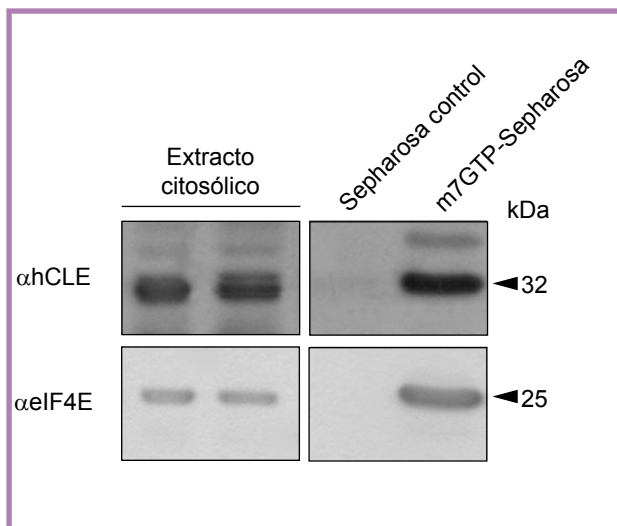
Tabla R1. Genes celulares que presentan expresión diferencial en células silenciadas.

En esta tabla se citan todos los genes que mostraron un aumento o disminución significativos al silenciar hCLE y cuya función es conocida. Los genes se han agrupado por grupos funcionales y se muestra el número de acceso a la base de datos del NCBI y el valor de *fold change*.

2 FUNCIÓN CITOSÓLICA DE hCLE

Todos los resultados mostrados hasta ahora se refieren a la función nuclear de hCLE, pero no podemos olvidar que hCLE tiene una distribución subcelular nuclear y citosólica, por lo que hay que contemplar la posibilidad de que también desempeñe distintas funciones en el citosol.

En el momento de realizar esta tesis, la única evidencia de una presencia no casual de hCLE en el citosol era la caracterización de dos tipos de gránulos de transporte de mRNAs en axones y dendritas de células nerviosas, que cuentan con hCLE como uno de sus componentes^{81, 155}. Puesto que habíamos descrito que tanto PB2 como hCLE en extractos nucleares se retienen en cromatografías de afinidad con resinas de análogos de cap, nos preguntamos si hCLE tendría capacidad de reconocer las estructuras cap por sí misma.



2.1. hCLE proveniente de extractos citosólicos se retiene en resinas de análogos de cap

Para contestar a esta cuestión, llevamos a cabo un ensayo de cromatografía de afinidad con resinas de análogos de cap utilizando extractos citosólicos. Con este fin, incubamos extractos citosólicos de células HEK293T con la resina Met⁷-GTP-Sepharosa 4B y, tras lavar extensivamente, la proteína retenida fue analizada por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y Western Blot. Como se muestra en la Figura R14, hCLE permanece asociada a la resina de cap en este ensayo y no se asocia a una resina control (Sepharosa 4B). Como control positivo de retención en las resinas de análogos de cap se analizó por Western Blot la presencia en

éstas del factor de iniciación de la traducción eIF4E. Dado que hemos utilizado extractos citosólicos y no una proteína hCLE aislada, no podemos descartar que esta asociación esté mediada por otros factores celulares presentes en el extracto.

2.2. Estudio de las proteínas que se encuentran asociadas a hCLE en complejos citosólicos

Como ya se ha comentado en el apartado 2.1.9. de este capítulo, el conocimiento de la identidad de las proteínas acompañantes a una proteína en estudio tiene un enorme valor y es una pieza clave en la comprensión de la función de dicha proteína. Todavía nos encontramos lejos de conocer la función que hCLE desempeña en el citosol, pero pensamos que caracterizar los complejos citosólicos de hCLE puede ser de gran utilidad en este sentido.

Con este interés, se purificaron los complejos de hCLE mediante purificación por la etiqueta TAP,

Figura R14. Retención de hCLE citosólica en resinas de análogos de cap.

Se prepararon extractos citosólicos de células HEK293T y se incubaron con resina Met⁷GTP-Sepharosa o con resina Sepharosa control. Tras lavar extensivamente, la fracción retenida se resolvió junto con los extractos citosólicos iniciales por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida y se analizaron por Western blot utilizando los anticuerpos α-hCLE y α-eIF4E. El análisis de eIF4E se realizó como control positivo de retención en resinas de análogos de cap.

a partir de extractos citosólicos de células HEK293T transfectadas con el plásmido pCDNA-3-hCLE-TAP, llevando en paralelo células transfectadas con pCDNA-3-TAP como control, de la misma manera que se indica en el apartado 2.1.9. Para asegurarnos de que los extractos citosólicos no estaban contaminados con proteínas nucleares debido a una posible rotura de núcleos, se comprobó por Western blot la ausencia de marcadores nucleares en estos extractos antes de la purificación.

Los complejos purificados se analizaron en geles de SDS-poliacrilamida y la presencia de diferentes bandas proteicas se detectó por tinción con plata (Figura R15). Las bandas se cortaron manualmente del gel, se digirieron con tripsina y se obtuvieron huellas tripticas de cada una por

espectrometría de masas MALDI-TOF, como se detalla en el apartado 5.10. de Materiales y Métodos y se ilustra en la Figura M2. Las proteínas identificadas de esta manera se muestran en la Tabla R2.

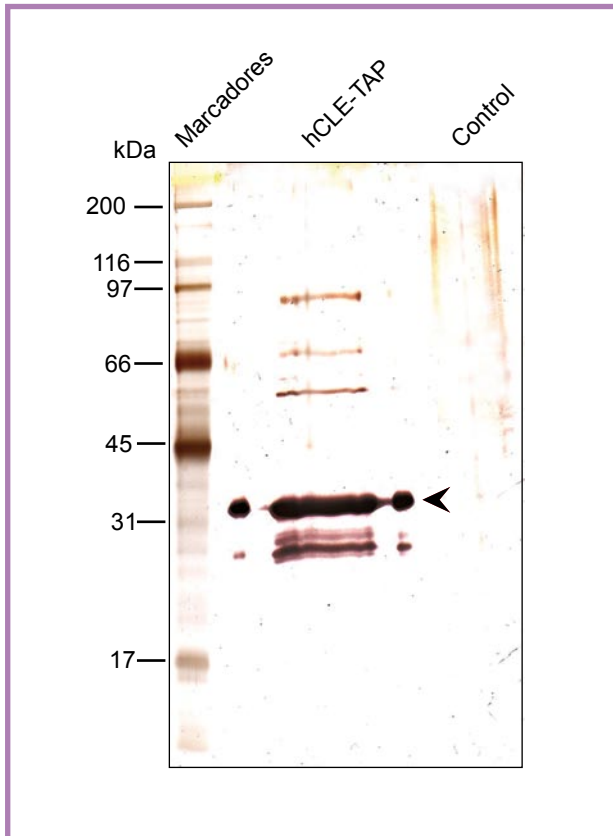


Figura R15. Purificación de los complejos citosólicos que contienen hCLE.

Se transfectaron células HEK293T con el plásmido pCDNA-3-hCLE-TAP o el plásmido control pCDNA-3-TAP y 24 horas después de la transfección se prepararon extractos citosólicos y se llevó a cabo la purificación por TAP. El eluido final se resolvió por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida y las proteínas purificadas se detectaron por tinción del gel con nitrato de plata. La punta de flecha indica la banda correspondiente a hCLE-TAP

Número de acceso	Nombre de la proteína	Masa Molecular	Mascot score	Queries searched	Queries matched	p-valor
gi 57284131	Myosin heavy chain 7B	222344	168	41	28	5.5 e-12
C3HU	Complement C3 precursor	188585	33	1	1	0.031
gi 58208329	DEAH box polypeptide 9 (RNA helicasa A)	142181	74	41	14	0.013
Q5W141_HUMAN	Beta-transducin repeat containing	70248	30	1	1	0.07
gi 118827830	Splicing factor proline/glutamine-rich (NroO)	68237	88	7	5	3.1 e-4
Q86W77_HUMAN	ANKS3 protein	58793	34	1	1	0.028
gi 33979558	SFPQ/PSF	55435	67	7	4	0.038
CCD71_HUMAN	Coiled-coil domain containing protein 71	48759	32	1	1	0.037
Q556C7_HUMAN	Synaptotagmin-like protein-1	38826	31	1	1	0.054
Q7Z6G5_HUMAN	Glycerate kinase 2	25468	31	1	1	0.053
Q4G168_HUMAN	CPNE4 protein (Copine IV)	11795	32	1	1	0.043

Tabla R2. Datos de espectrometría de masas de las proteínas asociadas a hCLE-TAP en el núcleo.

De cada proteína identificada, se muestra el número de acceso a la base de datos del NCBI, la masa molecular teórica, la puntuación (*score*) que le asocia el programa Mascot, el número de péptidos obtenidos en la digestión (*queries searched*), el número de péptidos positivos para la proteína identificada (*queries matched*) y el p-valor, que es inversamente proporcional a la credibilidad de la identificación. Las proteínas que tienen un valor de 1 en los péptidos (*queries*) fueron identificadas mediante MS-MS, que utiliza un único péptido, lo secuencia y lo compara con las bases de datos. Ese tipo de identificación se asocia con puntuaciones (*scores*) más bajos, siendo el p-valor el único parámetro comparable en el sistema de MALDI-TOF y el MS-MS.

Número de acceso	Nombre de la proteína	Masa Molecular	Mascot score	Queries searched	Queries matched	p-valor
gi 4539572	Dead box protein RB (DDX1)	83875	180	31	20	4.5 e-1
gi 118820058	Glucosidasa I	74392	171	30	17	3.6 e-11
gi 5123454	Heat-shock 70 kDa protein	70280	78	22	9	0.003
gi 48146487	HSPC117	56984	171	39	24	1.5 e-12
gi 118584870	Cytoplasmic linker associated protein 2 (CLASP2)	53881	72	12	6	0.011
gi 55613379	hCLE	28066	252	31	20	2.8 e-19

Tabla R3. Datos de espectrometría de masas de las proteínas asociadas a hCLE-TAP en el citosol.

De cada proteína identificada, se muestra el número de acceso a la base de datos del NCBI, la masa molecular teórica, la puntuación (*score*) que le asocia el programa Mascot, el número de péptidos obtenidos en la digestión (*queries searched*), el número de péptidos positivos para la proteína identificada (*queries matched*) y el p-valor, que es inversamente proporcional a la credibilidad de la identificación.







DISCUSIÓN



LA FUNCIÓN CELULAR DE hCLE CONECTA EL NÚCLEO Y EL CITOSOL

1 LA PROTEÍNA hCLE ESTÁ FUNCIONALMENTE ASOCIADA A LA RNA POLIMERASA II EN EL NÚCLEO

La homología de secuencia existente entre hCLE y la parte central del factor de transcripción de levadura Spt16 (Ccd68) sugirió que la función de este nuevo factor celular, que había sido identificado por interacción con la proteína viral PA, podría estar relacionada con la transcripción. Hasta el momento, como herramienta de trabajo, se disponía de anticuerpos específicos dirigidos contra hCLE que habían sido caracterizados, y se sabía que hCLE interactuaba con las RNPs virales activas purificadas¹⁴⁴, pero nada se sabía acerca del papel que hCLE podía desempeñar en la célula. Los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis y presentados en esta memoria aportan evidencias de que hCLE es una proteína moduladora de la actividad de la RNA polimerasa II y posiblemente un nuevo factor de transcripción celular.

Mediante ensayos de colocalización y coimmunoprecipitación, hemos podido demostrar la asociación física de hCLE con los complejos de transcripción de la RNAP II (Figura R6). La asociación se mostró por colocalización con los anticuerpos que reconocen diferencialmente las tres formas de fosforilación de la RNAP II²⁵⁴, sin embargo la forma hiperfosforilada (RNAP IIO) implicada en iniciación no pudo detectarse en los extractos nucleares utilizados para los ensayos de coimmunoprecipitación, por lo que no fue posible valorar su interacción con hCLE mediante esta técnica. Sí coimmunoprecipitaron con hCLE la RNAP IIA (hipofosforilada) y la RNAP IIO (hiperfosforilada) implicada en elongación. Además de asociarse físicamente, hCLE y la RNAP II tienen una relación funcional, ya que hemos visto que hCLE se encuentra presente en sitios de transcripción activa llevada a cabo por la RNAP II (Figura R7).

Puesto que estos resultados indicaban que hCLE formaba parte de la maquinaria de transcripción, nos propusimos conocer la importancia que la presencia de hCLE tenía para la actividad de dichos complejos. Utilizando el silenciamiento génico de hCLE por RNAi, hemos mostrado que hCLE es una proteína necesaria para el correcto funcionamiento de la maquinaria transcripcional, ya que su silenciamiento produce una disminución de un 50% en la síntesis total de RNA llevada a cabo por la RNAP II (Figura R10). Es importante mencionar que mediante la transfección de plásmidos que expresan un RNAi no se consiguió un silenciamiento

completo, como se puede ver en la Figura R9. Que el silenciamiento no sea total implica que el efecto que observamos podría ser aún mayor si la ausencia de hCLE fuera completa, lo que indica que la presencia de hCLE es fundamental en la transcripción mediada por la RNAP II.

El hecho de que la transcripción se vea tan afectada al silenciar hCLE puede explicarse de dos posibles maneras: que hCLE sea un factor que regula un único grupo de genes, pero que éstos sean muy abundantes o controlen muchas vías metabólicas, o bien que hCLE sea una proteína cuya presencia pueda ser necesaria para la transcripción en general, y que una bajada moderada de un gran número de genes pueda dar cuenta del descenso del 50% observado en la transcripción. Los resultados del *microarray*, que comparan el perfil de expresión de células silenciadas en hCLE con el perfil de expresión de células con un silenciamiento control, indican que el silenciamiento de hCLE afecta a la expresión de un gran número de genes pertenecientes a familias y grupos funcionales muy variados (Tabla R1). El análisis de los resultados del *microarray*, considerando valores absolutos de *fold change* de 1,5 o superiores, identificó 290 genes que mostraban cambios significativos de expresión, de los cuales el 91,7% (266 genes) sufren una bajada de expresión, mientras que tan sólo el 8,3% (24 genes) aumenta su expresión al silenciar hCLE. Considerando los genes con valor absoluto de *fold change* de 1 (condición algo menos restrictiva que la aplicada en el análisis anterior de los datos), obtenemos una bajada de expresión en 2322 genes, que suponen el 10% de los representados en el *microarray*. Este dato, junto con la bajada del 50% en la transcripción al silenciar hCLE, indica que la ausencia de hCLE causa un descenso general en la expresión génica celular en el que se ven afectados una gran variedad de genes. Entre las categorías funcionales afectadas (Figura R11 y Tabla R1), los genes implicados en la regulación de la transcripción son los más numerosos, encontrándose entre ellos los genes de la TBP (TATA-box binding protein), de RAI (inhibidor asociado a RelA) y de STAT5 (transductor de señales y activador de transcripción, 5). TBP es un componente esencial para la transcripción cuyos cambios causan un enorme impacto en la expresión del mRNA¹²⁷, RelA se une a la subunidad p65 de NF-kappa B y modula su actividad transcripcional³⁵³ y STAT5 regula la expresión de genes relacionados con procesos celulares tan importantes como proliferación, apoptosis y diferenciación³⁴⁷. También se encuentran en esta categoría genes que controlan el crecimiento tumoral, y su expresión

está disminuida. Otras categorías de genes muy afectadas por la ausencia de hCLE son las de señalización celular, algunos de cuyos genes regulan importantes cascadas metabólicas, metabolismo de proteínas y respuesta inmune. Teniendo en cuenta la bajada de expresión de genes que cumplen este tipo de funciones, es de esperar una disminución significativa en la expresión génica global, de acuerdo con los resultados obtenidos.

La única categoría de genes con aproximadamente el mismo número de representantes que experimentan aumento y disminución de expresión es la de biosíntesis de proteínas (Figura R11 y Tabla R1), en la que merece la pena resaltar la presencia de los genes de *Staufen-1* (identificado con un *fold change* de 1,38), implicada en traducción localizada¹⁵ y que interacciona con la proteína NS1 del virus de la gripe⁸⁸, del gen de *p38*, componente estructural del complejo aminoacil-tRNA sintetasa¹⁹¹ y del gen de la proteína ribosomal L36, todos ellos con aumento de expresión. El gen de la proteína quinasa activada por RNA de doble banda (PKR), muestra disminución de expresión al silenciar hCLE. PKR es una quinasa que modula procesos relacionados con el estrés celular, y su activación genera inhibición de la traducción³²². Por lo tanto, el aumento de expresión de *p38* y de *Staufen-1* y la disminución de la expresión de PKR desencadenarían la estimulación de la traducción. Es posible que los cambios observados en la expresión de estos genes al silenciar hCLE sea una respuesta celular para compensar la disminución en transcripción que sufren en estas condiciones.

2 hCLE LLEVA A CABO SU FUNCIÓN NUCLEAR ACOMPAÑADA DE OTRAS PROTEÍNAS

Los resultados anteriores demuestran que hCLE es una proteína necesaria para el funcionamiento normal de la transcripción, pero no dicen nada respecto del tipo de función que desempeña hCLE. Es decir, estos datos no permiten saber si hCLE es un componente estructural del complejo de transcripción y su ausencia produce un desensamblaje de otros componentes, o si por el contrario, hCLE participa de alguna manera en una actividad enzimática clave para el desarrollo de la transcripción. Lo que sabemos acerca de la secuencia de hCLE no permite decantarse por ninguna de estas posibilidades, ya que su pequeño tamaño no la hace ser *a priori* una candidata estructuralmente importante, y su falta de dominios con homología a otros con función conocida, tampoco aporta indicios

en ese sentido.

Hace unos años, en la biología celular en general y en el campo de la transcripción en particular, era comúnmente aceptado que cada proceso lo llevaban a cabo un conjunto de proteínas concretas y diferentes a las implicadas en otros procesos y que esto ocurría en lugares bien definidos dentro de la célula. Cada vez se conocen más y más ejemplos de procesos interrelacionados entre sí y cuyos factores son compartidos. Además, muchos factores antes asignados a un único evento celular se han descrito implicados en otros procesos, incluso viajando del núcleo al citosol y viceversa. Este es el caso de algunos factores de *splicing* como PSF/SFPQ y NonO, o de corte y poliadenilación como CstF (*cleavage stimulation factor*), que se ha visto que se unen al CTD de la RNAP II en el promotor y permanecen asociados hasta las etapas finales de la transcripción^(47, 82 y revisado en 130). También permanece unida a la RNAP II a lo largo de todo el proceso de transcripción la proteína DDX1, perteneciente a una familia de RNA helicasas, que interacciona con CstF³² y con PSF/SFPQ y NonO⁸². En este contexto, hCLE podría permanecer unida a los complejos de transcripción a lo largo de todo el proceso, sin que ese hecho arrojará luz sobre si su función es requerida en todo momento, o si participa activamente en una etapa más concreta.

Con el objetivo de saber más acerca de la función de hCLE en el núcleo, emprendimos la tarea de estudiar la identidad de las proteínas que la acompañan empleando un abordaje proteómico. Los resultados obtenidos muestran la presencia de las proteínas PSF/SFPQ, NonO, RNA helicasa A y la cadena pesada de la miosina 7B (MHC7B). PSF/SFPQ y NonO son proteínas de *splicing*, mencionadas anteriormente por tener la particularidad de permanecer asociadas a los complejos de transcripción desde su inicio hasta el final. La RNA helicasa A es una proteína del tipo DEAD-box altamente conservada que interacciona con el CTD de la RNAP II²³⁶, funciona como coactivadora de la transcripción³²³, modula el *splicing*³⁷ y se une al complejo del poro nuclear¹²². La cadena pesada de la miosina indica la presencia en el complejo de proteínas con función motora. La miosina es un motor molecular que se asocia a fibras de actina en la contracción muscular y en otros tipos de motilidad. Por último, detectamos entre los factores nucleares asociados a hCLE la presencia de la proteína *beta-transducin repeat containing*, que contiene dominios WD40, que son los dominios utilizados por las proteínas del complejo de iniciación de la traducción para unirse al factor eIF4E. eIF4E es el componente de estos complejos responsable de la unión al cap de los mRNAs. La relevancia de la detección de estas proteínas asociadas a hCLE en el núcleo se discutirá más adelante junto con las

proteínas identificadas en un estudio proteómico de complejos de hCLE en el citosol.

También se identificaron otras proteínas asociadas a hCLE en el núcleo, como el precursor C3 del complemento, la glicerato kinasa, la copina IV, relacionada con transducción de señales mediada por Ca^{2+} ⁵³, la *synaptotagmin-like protein 1*, relacionada con liberación de vesículas de exocitosis regulada por Ca^{2+} ^{103, 230}, y una proteína con tres repeticiones de dominios de ankirina y un dominio *sterile alpha motif* (SAM). Los dominios de ankirina median interacciones proteína-proteína en familias muy diversas, mientras que el dominio SAM está muy representado en proteínas nucleares y de señalización, y media la oligomerización de las proteínas que lo contienen, lo cual está de acuerdo con la presencia de esta proteína en complejos multiproteicos. Las funciones que tienen las proteínas pertenecientes a este segundo grupo no nos permiten establecer de momento ninguna relación con el papel que parece estar desempeñando hCLE, pero esperamos poder entender pronto el sentido de su asociación.

3 LA PROTEÍNA hCLE CITOSÓLICA FORMA PARTE DE GRÁNULOS DE TRANSPORTE DE RNA

Se ha comentado anteriormente que la manera de entender los procesos celulares y su relación entre sí ha dado un giro, pero el cambio de tendencia va aun más allá, ya que en los últimos años se han acumulado evidencias de la existencia de proteínas típicamente nucleares asociadas a complejos citosólicos. Frecuentemente, estas proteínas se han aislado de complejos ribonucleoproteicos de transporte de mRNAs para su traducción localizada, lo que sugiere que el transporte dirigido de los mRNAs en el citosol podría iniciarse ya en el núcleo. Muchos de los factores que acompañan al mRNA hasta su traducción son proteínas nucleocitoplásmicas de tipo *shuttling* que se asocian al transcrito en el núcleo y posteriormente dirigen el transporte del mRNA en el citosol⁹⁰. Parece ser que en etapas tempranas de la transcripción de ciertos genes, el reconocimiento del transcrito y la formación de un complejo ribonucleoproteico específico en el núcleo es un evento determinante para el destino citoplásmico del mRNA. Se conocen multitud de ejemplos, como es el caso del transcrito de oskar en oocitos de *Drosophila*,¹²⁰ la localización del mRNA de Vg1 en oocitos de *Xenopus*¹⁸¹, el transporte del mRNA de la proteína básica de mielina (MBP) en la morfogénesis de los

oligodendrocitos^{2, 132}, el transporte del mRNA de β -actina en fibroblastos y neuronas¹¹⁸ y algunos más. El complejo ribonucleoproteico preformado en el núcleo contiene factores de transcripción y de *splicing*, frecuentemente proteínas de la familia de las hnRNPs y se reforma al ser exportado al citosol, reclutándose entonces factores adicionales de transporte. El mensaje que se puede extraer de todas estas evidencias es que la localización de los mRNAs en células eucariotas es frecuentemente un proceso con múltiples pasos en el que un mRNA, desde que se transcribe en el núcleo hasta su traducción en su lugar de destino final, va reclutando un conjunto de factores y desprendiéndose de algunos de ellos de una manera secuencial y ordenada^{20, 168}. Esta “especialización” en el transporte y traducción de los mRNAs puede ser muy ventajosa en ciertos tipos celulares, como las neuronas, en las que se debe decidir entre diversas, largas y complejas rutas, ya que en una dendrita puede llegar a haber miles de posibles destinos sinápticos. Pero también puede ser muy útil en tipos celulares no neuronales en etapas concretas, como el desarrollo, o en células polarizadas, o para mensajeros específicos o en respuesta a estímulos determinados.

Dado que no se sabía nada acerca de la función citosólica de hCLE, nos dispusimos a realizar un estudio de sus proteínas acompañantes mediante un abordaje proteómico, de manera paralela al llevado a cabo en el núcleo. Las proteínas identificadas en este estudio son: glucosidasa I, HSP70, DDX1, HSPC117 y CLASP2 (*cytoplasmic linker associated protein 2*). La glucosidasa I está implicada en el corte controlado de residuos azucarados de las glicoproteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico²⁸², la HSP70 es una proteína de choque térmico, con actividad chaperona, relacionada con la inhibición de la apoptosis¹⁰⁹, implicada en señalización de proteínas para su degradación en el proteosoma y en el transporte de proteínas³¹², DDX1 es una helicasa de la familia de las DEAD-box, implicada en el procesamiento del extremo 3' de los mRNAs³² y localizada en *nuclear bodies*¹⁹³, HSP117 es una proteína con función desconocida y CLASP2 es una proteína que une microtúbulos y estabiliza sus extremos crecientes²²¹, está implicada en la formación del huso mitótico^{222, 264} y cuya interacción con fibras de actina ha sido descrita recientemente³³⁰.

Merece la pena recordar que se ha descrito la purificación y caracterización proteómica de dos complejos ribonucleoproteicos de transporte de mRNA en neuronas^{81, 155}, y en ambos se ha encontrado asociada hCLE/CGI-99. Los dos complejos presentan algunas diferencias, como que la partícula de transporte descrita por Kanai y colaboradores se mueve gracias al motor kinesina, no contiene ribosomas y transporta los mRNAs

de CaMKII y Arc, mientras que el gránulo de RNA descrito por Elvira y colaboradores debe su motilidad a la dineína, contiene ribosomas y transporta el mRNA de β -actina. Pero lo más interesante para nosotros es su característica común de ser ribonucleoproteínas citosólicas que contienen un gran número de proteínas típicamente nucleares, como hnRNPs y factores de transcripción. Además, algunas de las proteínas identificadas coinciden con los acompañantes de hCLE identificados por nosotros, tanto nucleares como citosólicos (ver Tabla D1). El factor DDX1 está presente en ambos gránulos y también se asocia a hCLE en nuestro estudio citosólico. Por otra parte, PSF/SFPQ y NonO están presentes en el gránulo caracterizado por Kanai y colaboradores y nosotros las hemos identificado como acompañantes nucleares de hCLE, mientras que HSPC117 y HSP70 se encuentran también en este gránulo y nosotros las hemos identificado junto con hCLE en el citosol.

También se ha publicado la caracterización proteómica de otros gránulos de RNA que contienen Staufen^{38,338}, proteína ampliamente relacionada con transporte de mRNAs y traducción localizada^{162,163,178,321}, aislados a partir de células HEK293 (Brendel) o HEK293T (Villacé), es decir en sistemas similares al empleado por nosotros. En estos estudios identifican diversas proteínas de características similares a las de los dos estudios mencionados anteriormente, y algunas de ellas coinciden (ver Tabla D1). Si comparamos los resultados de Brendel y Villacé con los nuestros, la RNA helicasa A aparece en las tres identificaciones y la cadena pesada de la miosina es común en nuestro estudio y en el de Villacé y colaboradores. Además, resultados no publicados de Villacé y colaboradores han mostrado por Western blot la presencia de hCLE en purificados de Staufen. La RNA helicasa A desempeña múltiples funciones relacionadas con la transcripción y su regulación, desde desenrollar cromatina³⁶², interaccionar con la RNAP II²³⁶, coactivar transcripción modulando la activación de diversos factores^{323,335} y modular el *splicing*³⁷. Esto sugiere que podría ser una proteína que se encuentre con hCLE y otros factores mencionados anteriormente asociada a la maquinaria transcripcional desde la iniciación hasta la terminación, y parece que, junto con PSF/SFPQ, NonO y DDX1, salga del núcleo acompañando a los mRNAs y permanezcan en los complejos de transporte y traducción hasta llegar a su destino final.

La miosina es un motor molecular que se mueve sobre filamentos de actina, a diferencia de la kinesina y la dineína, que lo hacen a lo largo de los microtúbulos. El hecho de que se hayan encontrado componentes de la miosina en los dos estudios realizados en células no neuronales, puede estar indicando una diferencia en el tipo de transporte

requerido en cada tipo celular. Hay que tener en cuenta que en las neuronas el citoesqueleto de tubulina es mayoritario, puesto que son un tipo celular altamente polarizado que necesita un transporte de orgánulos, proteínas y otros elementos de una manera mucho más acentuada que en células no neuronales. En cambio, en células menos polarizadas, el citoesqueleto de actina puede tener una importancia similar, de hecho tiene gran implicación en el crecimiento y la motilidad celular. Además, cada vez hay más casos descritos en la bibliografía de transporte mediado por miosina a lo largo de microfilamentos de actina^{100,129,168,313}, y se ha propuesto que en neuronas, el transporte de larga distancia esté mediado por microtúbulos pero que la posterior localización en el lugar de destino se mantenga gracias a filamentos de actina²³³. Curiosamente, la RNA helicasa A interacciona con F-actina³⁶³, pero además, la proteína CLASP2 que hemos identificado asociada a hCLE en el citosol, adicionalmente a su ya conocida función estabilizadora de microtúbulos, se acaba de describir como una proteína que interacciona con actina³³⁰. Esto sugiere que el transporte de los complejos en los que se encuentra hCLE puede llevarse a cabo a lo largo de filamentos de actina gracias a la motilidad aportada por la miosina y con ayuda de interacciones mediadas por CLASP2.

4 hCLE PODRÍA SER UN COMPONENTE DE COMPLEJOS IMPLICADOS EN TRADUCCIÓN

La mayoría de las proteínas que se encuentran asociadas a hCLE y que hemos discutido hasta ahora, han estado sobre todo relacionadas con la transcripción y el transporte de mRNA, pero existen evidencias que nos llevan a pensar que hCLE podría desempeñar un posible papel en la traducción de los mensajeros que se transportan en estos complejos.

Por una parte, en esta tesis se muestra la asociación de hCLE a las estructuras cap, como indica la retención de hCLE en resinas de Met⁷GTP en ensayos de cromatografía (Figura R14). No sabemos si esta asociación es directa o no, ya que podría estar mediada por otras proteínas formadoras de los complejos de traducción, o por proteínas acompañantes de hCLE, como la proteína *beta-transducin repeat containing*, que hemos detectado asociada a hCLE y que contiene dominios de unión a eIF4E, la proteína de unión al cap en el citosol. Sea directa o no, la capacidad de hCLE de interaccionar con las estructuras cap resulta muy sugerente, ya

Autores	Kanai y cols.	Elvira y cols.	Brendel y cols.	Villacé y cols.	Fierro-Monti y cols.	Fierro-Monti y cols.	Nuestros resultados
Procedencia	Cerebro de ratón	Cerebro de ratón	Células HEK293	Células HEK293T	Células HEK293	Células hMSC	Células HEK293T
Proteínas identificadas							
Proteínas de unión a RNA	DDX1 DDX3 DDX5 hnRNPA, U y otros Staufen	DDX1 DDX3 DDX5 hnRNPA, M, U y otros Staufen	hnRNPU RNA helicasa A FMRP Staufen	hnRNPU RNA helicasa A FMRP Staufen	DDX3 hnRNPA2B1 FMRP	DDX1 DDX3 hnRNPA2B1	DDX1 RNA helicasa A
Factores de <i>splicing</i>	PSF/SFPQ, NonO TLS/FUS				TLS/FUS	TLS/FUS	PSF/SFPQ, NonO
Motores moleculares	Kinesina	Dineína	Kinesina Dineína	Kinesina Dineína Miosina	Miosina, tropomiosina		Miosina
Proteínas implicadas en traducción	EF-1 α	EF-1 α	EF-1 α PABP1 Proteínas ribosomales	PABP1 Proteínas ribosomales	eIF4E, eIF4G eIF-3, EF-3, 4E-BP1 Proteínas ribosomales	eIF4E, eIF4G	
Citoesqueleto		Actina, tubulina	Tubulina	Actina, tubulina			
Chaperonas	Nucleolina HSP70	Nucleolina Nucleofosmina	Nucleolina	Nucleolina			HSP70
Otras	HSPC117				HSPC117		HSPC117
	hCLE/CGI-99	hCLE/CGI-99		hCLE/CGI-99			hCLE/CGI-99

Tabla D1. Análisis proteómico de diferentes complejos ribonucleoproteicos.

Tabla en la que se resumen las proteínas identificadas en las caracterizaciones de complejos llevadas a cabo por varios grupos, mencionadas en el texto. Se incluyen únicamente las proteínas que tienen relación con la posible función de hCLE.

que el evento de unión del cap-mRNA a la proteína eIF4G del complejo de iniciación de la traducción es lo que determina qué mensajero va a ser traducido^{220, 310}.

Por otra parte, en tres de los estudios proteómicos mencionados anteriormente^{38, 81, 155} se ha identificado el factor de elongación de la traducción EF-1 α . En la identificación de los componentes de los complejos estudiados por Kanai y Elvira, se encontraron tanto EF-1 α como hCLE. Además, Kanai y colaboradores llevaron a cabo una caracterización más detallada de las interacciones entre las proteínas del complejo y mostraron que la interacción entre hCLE, DDX1, EF-1 α y HSPC117 es insensible al tratamiento con RNasa y, por lo tanto, independiente de RNA y que hCLE coimmunoprecipita con DDX1 y EF-1 α . Los autores resaltan la fuerte interacción entre hCLE y EF-1 α , y sugieren que entre ellas podría existir una interacción directa¹⁵⁵.

En una caracterización proteómica recientemente publicada del complejo de unión a cap en células HEK293 y hMSC (células humanas del estroma mesenquimal)⁹², se han identificado algunas de las proteínas que suelen acompañar a hCLE, aunque ésta no fue detectada. Las proteínas que se encontraron formando parte de los complejos asociados al cap fueron: EF-1 α , DDX1, HSPC117 y la cadena pesada de la miosina, además de otras como varios tipos de actina y tubulina y muchos factores de traducción y componentes de los ribosomas (Tabla D1). También se identificó DDX3, que se encuentra presente en las purificaciones de Elvira y Kanai y colaboradores.

En conjunto, estos resultados sugieren una estrecha relación entre hCLE y componentes de la maquinaria de traducción y, teniendo en cuenta su asociación con las estructuras cap de los mRNAs, podrían indicar que hCLE es una pieza importante en la selección de los mensajeros que van a ser traducidos.

5 hCLE SE ENCUENTRA FORMANDO RNP_s QUE CONECTAN EL NÚCLEO CON EL CITOSOL

Creemos que es importante tener en cuenta que en los estudios de proteómica las identificaciones obtenidas de manera significativa no representan la totalidad de las proteínas que forman el complejo analizado, sino aquellas proteínas que permanecen asociadas al complejo tras todos los pasos de purificación y en una cantidad suficiente para permitir su identificación inequívoca. Por lo

tanto, los resultados de los estudios de proteómica representarían la “composición mínima” del complejo en cuestión.

Teniendo en cuenta esta reflexión y todo lo discutido respecto a las identificaciones de componentes de complejos ribonucleoproteicos (Tabla D1), las evidencias que manejamos, en conjunto, sugieren un modelo en el que existiría un sistema bastante general de “marcage de destino” de mensajeros, ya sea este destino una localización específica o una traducción controlada temporalmente. Este sistema se iniciaría en los primeros estadios de la transcripción del mRNA e incorporaría al complejo ribonucleoproteico factores que son comunes para todos los casos y otros que pueden variar dependiendo del tipo celular o del tipo de traducción a la que esté destinado el mRNA. Según estas condiciones, el motor molecular asociado al complejo sería de un tipo u otro y también los “raíles” del citoesqueleto por los que el complejo viajaría hasta su destino. Las proteínas típicamente nucleares que forman estos complejos deberían ser de tipo *shuttling*, para poder salir del núcleo y, tras acompañar al mRNA hasta su traducción, poder regresar e iniciar un nuevo ciclo. En este sentido, acerca de si hCLE puede ser o no una *shuttling protein*, hay que mencionar que en su secuencia hay varias regiones ricas en leucinas con características típicas de las secuencias de exportación nuclear o NES, pero todavía no han sido caracterizadas como tales. En cuanto a la existencia de alguna señal de localización nuclear o NLS en hCLE, puesto que su localización es en parte nuclear y su función de factor de transcripción se desarrolla en el núcleo, debe tener alguna señal de este tipo, aunque no hemos delimitado su secuencia.

Basándonos en la detección de hCLE/CGI-99, DDX1, DDX-3, EF-1 α , HSPC117, nucleolina y Staufen tanto en complejos aislados a partir de tejido neuronal^{81, 155} como en purificaciones de células no neuronales^(38, 92, 338) y nuestros resultados), nos atrevemos a sugerir que este conjunto de proteínas podría formar parte del núcleo del complejo, que sería común en los distintos tipos celulares y situaciones. Las demás proteínas podrían asociarse a este núcleo común, dependiendo del destino que vaya a tener el mRNA transportado, del tipo celular de que se trate y de otras posibles variables que de momento desconocemos. Cabe resaltar que tanto la miosina como la RNA helicasa A solamente han sido identificadas en complejos purificados de células no neuronales^(38, 92, 338) y nuestros resultados). La miosina debe ser el motor principal en este tipo de células, frente a la kinesina y dineína que predominan en células nerviosas. Pensamos que la RNA helicasa A no se ha identificado en neuronas por causas relacionadas con las técnicas empleadas, ya que se ha visto su colocalización con Staufen en

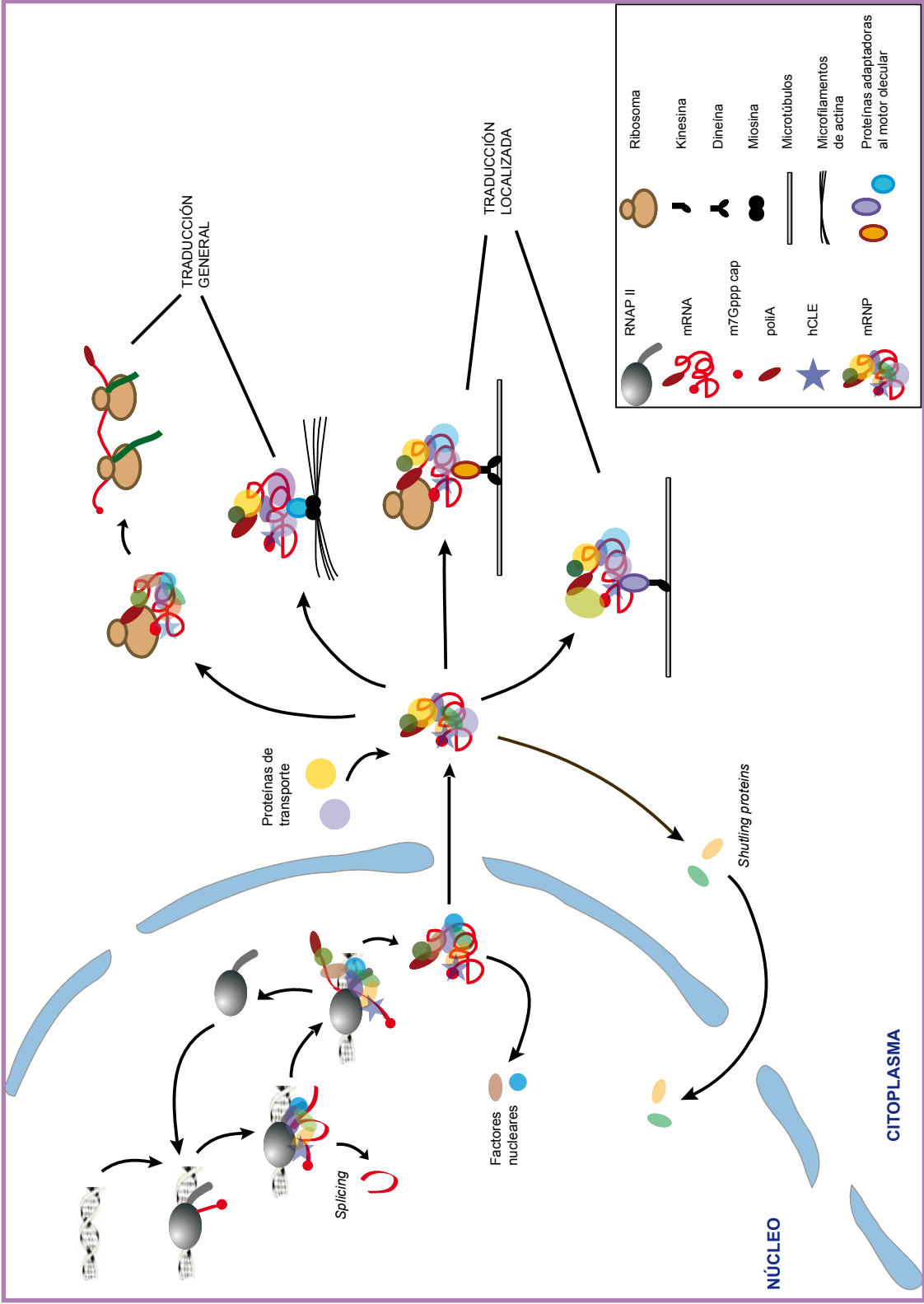


Figura D1. Modelo de la participación de hCLE en los complejos de transporte de mRNAs desde su síntesis hasta su traducción. Se representan esquemáticamente la síntesis y maduración de un mRNA en el núcleo, su transporte al citosol y las posibles modalidades de traducción que el mRNA puede sufrir. También se muestran mediante dibujos las proteínas que se incorporan y que abandonan los complejos ribonucleoproteicos en las diferentes etapas del proceso.

neuroblastos humanos³³⁸. Los factores PSF/SFPQ, NonO y HSP70 también se han identificado junto con hCLE/CGI-99 en células nerviosas y no nerviosas, pero no de forma tan repetitiva como las anteriores, por lo que no las hemos incluido entre nuestras candidatas a formar parte del núcleo común.

Serán necesarios muchos esfuerzos para llegar a comprender en profundidad los procesos que determinan la expresión de un gen, desde

que se activa su transcripción en el núcleo, hasta que se exporta al citosol y se traduce en el lugar y momento precisos, y conocer los factores que intervienen y que regulan cada evento. Creemos que los resultados aquí mostrados, junto con los datos aportados por otros grupos pueden ser una pincelada de la dirección en la que deberemos dirigir nuestros esfuerzos en el futuro.

hCLE INTERACCIONA CON LA POLIMERASA DEL VIRUS DE LA GRIPE

1 hCLE PODRÍA FUNCIONAR COMO VÍNCULO ENTRE LA POLIMERASA VIRAL Y LA RNA POLIMERASA II CELULAR

El virus de la gripe replica y transcribe su genoma en el núcleo de la célula infectada, y todas las actividades de síntesis de RNA virales son llevadas a cabo por la polimerasa viral, compuesta por las subunidades PB1, PB2 y PA. No obstante, la transcripción viral depende totalmente de una transcripción celular activa²⁸¹, ya que la polimerasa viral utiliza fragmentos cortos de RNA con estructura cap, derivados de los transcritos de la RNAP II, como cebadores para la síntesis de su mRNA. La polimerasa viral obtiene estos cebadores mediante el corte de los mRNAs celulares gracias a su actividad endonucleolítica. El virus también depende de la maquinaria de *splicing* celular para procesar aquellos mRNAs virales que lo requieren y posiblemente dependa de factores celulares para el ensamblaje de mRNPs virales competentes para el transporte al citosol. Como hemos visto anteriormente, los mRNAs celulares se acomplejan con numerosas proteínas durante su transcripción y éstas intervienen, entre otras cosas, en su salida del núcleo. Se ha dado por hecho que los mRNAs virales utilizan las mismas rutas de transporte que los mRNAs celulares, aunque no hay evidencias que lo aseguren. Ya que la transcripción viral no se realiza de la misma manera que la celular, si la exportación se efectuara por un mecanismo común, el virus debería haber desarrollado mecanismos para acabar interactuando con las mismas proteínas.

Todas estas actividades celulares, *capping*, *splicing* y ensamblaje de mRNPs, van asociadas a la transcripción llevada a cabo por la RNAP II celular y se dan de forma co-transcripcional, lo cual genera la pregunta de cómo accede la polimerasa viral a la RNAP II y, más concretamente, cómo consigue llegar a las estructuras cap de los transcritos celulares. Teniendo todo esto en cuenta, se hipotetizó que la

transcripción viral podría ocurrir de forma localizada en sitios donde tuviera lugar la transcripción celular. Los resultados presentados en esta tesis (Figura R2A) muestran que efectivamente, las RNPs virales colocalizan con los sitios en los que se encuentra la RNAP II en el núcleo de las células infectadas. Estos datos están de acuerdo con los obtenidos en el laboratorio de E. Fodor⁸⁶, en los que detectan colocalización entre RNAP II y PA en células infectadas. En este mismo estudio, Engelhardt y colaboradores muestran mediante ensayos de inmunoprecipitación que, además de colocalizar, la polimerasa viral y la RNAP II interactúan, que la interacción sucede a través del dominio CTD de la RNAP II y que son necesarias las tres subunidades de la polimerasa viral.

Estos resultados nada indican acerca de si la interacción entre ambas polimerasas es directa o no. El estudio antes mencionado⁸⁶ descarta la intervención de otras proteínas virales aparte de la polimerasa, pero la interacción podría estar mediada por uno o varios factores celulares. En cuanto a los factores celulares conocidos hasta el momento que interactúan con la polimerasa viral, hay varias proteínas relacionadas con la transcripción y el *splicing* (ver apartado 3.1.2. de la Introducción) que podrían cumplir esta función, pero en ningún caso se ha descrito una interacción directa. Nuestros resultados sugieren que hCLE podría intervenir mediando esta interacción, ya que es un factor de transcripción asociado a la RNAP II (Figuras R6-R10), colocaliza con las vRNPs (Figura R2B), se detectan puntos de triple colocalización entre las vRNPs, la RNAP II y hCLE en células infectadas (Figura R2C) y además la interacción que hCLE presenta con la polimerasa viral a través de PA es directa¹⁴⁴.

Una vez iniciada su transcripción, los mRNAs virales necesitan asociarse a factores celulares que les faciliten el *splicing* y el transporte al citosol y, puesto que su transcripción no está mediada por la RNAP II, deben conseguir esta

asociación a través de estrategias diferentes a las de los mRNAs celulares. Esto estaría de acuerdo con la detección de la interacción de la polimerasa viral solamente con la RNAP II implicada en iniciación y no con la RNAP II que elonga⁸⁶. La asociación con la RNAP II en la fase de iniciación le permitiría a la polimerasa viral obtener los cap que necesita, y después cesaría esta interacción entre ambas polimerasas. La interacción entre ellas podría estar mediada por un factor intermediario, que se mantendría unido a la polimerasa del virus y que acompañaría al mRNA viral a lo largo de su transcripción, de su posible procesamiento y de su transporte al citosol, formando una mRNP junto con otros factores acompañantes. Teniendo en cuenta que existen argumentos para pensar que hCLE puede formar parte del conjunto de proteínas que cumplen esta función para los mRNAs celulares, junto con las evidencias enumeradas anteriormente, pensamos que hCLE es un firme candidato a cumplir este papel como intermediario entre las polimerasas viral y celular.

2 LA INTERACCIÓN DE hCLE CON PB2 PUEDE SER IMPORTANTE PARA EL CAP SNATCHING

Hasta ahora, los resultados que hemos discutido parecen sugerir un papel de hCLE integrando a la polimerasa viral y al mRNA que ésta sintetiza dentro del complicado engranaje de la transcripción, procesamiento y transporte celular. En esta memoria, presentamos resultados que demuestran una interacción entre hCLE y la subunidad PB2 de la polimerasa viral, además de la ya descrita interacción de hCLE con PA¹⁴⁴. Esta interacción se ha demostrado mediante diferentes métodos, desde relocalización de hCLE al coexpresarse con PB2 (Figura R1), hasta ensayos de coimmunoprecipitación (Figura R3) y cromatografía *in vitro* (Figura R5). La interacción *in vitro* no nos permite decir que exista una interacción directa entre hCLE y PB2, ya que aunque PB2-His está purificada, hCLE se sintetizó en un lisado de reticulocitos en un sistema acoplado de transcripción-traducción. Pero no podemos descartar esta posibilidad, ya que la interacción observada con PB2-His es incluso mejor que la que se observa con His-PA (interacción directa,¹⁴⁴) en el mismo ensayo, y los lisados de reticulocitos carecen de muchas de las proteínas de un extracto celular convencional, por lo que el lisado aportaría menos posibles intermediarios.

En la línea del papel que creemos que puede tener hCLE y que se ha discutido en el

apartado anterior, esta nueva interacción resulta muy interesante, ya que es precisamente la subunidad PB2 dentro del complejo de la polimerasa viral la que reconoce las estructuras cap de los mRNAs celulares^{30 31 261, 333}. Además, como ya se ha mencionado en el apartado 1.4. de esta Discusión, hCLE se une a resinas de análogos de cap (Figura R14), y hCLE y PB2 copurifican en cromatografías de afinidad con este tipo de resinas (Figura R4). Por lo tanto, hCLE podría estar implicada situando a la polimerasa viral, en concreto a través de PB2, cerca de las estructuras cap de los mRNAs celulares para poder llevar a cabo el *cap snatching* por el cual la polimerasa viral obtiene sus cebadores para iniciar la transcripción.

3 LA POLIMERASA VIRAL DEGRADA A LA RNA POLIMERASA II A TIEMPOS TARDÍOS DE INFECCIÓN

Considerando los resultados que muestran que la polimerasa viral interacciona con la forma hipofosforilada e hiperfosforilada en Ser5 de la RNAP II (implicada en iniciación)⁸⁶, y que hCLE interacciona tanto con la polimerasa viral⁽¹⁴⁴⁾ y nuestros resultados), como con al menos dos formas de fosforilación de la RNAP II (nuestros resultados), nos preguntamos qué sucedería con el estado de fosforilación de la RNAP II a lo largo de la infección. Los resultados que se van a discutir a continuación no forman parte del contenido de esta tesis pero han sido obtenidos gracias al trabajo conjunto, durante el transcurso de la misma, de Ariel Rodríguez y de Alicia Pérez González, autora de esta memoria, como se puede ver en la publicación a la que dieron lugar²⁷⁷.

El estudio de las tres formas de fosforilación de la RNAP II a lo largo de un ciclo de infección dio lugar a la observación de que la forma hipofosforilada desaparecía progresivamente en células infectadas con el virus de la gripe. La disminución en los niveles de acumulación de esta forma de RNAP II comenzaba a tiempo medio de infección, siendo casi indetectables a tiempos tardíos. Curiosamente, los niveles de las formas hiperfosforiladas de RNAP II se mantenían inalterados. El análisis con anticuerpos que detectan la región N-terminal de la subunidad mayor de la RNAP II demostraron que esta degradación afectaba a la subunidad completa y no sólo a su dominio C-terminal (CTD). Ensayos de síntesis de RNA en núcleos aislados de células infectadas, mostraron que la actividad de la RNAP II se inhibe en la infección y que esta inhibición se correlaciona con el comienzo de la degradación

observada anteriormente.

En cuanto a la relación de la degradación de la RNAP II hipofosforilada causada por el virus con la cinética de infección, se observó que la disminución en la actividad y en los niveles de RNAP II coincidía con el comienzo de la acumulación de los RNAs virales, tanto mRNA como vRNA, es decir, con el comienzo de la transcripción y la replicación. El hecho de que el virus pueda llevar a cabo su transcripción mientras se inhibe la actividad de la RNAP II puede resultar paradójico, pero puede explicarse, ya que el virus no necesita transcritos celulares completos, sino solamente oligonucleótidos con estructura cap de unos 15 residuos de longitud^{62, 91}. A pesar de que el máximo de inhibición de la actividad de la RNAP II se alcanza entre 4-5 hpi, esta inhibición no es total y es posible que los mRNAs con estructura cap acumulados hasta ese momento puedan ser suficientes para que el virus lleve a cabo la transcripción de sus mRNAs o bien que la actividad residual sea suficiente para cubrir las necesidades del virus. Como se mencionó en el apartado 2.2.2. de la Introducción, la replicación viral se da en ausencia de cebador, lo que la hace independiente de la transcripción celular, lo cual explica que el vRNA se sintetice perfectamente a pesar de la inhibición de la RNAP II. Estos resultados están de acuerdo con los datos de Chan y colaboradores que, mediante inmunoprecipitación de cromatina en células infectadas, observan que en la región codificante de los genes celulares hay mucha menos RNAP II asociada que en la región del promotor, indicando que la infección con el virus de la gripe causa la inhibición de la elongación de la transcripción celular sin afectar a la iniciación⁵⁶.

La modificación de la RNAP II es una estrategia empleada por muchos virus para mejorar su transcripción o replicación. Algunos virus producen una mayor activación de la RNAP II aumentando el grado de fosforilación del CTD^{17, 54, 76, 148, 319}, o por el contrario causan la defosforilación del CTD^{98, 325}, o incluso la degradación de la RNAP II^{64, 283}, según sus necesidades. Resulta curioso que algunos de estos virus y el caso del virus de la gripe que aquí presentamos, cuya expresión depende de la RNAP II, inhiban su actividad incluso llegando a degradarla. Posiblemente estos mecanismos sirvan para evitar la competencia de la transcripción celular, una vez que el virus ya no la necesita, y cumplieran una doble función contribuyendo a la patogénesis causada por la infección.

4 hCLE PODRÍA ENCONTRARSE EN LOS COMPLEJOS DE TRADUCCIÓN DE LOS MENSAJEROS VIRALES

La infección por el virus de la gripe causa una disminución progresiva de la expresión de genes celulares, fenómeno conocido como *shut-off* celular. El *shut-off* es el efecto conjunto de varias acciones que el virus ejerce para bloquear etapas clave en la expresión génica celular. Así, el *cap snatching*, que provoca la degradación de los mRNAs que pierden el cap, la inhibición del *splicing*⁹⁷, del corte y poliadenilación^{59, 240} y de la exportación de los mRNAs celulares^{66, 97, 159} son eventos que contribuyen al *shut-off*. También son mecanismos clave para la inhibición de la expresión de genes celulares la degradación de los mRNAs citosólicos^{24, 145, 159}, el bloqueo de la traducción de mRNAs celulares a nivel de iniciación y elongación¹⁵⁸ y la traducción preferencial de los mRNAs virales²⁵⁷.

En los apartados 2.1. y 2.2. de esta Discusión hemos propuesto una posible función de hCLE en relación con la transcripción viral y su dependencia de la transcripción celular y sus procesos asociados, *capping*, *splicing*, corte y poliadenilación y transporte al citosol. Teniendo en cuenta que hCLE se encuentra formando parte de mRNPs citosólicas formadas en el núcleo y que parece que permanece en ellas hasta la traducción del mRNA transportado, podríamos pensar que la función de hCLE antes planteada se prolongue hasta la traducción de los mRNAs virales y que pueda colaborar de alguna manera en esta última etapa de la expresión génica.

Se sabe poco acerca del mecanismo mediante el cual el virus consigue que sus mensajeros se traduzcan eficazmente sin sufrir la degradación ni el bloqueo de la traducción celular. Se ha descrito la relevancia que tiene para la ventaja traduccional de los mRNAs virales la secuencia 5' no traducida (5' UTR), situada entre el cap usado como cebador y la región codificante^{66, 83, 108}. Se conocen dos factores celulares, el autoantígeno La y GRSF-1 (*G-rich sequence factor 1*)²⁵⁸, que interactúan con esta secuencia. No existen datos que impliquen al autoantígeno La en la traducción de los mRNAs de gripe²⁵⁷, aunque se sabe que en otros virus está implicado en estimular la traducción a través de IRES (*internal ribosome entry site*)^{9, 166}. En cuanto a GRSF-1, se ha visto que su unión al 5' UTR aumenta la traducibilidad del mRNA de NP²⁵⁸, pero no se ha descrito que tenga el mismo efecto para los demás mRNAs del virus, por lo que no permite explicar la ventaja traduccional asociada a las secuencias 5' UTR. En cuanto a factores virales, se sabe que NS1 interactúa con estas secuencias²⁵⁷, pero tampoco NS1 es imprescindible para la traducción selectiva de los mRNAs virales ya que un virus carente de esta proteína es capaz de traducir sus mensajeros, aunque con defectos en la síntesis de los mensajeros tardíos, y causa un *shut-off* eficaz²⁸⁵. Se ha descrito que la polimerasa viral puede unirse a

los mRNAs del virus precisamente por la región del 5' UTR y que mediante esta interacción los protege del *cap snatching*³⁰⁰. Datos de nuestro laboratorio, incluidos en la tesis doctoral de Idoia Burgui⁴⁵, han mostrado que la polimerasa viral interacciona con el factor de iniciación de la traducción eIF4GI de manera independiente de NS1 (la otra proteína viral capaz de unir eIF4GI), por lo que la asociación de la polimerasa al 5' UTR de los mensajeros virales podría señalarlos para la traducción preferencial o protegerlos de la degradación y del bloqueo de la traducción que sufren los mensajeros celulares. Además, en un estudio de factores celulares asociados a la polimerasa viral mediante proteómica llevado a cabo por Núria Jorba en el laboratorio de Juan Ortín, se ha identificado la proteína S3 de la subunidad 40S del ribosoma asociada a la polimerasa, lo cual representa otro vínculo entre la polimerasa del virus y la maquinaria de iniciación de la traducción (Jorba y colaboradores, resultados no publicados). La interacción entre la polimerasa y eIF4GI puede no ser directa y, aunque no parece estar mediada por otras proteínas virales, podría intervenir algún factor celular. Los resultados presentados por Idoia Burgui en su tesis doctoral⁴⁵ también muestran que la inhibición funcional del factor de traducción eIF4E y la disminución en sus niveles de acumulación, no impiden el progreso de la infección con el virus de la gripe. eIF4E es la proteína de unión a cap citosólica y forma parte del complejo

eIF4F junto con eIF4G y eIF4A. Estos resultados indican que otro factor debería sustituir a eIF4E en la unión al cap de los mRNAs en la infección, ya que no tenemos indicios de que la traducción de los mRNAs de gripe sea cap-independiente, pero estos datos sugieren que puede ser 4E-independiente.

Teniendo en cuenta que la polimerasa viral se une a las 5' UTR de los mRNAs y que interacciona con eIF4GI y con al menos una proteína ribosomal, podría ser el complejo de la polimerasa quien funcionara como *cap-binding complex* facilitando la traducción de los mRNAs virales. Además, el mRNA viral estaría en el contexto de la mRNP formada durante su paso por el núcleo, en la que se podrían encontrar hCLE y sus proteínas asociadas. En este modelo, hCLE podría participar de alguna manera manteniendo las interacciones entre los componentes del complejo, ya que se ha mostrado (Figura R14) su capacidad de unir cap en extractos citosólicos, y hay que mencionar que se ha detectado su interacción con PB2 en el citosol mediante inmunoprecipitación (resultados no mostrados). Las proteínas EF-1 α y Staufen, presentes también en la mRNP, podrían intervenir en la mejor traducción del mensajero. No podemos olvidar el posible papel de la proteína viral NS1, que tiene la capacidad de establecer interacciones con varios elementos de este complejo: las 5' UTR de los mRNAs²⁵⁷, la proteína Staufen⁸⁸, y los factores de traducción eIF4GI y PABP-1⁴⁶.

POSIBLE PAPEL DE hCLE EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE

Los resultados presentados a lo largo de esta memoria considerados en el contexto de todas las evidencias que aquí se han discutido, nos sugieren una participación de hCLE a varios niveles en la expresión génica viral.

Las vRNPs recién liberadas al citosol al comienzo de la infección viajarían al núcleo, donde interaccionarían con hCLE, que las situaría próximas a la maquinaria de transcripción, donde podrían asociarse a la RNAP II y establecer contacto con las estructuras cap de los pre-mRNAs celulares. Así, la polimerasa viral podría llevar a cabo el *cap snatching*, tras el cual las vRNPs inducirían la degradación de la RNAP II y llevarían a cabo la transcripción del mRNA viral. Durante estos eventos, hCLE se mantendría unida a la polimerasa viral, y así le facilitaría la asociación a los factores de *splicing*, procesamiento y exportación que, en conjunto, llegarían a formar una mRNP viral. Esta mRNP

sería transportada al citosol, donde se dirigiría a la maquinaria de iniciación de la traducción gracias a la interacción de la polimerasa viral con eIF4GI y con proteínas ribosomales. El resto de las proteínas de la mRNP ejercerían las funciones que suelen desempeñar en la traducción de mRNAs celulares, cuyos detalles aun desconocemos, pero podemos sugerir la posible importancia que tendrían EF-1 α como factor de elongación de la traducción, Staufen como componente habitual de estos complejos y NS1, que establece múltiples contactos entre proteínas implicadas en traducción.

A pesar de la dificultad de comprender el significado y el momento en el que se producen las interacciones, esperamos estar cada vez más cerca de desentrañar las asociaciones que establece el virus con la compleja maquinaria de la célula infectada.

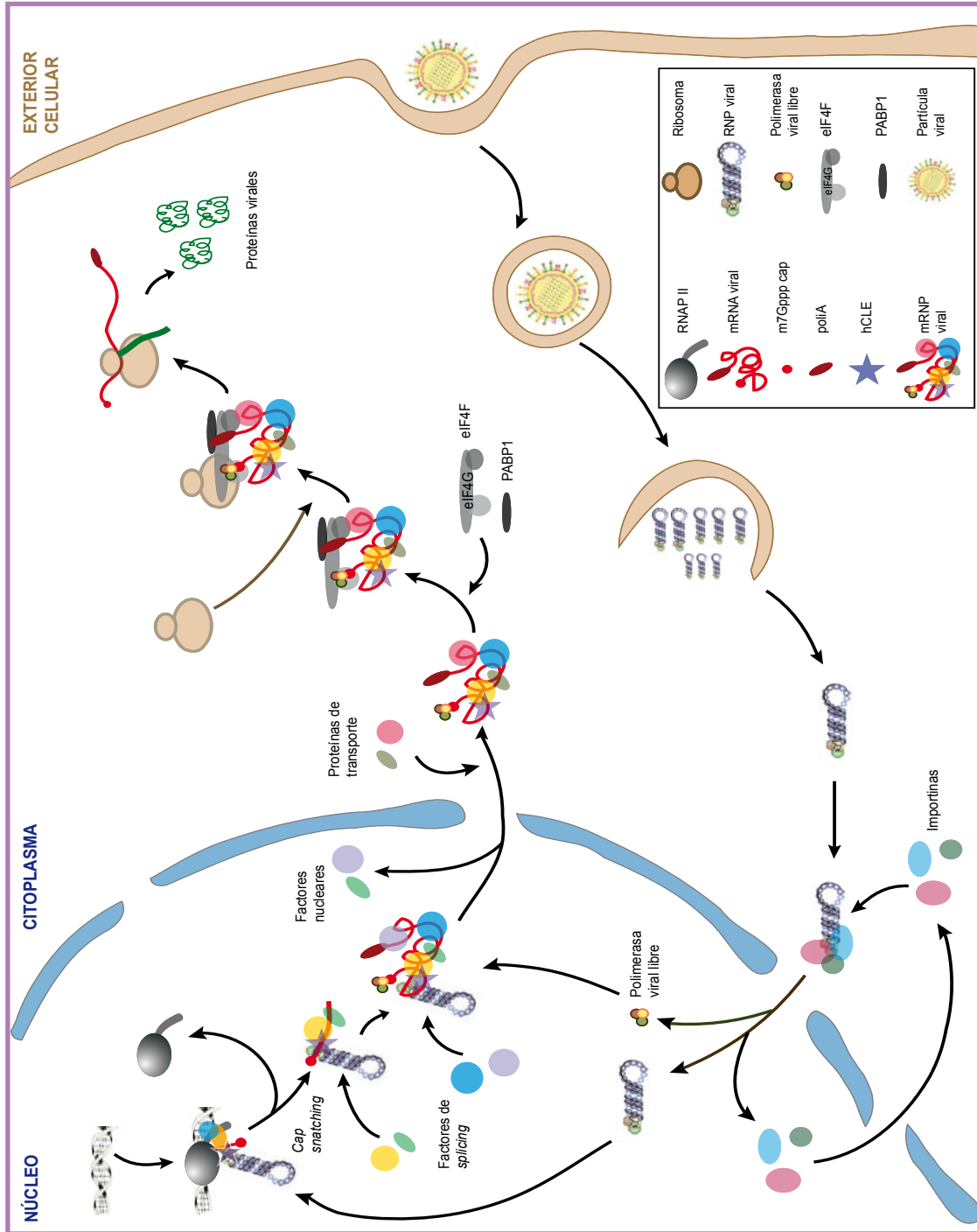


Figura D2. Modelo en que se representan la transcripción y traducción viral acopladas a la maquinaria celular.

Se representa esquemáticamente la entrada de una partícula viral a una célula y los eventos que, según nuestro modelo, tendrían lugar para la transcripción, transporte y traducción de un mRNA viral hasta la síntesis de las proteínas virales.







CONCLUSIONES

- 1** La proteína hCLE interacta *in vivo* e *in vitro* con la subunidad PB2 de la polimerasa del virus de la gripe. La región amino-terminal de PB2 es suficiente para que ocurra esta interacción *in vitro*.
- 2** hCLE colocaliza en el núcleo con las RNPs virales en células infectadas, existiendo puntos nucleares en los que ambas colocalizan además con la RNA polimerasa II celular.
- 3** hCLE se asocia físicamente a los complejos de transcripción de la RNA polimerasa II celular, independientemente de su estado de fosforilación, y se encuentra en sitios de síntesis activa de RNA llevada a cabo en estos complejos.
- 4** El silenciamiento de hCLE produce una importante disminución en la transcripción celular mediada por la RNA polimerasa II, afectando la expresión de un gran número de genes pertenecientes a familias y grupos funcionales muy variados.
- 5** En extractos nucleares, hCLE se asocia a la cadena pesada de la miosina, a la RNA helicasa A y a los factores de transcripción PSF/SFPQ y NonO, entre otras proteínas.
- 6** En extractos citosólicos, hCLE se asocia a la RNA helicasa DDX1, a la chaperona HSP70, a la proteína adaptadora CLASP2, a HSPC117 y a la glucosidasa I.
- 7** La proteína hCLE, tanto si se encuentra en extractos nucleares como citosólicos, es capaz de asociarse a estructuras cap.





BIBLIOGRAFÍA

1. **Adelman, K., Marr, M. T., Werner, J., Saunders, A., Ni, Z., Andrulis, E. D., and Lis, J. T.** 2005. Efficient release from promoter-proximal stall sites requires transcript cleavage factor TFIIIS. *Mol Cell* **17**:103-112.
2. **Ainger, K., Avossa, D., Diana, A. S., Barry, C., Barbarese, E., and Carson, J. H.** 1997. Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *J Cell Biol* **138**:1077-1087.
3. **Ainger, K., Avossa, D., Morgan, F., Hill, S. J., Barry, C., Barbarese, E., and Carson, J. H.** 1993. Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J Cell Biol* **123**:431-441.
4. **Akkina, R. K., Chambers, T. M., Londo, D. R., and Nayak, D. P.** 1987. Intracellular localization of the viral polymerase proteins in cells infected with influenza virus and cells expressing PB1 protein from cloned cDNA. *J. Virol.* **61**:2217-2224.
5. **Al-Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R., and Dopazo, J.** 2004. FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics* **20**:578-580.
6. **Albert, A., Lavoie, S., and Vincent, M.** 1999. A hyperphosphorylated form of RNA polymerase II is the major interphase antigen of the phosphoprotein antibody MPM-2 and interacts with the peptidyl-prolyl isomerase Pin1. *J Cell Sci* **112 (Pt 15)**:2493-2500.
7. **Albo, C., Valencia, A., and Portela, A.** 1995. Identification of an RNA binding region within the N-terminal third of the influenza A virus nucleoprotein. *J. Virol.* **69**:3799-3806.
8. **Ali, A., Avalos, R. T., Ponimaskin, E., and Nayak, D. P.** 2000. Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J Virol* **74**:8709-8719.
9. **Ali, N., and Siddiqui, A.** 1997. The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:2249-2254.
10. **Aragón, T., de la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortín, J., and Nieto, A.** 2000. Eukaryotic translation initiation factor 4G1 is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol. Cell. Biol.* **20**:6259-6268.
11. **Area, E., Martín-Benito, J., Gastaminza, P., Torreira, E., Valpuesta, J. M., Carascosa, J. L., and Ortín, J.** 2004. 3D Structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:308-313.
12. **Asano, Y., Mizumoto, K., Maruyama, T., and Ishihama, A.** 1995. Photoaffinity labeling of influenza virus RNA polymerase PB1 subunit with 8-azido GTP. *J Biochem Tokyo* **117**:677-682.

13. **Avalos, R. T., Yu, Z., and Nayak, D. P.** 1997. Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells. *J Virol* **71**:2947-2958.
14. **Avila-Flores, A., Santos, T., Rincon, E., and Merida, I.** 2005. Modulation of the mTOR pathway by diacylglycerol kinase-produced phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **280**:10091-10099.
15. **Barbee, S. A., Estes, P. S., Cziko, A. M., Hillebrand, J., Luedeman, R. A., Collier, J. M., Johnson, N., Howlett, I. C., Geng, C., Ueda, R., Brand, A. H., Newbury, S. F., Wilhelm, J. E., Levine, R. B., Nakamura, A., Parker, R., and Ramaswami, M.** 2006. Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron* **52**:997-1009.
16. **Bárcena, J., S., d. I. L., Ochoa, M., Melero, J. A., Nieto, A., Ortín, J., and Portela, A.** 1994. Monoclonal antibodies against the influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. *J. Virol.* **68**:6900-6909.
17. **Bark-Jones, S. J., Webb, H. M., and West, M. J.** 2005. EBV EBNA 2 stimulates CDK9-dependent transcription and RNA polymerase II phosphorylation on serine 5. *Oncogene.* **12**:1775-1785
18. **Barrett, T., Wolstenholme, A. J., and Mahy, B. W. J.** 1979. Transcription and replication of influenza virus RNA. *Virology* **98**:211-225.
19. **Basler, C. F., Wang, X., Muhlberger, E., Volchkov, V., Paragas, J., Klenk, H. D., Garcia-Sastre, A., and Palese, P.** 2000. The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:12289-12294.
20. **Bassell, G. J., and Kelic, S.** 2004. Binding proteins for mRNA localization and local translation, and their dysfunction in genetic neurological disease. *Curr Opin Neurobiol* **14**:574-581.
21. **Bates, G. J., Nicol, S. M., Wilson, B. J., Jacobs, A. M., Bourdon, J. C., Wardrop, J., Gregory, D. J., Lane, D. P., Perkins, N. D., and Fuller-Pace, F. V.** 2005. The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. *Embo J* **24**:543-553.
22. **Baudin, F., Bach, C., Cusack, S., and Ruigrok, R. W.** 1994. Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *Embo J* **13**:3158-3165.
23. **Beaton, A. R., and Krug, R. M.** 1986. Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **83**:6282-6286.
24. **Beloso, A., Martínez, C., Valcárcel, J., Fernández-Santarén, J., and Ortín, J.** 1992. Degradation of cellular mRNA during influenza virus infection: its possible role in protein synthesis shutoff. *J. Gen. Virol.* **73**:575-581.
25. **Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V. A., Orphanides, G., Studitsky, V. M., and Reinberg, D.** 2003. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* **301**:1090-1093.
26. **Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., and Golani, I.** 2001. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* **125**:279-284.
27. **Biswas, S. K., Boutz, P. L., and Nayak, D. P.** 1998. Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J. Virol.* **72**:5493-5501.
28. **Biswas, S. K., and Nayak, D.** 1996. Influenza virus polymerase basic protein 1 interacts with influenza virus polymerase basic protein 2 at multiple sites. *J. Virol.* **70**:6716-6722.
29. **Biswas, S. K., and Nayak, D. P.** 1994. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J. Virol.* **68**:1819-26.
30. **Blaas, D., Patzelt, E., and Kuechler, E.** 1982. Cap-recognizing protein of influenza virus. *Virology* **116**:339-348.
31. **Blaas, D., Patzelt, E., and Kuechler, E.** 1982. Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nuc. Acid. Res.* **10**:4803-4812.
32. **Bleoo, S., Sun, X., Hendzel, M. J., Rowe, J. M., Packer, M., and Godbault, R.** 2001. Association of human DEAD box protein DDX1 with a cleavage stimulation factor involved in 3'-end processing of pre-mRNA. *Mol. Biol. Cell* **12**:3046-3059.

33. **Bortvin, A., and Winston, F.** 1996. Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. *Science* **272**:1473-1476.
34. **Bouloy, M., Morgan, M. A., Shatkin, A. J., and Krug, R. M.** 1979. Cap and internal nucleotides of reovirus mRNA primers are incorporated into influenza viral complementary RNA during transcription in vitro. *J Virol* **32**:895-904.
35. **Bouloy, M., Plotch, S. J., and Krug, R. M.** 1980. Both the 7-methyl and the 2'-O-methyl groups in the cap of mRNA strongly influence its ability to act as primer for influenza virus RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:3952-3956.
36. **Braam, J., Ulmanen, I., and Krug, R. M.** 1983. Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell* **34**:609-618.
37. **Bratt, E., and Ohman, M.** 2003. Coordination of editing and splicing of glutamate receptor pre-mRNA. *Rna* **9**:309-318.
38. **Brendel, C., Rehbein, M., Kreienkamp, H. J., Buck, F., Richter, D., and Kindler, S.** 2004. Characterization of Staufien 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J* **384**:239-246.
39. **Brewster, N. K., Johnston, G. C., and Singer, R. A.** 1998. Characterization of the CP complex, an abundant dimer of Cdc68 and Pob3 proteins that regulates yeast transcriptional activation and chromatin repression. *J. Biol. Chem.* **273**:21972-21979.
40. **Briedis, D. J., Conti, G., Munn, E. A., and Mahy, B. W. J.** 1981. Migration of influenza virus-specific polypeptides from cytoplasm to nucleus of infected cells. *Virology* **111**:154-164.
41. **Brownlee, G. G., and Fechter, P.** 2005. Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins. *J. Gen. Virol.* **86**:1239-1249.
42. **Brownlee, G. G., Fodor, E., Pritlove, D. C., Gould, K. G., and Dalluge, J. J.** 1995. Solid phase synthesis of 5'-diphosphorylated oligoribonucleotides and their conversion to capped m7Gppp-oligoribonucleotides for use as primers for influenza A virus RNA polymerase in vitro. *Nucleic Acids Res* **23**:2641-2647.
43. **Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R.** 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**:550-552.
44. **Buratowski, S.** 2003. The CTD code. *Nat Struct Biol* **10**:679-680.
45. **Burgui, I.** 2006. Traducción selectiva de mRNAs del virus de la gripe: independencia de la proteína de unión al cap eIF4E y caracterización de proteínas virales implicadas. Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid.
46. **Burgui, I., Aragón, T., Ortín, J., and Nieto, A.** 2003. PABP1 and eIF4GI associate to influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J. Virol* **84**:3263-3274.
47. **Calvo, O., and Manley, J. L.** 2003. Strange bedfellows: polyadenylation factors at the promoter. *Genes Dev* **17**:1321-1327.
48. **Colgan, D. F., and Manley, J. L.** 1997. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* **11**:2755-2766.
49. **Colman, P. M., Varghese, J. N., and Laver, W. G.** 1983. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* **303**:41-44.
50. **Compans, R. W., Content, J., and Duesberg, P. H.** 1972. Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol* **10**:795-800.
51. **Compans, R. W., and Chopin, P. W.** 1975. Reproduction of Myxoviruses, p. 179-252. In Fraenkel-Conrat, H. a. W., R. R. (ed.), *Comprehensive Virology*, vol. 4. Plenum Press, New York.
52. **Coppola, J. A., Field, A. S., and Luse, D. S.** 1983. Promoter-proximal pausing by RNA polymerase II in vitro: transcripts shorter than 20 nucleotides are not capped. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:1251-1255.
53. **Cowland, J. B., Carter, D., Bjerregaard, M. D., Johnsen, A. H., Borregaard, N., and Lollike, K.** 2003. Tissue expression of copines and isolation of copines I and III from the cytosol of human neutrophils. *J Leukoc Biol* **74**:379-388.
54. **Cujec, T. P., Okamoto, H., Fujinaga, K., Meyer, J., Chamberlin, H., Morgan, D. O., and Peterlin, B. M.** 1997. The HIV transactivator TAT binds to the CDK-activating kinase and activates the phosphorylation of the carboxy-terminal

- domain of RNA polymerase II. *Genes Dev* **11**:2645-2657.
55. **Chabot, B., Bisotto, S., and Vincent, M.** 1995. The nuclear matrix phosphoprotein p255 associates with splicing complexes as part of the [U4/U6.U5] tri-snRNP particle. *Nucleic Acids Res* **23**:3206-3213.
 56. **Chan, A. Y., Vreede, F. T., Smith, M., Engelhardt, O. G., and Fodor, E.** 2006. Influenza virus inhibits RNA polymerase II elongation. *Virology* **1**: 210-217.
 57. **Chang, C. H., and Luse, D. S.** 1997. The H3/H4 tetramer blocks transcript elongation by RNA polymerase II in vitro. *J Biol Chem* **272**:23427-23434.
 58. **Chen, W., Calvo, P. A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J. R., and Yewdell, J. W.** 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**:1306-1312.
 59. **Chen, Z., Li, Y., and Krug, R. M.** 1999. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *Embo J* **18**:2273-2283.
 60. **Cho, H., Kim, T. K., Mancebo, H., Lane, W. S., Flores, O., and Reinberg, D.** 1999. A protein phosphatase functions to recycle RNA polymerase II. *Genes Dev* **13**:1540-1552.
 61. **Chou, M. Y., Rooke, N., Turck, C. W., and Black, D. L.** 1999. hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells. *Mol Cell Biol* **19**:69-77.
 62. **Chung, T. D., Cianci, C., Hagen, M., Terry, B., Matthews, J. T., Krystal, M., and Colonna, R. J.** 1994. Biochemical studies on capped RNA primers identify a class of oligonucleotide inhibitors of the influenza virus RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:2372-2376.
 63. **Chung, W. H., Craighead, J. L., Chang, W. H., Ezeokonkwo, C., Bareket-Samish, A., Kornberg, R. D., and Asturias, F. J.** 2003. RNA polymerase II/TFIIF structure and conserved organization of the initiation complex. *Mol Cell* **12**:1003-1013.
 64. **Dai-Ju, J. Q., Li, L., Johnson, L. A., and Sandri-Goldin, R. M.** 2006. ICP27 interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II and facilitates its recruitment to herpes simplex virus 1 transcription sites, where it undergoes proteasomal degradation during infection. *J Virol* **80**:3567-3581.
 65. **Dantoni, J. C., Murthy, K. G., Manley, J. L., and Tora, L.** 1997. Transcription factor TFIID recruits factor CPSF for formation of 3' end of mRNA. *Nature* **389**:399-402.
 66. **de la Luna, S., Fortes, P., Beloso, A., and Ortin, J.** 1995. Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J. Virol.* **69**:2427-2433.
 67. **de la Luna, S., Martinez, C., and Ortin, J.** 1989. Molecular cloning and sequencing of influenza virus A/Victoria/3/75 polymerase genes: sequence evolution and prediction of possible functional domains. *Virus Res* **13**:143-155.
 68. **Deng, T., Engelhardt, O. G., Thomas, B., Akoulitchev, A. V., Brownlee, G. G., and Fodor, E.** 2006. Role of ran binding protein 5 in nuclear import and assembly of the influenza virus RNA polymerase complex. *J Virol* **80**:11911-11919.
 69. **Desselberger, U., Raccaniello, V. R., Zazra, J. J., and Palese, P.** 1980. The 3' and 5'-end terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene* **3**: 315-328.
 70. **Digard, P., Blok, V. C., and Inglis, S. C.** 1989. Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology* **171**:162-169.
 71. **Digard, P., Elton, D., Bishop, K., Medcalf, E., Weeds, A., and Pope, B.** 1999. Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *J Virol* **73**:2222-2231.
 72. **Dignam, J. D., Levovitz, R. M., and Roeder, R. G.** 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl. Acids. Res.* **11**:1475-1488.
 73. **Doan, L., Handa, B., Roberts, N. A., and Klumpp, K.** 1999. Metal ion catalysis of RNA cleavage by the influenza virus endonuclease. *Biochemistry* **38**:5612-5619.
 74. **Duesberg, P. H.** 1969. Distinct subunits of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Mol Biol* **42**:485-499.

75. **Duhaut, S. D., and McCauley, J. W.** 1996. Defective RNAs inhibit the assembly of influenza virus genome segments in a segment-specific manner. *Virology* **216**:326-337.
76. **Durand, L. O., Advani, S. J., Poon, A. P., and Roizman, B.** 2005. The carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II is phosphorylated by a complex containing cdk9 and infected-cell protein 22 of herpes simplex virus 1. *J Virol* **79**:6757-6762.
77. **Ebright, R. H.** 2000. RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J Mol Biol* **304**:687-698.
78. **Elton, D., Digard, P., Tiley, L., and Ortín, J.** 2005. Structure and function of the influenza virus RNP, p. 1-92. In Kawaoka, Y. (ed.), *Current Topics in Influenza Virology*. Horizon Scientific Press, Norfolk.
79. **Elton, D., Medcalf, L., Bishop, K., Harrison, D., and Digard, P.** 1999. Identification of amino acid residues of influenza virus nucleoprotein essential for RNA binding. *J Virol* **73**:7357-7367.
80. **Elton, D., Simpson-Holley, M., Archer, K., Medcalf, L., Hallam, R., McCauley, J., and Digard, P.** 2001. Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol* **75**:408-4819.
81. **Elvira, G., Wasiak, S., Blandford, V., Tong, X. K., Serrano, A., Fan, X., del Rayo Sanchez-Carbente, M., Servant, F., Bell, A. W., Boismenu, D., Lacaille, J. C., McPherson, P. S., DesGroseillers, L., and Sossin, W. S.** 2006. Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol Cell Proteomics* **5**:635-651.
82. **Emili, A., Shales, M., McCracken, S., Xie, W., Tucker, P.W., Kobayashi, R., Blencowe, B. J., and Ingles, C. J.** 2002. Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54nrb/nonO bind to the RNA polymerase II CTD. *Rna* **8**:1102-1111.
83. **Enami, K., Sato, T. A., Nakada, S., and Enami, M.** 1994. Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J. Virol.* **68**:1432-1437.
84. **Enami, M., and Enami, K.** 1996. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein. *J Virol* **70**:6653-6657.
85. **Engelhardt, O. G., Sirma, H., Pandolfi, P. P., and Haller, O.** 2004. Mx1 GTPase accumulates in distinct nuclear domains and inhibits influenza A virus in cells that lack promyelocytic leukaemia protein nuclear bodies. *J Gen Virol* **85**:2315-2326.
86. **Engelhardt, O. G., Smith, M., and Fodor, E.** 2005. Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J. Virol.* **79**:5812-5818.
87. **Evans, D. R. H., Brewster, N. K., Xu, Q., Rowley, A., Altheim, B. A., Johnston, G. C., and Singer, R. A.** 1998. The yeast protein complex containing Cdc68 and Pob3 mediates core-promoter repression through the Cdc68 N-terminal domain. *Genetics* **150**:1393-1405.
88. **Falcón, A., Fortes, P., Marión, R. M., Beloso, A., and Ortín, J.** 1999. Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufien in vivo and in vitro. *Nuc. Acids. Res.* **27**:2241-2247.
89. **Falcón, A., Marión, R., Zürcher, T., Gomez, P., Portela, A., Nieto, A., and Ortín, J.** 2004. Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein. *J. Virol.* **78**:3880-3888.
90. **Farina, K. L., and Singer, R. H.** 2002. The nuclear connection in RNA transport and localization. *Trends Cell Biol* **12**:466-472.
91. **Fechter, P., Mingay, L., Sharps, J., Chambers, A., Fodor, E., and Brownlee, G. G.** 2003. Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding. *J Biol Chem* **278**:20381-20388.
92. **Fierro-Monti, I., Mohammed, S., Matthiesen, R., Santoro, R., Burns, J. S., Williams, D. J., Proud, C. G., Kassem, M., Jensen, O. N., and Roepstorff, P.** 2006. Quantitative proteomics identifies Gemin5, a scaffolding protein involved in ribonucleoprotein assembly, as a novel partner for eukaryotic initiation factor 4E. *J Proteome Res* **5**:1367-1378.
93. **Fodor, E., Crow, M., Mingay, L. J., Deng, T., Sharps, J., Fechter, P., and Brownlee, G. G.** 2002. A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. *J Virol* **76**:8989-9001.

94. Fodor, E., Mingay, L. J., Crow, M., Deng, T., and Brownlee, G. G. 2003. A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. *J Virol* **77**:5017-5020.
95. Fodor, E., Pritlove, D. C., and Brownlee, G. G. 1994. The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J Virol* **68**:4092-4096.
96. Fodor, E., Seong, B. L., and Brownlee, G. G. 1993. Photochemical cross-linking of influenza A polymerase to its virion RNA promoter defines a polymerase binding site at residues 9 to 12 of the promoter. *J Gen Virol* **74** (Pt 7):1327-1333.
97. Fortes, P., Beloso, A., and Ortín, J. 1994. Influenzavirus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks RNA nucleocytoplasmic transport. *The EMBO J.* **13**:704-712.
98. Fraser, K. A., and Rice, S. A. 2005. Herpes simplex virus type 1 infection leads to loss of serine-2 phosphorylation on the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Virol* **79**:11323-11334.
99. Fujii, K., Fujii, Y., Noda, T., Muramoto, Y., Watanabe, T., Takada, A., Goto, H., Horimoto, T., and Kawaoka, Y. 2005. Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J Virol* **79**:3766-3774.
100. Fujii, R., and Takumi, T. 2005. TLS facilitates transport of mRNA encoding an actin-stabilizing protein to dendritic spines. *J Cell Sci* **118**:5755-5765.
101. Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T., and Kawaoka, Y. 2003. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:2002-2007.
102. Fujinaga, K., Irwin, D., Huang, Y., Taube, R., Kurosu, T., and Peterlin, B. M. 2004. Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element. *Mol Cell Biol* **24**:787-795.
103. Fukuda, M., and Mikoshiba, K. 2001. Synaptotagmin-like protein 1-3: a novel family of C-terminal-type tandem C2 proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **281**:1226-1233.
104. Ganem, C., Devaux, F., Torchet, C., Jacq, C., Quevillon-Cheruel, S., Labesse, G., Facca, C., and Faye, G. 2003. Ssu72 is a phosphatase essential for transcription termination of snoRNAs and specific mRNAs in yeast. *Embo J* **22**:1588-1598.
105. Garaigorta, U., and Ortin, J. 2007. Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic Acids Res.* In press.
106. Garcia-Robles, I., Akarsu, H., Muller, C. W., Ruigrok, R. W., and Baudin, F. 2005. Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes. *Virology* **332**:329-336.
107. Garfinkel, M. S., and Katze, M. G. 1992. Translational control by influenza virus. Selective and cap-dependent translation of viral mRNAs in infected cells. *J Biol Chem* **267**:9383-9390.
108. Garfinkel, M. S., and Katze, M. G. 1993. Translational control by influenza virus. Selective translation is mediated by sequences within the viral mRNA 5'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* **268**:22223-22226.
109. Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Zermati, Y., Schmitt, E., and Kroemer, G. 2006. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* **5**:2592-2601.
110. Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M. A., Copley, R. R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G., and Superti-Furga, G. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**:141-147.
111. Gomez-Puertas, P., Albo, C., Perez-Pastrana, E., Vivo, A., and Portela, A. 2000. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol* **74**:11538-11547.
112. Gomez-Puertas, P., Mena, I., Castillo, M., Vivo, A., Perez-Pastrana, E., and Portela, A. 1999. Efficient formation of influenza

- virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *J Gen Virol* **80** (Pt 7):1635-1645.
113. **Gonzalez, S., and Ortin, J.** 1999. Characterization of influenza virus PB1 protein binding to viral RNA: two separate regions of the protein contribute to the interaction domain. *J Virol* **73**:631-637.
 114. **Gonzalez, S., and Ortín, J.** 1999. Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *EMBO J.* **18**:3767-3775.
 115. **González, S., Zürcher, T., and Ortín, J.** 1996. Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein involved in the interaction with the PB2 and PA subunits: a model for the viral RNA polymerase structure. *Nuc. Acids. Res.* **24**:4456-4463.
 116. **Goodrich, J. A., and Tjian, R.** 1994. Transcription factors IIE and IIH and ATP hydrolysis direct promoter clearance by RNA polymerase II. *Cell* **77**:145-56.
 117. **Green, M. R.** 2005. Eukaryotic transcription activation: right on target. *Mol Cell* **18**:399-402.
 118. **Gu, W., Pan, F., Zhang, H., Bassell, G. J., and Singer, R. H.** 2002. A predominantly nuclear protein affecting cytoplasmic localization of beta-actin mRNA in fibroblasts and neurons. *J Cell Biol* **156**:41-51.
 119. **Gubareva, L. V., Varich, N. L., Markushin, S. G., and Kaverin, N. V.** 1991. Studies on the regulation of influenza virus RNA replication: a differential inhibition of the synthesis of vRNA segments in shift-up experiments with ts mutants. *Arch Virol* **121**:9-17.
 120. **Hachet O, E. A.** 2004. Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature* **428**:959-963.
 121. **Hara, K., Shiota, M., Kido, H., Ohtsu Y, Kashiwagi, T., Iwahashi, J., Hamada, N., Mizoue, K., Tsumura, N., Kato, H., and Toyoda, T.** 2001. Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site. *Genes Cells* **6**:87-97.
 122. **Hartman, T. R., Qian, S., Bolinger, C., Fernandez, S., Schoenberg, D. R., and Boris-Lawrie, K.** 2006. RNA helicase A is necessary for translation of selected messenger RNAs. *Nat Struct Mol Biol* **13**:509-516.
 123. **Hartzog, G. A., Wada, T., Handa, H., and Winston, F.** 1998. Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **12**:357-369.
 124. **Hay, A. J.** 1982. Characterization of influenza virus RNA complete transcripts. *Virology*. **116**:517-522.
 125. **Hay, A. J., Abraham, G., Skehel, J. J., Smith, J. C. and Fellner, P.** 1977. Influenza virus messenger RNAs are incomplete transcripts of the genome RNAs. *Nucl. Acids. Res.* **4**:4197-4209.
 126. **Helenius, A.** 1992. Unpacking the incoming influenza virus. *Cell* **69**:577-578.
 127. **Hernandez, N.** 1993. TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev* **7**:1291-1308.
 128. **Hirayama, E., Atagi, H., Hiraki, A., and Kim, J.** 2004. Heat shock protein 70 is related to thermal inhibition of nuclear export of the influenza virus ribonucleoprotein complex. *J Virol* **78**:1263-1270.
 129. **Hirokawa, N., and Takemura, R.** 2005. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* **6**:201-214.
 130. **Hirose, Y., and Manley, J. L.** 2000. RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev* **14**:1415-1429.
 131. **Hirose, Y., Tacke, R., and Manley, J. L.** 1999. Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing. *Genes Dev* **13**:1234-1239.
 132. **Hoek, K. S., Kidd, G. J., Carson, J. H., and Smith, R.** 1998. hnRNP A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA. *Biochemistry* **37**:7021-7029.
 133. **Holsinger, L. J., and Lamb, R. A.** 1991. Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* **183**:32-43.
 134. **Holstege, F. C., van der Vliet, P. C., and Timmers, H. T.** 1996. Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *Embo J* **15**:1666-1677.
 135. **Honda, A., Mizumoto, K., and Ishihama, A.** 2002. Minimum molecular architectures for transcription and replication of the influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:13166-13171.

136. Honda, A., Mizumoto, K., and Ishihama, A. 1999. Two separate sequences of PB2 subunit constitute the RNA cap-binding site of influenza virus RNA polymerase. *Genes Cells* **8**:475-485.
137. Honda, A., Okamoto, T., and Ishihama, A. 2007. Host factor Ebp1: selective inhibitor of influenza virus transcriptase. *Genes Cells* **12**:133-142.
138. Honda, A., Ueda, K., Nagata, K., and Ishihama, A. 1988. RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem Tokyo* **104**:1021-1026.
139. Horne, R. W., Waterson, A. P., Wildy, P. and Famham, A. E. 1960. The structure and composition of the myxoviruses. I. Electron microscope studies on the structure of myxovirus particles by negative staining techniques. *Virology* **11**:79-88.
140. Houthaeve, T., Gausepohl, H., Mann, M., and Ashman, K. 1995. Automation of micro-preparation and enzymatic cleavage of gel electrophoretically separated proteins. *Febs Lett* **376**:91-94.
141. Hoyle, L., Horne, R. W., and Waterson, A. P. 1961. The structure and composition of the myxoviruses. II. Components released from the influenza virus particle by ether. *Virology* **13**:448-459.
142. Hsu, M. T., Parvin, J. D., Gupta, S., Krystal, M., and Palese, P. 1987. Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:8140-8144.
143. Huarte, M., Falcón, A., Nakaya, Y., Ortín, J., Garcia-Sastre, A., and Nieto, A. 2003. Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses. *J Virol* **77**:6007-6013.
144. Huarte, M., Sanz-Ezquerro, J. J., Roncal, F., Ortín, J., and Nieto, A. 2001. PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J Virol* **75**:8597-8604.
145. Inglis, S. C. 1982. Inhibition of host protein synthesis and degradation of cellular mRNAs during infection by influenza and Herpes simplex virus. *Mol. Cell. Biol.* **2**:1644-1648.
146. Inglis, S. C., Barret, T., Brown, C. M., and Almond, J. W. 1979. The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:3790-3794.
147. Inglis, S. C., and Brown, C. M. 1981. Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nucleic Acid Res.* **9**:2727-2740.
148. Isel, C., and Karn, J. 1999. Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation. *J Mol Biol* **290**:929-941.
149. Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Noda, T., Kiso, M., Maeda, J., Watanabe, S., Muramoto, Y., Fujii, K., and Kawaoka, Y. 2006. The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J Virol* **80**:5233-5240.
150. Izban, M. G., and Luse, D. S. 1991. Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II in vitro: inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing. *Genes Dev* **5**:683-696.
151. Jiang, Y., and Price, D. H. 2004. Rescue of the TTF2 knockdown phenotype with an siRNA-resistant replacement vector. *Cell Cycle* **3**:1151-1153.
152. Jones, I. M., Reay, P. A., and Philpott, K. L. 1986. Nuclear location of all three influenza polymerase proteins and a nuclear signal in polymerase PB2. *EMBO J.* **9**:2371-2376.
153. Jove, R., and Manley, J. L. 1984. In vitro transcription from the adenovirus 2 major late promoter utilizing templates truncated at promoter-proximal sites. *J Biol Chem* **259**:8513-8521.
154. Kafasla, P., Patrinoou-Georgoula, M., Lewis, J. D., and Guialis, A. 2002. Association of the 72/74-kDa proteins, members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M group, with the pre-mRNA at early stages of spliceosome assembly. *Biochem J* **363**:793-799.
155. Kanai, Y., Dohmae, N., and Hirokawa, N. 2004. Kinesin transport RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**:513-525.
156. Kaplan, C. D., Laprade, L., and Winston, F. 2003. Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites. *Science* **301**:1096-1099.

157. Kaplan, C. D., Morris, J. R., Wu, C., and Winston, F. 2000. Spt5 and spt6 are associated with active transcription and have characteristic of general elongation factors in *D. melanogaster*. *Genes Dev.* **14**:2635-2649.
158. Katze, M. G., Detjen, B. M., Safer, B., and Krug, R. M. 1986. Translational control by influenza virus: suppression of the kinase that phosphorylates the alpha subunit of initiation factor eIF-2 and selective translation of influenza viral mRNAs. *Mol Cell Biol* **6**:1741-1750.
159. Katze, M. G., and Krug, R. M. 1984. Metabolism and expression of RNA polymerase II transcripts in influenza virus-infected cells. *Mol. Cell. Biol.* **4**:2198-2206.
160. Katze, M. G., and Krug, R. M. 1990. Translational control in influenza virus-infected cells. *Enzyme* **44**:265-277.
161. Kettenberger, H., Armache, K. J., and Cramer, P. 2003. Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage. *Cell* **114**:347-357.
162. Kiebler, M. A., and DesGroseillers, L. 2000. Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* **25**:19-28.
163. Kiebler, M. A., Hemraj, I., Verkade, P., Kohrmann, M., Fortes, P., Marion, R. M., Ortin, J., and Dotti, C. G. 1999. The mammalian stau protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* **19**:288-297.
164. Kim, E., Du, L., Bregman, D. B., and Warren, S. L. 1997. Splicing factors associate with hyperphosphorylated RNA polymerase II in the absence of pre-mRNA. *J Cell Biol* **136**:19-28.
165. Kim, T. K., Ebright, R. H., and Reinberg, D. 2000. Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIH. *Science* **288**:1418-1422.
166. Kim, Y. K., and Jang, S. K. 1999. La protein is required for efficient translation driven by encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site. *J Gen Virol* **80** (Pt 12):3159-3166.
167. Kimura, Y., Sakai, F., Nakano, O., Kisaki, O., Sugimoto, H., Sawamura, T., Sadano, H., and Osumi, T. 2002. The newly identified human nuclear protein NXP-2 possesses three distinct domains, the nuclear matrix-binding, RNA-binding, and coiled-coil domains. *J Biol Chem* **277**:20611-20617.
168. Kindler, S., Wang, H., Richter, D., and Tiedge, H. 2005. RNA transport and local control of translation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**:223-245.
169. Kingsbury, D. W., Jones, I. M., and Murti, K. G. 1987. Assembly of influenza ribonucleoprotein in vitro using recombinant nucleoprotein. **156**:396-403.
170. Kireeva, M. L., Walter, W., Tchernajenko, V., Bondarenko, V., Kashlev, M., and Studitsky, V. M. 2002. Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription. *Mol Cell* **9**:541-552.
171. Klumpp, K., Ford, M. J., and Ruigrok, R. W. 1998. Variation in ATP requirement during influenza virus transcription. *J Gen Virol* **79** (Pt 5):1033-1045.
172. Klumpp, K., Ruigrok, R. W., and Baudin, F. 1997. Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *Embo J* **16**:1248-1257.
173. Knowles, R. B., Sabry, J. H., Martone, M. E., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Bassell, G. J., and Kosik, K. S. 1996. Translocation of RNA granules in living neurons. *J Neurosci* **16**:7812-7820.
174. Kobayashi, M., Toyoda, T., Adyshev, D. M., Azuma, Y., and Ishihama, A. 1994. Molecular dissection of influenza virus nucleoprotein: deletion mapping of the RNA binding domain. *J Virol* **68**:8433-8436.
175. Kobayashi, M., Toyoda, T., and Ishihama, A. 1996. Influenza virus PB1 protein is the minimal and essential subunit of RNA polymerase. *Arch Virol* **141**:525-539.
176. Kobor, M. S., and Greenblatt, J. 2002. Regulation of transcription elongation by phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1577**:261-275.
177. Kochs, G., and Haller, O. 1999. GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). *J Biol Chem* **274**:4370-4376.

178. Kohrmann, M., Luo, M., Kaether, C., DesGroseillers, L., Dotti, C. G., and Kiebler, M. A. 1999. Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* **10**:2945-2953.
179. Kornberg, R. D., and Lorch, Y. 1999. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**:285-294.
180. Kramer, A. 1996. The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu Rev Biochem* **65**:367-409.
181. Kress, T. L., Yoon, Y. J., and Mowry, K. L. 2004. Nuclear RNP complex assembly initiates cytoplasmic RNA localization. *J Cell Biol* **165**:203-211.
182. Krogan, N. J., Kim, M., Ahn, S. H., Zhong, G., Kobor, M. S., Cagney, G., Emili, A., Shilatifard, A., Buratowski, S., and Greenblatt, J. F. 2002. RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Mol. Cell. Biol.* **22**:6979-6992.
183. Krug, R. A., Ueda, M., and Palese, P. 1975. Temperature-sensitive mutants of influenza WSN virus defective in virus-specific RNA synthesis. *J. Virol.* **16**:790-796.
184. Krug, R. M., Alonso-Kaplen, F. V., Julkunen, I., and Katze, M. G. 1989. Expression and replication of the influenza virus genome., p. 89-152. In Krug, R. M. (ed.), *The influenza viruses*. Plenum Press, New York.
185. Krug, R. M., Broni, B. A., and Bouloy, M. 1979. Are the 5'-ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs? *Cell* **18**:329-334.
186. Lai, C. H., Chou, C. Y., Ch'ang, L. Y., Liu, C. S., and Lin, W. 2000. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Res* **10**:703-713.
187. Lamb, R. A., and Choppin, P. W. 1983. The gene structure and replication of influenza virus. *Annu Rev Biochem* **52**:467-506.
188. Lamb, R. A., and Choppin, P. W. 1979. Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4908-4912.
189. Lamb, R. A., and Lai, C. J. 1980. Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. *Cell* **21**:475-485.
190. Lamb, R. A., Lai, C. J., and Choppin, P. W. 1981. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:4170-4174.
191. Lee, S. W., Cho, B. H., Park, S. G., and Kim, S. 2004. Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: beyond translation. *J Cell Sci* **117**:3725-3734.
192. Li, B., Carey, M., and Workman, J. L. 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**:707-719.
193. Li, L., Roy, K., Katyal, S., Sun, X., Bleoo, S., and Godbout, R. 2006. Dynamic nature of cleavage bodies and their spatial relationship to DDX1 bodies, Cajal bodies, and gems. *Mol Biol Cell* **17**:1126-1140.
194. Li, M.-L., rao, P., and Krug, R. M. 2001. The active site of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *EMBO. J.* **20**:2078-2001.
195. Li, M. L., Ramirez, B. C., and Krug, R. M. 1998. RNA-dependent activation of primer RNA production by influenza virus polymerase: different regions of the same protein subunit constitute the two required RNA-binding sites. *EMBO J* **17**:5844-5852.
196. Li, M. L., Rao, P., and Krug, R. M. 2001. The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *Embo J* **20**:2078-2086.
197. Li, S., Min, J. Y., Krug, R. M., and Sen, G. C. 2006. Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology* **349**:13-21.
198. Liang, Y., Hong, Y., and Parslow, T. G. 2005. cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *J Virol* **79**:10348-10355.
199. Lin, C., Yang, L., Yang, J. J., Huang, Y., and Liu, Z. R. 2005. ATPase/helicase activities of p68 RNA helicase are required for pre-mRNA splicing but not for assembly of the spliceosome. *Mol Cell Biol* **25**:7484-7493.

200. Lindstrom, D. L., Squazzo, S. L., Muster, N., Burckin, T. A., Wachter, K. C., Emigh, C. A., McCleery, J. A., Yates, J. R., 3rd, and Hartzog, G. A. 2003. Dual roles for Spt5 in pre-mRNA processing and transcription elongation revealed by identification of Spt5-associated proteins. *Mol Cell Biol* **23**:1368-1378.
201. Liu, C., Eichelberger, M. C., Compans, R. W., and Air, G. M. 1995. Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J Virol* **69**:1099-1106.
202. Liu, Z. R. 2002. p68 RNA helicase is an essential human splicing factor that acts at the U1 snRNA-5' splice site duplex. *Mol Cell Biol* **22**:5443-5450.
203. Lu, Y., Qian, X. Y., and Krug, R. M. 1994. The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes Dev* **8**:1817-1828.
204. Lu, Y., Wambach, M., Katze, M. G., and Krug, R. M. 1995. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology* **214**:222-228.
205. Lusser, A., and Kadonaga, J. T. 2003. Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays* **25**:1192-1200.
206. Lutz, T., Stoger, R., and Nieto, A. 2006. CHD6 is a DNA-dependent ATPase and localizes at nuclear sites of mRNA synthesis. *FEBS Lett* **580**:5851-5857.
207. Ma, K., Roy, A. M., and Whittaker, G. R. 2001. Nuclear export of influenza virus ribonucleoproteins: identification of an export intermediate at the nuclear periphery. *Virology* **282**:215-220.
208. Mahy, B. W. J. 1983. Mutants of influenza virus., p. 192-253. In Palese, P. and Kingsbury, D. W. (ed.), *Genetics of influenza viruses*. Springer Verlag, Wien.
209. Manley, J. L., and Tacke, R. 1996. SR proteins and splicing control. *Genes Dev* **10**:1569-1579.
210. Marión, R. M., Fortes, P., Beloso, A., Dotti, C., and Ortín, J. 1999. A human sequence homologue of Staufin is an RNA binding protein that is associated to polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Moll. Cell. Biol.* **19**:2212-2219.
211. Martin-Benito, J., Area, E., Ortega, J., Llorca, O., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L., and Ortín, J. 2001. Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Rep* **2**:313-317.
212. Martin, K., and Helenius, A. 1991. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J Virol* **65**:232-244.
213. Mason, P. B., and Struhl, K. 2003. The FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation in vivo. *Mol Cell Biol* **23**:8323-8333.
214. Mayer, D., Molawi, K., Martinez-Sobrido, L., Ghanem, A., Thomas, S., Baginsky, S., Grossmann, J., Garcia-Sastre, A., and Schwemmle, M. 2007. Identification of cellular interaction partners of the influenza virus ribonucleoprotein complex and polymerase complex using proteomic-based approaches. *J Proteome Res* **6**:672-682.
215. McCown, M. F., and Pekosz, A. 2006. Distinct domains of the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *J Virol* **80**:8178-8189.
216. McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S. D., Wickens, M., and Bentley, D. L. 1997. The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* **385**:357-361.
217. Medcalf, L., Poole, E., Elton, D., and Digard, P. 1999. Temperature-sensitive lesions in two influenza A viruses defective for replicative transcription disrupt RNA binding by the nucleoprotein. *J. Virol.* **73**:7349-7356.
218. Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S., and Cramer, P. 2005. A structural perspective of CTD function. *Genes Dev* **19**:1401-1415.
219. Meinhart, A., Silberzahn, T., and Cramer, P. 2003. The mRNA transcription/processing factor Ssu72 is a potential tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* **278**:15917-15921.
220. Merrick, W. C., and J.W.B, H. 2000. The Pathway and Mechanism of Eukaryotic Protein Synthesis, p. 31-69. In Hershey J.W.B, M. M. B., Sonenberg N. (ed.), *Translational Control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

221. Mimori-Kiyosue, Y., Grigoriev, I., Lansbergen, G., Sasaki, H., Matsui, C., Severin, F., Galjart, N., Grosveld, F., Vorobjev, I., Tsukita, S., and Akhmanova, A. 2005. CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *J Cell Biol* **168**:141-153.
222. Mimori-Kiyosue, Y., Grigoriev, I., Sasaki, H., Matsui, C., Akhmanova, A., Tsukita, S., and Vorobjev, I. 2006. Mammalian CLASPs are required for mitotic spindle organization and kinetochore alignment. *Genes Cells* **11**:845-857.
223. Momose, F., Basler, C. F., O'Neil, R. E., Iwamatsu, A., Palese, P., and Nagata, K. 2001. Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J. Virol.* **75**:1899-1908.
224. Momose, F., Naito, T., Yano, K., Sugimoto, S., Morikawa, Y., and Nagata, K. 2002. Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J. Biol. Chem.* **277**:45306-45314.
225. Moore, M. J., and Sharp, P. A. 1993. Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing. *Nature* **365**:364-368.
226. Mortillaro, M. J., Blencowe, B. J., Wei, X., Nakayasu, H., Du, L., Warren, S. L., Sharp, P. A., and Berezney, R. 1996. A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:8253-8257.
227. Mowshowitz, S. L. 1981. RNA synthesis of temperature-sensitive mutants of WSN influenza virus. "The replication of Negative Stranded viruses" (D. H. L. Bishop and R. W. Compans, Eds.), Elsevier, New York. 317-323.
228. Mukaigawa, J., and Nayak, D. P. 1991. Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. *J. Virol.* **65**:245-253.
229. Muller, R., Poch, O., Delarue, M., Bishop, D. H., and Bouloy, M. 1994. Rift Valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. *J Gen Virol* **75 (Pt 6)**:1345-1352.
230. Munafo, D. B., Johnson, J. L., Ellis, B. A., Rutschmann, S., Beutler, B., and Catz, S. D. 2007. Rab27a is a key component of the secretory machinery of azurophilic granules in granulocytes. *Biochem J* **402**:229-239.
231. Muramoto, Y., Takada, A., Fujii, K., Noda, T., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., Horimoto, T., Kida, H., and Kawaoka, Y. 2006. Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol* **80**:2318-2325.
232. Murphy, B. R., and Webster, R. G. 1996. Orthomyxoviruses, p. 1397-1445. In B. N. Fields, D. M. K. a. H. (ed.), *Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia.
233. Muslimov, I. A., Titmus, M., Koenig, E., and Tiedge, H. 2002. Transport of Neuronal BC1 RNA in Mauthner Axons. *J Neurosci* **22**:4293-4301.
234. Naito, T., Momose, F., Kawaguchi, A., and Nagata, K. 2007. Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits. *J Virol* **81**:1339-1349.
235. Nakagawa, Y., Oda, K., and Nakada, S. 1996. The PB1 subunit alone can catalyze cRNA synthesis, and the PA subunit in addition to the PB1 subunit is required for viral RNA synthesis in replication of the influenza virus genome. *J Virol* **70**:6390-6394.
236. Nakajima, T., Uchida, C., Anderson, S. F., Lee, C. G., Hurwitz, J., Parvin, J. D., and Montminy, M. 1997. RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell* **90**:1107-1112.
237. Nath, S. T., and Nayak, D. P. 1990. Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1N1). *Mol. Cell. Biol.* **10**:4139-4145.
238. Nayak, D. P., Hui, E. K., and Barman, S. 2004. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* **106**:147-165.
239. Nayak, D. P., Sivasubramanian, N., Davis, A. R., Cortini, R., and Sung, J. 1982. Complete sequence analyses show that two defective interfering influenza viral RNAs contain a single internal deletion of a polymerase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**:2216-2220.

240. Nemeroff, M. E., Barabino, S. M., Li, Y., Keller, W., and Krug, R. M. 1998. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol Cell* **1**:991-1000.
241. Nieto, A., de la Luna, S., Bárcena, J., Portela, A., and Ortín, J. 1994. Complex structure of the nuclear translocation signal of the influenza virus polymerase PA subunit. *J. Gen. Virol.* **75**:29-36.
242. Nieto, A., de la Luna, S., Bárcena, J., Portela, A., Valcárcel, J., Melero, J. A., and Ortín, J. 1992. Nuclear transport of influenza virus polymerase PA protein. *Virus Res.* **24**:65-75.
243. Noda, T., Sagara, H., Yen, A., Takada, A., Kida, H., Cheng, R. H., and Kawaoka, Y. 2006. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* **439**:490-492.
244. O'Neill, R. E., and Palese, P. 1995. NPI-1, the human homolog of SRP-1, interacts with influenza virus nucleoprotein. *Virology* **206**:116-125.
245. O'Neill, R. E., Talon, J., and Palese, P. 1998. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *Embo J* **17**:288-296.
246. Ochoa, M., Bárcena, J., de la Luna, S., Melero, J.A., Douglas, A.R., Nieto, A., Ortín, J., Skehel, J.J. and Portela, A. 1995. Epitope mapping of cross-reactive monoclonal antibodies specific for the influenza A virus PA and PB2 polypeptides. *Virus Res* **37**:305-315.
247. Ohtsu, Y., Honda, Y., Sakata, Y., Kato, H., and Toyoda, T. 2002. Fine mapping of the subunit binding sites of influenza virus RNA polymerase. *Microbiol Immunol* **46**:167-175.
248. Okuhara, K., Ohta, K., Seo, H., Shioda, M., Yamada, T., Tanaka, Y., Dohmae, N., Seyama, Y., Shibata, T., and Murofushi, H. 1999. A DNA unwinding factor involved in DNA replication in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Current Biology* **9**:341-350.
249. Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. 1996. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* **10**:2657-2683.
250. Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C. H., Luse, D. S., and Reinberg, D. 1998. FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell* **92**:105-116.
251. Orphanides, G., Wu, W.-H., Lane, W. S., Hampsey, M., and Reinberg, D. 1999. The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature* **400**:284-288.
252. Ortega, J., Martín-Benito, J., Zürcher, T., Valpuesta, J. M., and Carrascosa, J. L. O., J. 2000. Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J. Virol.* **74**:156-163.
253. Ortín, J., Nájera, R., López, C., Dávila, M., and Domingo, E. 1980. Genetic variability of Hong Kong (H3N2) influenza viruses: spontaneous mutations and their location in the viral genome. *Gene* **11**:319-331.
254. Palancade, B., and Bensaude, O. 2003. Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* **270**:3859-3870.
255. Palese, P., and Shaw, M. 2006. Orthomyxoviruses: the viruses and their replication. In Knipe, D. M. a. H., P. M. (ed.), *Fields Virology*, 5th ed, vol. 1. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia.
256. Palese, P., Tobita, K., Ueda, M., and Compans, R. W. 1974. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* **61**:397-410.
257. Park, Y. W., and Katze, M. G. 1995. Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation. *J. Biol. Chem.* **270**:28433-28439.
258. Park, Y. W., Wilusz, J., and Katze, M. G. 1999. Regulation of eukaryotic protein synthesis: selective influenza viral mRNA translation is mediated by the cellular RNA-binding protein GRSF-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:6694-6699.
259. Pei, Y., Schwer, B., and Shuman, S. 2003. Interactions between fission yeast Cdk9, its cyclin partner Pch1, and mRNA capping enzyme Pct1 suggest an elongation checkpoint for mRNA quality control. *J Biol Chem* **278**:7180-7188.

260. Pei, Y., and Shuman, S. 2002. Interactions between fission yeast mRNA capping enzymes and elongation factor Spt5. *J Biol Chem* **277**:19639-19648.
261. Penn, C. R., Blaas, D., Kuechler, E., and Mahy, B. W. 1982. Identification of the cap-binding protein of two strains of influenza A/FPV. *J Gen Virol* **62** (Pt 1):177-180.
262. Perales, B., and Ortín, J. 1997. The influenza A virus PB2 polymerase subunit is required for the replication of viral RNA. *J. Virol.* **71**:1381-1385.
263. Perales, B., Sanz-Ezquerro, J. J., Gastaminza, P., Ortega, J., Fernandez-Santarén, J., Ortín, J., and Nieto, A. 2000. The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis. *J. Virol.* **74**:1307-1312.
264. Pereira, A. L., Pereira, A. J., Maia, A. R., Drabek, K., Sayas, C. L., Hergert, P. J., Lince-Faria, M., Matos, I., Duque, C., Stepanova, T., Rieder, C. L., Earnshaw, W. C., Galjart, N., and Maiato, H. 2006. Mammalian CLASP1 and CLASP2 cooperate to ensure mitotic fidelity by regulating spindle and kinetochore function. *Mol Biol Cell* **17**:4526-4542.
265. Pérez-González, A., Rodríguez, A., Huarte, M., Salanueva, I. J., and Nieto, A. 2006. hCLE/CGI-99, a human protein that interacts with the influenza virus polymerase, is a mRNA transcription modulator. *J. Mol. Biol.* **362**:887-900.
266. Perez, D. R., and Donis, R. O. 1995. A 48-amino-acid region of influenza A virus PB1 protein is sufficient for complex formation with PA. *J Virol* **69**:6932-6939.
267. Perez, D. R., and Donis, R. O. 1998. The matrix 1 protein of influenza A virus inhibits the transcriptase activity of a model influenza reporter genome in vivo. *Virology* **249**:52-61.
268. Pinto, L. H., Holsinger, L. J., and Lamb, R. A. 1992. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**:517-528.
269. Plotch, S. J., Bouloy, M., Ulmanen, I., and Krug, R. M. 1981. A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* **23**, 847-858.
270. Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M., and Tordo, N. 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *Embo J* **8**:3867-3874.
271. Poole, E., Elton, D., Medcalf, L., and Digard, P. 2004. Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology* **321**:120-133.
272. Poon, L. L., Fodor, E., and G., B. G. 2000. Polyuridylylated mRNA synthesized by a recombinant influenza virus is defective in nuclear export. *J. Virol.* **74**:418-427.
273. Poon, L. L., Pritlove, D. C., Fodor, E., and Brownlee, G. G. 1999. Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J. Virol.* **73**:3473-3476.
274. Proudfoot, N. J. 1989. How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **14**:105-110.
275. Richardson, J. C., and Akkina, R. K. 1991. NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch. Virol.* **116**:69-80.
276. Robertson, J. S. 1979. 5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic Acids Res* **6**:3745-3757.
277. Rodríguez, A., Pérez-González, A., and Nieto, A. 2007. Influenza virus infection causes specific degradation of the largest subunit of cellular RNA polymerase II. *J Virol* **81**:5315-5324.
278. Romanos, M. A., and Hay, A. J. 1984. Identification of the influenza virus transcriptase by affinity-labeling with pyridoxal 5'-phosphate. *Virology* **132**:110-117.
279. Rose, J. K., Buonocore, L., and Whitt, M. A. 1991. A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *Biotechniques* **10**:520-525.
280. Rosendorff, A., Sakakibara, S., Lu, S., Kieff, E., Xuan, Y., DiBacco, A., Shi, Y., Shi, Y., and Gill, G. 2006. NXP-2 association with SUMO-2 depends on lysines required for transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:5308-5313.

281. **Rott, R., and Scholtissek, C.** 1970. Specific inhibition of influenza replication by alpha-amanitin. *Nature* **228**:56.
282. **Ruddock, L. W., and Molinari, M.** 2006. N-glycan processing in ER quality control. *J Cell Sci* **119**:4373-4380.
283. **Ruf, M., Blakqori, G., Wagner, V., and Weber, F.** 2006. The interferon antagonist NSs of orthobunyaviruses targets the phosphorylated form of RNA polymerase II in a proteasome-dependent manner. *XIII International Conference on Negative Strand Viruses*:150.
284. **Ruigrok, R. W., and Baudin, F.** 1995. Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles. *J Gen Virol* **76 (Pt4)**: 1009-1014.
285. **Salvatore, M., Basler, C. F., Parisien, J. P., Horvath, C. M., Bourmakina, S., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., and Garcia-Sastre, A.** 2002. Effects of influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances translation and is not required for shutoff of host protein synthesis. *J Virol* **76**:1206-1212.
286. **Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning. A laboratory manual, Second Edition ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
287. **Sanz-Ezquerro, J. J., Fernández-Santarén, J., Sierra, T., Aragón, T., Ortega, J., Ortín, J., Smith, G. L., and Nieto, A.** 1998. The PA influenza virus polymerase subunit is a phosphorylated protein. *J. Gen. Virol.* **79**:471-478.
288. **Sanz-Ezquerro, J. J., Zurcher, T., de la Luna, S., Ortín, J., and Nieto, A.** 1996. The amino-terminal one-third of the influenza virus PA protein is responsible for the induction of proteolysis. *J. Virol.* **70**:1905-1911.
289. **Sato, Y., Yoshioka, K., Suzuki, C., Awashima, S., Hosaka, Y., Yewdell, J., and Kuroda, K.** 2003. Localization of influenza virus proteins to nuclear dot 10 structures in influenza virus-infected cells. *Virology* **310**:29-40.
290. **Scheiffele, P., Rietveld, A., Wilk, T., and Simons, K.** 1999. Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J Biol Chem* **274**:2038-2044.
291. **Schevchenko, V. A., Akayeva, E. A., Yeliseyeva, I. M., Yelisova, T. V., Yofa, E. L., Nilova, I. N., Syomov, A. B., and Burkart, W.** 1996. Human cytogenetic consequences of the Chernobyl accident. *Mutat Res* **361**:29-34.
292. **Scholtissek, C., and Becht, H.** 1971. Binding of ribonucleic acids to the RNP-antigen protein of influenza viruses. *J Gen Virol* **10**:11-16.
293. **Scholtissek, C., and Bowles, A. L.** 1975. Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of fowl plague virus. *Virology* **67**:576-587.
294. **Schroeder, S. C., Schwer, B., Shuman, S., and Bentley, D.** 2000. Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes Dev* **14**:2435-2440.
295. **Schuster, E. F., and Stöger, R.** 2002. CHD5 defines a new subfamily of chromodomain-SW12/SNF2-like helicases. *Mammalian genome* **13**: 117-119.
296. **Schwabish, M. A., and Struhl, K.** 2006. Asf1 mediates histone eviction and deposition during elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* **22**:415-422.
297. **Shapiro, G. I., Gurney, T. J., and Krug, R. M.** 1987. Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J Virol* **61**:764-773.
298. **Shapiro, G. I., and Krug, R. M.** 1988. Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J. Virol.* **62**:2285-2290.
299. **Shi, L., Galarza, J. M., and Summers, D. F.** 1996. Recombinant-baculovirus-expressed PB2 subunit of the influenza A virus RNA polymerase binds cap groups as an isolated subunit. *Virus Res* **42**:1-9.
300. **Shih, S. R., and Krug, R. M.** 1996. Surprising function of the three influenza viral polymerase proteins: selective protection of viral mRNAs against the cap-snatching reaction catalyzed by the same polymerase proteins. *Virology* **226**:430-435.
301. **Shope, R. E.** 1931. Swine influenza. III. Filtration experiments and etiology. *J Exp Med* **54**:373-380.

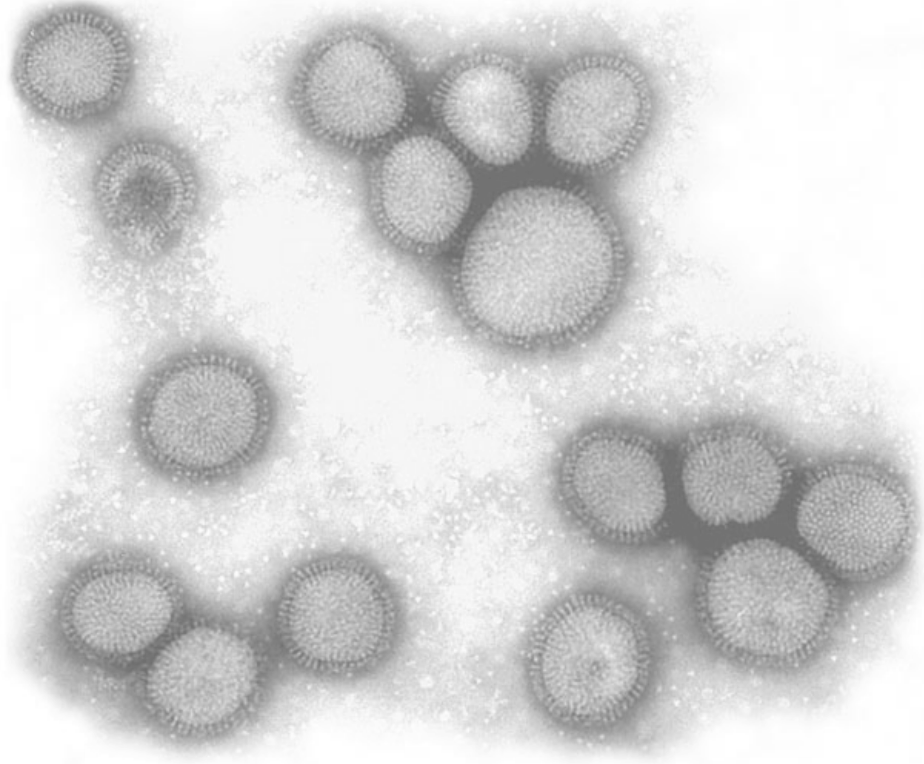
302. Simpson-Holley, M., Ellis, D., Fisher, D., Elton, D., McCauley, J., and Digard, P. 2002. A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts during budding of filamentous influenza virions. *Virology* **301**:212-225.
303. Skehel, J. J., Bizebard, T., Bullough, P. A., Hughson, F. M., Knossow, M., Steinhauer, D. A., Wharton, S. A., and Wiley, D. C. 1995. Membrane fusion by influenza hemagglutinin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**:573-580.
304. Skehel, J. J., and Hay, A. J. 1978. Nucleotide sequences at the 5' termini of influenza virus RNAs and their transcripts. *Nucleic Acids Res* **5**:1207-1219.
305. Sliter, T. J., and Gilbert, L. I. 1992. Developmental arrest and ecdysteroid deficiency resulting from mutations at the dre4 locus of *Drosophila*. *Genetics*. **130**:555-568.
306. Smith, G. L., and Hay, A. J. 1982. Replication of the influenza virus genome. *Virology* **118**:96-108.
307. Smith, G. L., Levin, J. Z., Palese, P., and Moss, B. 1987. Synthesis and cellular location of the ten influenza polypeptides individually expressed by recombinant vaccinia viruses [published erratum appears in *Virology* 1988 Mar;163(1):259]. *Virology* **160**:336-345.
308. Smith, W., Andrews, C. H., and Laidlaw, P. P. 1933. A virus obtained from influenza patients, p. 66-68, *Lancet*, vol. 1.
309. Smyth, G. K., Michaud, J., and Scott, H. S. 2005. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* **21**:2067-2075.
310. Sonenberg, N. 2000. mRNA 5' Cap-binding Protein eIF4E and Control of Cell Growth, p. 245-269. In Hershey J.W.B, M. M. B., Sonenberg N. (ed.), *Translational Control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
311. Sossin, W. S., and DesGroseillers, L. 2006. Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic* **7**:1581-1589.
312. Sousa, R., and Lafer, E. M. 2006. Keep the traffic moving: mechanism of the Hsp70 motor. *Traffic* **7**:1596-1603.
313. St Johnston, D. 2005. Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:363-375.
314. Stegmann, T., Booy, F. P., and Wilschut, J. 1987. Effects of low pH on influenza virus. Activation and inactivation of the membrane fusion capacity of the hemagglutinin. *J Biol Chem* **262**:17744-17749.
315. Stegmann, T., Morselt, H. W., Scholma, J., and Wilschut, J. 1987. Fusion of influenza virus in an intracellular acidic compartment measured by fluorescence dequenching. *Biochim Biophys Acta* **904**:165-170.
316. Stuart-Harris, C. H., Schild, G. C., and Oxford, J. S. 1985. *Influenza. The viruses and the disease*, Second edition ed. Arnold Press, Victoria.
317. Studitsky, V. M., Walter, W., Kireeva, M., Kashlev, M., and Felsenfeld, G. 2004. Chromatin remodeling by RNA polymerases. *Trends Biochem Sci* **29**:127-135.
318. Sun, Z. W., and Hampsey, M. 1996. Synthetic enhancement of a TFIIB defect by a mutation in SSU72, an essential yeast gene encoding a novel protein that affects transcription start site selection in vivo. *Mol Cell Biol* **16**:1557-1566.
319. Tamrakar, S., Kapasi, A. J., and Spector, D. H. 2005. Human cytomegalovirus infection induces specific hyperphosphorylation of the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II that is associated with changes in the abundance, activity, and localization of cdk9 and cdk7. *J Virol* **79**:15477-15493.
320. Tan, S. L., and Katze, M. G. 1998. Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase. *J Interferon Cytokine Res* **18**:757-766.
321. Tang, S. J., Meulemans, D., Vazquez, L., Colaco, N., and Schuman, E. 2001. A role for a rat homolog of stau6 in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* **32**:463-475.
322. Taylor, S. S., Haste, N. M., and Ghosh, G. 2005. PKR and eIF2alpha: integration of kinase dimerization, activation, and substrate docking. *Cell* **122**:823-825.
323. Tetsuka, T., Uranishi, H., Sanda, T., Asamitsu, K., Yang, J. P., Wong-Staal, F., and Okamoto, T. 2004. RNA helicase A interacts with nuclear factor kappaB p65 and functions as a transcriptional coactivator. *Eur J Biochem* **271**:3741-3751.

324. Thierry, F., and Danos, O. 1982. Use of specific single stranded DNA probes cloned in M13 to study the RNA synthesis of four temperature-sensitive mutants of HK/68 influenza virus. *Nucleic Acids Res.* **10**:2925-2937.
325. Thomas, D., Blakqori, G., Wagner, V., Banholzer, M., Kessler, N., Elliott, R. M., Haller, O., and Weber, F. 2004. Inhibition of RNA polymerase II phosphorylation by a viral interferon antagonist. *J Biol Chem* **279**:31471-31477.
326. Thomas, M. C., and Chiang, C. M. 2006. The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**:105-178.
327. Tiley, L. S., Hagen, M., Matthews, J. T., and Krystal, M. 1994. Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs. *J Virol* **68**:5108-5116.
328. Toyoda, T., Adyshev, D. M., Kobayashi, M., Iwata, A., and Ishihama, A. 1996. Molecular assembly of the influenza virus RNA polymerase: determination of the subunit-subunit contact sites. *J. Gen. Virol.* **77**:2149-2157.
329. Toyoda, T., Hara, K., and Imamura, Y. 2003. Ser624 of the PA subunit of influenza A virus is not essential for viral growth in cells and mice, but required for the maximal viral growth. *Arch Virol* **148**:1687-1696.
330. Tsvetkov, A. S., Samsonov, A., Akhmanova, A., Galjart, N., and Popov, S. V. 2007. Microtubule-binding proteins CLASP1 and CLASP2 interact with actin filaments. *Cell Motil Cytoskeleton* **64**: 519-530.
331. Turan, K., Mibayashi, M., Sugiyama, K., Saito, S., Numajiri, A., and Nagata, K. 2004. Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Res* **32**:643-652.
332. Ulmanen, I., Broni, B. A., and Krug, R. M. 1983. Influenza virus temperature-sensitive cap(m7GpppNm)-dependent endonuclease. *J Virol* **45**:27-35.
333. Ulmanen, I., Broni, B. A., and Krug, R. M. 1981. Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:7355-7359.
334. Valcárcel, J., Portela, A., and Ortín, J. 1991. Regulated M1 mRNA splicing in influenza virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* **72**:1301-1308.
335. Valineva, T., Yang, J., and Silvennoinen, O. 2006. Characterization of RNA helicase A as component of STAT6-dependent enhanceosome. *Nucleic Acids Res* **34**:3938-3946.
336. van Holde, K. E. 1989. Chromatin. Springer, New York.
337. Varghese, J. N., Laver, W. G., and Colman, P. M. 1983. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* **303**:35-40.
338. Villacé, P., Marión, R. M., and Ortín, J. 2004. The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic. Acids. Res.* **32**:2411-2420.
339. Wang, P., Palese, P., and O'Neill, R. E. 1997. The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol* **71**:1850-1856.
340. Wansink, D. G., Schul, W., van der Kraan, I., van Steensel, B., van Driel, R., and de Jong, L. 1993. Fluorescence labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J. Cell Biol.* **122**:283-293.
341. Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Takeyama, K., Ogawa, S., Arai, Y., Suzawa, M., Kobayashi, Y., Yano, T., Yoshikawa, H., Masuhiro, Y., and Kato, S. 2001. A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor alpha coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *Embo J* **20**:1341-1352.

342. Watanabe, T., Watanabe, S., Noda, T., Fujii, Y., and Kawaoka, Y. 2003. Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. *J Virol* **77**:10575-10583.
343. Weber, F., Haller, O., and Kochs, G. 2000. MxA GTPase blocks reporter gene expression of reconstituted Thogoto virus ribonucleoprotein complexes. *J Virol* **74**:560-563.
344. Weis, W., Brown, J. H., Cusack, S., Paulson, J. C., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. 1988. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* **333**:426-431.
345. Wen, Y., and Shatkin, A. J. 1999. Transcription elongation factor hSPT5 stimulates mRNA capping. *Genes Dev* **13**:1774-1779.
346. Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R., Urlaub, G., and Chasin, L. 1979. DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:1373-1376.
347. Wittig, I., and Groner, B. 2005. Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5), a crucial regulator of immune and cancer cells. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **5**:449-463.
348. Wolff, T., O'Neill, R. E., and Palese, P. 1996. Interaction cloning of NS1-I, a human protein that binds to the nonstructural NS1 proteins of influenza A and B viruses. *J Virol* **70**:5363-5372.
349. Wolff, T., O'Neill, R. E., and Palese, P. 1998. NS1-Binding protein (NS1-BP): a novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of infected cells. *J Virol* **72**:7170-7180.
350. Woychik, N. A., and Hampsey, M. 2002. The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* **108**:453-463.
351. Yamada, T., Yamaguchi, Y., Inukai, N., Okamoto, S., Mura, T., and Handa, H. 2006. P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Mol Cell* **21**:227-237.
352. Yamanaka, K., Ishihama, A., and Nagata, K. 1990. Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores. *J Biol Chem* **265**:11151-11155.
353. Yang, J. P., Hori, M., Sanda, T., and Okamoto, T. 1999. Identification of a novel inhibitor of nuclear factor-kappaB, RelA-associated inhibitor. *J Biol Chem* **274**:15662-15670.
354. Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., Toyoda, T., and Ishihama, A. 1993. Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* **196**:249-255.
355. Ye, Z. P., Pal, R., Fox, J. W., and Wagner, R. R. 1987. Functional and antigenic domains of the matrix (M1) protein of influenza A virus. *J Virol* **61**:239-246.
356. Yedavalli, V. S., Neuveut, C., Chi, Y. H., Kleiman, L., and Jeang, K. T. 2004. Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell* **119**:381-392.
357. Yeo, M., Lin, P. S., Dahmus, M. E., and Gill, G. N. 2003. A novel RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase that preferentially dephosphorylates serine 5. *J Biol Chem* **278**:26078-26085.
358. Young, R. J., and Content, J. 1971. 5'-terminus of influenza virus RNA. *Nat New Biol* **230**:140-142.
359. Yuryev, A., Patturajan, M., Litingtung, Y., Joshi, R. V., Gentile, C., Gebara, M., and Corden, J. L. 1996. The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:6975-6980.
360. Zamarin, D., Garcia-Sastre, A., Xiao, X., Wang, R., and Palese, P. 2005. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog* **1**:e4.
361. Zamarin, D., Ortigoza, M. B., and Palese, P. 2006. Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol* **80**:7976-7983.
362. Zhang, H., and Air, G. M. 1994. Expression of functional influenza virus A polymerase proteins and template from cloned cDNAs in recombinant vaccinia virus infected cells. *Biochem Biophys Res Commun* **200**:95-101.

363. **Zhang, S., Kohler, C., Hemmerich, P., and Grosse, F.** 2004. Nuclear DNA helicase II (RNA helicase A) binds to an F-actin containing shell that surrounds the nucleolus. *Exp Cell Res* **293**:248-258.
364. **Zhao, J., Hyman, L., and Moore, C.** 1999. Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:405-445.
365. **Zhirnov, O. P., and Klenk, H. D.** 1997. Histones as a target for influenza virus matrix protein M1. *Virology* **235**:302-310.
366. **Zurcher, T., de, I. L. S., Sanz, E. J., Nieto, A., and Ortin, J.** 1996. Mutational analysis of the influenza virus A/Victoria/3/75 PA protein: studies of interaction with PB1 protein and identification of a dominant negative mutant. *J Gen Virol* **77**:1745-1749.
367. **Zvonarjev, A. Y., and Ghendon, Y. Z.** 1980. Influence of membrane (M) protein on influenza A virus virion transcriptase activity in vitro and its susceptibility to rimantadine. *J Virol* **33**:583-586.





ANEXO

- **Pérez-González, A., Rodríguez, A., Huarte, M., Salanueva, I. J., and Nieto, A.**
hCLE/CGI-99, a human protein that interacts with the influenza virus polymerase, is a mRNA transcription modulator.
J. Mol. Biol. 2006 July 31; **362**:887-900.
- **Rodríguez, A., Pérez-González, A., and Nieto, A.**
Influenza virus infection causes specific degradation of the largest subunit of cellular RNA polymerase II.
J Virol. 2007 February 28; **81**:5315-5324.



hCLE/CGI-99, a Human Protein that Interacts with the Influenza Virus Polymerase, Is a mRNA Transcription Modulator

Alicia Pérez-González, Ariel Rodríguez, Maite Huarte
 Iñigo J. Salanueva and Amelia Nieto*

Centro Nacional de
 Biotecnología, Cantoblanco
 28049 Madrid, Spain

The human protein hCLE was previously identified by its interaction with the PA subunit of influenza virus polymerase. It exhibits a sequence similarity of 38% with the yeast Spt16 component of the FACT complex, which is involved in transcriptional regulation. Therefore, we studied the possible relationship of hCLE with the transcription machinery. Here we show that hCLE and different phosphorylated forms of the RNA polymerase II (RNAP II) largest subunit, co-immunoprecipitate and colocalize by confocal microscopy analysis. Furthermore, hCLE was found in nuclear sites of active mRNA synthesis, as demonstrated by its colocalization with spots of *in situ* Br-UTP incorporation. Silencing of hCLE expression by RNA interference inhibited the synthesis of RNAP II transcripts around 50%. Accordingly, the expression profiling in hCLE-silenced cells studied by microarray analysis showed that, among the genes that exhibited a differential expression under hCLE silencing, more than 90% were down-regulated. Collectively these results indicate that hCLE works as a positive modulator of the RNA polymerase II activity.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: hCLE/CGI-99; transcription; RNAP II; influenza virus; CTD-phosphorylation

*Corresponding author

Introduction

Cellular RNA metabolism is accomplished by a wide network of multiprotein complexes that couple RNA transcription, processing, transport and translation leading to an accurate pattern of protein expression necessary for a proper cellular development. Many RNA viruses interfere with this network and take over the cellular gene expression and translation machinery for their own benefit. Looking for cellular factors that could be necessary for gene expression of influenza virus we isolated a protein,

hCLE/CGI-99, that interacts with the PA subunit of the viral polymerase.¹ This host factor is a 32 kDa protein of nuclear and cytoplasmic distribution that is expressed ubiquitously and associates to active, purified viral ribonucleoproteins (RNPs) reconstituted *in vivo*.¹ The viral RNA polymerase is composed of three subunits, PB1, PB2 and PA that are part of the viral RNPs^{2–4} and carry out viral transcription and replication in the nucleus of the infected cell.⁵ The transcription process involves a cap-stealing mechanism by which 5'-capped oligonucleotides derived from newly synthesized RNA polymerase (RNAP) II transcripts are used as primers and elongated by the viral polymerase.^{6,7} In line with this transcription strategy, parental virion RNPs colocalize with active RNAP II in the infected cell nucleus (unpublished results) and *in vivo* reconstituted viral polymerase co-immunoprecipitates with the RNAP II.⁸

Databases searches have shown that hCLE has a sequence similarity of 38% to the central region of the yeast protein Cdc68 (also named ySpt16). Yeast Spt16 is an essential nuclear protein that associates with Pob3 to form the CP or yFACT complex.⁹

Present addresses: M. Huarte, Harvard Medical School, Pathology Department, New Research Building, Room 854, 77 Ave Louis Pasteur, Boston 02115 MA, USA; I. Salanueva, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid.

Abbreviations used: RNAP, RNA polymerase; RNP, ribonucleoprotein; CTD, C-terminal domain; HPRI, human placental ribonuclease inhibitor.

E-mail address of the corresponding author:
 anmartin@cnb.uam.es

Analogues to this complex are found in different species, such as DUF from *Xenopus laevis*,¹⁰ DRE from *Drosophila melanogaster*,¹¹ hFACT from human¹² or the corresponding complex from *Arabidopsis thaliana*.¹³ The FACT complexes are components of transcriptional regulator complexes and biochemical and genetic studies of transcription have identified them as chromatin-specific factors required for transcription elongation.^{14,15} Yeast Spt16 was shown to copurify with factors engaged in the elongation phase of the transcription process^{15,16} and hFACT seems to function *in vivo* as a factor required for transcription elongation.¹⁷⁻¹⁹

Recently hCLE/CGI-99 has been found in dendrites in kinesin-associated granules that play a role in local protein synthesis.²⁰ During the characterization of kinesin-containing RNA-transporting granules in neurons, 42 associated proteins were found, among them Staufen-1 and the hCLE/CGI-99 proteins.²⁰ Staufen-1 is involved in mRNA localization and translation and has been found associated to the NS1 protein of influenza virus in HEK293 cells.^{21,22} Co-immunoprecipitation studies indicated the association of hCLE/CGI-99 with the translation elongation factor EF-1 α and DDX1 proteins in the kinesin granules.²⁰ DDX1 protein is an RNA and DNA binding protein that binds poly(A), has helicase and ATPase activities^{23,24} and has been implicated in the 3' end processing of pre-mRNA.²⁵

Taking these observations into account, we studied the possibility that hCLE could have a function on cellular transcription and might represent a link between the sites of capped RNA synthesis and the viral polymerase. Here we show that hCLE is physically and functionally associated to RNAP II. The silencing of the hCLE gene caused a remarkable decrease of cellular RNAP II-directed transcription. Moreover, transcription profiling upon hCLE silencing showed that among the genes that are regulated by hCLE, the majority were down-regulated, suggesting that hCLE is a modulator of the RNAP II activity.

Results

hCLE/CGI-99 is associated to RNA polymerase II and is present in nuclear sites of active mRNA synthesis

Since hCLE protein shows similarity to the yeast Spt16 factor, a component of the FACT complex, we studied the possible association of hCLE protein with the cellular mRNA synthesizing apparatus. To investigate this hypothesis, we used confocal immunofluorescence microscopy in MDCK cells to simultaneously study the localization of hCLE and RNAP II. To this aim, specific antibodies for hCLE and antibodies that recognize different phosphorylated forms of the RNAP II largest subunit, such as unphosphorylated at serine 2 (8WG16) and phosphorylated at serine 5 (H14) or at serine 2 (H5) of its

carboxy-terminal domain (CTD), were used.²⁶ A good colocalization between hCLE and the different RNAP II forms detected with the corresponding antibodies was observed, as can be seen in the colocalization panels (Figure 1(a)). These colocalization data have been obtained using the colocalization mask, that eliminates signals that are not common to both antibodies. To further characterize the hCLE-RNAP II association, co-immunoprecipitation assays were carried out using nuclear extracts from HEK293T cells. The data are presented in Figure 1(b). The presence of hCLE and the different RNAP II forms was verified by Western blot with the corresponding antibodies. The hCLE protein could be immunoprecipitated from the nuclear extracts with the specific antibody but not with an unrelated antibody. As can be seen, the hypo- and hyperphosphorylated RNAP II at serine 2 (RNAP II Ser2-P) were co-immunoprecipitated with the anti-hCLE antibodies, but not with the control antibody. These results indicate that both the hypophosphorylated and the RNAP II Ser2-P are physically associated to the hCLE protein. We also wanted to test the association between hCLE and the RNAP II phosphorylated at serine 5 (RNAP II Ser5-P). Although this form is very clearly visible in total extracts of HEK293T cells, it was undetectable in nuclear extracts. It is possible that phosphorylation at serine 5 was more transient or unstable than that of serine 2 of the CTD, impeding its examination under these conditions.

To ascertain whether the sites of hCLE-RNAP II colocalization represent active transcription sites, live MDCK cells were permeabilized and *in situ* incorporation of Br-UTP was carried out as described in Materials and Methods. These cells were chosen as they attach very firmly to the incubation plates facilitating *in situ* studies. After RNA synthesis, the cells were fixed and stained with anti-Br-dUridine and anti-hCLE antibodies to monitor nuclear sites of RNA synthesis and localization of endogenous hCLE. The label obtained was true RNA synthesis, as it was dependent on the presence of all four nucleoside triphosphates (data not shown). The results are presented in Figure 2(a). RNA synthesis showed a punctuated pattern and hCLE was clearly present in an important fraction of the RNA synthesis-dots as can be observed in the merge and colocalization panels. The same experiment was performed in the presence of 100 $\mu\text{g/ml}$ α -amanitin to inhibit both RNAP II and III. As expected, only nucleolar staining due to RNA polymerase I was resistant to this treatment and hCLE did not colocalize with nucleolar RNA synthesis. Additional experiments were carried out using α -amanitin at 5 $\mu\text{g/ml}$ to inhibit RNA polymerase II. Under these conditions, the non-nucleolar RNA synthesis due to RNA polymerase III was very scarce and did not allow a precise examination of colocalization with hCLE (data not shown). This fact indicates that the non-nucleolar RNA synthesis detected in the absence of α -amanitin is mainly due to RNAP II activity. Altogether, these results suggest that hCLE is

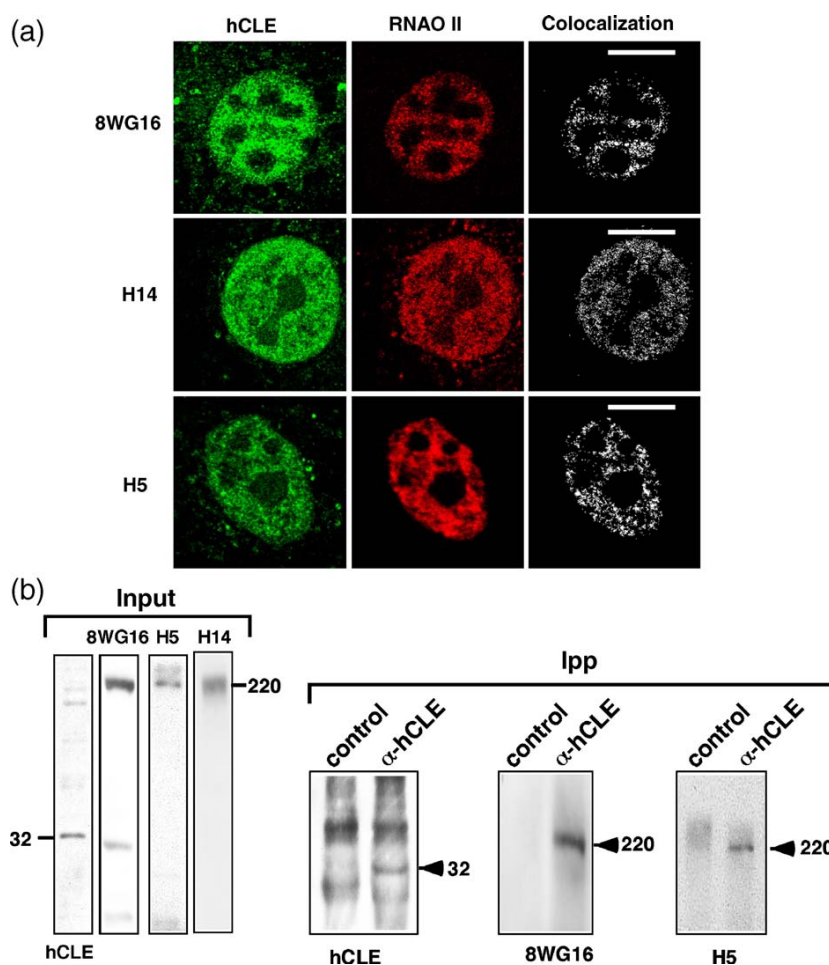


Figure 1. hCLE associates to RNA polymerase II complexes. (a) MDCK cells were fixed, processed for immunofluorescence and analyzed by confocal microscopy. Confocal sections were acquired sequentially every 0.2–0.3 μm . An anti-hCLE antibody was used to detect hCLE protein (hCLE) and antibodies 8WG16 (top), H14 (middle), or H5 (bottom) for RNA polymerase II (RNAP II), respectively. Colocalization panel shows signals common to both antibodies obtained with the colocalization mask. (b) HEK293T nuclear extracts were used for co-immunoprecipitation assays to study the hCLE-RNA polymerase II association. The presence of hCLE and RNA polymerase II was monitored by Western blot with the α -hCLE or α -RNAP II (8WG16), (H5) and (H14) antibodies, respectively. (Input) represent the HEK293T nuclear extracts and (Ipp) the immunoprecipitates using anti-hCLE (α -hCLE) or a control antibody (control). The percentages of RNAP II co-immunoprecipitated with hCLE are 5.7% and 6.5% of the input, using antibodies 8WG16 or H5 for Western blot detection, respectively. Bars represent 10 μm .

physically associated to intranuclear sites of RNAP II transcription and propose a role for hCLE in this process.

Next we examined if hCLE association to RNAP II was dependent on active transcription. To answer this question we used confocal microscopy in MDCK cells treated during 1 h with α -amanitin at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, to simultaneously study the pattern of nuclear distribution of the different RNAP II forms and hCLE, in conditions of transcription inhibition. Incorporation of Br-UTP was carried out as a control of the effectiveness of the treatment and the results are presented in Figure 3(a). Treatment with α -amanitin clearly inhibited the transcriptional activity of the RNAP II as observed in the Br-UTP panels, where exclusively nucleolar-RNA synthesis was

detected. According to the previous results (Figure 2), hCLE distribution did not show variations after the drug treatment. The distribution of the hypophosphorylated RNAP II and the RNAP II Ser2-P did not change upon 1 h of α -amanitin treatment, whereas the RNAP II Ser5-P, which is involved in transcription initiation,²⁷ showed a partial disruption with the drug treatment. On the other hand, 1 h treatment with α -amanitin did not change the accumulation levels of the different RNAP II forms, as detected with Western blot assays using antibodies against this protein (Figure 3(b)). Although changes in the nuclear distribution of RNAP II Ser2-P have been reported with α -amanitin treatment in HeLa cells,^{28,29} no major changes were observed for total RNAP II in this situation. The

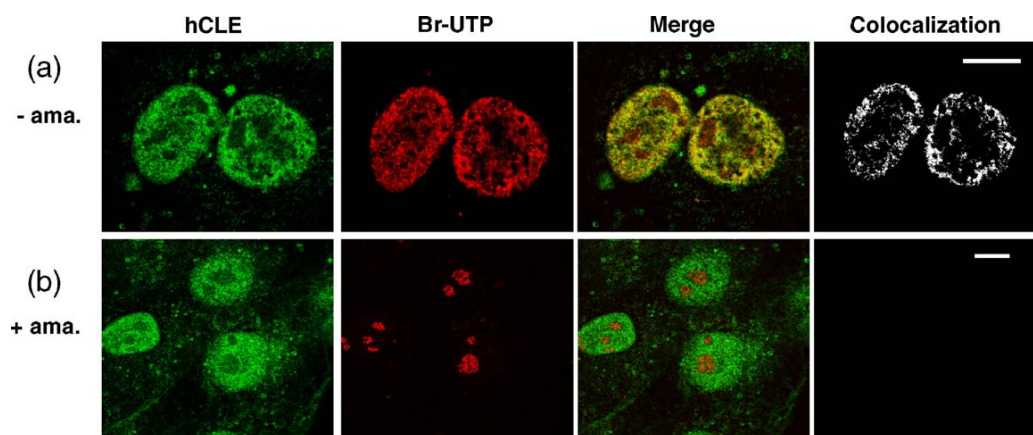


Figure 2. hCLE is present in sites of RNA synthesis. (a) Permeabilized MDCK cells were used to detect RNA synthesis by Br-UTP incorporation. After a RNA synthesis pulse of 1 h, cells were fixed, processed for immunofluorescence and analyzed using confocal microscopy. Confocal sections were acquired sequentially every 0.2–0.3 μm . hCLE detection (hCLE) was achieved with anti-hCLE antibody and RNA synthesis (Br-UTP) with anti-BrdUridine antibody. Colocalization panel shows signals common to both antibodies obtained with the colocalization mask. (b) The same experiment was done in the presence of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of α -amanitin to inhibit the RNAP II RNA synthesis. Bars represent 10 μm .

transcriptional process is arrested at the initiation step by high concentrations of α -amanitin,³⁰ which is in agreement with the observed disturbance in the nuclear localization of the RNAP II Ser5-P in the treated cells. Alternatively, changes in the protein composition of the transcription initiation complex can occur upon α -amanitin treatment resulting in a restricted reactivity of the H14 antibody in these conditions. As can be observed, the level of colocalization between hCLE and the RNAP II Ser5-P seems to decrease under conditions of inhibition of mRNA synthesis, although the nuclear disturbance and decreased accumulation of RNAP II Ser5-P, do not allow an unambiguous conclusion. On the other hand, under conditions where RNAP II-dependent transcription was inhibited, the hCLE protein remained associated to the hypophosphorylated RNAP II or RNAP II Ser2-P. Although it is plausible that hCLE-RNAP II association occurs only in the context of active transcription but once formed the complex is very stable, the presented data support the statement of a transcription-independent hCLE-RNAP II association.

hCLE/CGI-99 modulates the RNA polymerase II activity

To explore the possible role of endogenous hCLE on mRNA synthesis we performed gene-silencing experiments using RNA interference. To study the phenotype of hCLE loss-of-function, we generated a construct of plasmid pSUPER³¹ expressing under the RNAP III H1 promoter a small hairpin transcript containing a 23 nt sequence derived from the hCLE mRNA (pSUPER-hCLE). As negative control we used a construct of pSUPER expressing a 21 nt RNA derived from the transcript of the Dgk α gene (pSUPER-Dgk α).³² This gene is not expressed in the cell line used, HEK293T.³² To analyze the effec-

tiveness of the construct to down-regulate the hCLE gene, HEK293T cells were transfected with plasmid pSUPER-hCLE, or pSUPER-Dgk α and 48 h post-transfection, nuclei were isolated as described in Materials and Methods and Western blot assays were carried out using an anti-hCLE antibody. As negative control the same membrane was used to perform Western blot analysis, using antibodies against β -tubulin. As can be seen in Figure 4(a), the amount of hCLE protein was severely decreased in pSUPER hCLE transfected cells (30% of hCLE protein remains after treatment), indicating that this treatment efficiently down-regulates the hCLE gene. We also assayed the effect of pSUPER hCLE transfection in the endogenous levels of hCLE transcript in the same conditions. Then, total RNA was isolated and expression of hCLE gene was determined by Northern blot assays as described in Materials and Methods. Two different species of hCLE RNA whose accumulation decreases in pSUPER-hCLE transfected cells were detected (Figure 4(b)).

Subsequently we assayed the effect of hCLE silencing on mRNA synthesis. Cultures of HEK293T cells were transfected with pSUPER-Dgk α or pSUPER-hCLE plasmids and at 48 h post-transfection nuclei of these cells were isolated and frozen. These nuclei were afterwards used to perform *in vitro* RNA synthesis with or without α -amanitin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) to evaluate the RNAP II-directed RNA synthesis as described in Materials and Methods. In parallel the transfected HEK293T cells were used to determine the endogenous hCLE levels, to assure the effectiveness of the hCLE silencing. Five different experiments were carried out with triplicate independent samples and the results obtained are shown in Figure 4(c), as average values and standard deviations. The RNA synthesis due to RNA polymerase II activity is calculated as the difference between the values obtained without the drug (total synthesis

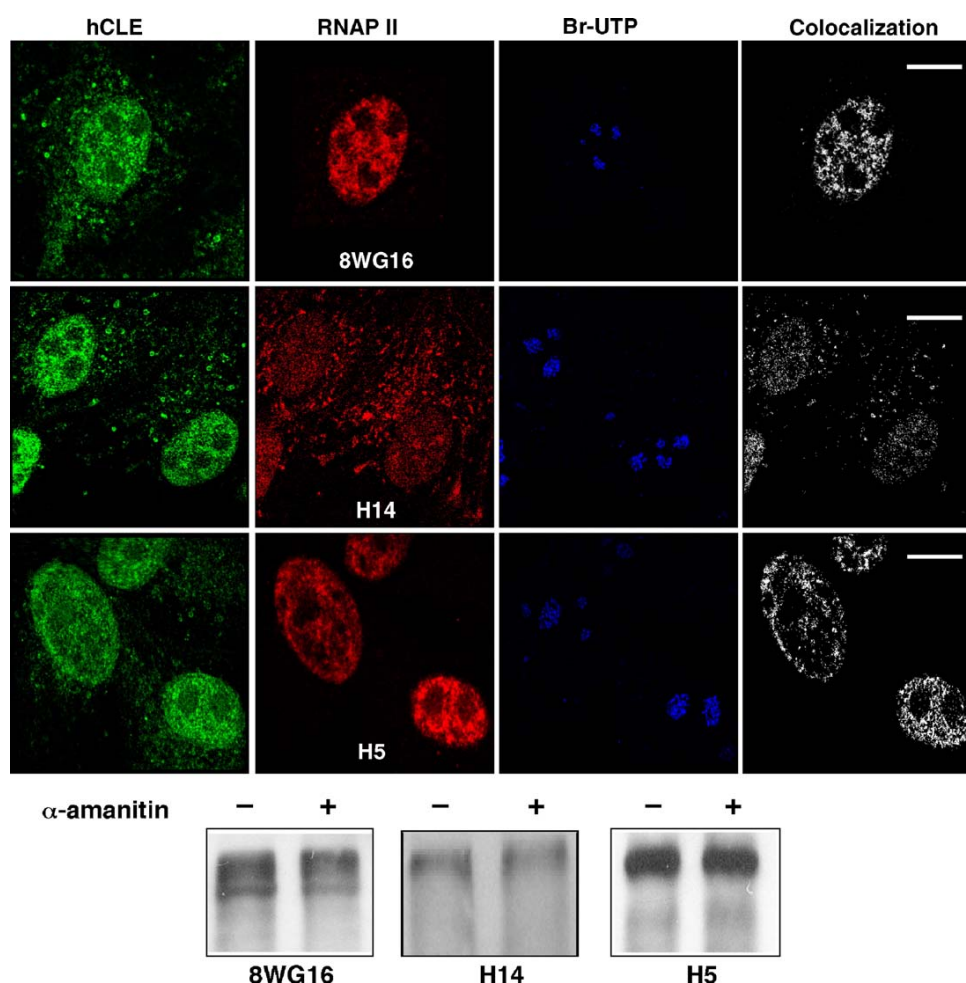


Figure 3. hCLE-RNAP II association is transcription-independent. Permeabilized MDCK cells treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ α -amanitin during 1 h were used to detect hCLE-RNAP II association and RNA synthesis by Br-UTP incorporation. The cells were fixed, processed for immunofluorescence and analyzed using confocal microscopy. Confocal sections were acquired sequentially every 0.2–0.3 μm . hCLE and RNAP II phosphorylated forms were detected with anti-hCLE antibody (hCLE) and 8WG16, H14 and H5 antibodies (RNAP II) respectively, as described in Materials and Methods. Br-UTP panels show RNA synthesis. Colocalization panels show signals common to hCLE and RNAP II antibodies obtained with the colocalization mask. Bottom; Western blots against RNAP II using 8WG16, H14 and H5 antibodies of cells untreated (–) or treated (+) with α -amanitin during 1 h. Bars represent 10 μm .

RNAP I+II+III) and with the drug (RNAP I+III). As can be observed, silencing of hCLE produced a decrease in RNAP II-directed RNA synthesis of around 50%, whereas synthesis directed by RNA polymerase I plus III was not affected. Similar experiments were carried out in *in situ* analysis and an analogous reduction in mRNA synthesis was also obtained in these conditions (data not shown). These results indicate that hCLE is required for an appropriate RNAP II transcriptional activity.

Effect of hCLE/CGI-99 silencing on global gene expression

The observed inhibition of mRNA synthesis when hCLE is down-regulated could be the consequence of an important inhibition of some very actively

transcribed genes or the moderate inhibition of a large number of genes. To distinguish between these possibilities, we examined the global gene expression under hCLE silencing conditions by using a microarray screening. RNA from pSUPER-Dgk α or pSUPER-hCLE transfected HEK293T cells was isolated at 48 h post-transfection and used to hybridize the Human oligo set from Qiagen-Operon chips containing 22,264 known human genes, as described in Materials and Methods. The “fold change” parameter of the microarray analysis software was used as value to choose statistically significant changes in gene expression. Genes with absolute values of 1.5-fold change or greater were considered as differentially expressed. Fold change values greater than 0 (positives) mean up-regulation, whereas values lower than 0 (negatives) represent

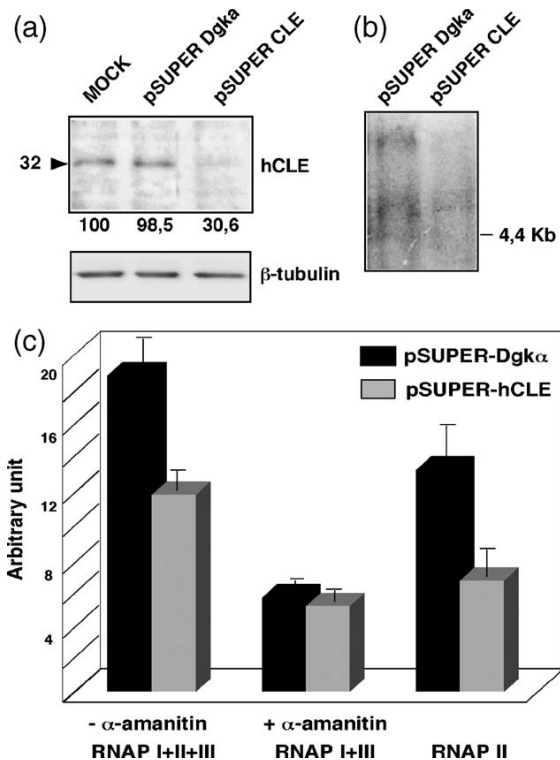


Figure 4. Silencing of hCLE gene decreases the RNAP II-dependent RNA synthesis in isolated nuclei. (a) HEK293T cells were mock-transfected (MOCK) or transfected with pSUPER Dgk α or pSUPER hCLE. 48 h post-transfection cell nuclei were isolated and used for Western blot analysis with antibodies against hCLE (1:1000) and β -tubulin (1:15,000) that was used as control. (b) Total RNA was isolated from the same cells as in (a), separated in denaturing gels, transferred to nylon membranes and probed with a radiolabeled specific riboprobe for hCLE gene. (c) The same cell nuclei as in (a) were used to analyze the RNA synthesis by *in vitro* incorporation of a labeled nucleotide. The synthesis was performed with or without α -amanitin (5 μ g/ml), to detect the RNA synthesis directed by the RNAP I plus RNAP III or the total RNA synthesis (RNAP I+II+III) respectively, as described in Materials and Methods.

down-regulation. This parameter is non-linear, so genes with slight fold change values can present very different mRNA expression. Microarray analysis identified 290 genes that exhibited a differential expression under hCLE silencing. Among these, 266 (91.7%) genes were down-regulated and only 24 (8.3%) were up-regulated in hCLE-silenced cells. To assess the potential functionality of these genes, the gene products were grouped into Gene Ontology categories with the assistance of fatiGo data base.³³ Of the 290 hCLE-responsive genes, 125 had known biological roles and are listed in Table 1. The functions of these genes include many different categories and among these functional groups, genes corresponding to transcription factors and cell signaling were the most represented categories (around 11% each one). A representation

of the global change in the different functional groups is shown in Figure 5. The microarray analysis revealed that up to 10% (2322) of the total genes represented in the chip were down-regulated under hCLE-silenced conditions by onefold change (data not shown). These data, together with those presented in Figures 4 and 5 show that the silencing of hCLE gene essentially originated a down-regulation of gene expression and indicate that hCLE affects the expression of a considerable number of genes.

In order to verify the data generated from the microarray, we analyzed by semiquantitative RT-PCR the expression of a number of genes identified as regulated by hCLE silencing. The TGFBR1 (transforming growth factor, beta receptor I) gene that is down-regulated and DYNLRB1 (Dynein light chain 2A), HYPK (Huntingtin interacting protein K) and DFFA (DNA fragmentation factor) genes that are up-regulated in hCLE knock-down cells were used. GAPDH served as a control gene whose expression is not altered under these conditions. The data are presented in Figure 6. A unique amplification PCR product of the expected size was obtained for every gene (Figure 6(a)). Consistent with the microarray data, hCLE-silencing either inhibited or stimulated the mRNA level of the corresponding genes, validating the obtained results (Figure 6(b)). A quantification of the expression levels of these genes under hCLE silencing, normalized by the expression levels of GAPDH gene is presented in Figure 6(c).

Although the fold change values obtained in the microarray analysis fluctuate in the range of 2.34 to 1.5, it should be mentioned that even the hCLE gene was downregulated by a -1.34-fold change upon hCLE-silencing and both its mRNA and protein accumulation (Figure 4) levels were severely reduced in these conditions. Then, these data together with the RT-PCR analysis provide the required reliability to allow a correct interpretation of the effects of hCLE knock-down in the expression profile of cellular mRNAs.

Discussion

The mammalian RNAP II CTD consists of more than 50 repeats of the YSPTSPS heptapeptide,³⁴ being the main phosphoacceptor residues, the Ser2 and Ser5 (see Palancade and Pencaude²⁶ for a review). It has been reported that serine 5 phosphorylation is detected at the promoter region of the transcribing genes, whereas serine 2 phosphorylation is required for transcription elongation. The sequence homology between hCLE/CGI-99 and the FACT family of transcription activators suggested that hCLE could be a transcription-related protein. Here we provide data that support this statement. (i) hCLE colocalizes with the different RNAP II forms and co-immunoprecipitates at least with both the hypophosphorylated RNAP II and the RNAP II Ser2-P, (ii) hCLE is present in intranuclear sites of RNAP II-directed RNA transcription and (iii) hCLE

Table 1. Expression profiling in hCLE-silenced cells

	Gene name	GenBank accession	Fold change ^a
<i>Transcription factors</i>			
FOXO1A	Forkhead box O1A	NM_002015	-2.00
KIAA1474	KIAA1474 protein	AL136805	-1.99
PLAGL1	Pleiomorphic adenoma gene-like 1	U72621	-1.82
RBM15	RNA binding motif protein 15	NM_022768	-1.75
POU4F2	POU domain, class 4, transcription factor 2	NM_004575	-1.64
RREB1	Ras responsive element binding protein 1	D49835	-1.64
NAB1	NGFI-A binding protein 1 (EGR1 binding protein 1)	AF045451	-1.63
MGC:9010	Homo sapiens, IMAGE:3873712, mRNA, complete cdsH	BC008688	-1.62
SREBF1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	NM_004176	-1.61
NEUROD1	Neurogenic differentiation 1	NM_002500	-1.60
SIM1	Single-minded homolog 1 (Drosophila)	NM_005068	-1.59
AML1		S76346	-1.58
DKFZp434J0828	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434J0828	AJ420510	-1.58
RAI	RelA-associated inhibitor	NM_006663	-1.57
MGC14797	Hypothetical protein MGC14797	AB058726	-1.56
TRIP8	Thyroid hormone receptor interactor 8	AB037801	-1.53
STAT5A	Signal transducer and activator of transcription 5 ^a	NM_003152	-1.52
TAF9L	RNA polymerase II,TATA box binding protein	BC009566	-1.50
<i>Cell signalling</i>			
LOC57401	Uncharacterized gastric protein ZG24P	AF264628	-2.01
TGFBR1	Transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kD)	NM_004612	-1.91
ADAM9	A disintegrin and metalloproteinase domain 9 (meltrin gamma)	NM_003816	-1.66
PTPRK	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	NM_002844	-1.64
MAPK6	Mitogen-activated protein kinase 6	NM_002748	-1.60
FY	Duffy blood group	NM_002036	-1.60
NM23-H6	Nucleoside diphosphate kinase type 6 (inhibitor of p53-induced apoptosis-alpha)	NM_005793	-1.59
PKIA	Protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha	NM_006823	-1.58
PRKAR2B	Protein kinase, cAMP-dependent	NM_002736	-1.56
RG55	Regulator of G-protein signalling 5 regulatory, type II, beta	NM_003617	-1.55
FLJ10461	Hypothetical protein FLJ10461	NM_018098	-1.54
GNGT2	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma transducing activity	NM_031498	-1.53
GNG2	Guanine nucleotide binding protein	AK026424	-1.53
PTPRR	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	NM_002849	-1.52
DKFZP564D0462	Hypothetical protein DKFZp564D0462	AK027843	-1.51
IMAGE:3888869	Homo sapiens, clone, mRNA, partial cds	BC016839	-1.51
C6orf5	Chromosome 6 open reading frame 5 polypeptide 2 (G protein), gamma 2	AF136407	-1.50
DMPK	Dystrophia myotonica-protein kinase	NM_004409	1.62
CSK	C-src tyrosine kinase	NM_004383	1.51
<i>Protein metabolism</i>			
PPT2	Palmitoyl-protein thioesterase 2	AF020544	-1.95
STRIN	STRIN protein	NM_016271	-1.84
MMP8	Matrix metalloproteinase 8	NM_002424	-1.77
HP43.8KD	HP43.8KD protein	AB067478	-1.73
FLJ25267	Homo sapiens cDNA fis, clone STM05473	AK057996	-1.73
FLJ21343	Hypothetical protein FLJ21343	NM_022781	-1.71
DPEP1	Dipeptidase 1 (renal)	NM_004413	-1.65
TRAF1	TNF receptor-associated factor 1	NM_005658	-1.59
FBXL3A	F-box and leucine-rich repeat protein 3A	NM_012158	-1.56
FLJ13255	Homo sapiens cDNA fis, clone OVARC1000800,	AK023317	-1.54
PTPRR	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	NM_002849	-1.52
FLJ23560	Hypothetical protein FLJ23560	NM_024685	-1.52
1810055D05	Homo sapiens, Similar to RIKEN cDNA	BC009702	-1.51
ADAMTS3	A disintegrin-like and with thrombospondin type 1 motif, 3	AB002364	-1.51
<i>Immune response and apoptosis</i>			
PF4	Platelet factor 4	NM_002619	-2.37
IL1A	Interleukin 1. alpha	NM_000575	-1.82
KLRC1	Killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1	NM_002259	-1.69
SEMA7A	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig) and GPI membrane anchor, (semaphorin) 7 ^a	NM_003612	-1.69
HLA-DPB1	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	NM_002121	-1.66
SEMA3C	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	NM_006379	-1.63

(continued on next page)

Table 1 (continued)

	Gene name	GenBank accession	Fold change ^a
<i>Immune response and apoptosis</i>			
NM23-H6	Nucleoside diphosphate kinase type 6 (inhibitor of p53-induced apoptosis-alpha)	NM_005793	-1.59
ADORA3	Adenosine A3 receptor	NM_000677	-1.57
BDKRB1	Bradykinin receptor B1	NM_000710	-1.55
TLR10	Toll-like receptor 10	NM_030956	-1.53
TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	NM_003844	-1.51
CEACAM1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion mole 1 (biliary glycoprotein)	X16354	-1.51
DFFA	DNA fragmentation factor, 45 kD,	NM_004401	1.62
<i>Development and differentiation</i>			
DKK3	Dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)	NM_013253	-2.18
CA10	Carbonic anhydrase X	AF288385	-1.72
KIAA1813	KIAA1813 protein	AB058716	-1.75
GDF9	Growth differentiation factor 9	NM_005260	-1.60
FLJ13057	Hypothetical protein FLJ13057 similar to germ cell-less	NM_022471	-1.57
KERA	Keratocan	NM_007035	-1.56
ROD1	ROD1 regulator of differentiation 1 (S. pombe)	AK001685	-1.53
CD2AP	CD2-associated protein	NM_012120	1.53
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich	NM_003118	1.51
<i>Intracellular protein transport</i>			
LOC50999	CGI-100 protein	BC016556	-1.82
KIAA0660	Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding protein 2	AB014560	-1.82
NFKBIL2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 2	NM_013432	-1.64
G3BP	Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein	BC006997	-1.62
SEC24B	SEC24 related gene family, member B (S. cerevisiae)	NM_006323	-1.62
SEC24A	SEC24 related gene family, member A (S. cerevisiae)	AJ131244	-1.61
XPO1	Exportin 1 (CRM1 homolog, yeast)	NM_003400	-1.55
TOMM34	Translocase of outer mitochondrial membrane	NM_006809	1.52
FLJ20695	Hypothetical protein FLJ20695	NM_017929	1.52
<i>Protein biosynthesis</i>			
SIAT8A	Sialyltransferase 8A	NM_003034	-1.67
MRPL49	Mitochondrial ribosomal protein L49	NM_004927	-1.61
PRKRIR	Protein-kinase, interferon-inducible double stranded RNAdependent inhibitor,	AF081567	-1.51
EIF4A2	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	NM_001967	-1.51
MGC2744	Hypothetical protein MGC2744	NM_025267	1.54
JTV1	JTV1 gene	NM_006303	1.52
RPL36A	Ribosomal protein L36a	NM_021029	1.51
<i>Phosphate metabolism</i>			
UMP-CMPK	UMP-CMP kinase	NM_016308	-1.91
FLJ31077	HSYRA2001574, highly similar to GLUCOSAMINE-6-PHOSPHATE ISOMER	AK055639	-1.68
IMPA1	Inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1	NM_005536	-1.66
TDPGD	DTDP-D-glucose 4,6-dehydratase	NM_014305	-1.58
DKFZp586G2222	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586G2222	AL080111	-1.56
KIAA0630	KIAA0630 protein	AB014530	-1.52
<i>Ion transport</i>			
CSN2	Casein, beta	NM_001891	-1.73
SLC4A7	Solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member Homo sapiens clone 24411 mRNA sequence	AF047033 AF070606	-1.68 -1.63
CLIC4	Chloride intracellular channel 4	NM_013943	-1.61
COL10A1	Collagen, type X, alpha 1(Schmid metaphyseal chondrodysplasia)	NM_000493	-1.54
ATP1B2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 2 polypeptide	NM_001678	-1.51
KCNE1	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1	NM_000219	1.53
<i>Nucleic acid metabolism</i>			
KIAA0111	KIAA0111 gene product	NM_014740	-1.68
G3BP	Ras-GTPase-activating protein	BC006997	-1.62
H4FH	H4 histone family, member H SH3-domain-binding protein	NM_003543	-1.61
RBM7	RNA binding motif protein 7	NM_016090	-1.57
H4FA	H4 histone family, member A	NM_003538	-1.55
H2BFD	H2B histone family, member D	BC011372	-1.53
MGEA6	Meningioma expressed antigen 6	NM_005930	-1.53
RAD21	RAD21 homolog (S. pombe)	NM_006265	-1.50
MGC2744	Hypothetical protein	NM_025267	1.54

Table 1 (continued)

	Gene name	GenBank accession	Fold change ^a
<i>Cytoskeleton and adhesion</i>			
CDH2	Cadherin 2, type 1. N-cadherin (neuronal)	NM_001792	-1.61
MRAS	Muscle RAS oncogene homolog	AK056337	-1.56
FLJ25193	Homo sapiens cDNA fis, clone JTH00761	AK057922	-1.54
MIG2	Mitogen inducible 2	Z24725	-1.50
DNLC2A	Dynein light chain 2A	NM_014183	1.75
<i>Others</i>			
FLJ11149	Hypothetical protein FLJ11149	BC007069	-1.95
LY75	Lymphocyte antigen 75	NM_002349	-1.73
LYPLA1	Lysophospholipase I	NM_006330	-1.71
SEC15B	Sec15B protein	AB023136	-1.71
ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	NM_002210	-1.70
FLJ23282	Hypothetical protein FLJ23282	NM_024816	-1.66
	Coproporphyrinogen oxidase (coproporphyrin, harderporphyria)	NM_000097	-1.60
CCNE2	Cyclin E2	NM_057749	-1.59
GCLC	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	NM_001498	-1.54

^a Fold changes lesser than 0 reflect fold repression and those greater than 0 indicate the reciprocal fold induction.

silencing produces a 50% inhibition of mRNA transcription. This important inhibition on mRNA transcription indicates that hCLE plays a significant role in the generation of cellular messengers and is in agreement with the repeated incapability to obtain a stable cell line with a down-regulated expression of hCLE, suggesting that hCLE could be an essential gene.

The hCLE silencing down-regulates a large number of genes. Among the genes that are regulated, many different functional categories were observed although those involved in transcriptional regulation were the most represented. Within this category, some of them modulate the expression of a broad variety of genes such as the TATA box binding protein (TBP), the RelA-associated inhibitor (RelA) and the signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5). TBP is an essential transcription component whose changes have a profound impact on mRNA expression,³⁵ RelA binds to the NK-kappaB subunit p65 and modulates its transcriptional activity,³⁶ and STAT5 regulates the expression of genes that determine important cellular phenotypes such as proliferation, apoptosis and differentiation.³⁷ Interestingly, there are several genes inside this group that are involved in the control of tumor proliferation and in addition some of the genes included in the cell signaling category modulate very important metabolic cascades. Therefore, regarding the functions of these hCLE-regulated genes, a considerable effect on global gene expression should be expected under hCLE silencing conditions, in agreement with the obtained data.

Genes involved in protein biosynthesis are unique in having similar number of genes down and up-regulated by hCLE silencing (Table 1). Within this category it should be mentioned the presence of hStaufen-1 that is involved in local translation, p38 a key structural component of the mammalian aminoacyl-tRNA synthetase complex³⁸ and ribosomal protein L36 that were up-regulated, together with the double-stranded RNA-activated kinase (PKR) that was down-regulated. PKR is a protein kinase that

modulates a number of different stress processes and its stimulation gives rise to translation inhibition.³⁹ Then, appropriate p38 and PKR levels are required for a suitable protein translation and the up-regulation of p38 and Staufen-1 and down-regulation of PKR could lead to translation stimulation. It is possible that the observed variations in their expression could be a response in hCLE-silenced cells to compensate the inhibition of mRNA transcription.

Role of hCLE on influenza infection

Taking into consideration the association of hCLE with the different forms of the RNAP II, which can be the function of hCLE in the context of the influenza virus infection? As previously described, hCLE/CGI-99 was found associated to the PA polymerase subunit of the influenza virus and to active reconstituted viral RNPs.¹ It is worthwhile remembering that viral transcription must be functionally associated to cellular transcription, as 5' capped-oligonucleotides are required as primers for viral transcription. In agreement with that, it has been shown that influenza virus polymerase binds to the hypophosphorylated RNAP II and RNAP II Ser5-P, suggesting that it targets actively transcribing RNAP II.⁸ As the RNAP II Ser5-P is engaged in transcription initiation, the presence of hCLE in RNAP II-containing complexes, could be a way of placing the viral polymerase close to the sites of generation of the 5' capped pre-messengers. Therefore, it is possible that influenza polymerase uses the binding to hCLE as a physical link with the cellular transcription machinery to locate the viral polymerase close to those intranuclear sites where the generation of cap-pre-mRNAs is taking place.

Potential roles for hCLE in gene expression

There are many reports that point out the main role of the RNA polymerase II CTD in the coupling of transcription, capping, splicing and polyadenylation, recruiting different multiprotein complexes

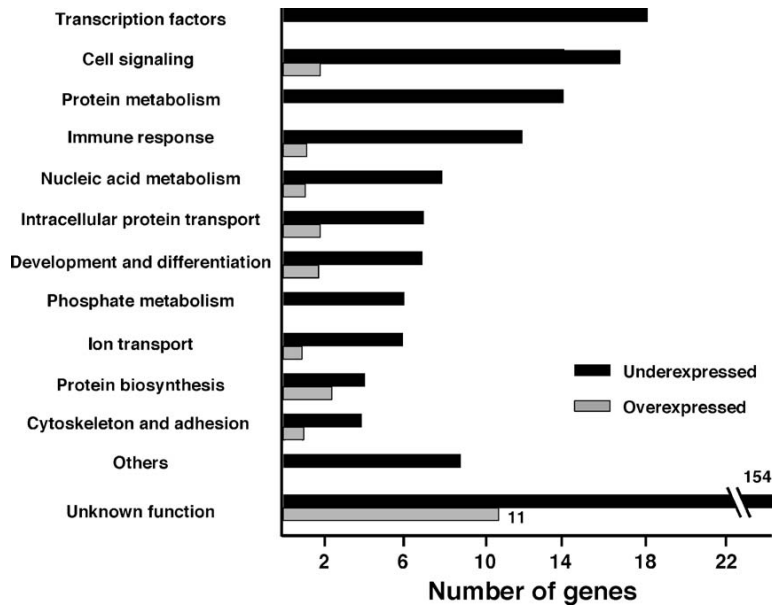


Figure 5. Functional classification of the genes differentially expressed in hCLE-silenced cells. Genes were grouped into Gene Ontology categories with the assistance of *fatiGo* data base. Black bars represent down-regulated genes and grey bars up-regulated genes in hCLE-silenced cells.

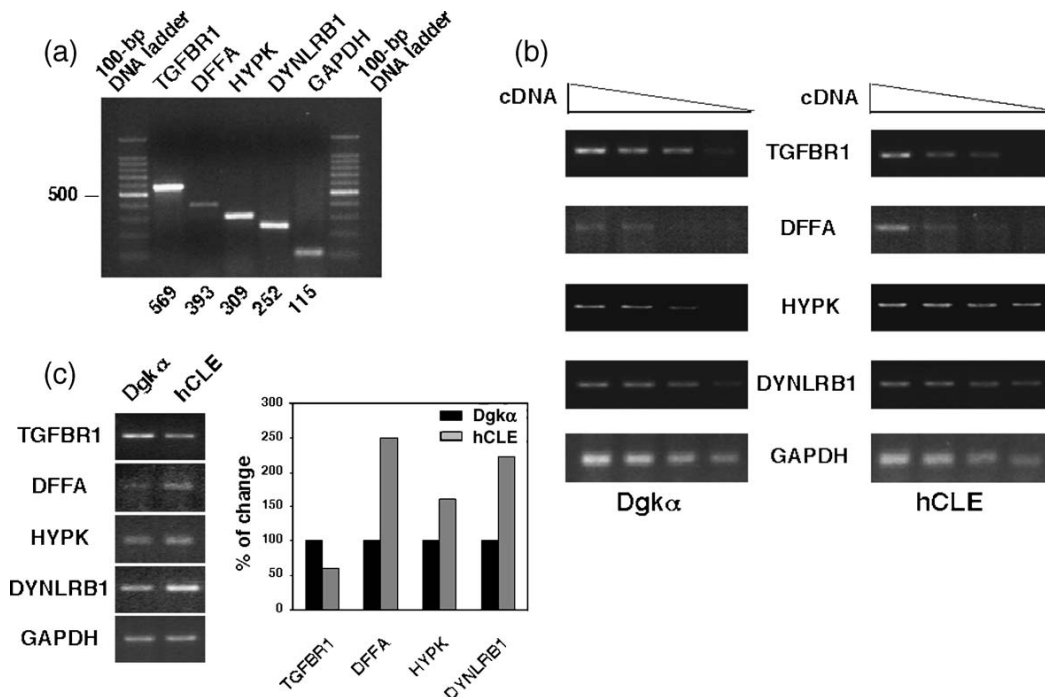


Figure 6. Validation of gene array results by semiquantitative RT-PCR. The RNA expression of TGFBFR1, DYNLRB1, HYPK, DFFA and GAPDH genes, was analyzed by semiquantitative RT-PCR as described in Materials and Methods. (a) A representative gel showing the sizes of the specific RT-PCR amplification products. The expected sizes are indicated at the bottom; the 100 bp DNA ladder is shown on the left. (b) RT-PCR products of the corresponding genes using the same RNA samples used in the microarray of HEK293T cells transfected with pSUPER-Dgk α (Dgk α) or pSUPER-hCLE (hCLE) plasmids. Each reaction contained decreasing amounts of cDNA (1:2 serial dilution) as indicated by the descending triangle and two different RNA pools were analyzed. (c) Quantification of gene expression of the corresponding genes after normalization with GAPDH control for each sample. The expression level of each gene in Dgk α samples was referred to as 100.

and coordinating the different steps of mRNA synthesis. Reversible phosphorylation of the RNAP II CTD plays a key role in the progression of RNAP II through the transcription cycle.⁴⁰ In contrast to the capping and splicing factors that have been found associated specifically to the RNAP II Ser2-P,^{41,42} the phosphorylation status of the CTD does not affect the association of CstF (cleavage stimulation factor) components with the RNAP II (see Hirose and Manley for a review⁴³). This factor is required for the processing of the 3' end of the messenger RNA and consistent with these reports, the CstF-64 yeast homologue is recruited to promoters and remains associated along the length of several yeast genes.⁴⁴

Several data might indicate an additional function of hCLE in pre-mRNA processing, besides its role as transcriptional modulator. In addition to the hCLE-RNAP II association that is independent of the phosphorylation degree of the CTD, hCLE binds to DDX1 in neuronal RNA-transporting granules.²⁰ DDX1 protein is a component of the CstF^{25,45} and associates to proteins that are present in transcription initiation and elongation complexes²⁰ and bind directly to both the hypophosphorylated and hyperphosphorylated forms of the CTD.⁴⁶ DDX1 and these proteins have been identified in complexes that operate in different processes, including pre-mRNA processing and transcription. Taking all of these data into consideration it is plausible that hCLE, besides its role as a modulator of the mRNA transcription, could be engaged in different steps of the mRNA processing by its association to protein factors that are involved in different steps of pre-mRNA maturation.

Finally, it seems that hCLE should be present in different multiprotein complexes that could be involved in a diversity of cellular functions. The isolation, characterization and further knowledge of these hCLE protein partners, requires additional studies and would provide clues about the possible roles and molecular mechanisms that should govern the global activity of hCLE. Nevertheless, the present study points out the importance of the presence of hCLE in the transcription complexes and allows its definition as a new positive modulator of the RNA polymerase II activity.

Materials and Methods

Biological materials

HEK293T and MDCK cell lines were used throughout. Antiserum specific for hCLE was prepared by hyperimmunization of rabbits with purified His-hCLE as described.¹ Rat polyclonal antibody anti-BrdUridine was obtained from Abcam and mouse monoclonal antibody anti- β -tubulin and α -amanitin were from Sigma.

Construction of plasmids

To generate the pSUPER-hCLE plasmid to silence the hCLE gene sense (5'GATCCCAAGATTGAAGACAGAGGGAAATTTTCAAGAGAAAATCCCTCTGTCTTCAA-

TCTTTTTTGGAAA) and antisense (5'AGCTTTTCCA-AAAAAAGATTGAAGACAGAGGGAAATTTTCTTTGAAAAATCCCTCTGTCTTCAATCTTGGG 3') oligonucleotides, corresponding to the mRNA of hCLE gene and containing BglIII and HindIII sites, were hybridized and ligated to the pSUPER plasmid digested with these enzymes.³¹ The short-hairpin RNA generated by this plasmid showed no homology to other gene sequences when using BLAST. To create pSUPER-Dgk α plasmid used as negative control in silencing experiments, the oligonucleotide (5'GATCCCCGCCAGAAGACCATGG-ATGATTCAAGAGATCATCCATGGTCTTCTGGC-TTTTTGGAAA 3') was used as sense sequence and (5'AGCTTTTCCA AAAAAGCCAGAAGACCATGGATGATC-TCTTGAATCATCCATGGTCTTCTGGCGGG) as antisense oligonucleotide.

Immunofluorescence

MDCK cells were fixed with 3.7% formalin for 20 min at room temperature and stored in PBS. Fixed cells were permeabilized and incubated with the following primary antibodies: anti-hCLE (1:500), anti-RNAP II Ser2-P (H5) (1:100), anti-RNAP II Ser5-P (H14) (1:100) or anti-RNAP II unphosphorylated Ser2 (8WG16) (1:100) monoclonal antibodies from BabCo in PBS/0.1% (w/v) BSA. Confocal microscopy was performed with a Bio-Rad Radiance 2100 laser scanning system on a Zeiss Axiovert 200 microscope. Images of 1024 \times 1024 pixels and an eight bit gray scale depth were acquired sequentially every 0.2–0.3 μ m employing LaserSharp v5.0 software (Bio-Rad) and analyzed using LaserPix v.4 image program (Bio-Rad). The colocalization mask was used for colocalization analysis. All the experiments were repeated at least three times and a representative experiment is shown.

RNA analysis

In situ RNA synthesis

For *in situ* RNA synthesis followed by immunofluorescence studies, MDCK cells were grown on microscope cover glasses. Detection of *in situ* RNA synthesis by Br-UTP incorporation was adapted from a previous report.⁴⁷ Cultures were washed once with TBS at 4 °C and then washed for 10 min at 4 °C with glycerol buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 25% glycerol, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM EGTA). Cells were then permeabilized for 3 min at 4 °C with glycerol buffer plus 1 mM DTT, 25 units/ml human placental ribonuclease inhibitor (HPRI) from Amersham, 0.05% Triton X100. After washing with TBS, cells were incubated in transcription buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 25% glycerol, 1 mM DTT, 25 units/ml HPRI, 0.5 mM PMSF, 1.8 mM ATP, 0.5 mM CTP, 0.5 mM GTP with or without 5 μ g/ml α -amanitin) and 1 mM Br-UTP for 60 min at room temperature and washed twice with TBS plus 25 units/ml HPRI and 1 mM DTT. Finally, to analyze the Br-UTP incorporation, the cells were fixed for 20 min at room temperature in 3.7% formalin, washed with PBS and processed for confocal microscopy as indicated above. RNA synthesis was monitored with anti-BrdU antibody (1:100).

In vitro RNA synthesis

To analyze the RNA synthesis in isolated nuclei of hCLE silenced cells, cultures of HEK293T cells were

transfected with the indicated pSUPER plasmids by the calcium phosphate method,⁴⁸ the nuclei were isolated 48 h post-transfection as described⁴⁹ and frozen in liquid nitrogen. These nuclei were used to perform *in vitro* RNA synthesis by incorporation of a labeled ribonucleotide during a 10 min pulse, with or without α -amanitin (5 μ g/ml) to evaluate the RNAP II-directed RNA synthesis, as described.⁴⁹ The RNA was isolated by phenol-extraction and ethanol-precipitation. Finally, total RNAs were applied to denaturing gels and after quantification by ethidium bromide staining in a Bio-Rad Chemi Doc equipment, transferred to nylon membranes and the radioactivity was quantified in a phosphorimager.

Northern blot

Total RNA was isolated using the Ultraspec RNA Isolation Reagent from Biotex and treated with 40 μ g/ml of RNase-free DNase I and 25 units/ml HPRI for 15 min at 30 °C. Northern blots were performed using standard conditions⁴⁹ and the filters were hybridized with a negative-polarity riboprobe to detect RNA levels of hCLE gene.

Co-immunoprecipitation

For co-immunoprecipitation studies, nuclei of HEK293T cells were prepared as described above and transcriptionally active nuclear extracts obtained as reported.⁵⁰ The extracts were incubated with the corresponding antibodies as reported⁵¹ and the co-immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blotting that was done as described.¹ The primary antibodies used were a rabbit anti-hCLE serum (1:1000) for hCLE protein and monoclonal antibodies 8WG16, H14 and H5 (1:500) each for RNA polymerase II.

RNA isolation and DNA microarray

Cultures of HEK293T cells were transfected with pSUPER-Dgk α or pSUPER-hCLE plasmids and at 48 h post-transfection total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Further purification was carried out using the RNeasy Clean-Up protocol (Qiagen, Valencia, CA). Quantification and integrity of the RNA was assessed in a Bionalyzer 2100 (Agilent) by $A_{260/280}$ absorption. Three different RNA pools containing 10 μ g of total RNA derived from three independent experiments performed in triplicate were used.

Aminosilane-coated slides containing 32,256 spots (corresponding to 22,264 unigenes) representing the Human oligo set from Qiagen-Operon, obtained from the University of Cincinnati[†], were hybridized by conventional methods with RNA probes labelled with either Cy3 or Cy5 Mono NHS Esters (CyTMDye Post-labelling Reactive Dye Pack, Amersham). "Dye-swap" labelling was used in half of the replicated hybridizations in order to correct for gene-specific dye bias. Images from Cy3 and Cy5 channels were equilibrated and captured with a GenePix 4000B (Axon) and spots quantified using GenPix software (Axon).

[†] <http://www.microarray.uc.edu/Resources/genelist.htm>

Microarray data analysis

Normalization and statistical analysis of the expression data were performed by using the LIMMA software package.⁵² For local background correction we used the "normexp" method in LIMMA to adjust the local median background estimates. The resulting log-ratios were print-tip loess normalized for each array. To have similar distribution across arrays and to achieve consistency among arrays, log-ratio values were scaled using as scale estimator the median-absolute-value.⁵² To assess the differential expression in conditions of hCLE silencing a linear model was used. Each probe was tested for changes in expression over replicates by using a moderated *t* statistic.⁵² To control the false discovery rate (FDR), *p*-values were corrected by using the method of Benjamini and Hochberg.⁵³ To select differentially expressed genes in conditions of hCLE knock-down two criteria were used: FDR <10% and a fold change greater than 1.0. Values were considered to be significant if the corrected *p*-values were <0.1 and 2,322 differentially expressed genes emerged. Finally, establishing the criterion of a fold change greater than 1.5 at three replicas a total of 290 genes differentially expressed in conditions of hCLE knock-down appeared.

Semiquantitative RT-PCR and primers

The genes TGFBR1 (Transforming growth factor, beta receptor I), DYNLRB1 (Dynein light chain 2A), HYPK (Huntingtin interacting protein K) and DFFA (DNA fragmentation factor) identified among the regulated genes by hCLE knock-down were analyzed using semi-quantitative RT-PCR to validate the array data. RNA templates were reverse-transcribed into cDNA for 1 h at 45 °C by using AMV reverse transcriptase (Promega) according to the manufacturer's instructions. The enzyme was inactivated by heating 10 min at 75 °C; and the denatured cDNA templates were amplified using Taq polymerase by the following cycles: 94 °C for 10 s, 54 °C for 30 s and 68 °C for 60 s. A final extension was performed for 2 min at 68 °C. To ensure that amplification remained within the linear range, 1:2 serial dilutions of cDNA were made. RT-PCR for GAPDH (25 cycles) was used as a control for mRNA abundance. For the other genes, the number of cycles ranged from 25 to 35. RT-PCR for each gene was performed several times using different batches of cDNA.

The oligonucleotide primer pairs used for each of the genes in this study corresponded to the following nucleotides: TGFBR1, 737–751 and 1288–1304 NM_004612; DYNLRB1, 63–78 and 297–315 NM_014183; HYPK, 221–237 and 513–530 NM_016400 and DFFA, 695–711 and 1071–1088 NM_004401. Amplified PCR products were visualized on a 2% (w/v) agarose gel. Amplification yielded the predicted size of the respective amplified fragments.

Acknowledgements

We are indebted to the transcriptomics facility of the Centro Nacional de Biotecnología, C.S.I.C., Madrid, Spain, that performed the microarray studies. We thank C. Suñe for his help during the course of this work. We also thank N. Brewster and

R. Singer for performing studies of hCLE in yeast. We are indebted to J. Ortin and T. Lutz for critical review of the manuscript. The technical assistance of S. Gutierrez with the confocal microscopy studies is gratefully acknowledged. We also thank Y. Fernandez, J. Fernandez and C. Enriquez for their technical support.

A. P.-G. was a fellow from the Fondo de Investigaciones Sanitarias and A. R. from Programa Nacional de Formación de Personal Universitario. This work was supported by Programa Sectorial de Promoción General del Conocimiento (grants BMC2002-01141 and BFU2005-02834).

References

- Huarte, M., Sanz-Ezquerro, J. J., Roncal, F., Ortín, J. & Nieto, A. (2001). PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J. Virol.* **75**, 8597–8604.
- Horisberger, M. A. (1980). The large P proteins of influenza A viruses are composed of one acidic and two basic polypeptides. *Virology*, **107**, 302–305.
- Detjen, B. M., St. Angelo, C., Katze, M. G. & Krug, R. M. (1987). The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in the form of a complex. *J. Virol.* **61**, 16–22.
- Honda, A., Mukaigawa, J., Yokoiyama, A., Kato, A., Ueda, S., Nagata, K. *et al.* (1990). Purification and molecular structure of RNA polymerase from influenza virus A/PR8. *J. Biochem. Tokyo*, **107**, 624–628.
- Elton, D., Digard, P., Tiley, L. & Ortín, J. (2005). Structure and function of the influenza virus RNP. In *Contemporary Topics in Influenza Virology* (Kawaoka, Y., ed.), Horizon Scientific Press, Norfolk, VA.
- Bouloy, M., Plotch, S. J. & Krug, R. M. (1978). Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA *in vitro*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **75**, 4886–4890.
- Plotch, S. J., Bouloy, M., Ulmanen, I. & Krug, R. M. (1981). A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell*, **23**, 847–858.
- Engelhardt, O. G., Smith, M. & Fodor, E. (2005). Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J. Virol.* **79**, 5812–5818.
- Brewster, N. K., Johnston, G. C. & Singer, R. A. (1998). Characterization of the CP complex, an abundant dimer of Cdc68 and Pcb3 proteins that regulates yeast transcriptional activation and chromatin repression. *J. Biol. Chem.* **273**, 21972–21979.
- Okuhara, K., Ohta, K., Seo, H., Shioda, M., Yamada, T., Tanaka, Y. *et al.* (1999). A DNA unwinding factor involved in DNA replication in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Curr. Biol.* **9**, 341–350.
- Sliter, T. J. & Gilbert, L. I. (1992). Developmental arrest and ecdysteroid deficiency resulting from mutations at the *dre4* locus of *Drosophila*. *Genetics*, **130**, 555–568.
- Orphanides, G., Wu, W.-H., Lane, W. S., Hampsey, M. & Reinberg, D. (1999). The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature*, **400**, 284–288.
- Duroux, M., Houben, A., Ruzicka, K., Frimi, J. & Grasser, D. (2004). The chromatin remodelling complex FACT associates with actively transcribed regions of the Arabidopsis genome. *Plant J.* **40**, 660–671.
- Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C. H., Luse, D. S. & Reinberg, D. (1998). FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell*, **92**, 105–116.
- Krogan, N. J., Kim, M., Ahn, S. H., Zhong, G., Kobor, M. S., Cagney, G. *et al.* (2002). RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6979–6992.
- Squazzo, S. L., Costa, P. J., Lindstrom, D. L., Kumer, K. E., Simic, R., Jennings, J. L. *et al.* (2002). The Paf1 complex physically and functionally associates with transcription elongation factors. *EMBO J.* **21**, 1764–1774.
- Saunders, A., Werner, J., Andrusis, E. D., Nakayama, T., Hirose, S., Reinberg, D. & Lis, J. T. (2003). Tracing FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin *in vivo*. *Science*, **301**, 1094–1096.
- Belotserkovskaya, R., Saunders, A., Lis, J. T. & Reinberg, D. (2004). Transcription through chromatin: understanding a complex FACT. *Biochim. Biophys. Acta*, **1677**, 87–99.
- Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V. A., Orphanides, G., Studitsky, V. M. & Reinberg, D. (2003). FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science*, **301**, 1090–1093.
- Kanai, Y., Dohmae, N. & Hirokawa, N. (2004). Kinesin transport RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*, **43**, 513–525.
- Marión, R. M., Fortes, P., Beloso, A., Dotti, C. & Ortín, J. (1999). A human sequence homologue of Staufén is an RNA binding protein that is associated to polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2212–2219.
- Falcón, A., Fortes, P., Marión, R. M., Beloso, A. & Ortín, J. (1999). Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufén *in vivo* and *in vitro*. *Nucl. Acids Res.* **27**, 2241–2247.
- Rocak, S. & Linder, P. (2004). DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 232–241.
- Chen, H.-C., Lin, W.-C., Tsay, Y.-G., Lee, S.-C. & Chang, C.-J. (2002). An RNA helicase, DDX1, interacting poly(A) RNA and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. *J. Biol. Chem.* **277**, 40403–40409.
- Bleoo, S., Sun, X., Hendzel, M. J., Rowe, J. M., Packer, M. & Godbault, R. (2001). Association of human DEAD box protein DDX1 with a cleavage stimulation factor involved in 3'-end processing of pre-mRNA. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 3046–3059.
- Palancade, B. & Bensaude, O. (2003). Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* **270**, 3859–3870.
- Kobor, M. S. & Greenblatt, J. (2002). Regulation of transcription elongation by phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1577**, 261–275.
- Kumaran, R. I., Muralikrishna, B. & Parnaik, V. K. (2002). Lamin A/C speckles mediate spatial organization of splicing factor compartments and RNA polymerase II transcription. *J. Cell. Biol.* **159**, 783–793.
- Zhu, X., Zeng, X., Huang, B. & Hao, S. (2004). Actin is closely associated with RNA polymerase II and involved in activation of gene transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 623–630.

30. Vaisius, A. C. & Wieland, T. (1982). Formation of a single phosphodiester bond by RNA polymerase B from calf thymus is not inhibited by alpha-amanitin. *Biochemistry*, **21**, 3097–3101.
31. Brummelkamp, T. R., Bernards, R. & Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**, 550–552.
32. Avila-Flores, A., Santos, T., Rincon, E. & Merida, I. (2005). Modulation of the mTOR pathway by diacylglycerol kinase-produced phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **280**, 10091–10099.
33. Al-Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R. & Dopazo, J. (2004). FatIGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics*, **20**, 578–580.
34. Corden, J. L., Cadena, J. M., Ahearn, J. M. & Dahmus, M. E. (1985). A unique structure at the carboxy terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **82**, 7934–7938.
35. Hernandez, N. (1993). TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev.* **7**, 1291–1308.
36. Yang, J. P., Hori, M., Sanda, T. & Okamoto, T. (1999). Identification of a novel inhibitor of nuclear factor-kappaB, RelA-associated inhibitor. *J. Biol. Chem.* **274**, 15662–15670.
37. Wittig, I. & Groner, B. (2005). Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5), a crucial regulator of immune and cancer cells. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* **5**, 449–463.
38. Lee, S. W., Cho, B. H., Park, S. G. & Kim, S. (2004). Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: beyond translation. *J. Cell Sci.* **117**, 3725–3734.
39. Taylor, S. S., Haste, N. M. & Ghosh, G. (2005). PKR and eIF2alpha: integration of kinase dimerization, activation, and substrate docking. *Cell*, **122**, 823–825.
40. Dahmus, M. E. (1996). Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **271**, 19009–19012.
41. Cho, E. J., Rodriguez, C. R., Takagi, T. & Buratowski, S. (1998). Allosteric interactions between capping enzyme subunits and the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* **12**, 3482–3487.
42. Yue, Z., Maldonado, E., Pillutla, R., Cho, H., Reinberg, D. & Shatkin, A. J. (1997). Mammalian capping enzyme complements mutant *Saccharomyces cerevisiae* lacking mRNA guanylyltransferase and selectively binds the elongating form of RNA polymerase II. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 12898–12903.
43. Hirose, Y. & Manley, J. L. (2000). RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev.* **14**, 1415–1429.
44. Calvo, O. & Manley, J. L. (2005). The transcriptional coactivator PC4/Sub1 has multiple functions in RNA polymerase II transcription. *EMBO J.* **24**, 1009–1020.
45. Li, L., Roy, K., Katyal, S., Sun, X., Bleoo, S. & Godbout, R. (2006). Dynamic nature of cleavage bodies and their spatial relationship to DDX1 bodies, Cajal bodies, and gems. *Mol. Biol. Cell*, **17**, 1126–1140.
46. Emili, A., Shales, M., McCracken, S., Xie, W., Tucker, P. W., Kobayashi, R., Blencowe, B. J. & Ingles, C. J. (2002). Splicing and transcription-associated protein PSF and p54nrb/nonO bind to the RNA polymerase II CTD. *RNA*, **8**, 1102–1111.
47. Wansink, D. G., Schul, W., van der Kraan, I., van Steensel, B., van Driel, R. & de Jong, L. (1993). Fluorescence labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J. Cell Biol.* **122**, 283–293.
48. Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R., Urlaub, G. & Chasin, L. (1979). DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **76**, 1373–1376.
49. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd edit, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edit Cold Spring Harbor, New York.
50. Dignam, J. D., Levovitz, R. M. & Roeder, R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl. Acids Res.* **11**, 1475–1488.
51. Sanz-Ezquerro, J. J., de la Luna, S., Ortín, J. & Nieto, A. (1995). Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *J. Virol.* **69**, 2420–2426.
52. Smyth, G. K., Michaud, J. & Scott, H. S. (2005). Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics*, **21**, 2067–2075.
53. Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N. & Golani, I. (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav. Brain Res.* **125**, 279–284.

Edited by J. Karn

(Received 12 May 2006; received in revised form 28 July 2006; accepted 31 July 2006)
Available online 3 August 2006

Influenza Virus Infection Causes Specific Degradation of the Largest Subunit of Cellular RNA Polymerase II[∇]

A. Rodríguez,† A. Pérez-González,† and A. Nieto*

Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Received 28 September 2006/Accepted 28 February 2007

It has been described that influenza virus polymerase associates with RNA polymerase II (RNAP II). To gain information about the role of this interaction, we explored if changes in RNAP II occur during infection. Here we show that influenza virus causes the specific degradation of the hypophosphorylated form of the largest subunit of RNAP II without affecting the accumulation of its hyperphosphorylated forms. This effect is independent of the viral strain and the origin of the cells used. Analysis of synthesized mRNAs in isolated nuclei of infected cells indicated that transcription decreases concomitantly with RNAP II degradation. Moreover, this degradation correlated with the onset of viral transcription and replication. The ubiquitin-mediated proteasome pathway is not involved in virally induced RNAP II proteolysis. The expression of viral polymerase from its cloned cDNAs was sufficient to cause the degradation. Since the PA polymerase subunit has proteolytic activity, we tested its participation in the process. A recombinant virus that encodes a PA point mutant with decreased proteolytic activity and that has defects in replication delayed the effect, suggesting that PA's contribution to RNAP II degradation occurs during infection.

The genome of influenza virus consists of eight single-stranded RNA molecules of negative polarity. The viral RNA polymerase is composed of three subunits, PB1, PB2, and PA (16, 26, 27), which together with the nucleoprotein perform all the activities required for viral RNA expression (15, 18, 28, 33). The PB2 subunit is able to bind cap 1 structures of host cell hnRNAs (8, 57). The PB1 subunit contains both sequence motifs typical of the viral RNA-dependent RNA polymerases (46), which are essential for RNA synthesis (7), and the endonuclease activity responsible for the cleavage of host mRNA precursors (35). The PA subunit is a phosphoprotein with proteolytic activity (25, 40, 50, 51). The phenotype of viral temperature-sensitive and protease mutants suggests that the PA subunit may be involved in the transition from mRNA transcription to replication (29, 37). The transcription process involves a cap-stealing mechanism by which 5'-capped oligonucleotides derived from newly synthesized RNA polymerase II (RNAP II) transcripts are used as primers and elongated by the viral polymerase (9, 45). In line with this transcription strategy, parental virion RNPs colocalize with active RNAP II in the infected-cell nucleus (I. Salanueva, personal communication). Due to the requirements for cellular capped mRNAs, virus transcription is inhibited by actinomycin D or α -amanitin (38). Viral RNA replication involves the synthesis of cap-independent, full-length positive-stranded RNAs complementary to the genomic viral RNAs (vRNAs), which serve as templates for amplification of the vRNAs and are not sensitive to actinomycin D or α -amanitin (53).

Many viruses induce alterations in host cell gene expression. Among these, changes in the transcriptional machinery of the

infected cells are broadly documented. RNAP II, a multiprotein complex composed of 12 subunits, is the enzyme responsible for the transcription of mRNAs. Two major forms of RNAP II are found in cells, hyperphosphorylated and hypophosphorylated on the carboxy-terminal domain (CTD) of its largest subunit. The CTD consists of more than 50 repeats of the Y₁S₂P₃T₄S₅P₆S₇ heptapeptide (12), with Ser-2 and Ser-5 (boldface) being the main phosphoacceptor residues (see reference 42 for a review). It has been reported that serine 5 phosphorylation is detected at the promoter region of the transcribing genes, whereas serine 2 phosphorylation is increased as RNAP II leaves the promoter and transcribes the body of the gene. Several cyclin-dependent kinases phosphorylate the CTD. Among them CDK7, a subunit of the transcription factor TFIIH, and CDK9, a subunit of the elongation factor P-TEFb, are found. These kinases associate with one of the several regulatory cyclin T proteins (6, 47, 54). There are many examples of viruses that modify the RNAP II CTD to improve their replication, including human immunodeficiency virus type 1 (13, 31, 59), cytomegalovirus (55), herpes simplex virus type 1 (HSV-1) (14, 17, 21), Epstein-Barr virus (5), and Bunyamwera virus (56).

It has been found that the RNA polymerase complex of influenza virus interacts with the largest subunit of the RNAP II via the CTD. The viral polymerase binds to the hypo- and hyperphosphorylated forms of RNAP II, suggesting that it targets actively transcribing RNAP II (19). We previously identified the cellular protein hCLE/CGI-99 as a factor interacting with the PA subunit of the influenza virus polymerase that associates with active, purified viral RNPs reconstituted *in vivo* (30). We have also shown that hCLE is a new positive transcription modulator of RNAP II that is present in complexes with both the hypo- and hyperphosphorylated forms of RNAP II (44). All these data prompted us to explore if changes in RNAP II levels or in its phosphorylation pattern occur during influenza virus infection.

* Corresponding author. Mailing address: Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. Phone: 34 91 5854914. Fax: 34 91 5854506. E-mail: anmartin@cnb.uam.es.

† A. Rodríguez and A. Pérez-González contributed equally to this work.

[∇] Published ahead of print on 7 March 2007.

MATERIALS AND METHODS

Biological materials. The cell lines used in this study were HEK293T and HeLa (human), COS-1 (monkey), NIH 3T3 (mouse), and NLB2 (canine). The influenza virus A/Victoria/3/75 (VIC) and A/WSN/33 (WSN) strains were used. Recombinant viruses containing PA, PB1, PB2, and NP genes from the VIC strain and all other genes from the WSN strain, with either wild-type PA or the T157A PA mutant, have been described previously (29). Plasmids pCMVPA, pCMVPB1, and pCMVPB2 have been described previously (20). α -Amanitin and proteasome inhibitor MG132 were from Sigma. The protease inhibitor "Complete" was from Roche.

Virus infection and transfection. Cells were infected at a multiplicity of infection of 3 PFU/cell. At different hours postinfection (hpi), the cells were collected in phosphate-buffered saline with protease ("Complete") and phosphatase (500 μ M sodium orthovanadate, 500 μ M β -glycerophosphate, and 500 μ M sodium molybdate) inhibitors, and the cell pellet was resuspended in Laemmli sample buffer (49).

Cell cultures were transfected by the calcium phosphate method (58) with pCMV plasmids expressing PB1, PB2, or PA. After 16 hours of transfection, the cells were collected and used for Western blot analysis.

Western blotting. Western blotting was done as described previously (30). The following primary antibodies were used: for RNAP II, monoclonal antibodies 8WG16 (1:500), H14 (1:500), and H5 (1:500) from BabCo; for the N-terminal part of the largest RNAP II subunit, polyclonal antibody N-20 from Santa Cruz (1:500); for PA, monoclonal antibodies 2 and 14 (1:20 each) (4); for PB1, a rabbit polyclonal antibody (1:1,000) (24); for PB2, monoclonal antibodies 8 and 28 (1:100 each) (2); for NP protein, a rat polyclonal antibody generated using as antigen a His-NP protein expressed and purified from bacteria (1:2,000); for translation initiation factor 4GI (eIF4GI), a mixture of four rabbit polyclonal antibodies (1:8,000 each) (1); for β -tubulin, a mouse monoclonal antibody (1:15,000) from Sigma; for cyclin T1, a goat polyclonal antibody (1:1,000) from Santa Cruz; for CDK7, a mouse monoclonal antibody (1:1,000) from Santa Cruz; and for ubiquitin, a rabbit polyclonal antibody (1:1,000) from Santa Cruz.

In vitro RNA synthesis. To analyze total RNA synthesis, cultures of HEK293T cells were mock infected or infected with the VIC or WSN strain and their nuclei were isolated and frozen. These nuclei were used to detect in vitro RNA synthesis by incorporation of [α - 32 P]GTP (250 μ Ci/ml) during a 30-min pulse, with or without α -amanitin (5 μ g/ml), as described previously (49). After in vitro RNA synthesis, total RNAs were isolated by phenol extraction and ethanol precipitation. The RNAs were quantified by ethidium bromide staining in Bio-Rad Chemi Doc equipment. The radioactivity was quantitated in a phosphorimager after blotting to a nylon membrane.

To analyze the synthesis of hStaufen-1, vimentin, and β -tubulin mRNAs, the in vitro-synthesized RNAs using isolated nuclei from either mock- or influenza virus-infected cells were used as probes for runoff experiments (49). Five hundred nanograms of the corresponding coding sequences was spotted and fixed to nylon membranes and hybridized with the labeled RNAs, and the label was quantitated in a phosphorimager.

Detection of viral RNAs. Total RNA from infected HEK293T cells was isolated using the Ultraspec RNA isolation reagent from Biotex. Northern blotting was performed using standard conditions (49), and the membranes were hybridized with oligonucleotide probes radiolabeled with [γ - 32 P]ATP. The probes recognized NP positive sense RNA or vRNA from VIC and WSN strains, and their sequences were 5'-GTCTTCGAGCTCTCGAC-3' and 5'-TCTTAGGATCTTCCCCGC-3', respectively.

Pulse-chase experiments. Cultures of HEK293T cells were starved for 2 h in methionine- and cysteine-free Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) and labeled for 1 h with a mixture of [35 S]Met/Cys (Promix; Amersham) in 100 μ l of the same medium. The chase was carried out by extensive washing with DMEM and incubation in 500 μ l of DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. Finally, cells were washed with phosphate-buffered saline buffer, resuspended in 200 μ l of DMEM, and used for immunoprecipitation assays as reported previously (50).

Metabolic labeling. HEK293T cells were mock infected or infected with the VIC strain at a multiplicity of infection of 3 PFU/cell. The cells that were treated with α -amanitin received the treatment at various times postinfection, and the cells tested at 0 hpi were pretreated 1.5 h before the infection. In all cases, the drug was present from its addition until the end of the infection (8 h). At 7 hpi the cells were washed and incubated for 1 hour in the culture medium containing [35 S]Met/Cys.

TABLE 1. Phosphorylation dependence of anti-CTD monoclonal antibodies

Antibody	Epitope (Y ₁ S ₂ P ₃ T ₄ S ₅ P ₆ S ₇)	Recognition ^a
8WG16	Unphosphorylated	Unphosphorylated repeats (no affinity for repeats containing Ser-2P)
H14	Ser-5P	Ser-5P, Ser-5P + Ser-2P
H5	Ser-2P	Ser-2P, Ser-5P, Ser-2P + Ser-5P

^a See reference 32.

RESULTS

Influenza virus infection induces the specific degradation of hypophosphorylated RNAP II. It has been found that the influenza virus polymerase associates with the hypo- and Ser-5P-hyperphosphorylated forms of RNAP II, whereas Ser-2P RNAP II does not associate with the viral polymerase (19). To check whether such interactions could produce changes in the accumulation or phosphorylation state of RNAP II during influenza virus infection, HEK293T cells were infected with the VIC strain of influenza virus and total cell extracts used for Western blot analysis with antibodies that recognize different phosphorylated forms of RNAP II. These antibodies have been produced using as epitopes different phosphorylated forms of the Y₁S₂P₃T₄S₅P₆S₇ heptapeptide, and their specificities have been extensively studied (42). In Table 1 their recognition pattern for CTD peptides subjected to Biacore analysis is shown (32). As can be observed, 8WG16 antibody mainly detects hypophosphorylated RNAP II; H5 antibody detects phosphorylated RNAP II either at Ser-2 or Ser-5, and H14 antibody detects RNAP II phosphorylated specifically at Ser-5. To assess the progression of the infection, the accumulation levels of nucleoprotein were analyzed and β -tubulin accumulation was also determined as a loading control. Around 4 hpi, the accumulation of the RNAP II forms recognized by the 8WG16 antibody began to decrease, reaching nearly undetectable levels at later times postinfection (10 to 12 h). In contrast, the levels of accumulation of the hyperphosphorylated forms of RNAP II did not show variations as the infection progressed (Fig. 1A). This experiment was repeated more than five times with identical results. The quantitation of the amount of total RNAP II (hypo- plus hyperphosphorylated forms) during influenza virus infection in the representative experiment presented in Fig. 1A is shown at the right of the figure. As observed, a 50% reduction was attained at late times postinfection. Degradation of RNAP II was also observed using an antibody that recognizes the N-terminal part of the largest subunit (Fig. 1, N20). In this case the decline of total RNAP II was lower and mainly affected the RNAP II form with higher electrophoretic mobility, which should correspond to the hypophosphorylated form. On the other hand, no specific cleavage products were found using antibodies that recognize both the N- and C-terminal parts of RNAP II. Thus, these data confirm the above results and indicate that degradation of hypophosphorylated RNAP II does not affect the CTD specifically.

It is well established that influenza virus infection shuts down host cell protein synthesis (1, 22). Depending on the

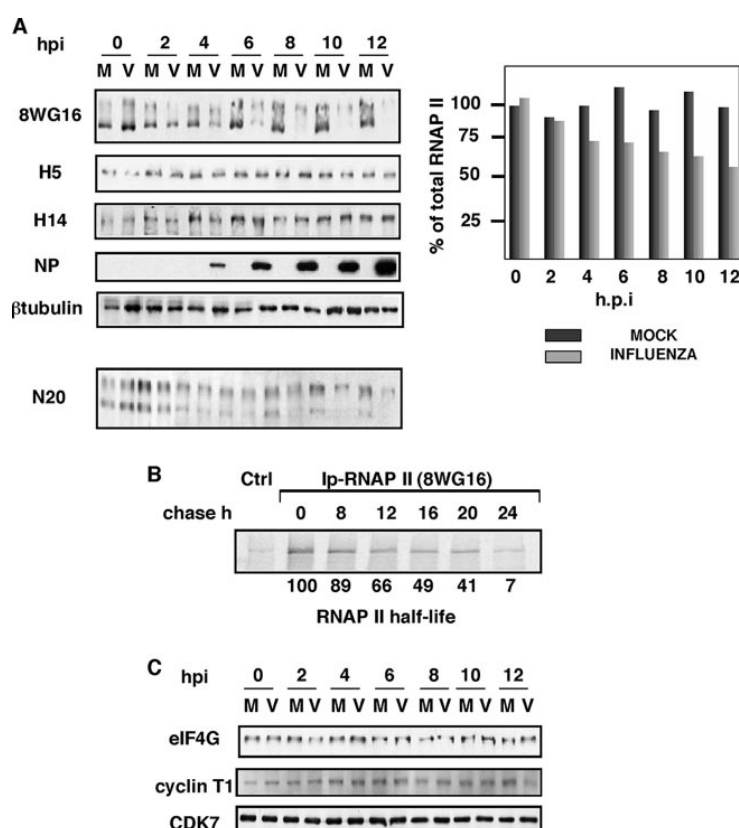


FIG. 1. Influenza virus infection produces degradation of hypophosphorylated RNAP II. (A) HEK293T cells were infected with the VIC strain of influenza virus and at the designated hpi hypophosphorylated RNAP II (8WG16), RNAP II Ser-2P and Ser-5P (H5), RNAP II Ser-5P (H14), total RNAP II (N20), and the indicated proteins were monitored in total cell extracts by Western blotting. Five different experiments were carried out, and a representative experiment is shown. Quantitation of the amount of total RNAP II (hypo- plus hyperphosphorylated forms) during the virus infection is shown at the right. M, mock-infected cells; V, influenza virus-infected cells. (B) Pulse-chase experiments. Synthesis of hypophosphorylated RNAP II was monitored in HEK293T cells with a mixture of [35 S]Met/Cys. The specific 8WG16 antibody was used to immunoprecipitate (Ip) hypophosphorylated RNAP II. Ctrl, unspecific monoclonal antibody. (C) HEK293T cells were infected with the VIC strain of influenza virus and at the designated hpi the presence of the indicated proteins was monitored in total cell extracts by Western blotting.

half-lives of cellular proteins, their amounts may therefore decline during the time of influenza virus infection. Although the different RNAP II forms come from the same mRNA, it could be argued that the specific decline of the hypophosphorylated form may be the consequence of a particularly short half-life. Thus, we studied the half-lives of the different RNAP II forms. With this aim, pulse-chase experiments were carried out with HEK293T cells followed by immunoprecipitation using specific antibodies as described in Materials and Methods. As can be seen (Fig. 1B), immunoprecipitation with the 8WG16 antibody shows that the half-life of the hypophosphorylated form of the RNAP II is around 16 h, indicating that the observed decrease in the accumulation of this RNAP II form is not the consequence of the block in protein synthesis that occurs upon viral infection. Quantitation of the remaining labeled hypophosphorylated RNAP II during the chase time is shown at the bottom of the figure. Similar half-lives were detected for the hyperphosphorylated forms of RNAP II (data not shown). To assess the specificity of the degradation, we

probed the membranes with an antibody specific for eIF4GI. This translation factor has a half-life greater than 12 h in human cells, but it is very susceptible to degradation (11, 39). In spite of this susceptibility, no variations were found in eIF4GI levels upon influenza virus infection (Fig. 1C). Finally, we analyzed possible changes in the CTD kinases. Thus, the levels of CDK7 and the regulatory cyclin of CDK9, cyclin T1, were analyzed. No variations were found in their accumulation levels during the infection, in agreement with the unchanged levels of the hyperphosphorylated forms of RNAP II (Fig. 1C).

To check the validity of this observation for other influenza virus strains, we performed similar experiments using the influenza virus WSN strain (a mouse-adapted strain) to infect HEK293T cells. As shown in Fig. 2A, the WSN strain also produced degradation of the hypophosphorylated RNAP II, similarly to the VIC strain. In this case the degradation was delayed starting at around 6 hpi. To explore if this delay could be the consequence of specific requirements of virus-host cell interactions, the same experiment was performed with NIH

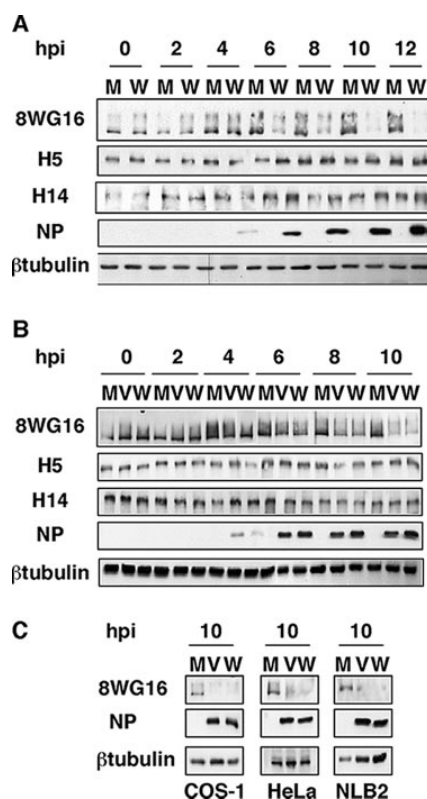


FIG. 2. Degradation of hypophosphorylated RNAP II in different virus-host cell systems. (A) HEK293T cells were mock infected (M) or infected with the WSN strain of influenza virus (W) and processed as for Fig. 1. (B) NIH 3T3 cells were mock infected or infected with the VIC (V) or the WSN strain of influenza virus and processed as for Fig. 1. (C) COS-1, HeLa, and NLB2 cells were mock infected or infected with the VIC or WSN strain of influenza virus, and at 10 hpi the presence of RNAP II (8WG16) and the designated proteins was analyzed by Western blotting.

3T3 cells of mouse origin. The results using WSN and VIC strains (Fig. 2B) show that degradation of hypophosphorylated RNAP II by WSN infection in NIH 3T3 cells starts at around 4 hpi, whereas the VIC strain produces a somewhat delayed degradation in the NIH 3T3 cell line. This observation was obtained in three different experiments, and here we show a representative experiment. These results indicate that the effect occurs independently of the virus strain, although some modulation depending on specific virus-host cell interactions could take place. Finally, we studied the degradation in additional cell lines such as HeLa, COS-1, and NLB2, of human, monkey, and canine origin, respectively. The cells were infected with the VIC and WSN strains and processed as indicated above at 10 hpi. Results are presented in Fig. 2C and show that, independently of the cell origin, influenza virus infection gives rise to a specific degradation of hypophosphorylated RNAP II. Altogether these results indicate that influenza virus infection produces a specific degradation of the

hypophosphorylated form of RNAP II that is independent of the strain and cell origin.

Dependence of cellular mRNA and viral protein synthesis on active RNAP II. To study the relationship between the virally induced degradation of the hypophosphorylated RNAP II and its activity, we carried out *in vitro* RNA synthesis. Cultures of HEK293T cells were either mock infected or infected with the VIC or WSN strain, and at the indicated (Fig. 3) hpi the nuclei were isolated. These nuclei were afterward used to perform *in vitro* RNA synthesis with or without α -amanitin (5 μ g/ml) to specifically inhibit RNAP II. The RNA synthesis due to RNAP II activity (plus the RNA produced by viral replication in infected cells that is insensitive to α -amanitin) is calculated as the difference between the values obtained without the drug (total synthesis is synthesis of RNAP I plus RNAP II plus RNAP III) and with the drug (synthesis of RNAP I plus RNAP III). The results are shown in Fig. 3A. The synthesis of cellular mRNAs was unchanged during the 8-h period that was assayed for the mock-infected cells. In contrast, an important inhibition of RNAP II synthesis was observed in the infected cells, which reached its maximum around 4 to 5 hpi and persisted throughout the infection, with an increase at late hpi possibly due to viral replication (see below). To confirm this inhibition, the specific synthesis of several mRNAs corresponding to cellular genes was evaluated. With this aim, *in vitro*-labeled RNAs from either mock- or influenza virus-infected cells were used as probes in runoff experiments using the cDNAs of hStaufen-1, β -tubulin, and vimentin genes. A progressive reduction in the synthesis of these mRNAs during the infection was observed (Fig. 3B). These results indicate that there is inhibition of cellular mRNA synthesis upon influenza virus infection and that this inhibition correlates with the start of degradation of the hypophosphorylated RNAP II.

It has been previously shown that active RNAP II is required for primary transcription of the influenza virus genome and that the presence of α -amanitin in the infected cells abolishes viral protein production (34). The addition of α -amanitin during the first 2 h of infection inhibits virus replication, whereas no effect is observed if the drug is added around 4 hpi or later (36). To analyze if there is a correlation between the RNAP II inhibition, its degradation, and its effect on viral progression, we studied the extent of degradation of RNAP II upon α -amanitin treatment in infected cells. With this aim, HEK293T cells were infected with the VIC strain and treated or not with α -amanitin (50 μ g/ml) at the indicated (Fig. 3C) times postinfection. In the treated cells, the drug was present from its addition until the end of the infection (8 h). To estimate the synthesis of viral proteins, at 7 hpi the cells were metabolically labeled with [35 S]Met-Cys, collected at 8 hpi, and analyzed in denaturing polyacrylamide gels. The results are shown in Fig. 3C. Synthesis of influenza virus proteins was undetectable or very scarce if α -amanitin was present throughout the infection cycle (0 hpi) or added at 0.5 hpi. If the drug was added between 1.5 and 2.5 hpi, a small decrease in viral protein synthesis, compared to untreated cultures, was observed. In contrast, the addition of the drug at later times did not inhibit viral protein synthesis, in agreement with previous results (36). The same samples were used to analyze hypophosphorylated RNAP II levels by Western blot assays. The results are shown in Fig. 3C, bottom panel. The addition of α -amani-

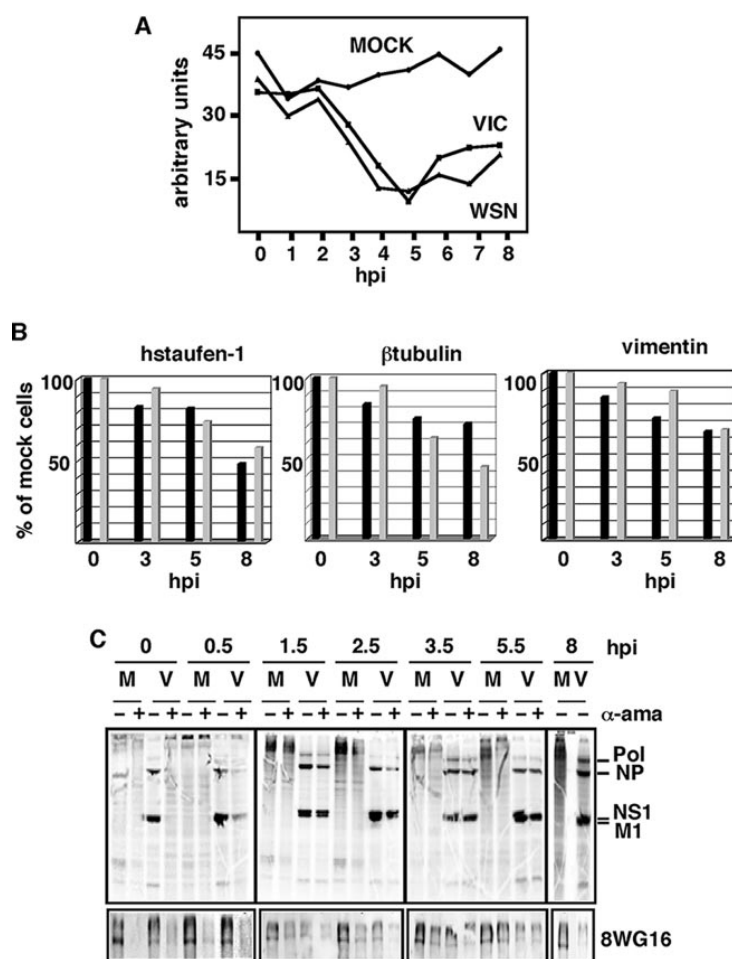


FIG. 3. Dependence of cellular mRNA and viral protein synthesis on active RNAP II. (A) Synthesis of cellular mRNA. HEK293T cells were mock-infected or infected with the VIC or WSN strain of influenza virus, and at the indicated hpi nuclei were isolated and total RNA synthesis was measured by *in vitro* incorporation of a labeled ribonucleotide with or without α -amanitin ($5 \mu\text{g/ml}$). The mRNA synthesis due to RNAP II activity is calculated as the difference between the values obtained without the drug (total synthesis is synthesis of RNAP I plus RNAP II plus RNAP III) and with the drug (synthesis of RNAP I plus RNAP III). In the infected cells the contribution of viral replication that is insensitive to α -amanitin should be taken into account. (B) Synthesis of hStaufen-1, β -tubulin, and vimentin mRNAs. Total labeled RNAs from panel A were used as probes for runoff experiments. Five hundred nanograms of the corresponding coding sequences was used, and the label was quantitated in a phosphorimager. Black bars, cells infected with the VIC strain; gray bars, cells infected with the WSN strain. (C) HEK293T cells were mock infected (M) or infected with the VIC strain of influenza virus (V), and α -amanitin ($50 \mu\text{g/ml}$; α -ama) was added (+) or not (-) to the cell culture at the indicated hpi. At 7 hpi the cells were metabolically labeled with [^{35}S]Met-Cys. Cells were collected at 8 hpi and the synthesized proteins analyzed. At the same times, total cell extracts were used to analyze hypophosphorylated RNAP II by Western blotting (8WG16).

tin between 0 and 0.5 hpi leads to an almost complete degradation of RNAP II, both in uninfected and infected cells, in agreement with previous data reporting that the degradation rate of RNAP II is α -amanitin dose dependent but is not a consequence of transcriptional arrest (41). From 1.5 to 2.5 hpi the degradation of hypophosphorylated RNAP II increases in the treated and infected cells as a result of the additive effects of both treatments. If the drug is added later, such as at 3.5 hpi, the levels of accumulation of hypophosphorylated RNAP II are similar in treated and uninfected cells and in untreated and infected cells; in this situation viral protein synthesis is normal.

Viral protein and hypophosphorylated RNAP II accumulation at 8 hpi in the absence of α -amanitin is presented in Fig. 3C, right, for comparison. The results obtained indicate that a fully active, nondegraded hypophosphorylated RNAP II protein is required during the first 0 to 2.5 hpi to allow appropriate viral protein synthesis; after this time the synthesis becomes independent of the integrity of the cellular transcription machinery. Furthermore, the data also indicate that, if a degradation of hypophosphorylated RNAP II similar to that caused by the infection is produced exogenously by α -amanitin treatment (as described above for 3.5 hpi), it does not impede viral progres-

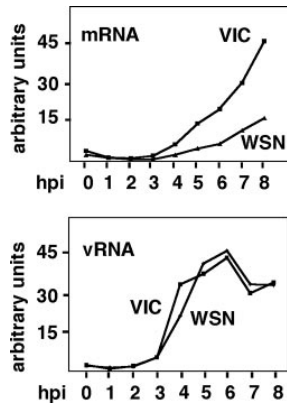


FIG. 4. Degradation of hypophosphorylated RNAP II correlates with the onset of viral transcription and replication. HEK293T cells were mock infected or infected with the VIC or WSN strain of influenza virus, and at the indicated hpi total RNAs were isolated and used to detect the positive sense RNA (top) or the vRNA (vRNA; bottom) of viral nucleoproteins by Northern blot analysis.

sion if this effect takes place at the same time that it would occur naturally during the infection (compare Fig. 1A, 4 hpi).

The degradation of hypophosphorylated RNAP II correlates with the onset of viral transcription and replication. To study the relationship between RNAP II degradation and the kinetics of viral transcription and replication, we analyzed the positive and negative sense viral RNA levels during infection. Cultures of HEK293T cells were either mock infected or infected with the VIC or WSN strain, and at the indicated hpi total RNA was isolated and used to detect the positive and negative sense RNA for viral nucleoprotein (Fig. 4, top and bottom panels, respectively). Total positive sense RNA (cRNA plus mRNA) starts accumulating at around 3 hpi and continues increasing until 8 hpi, indicating that its synthesis persists during the infection. As the amount of cRNA is much lower than that of mRNA, the presented data would mainly represent mRNA levels. The NP mRNA levels in the WSN-infected cells were less than those attained in the VIC-infected cells. These results point out that the synthesis of viral messengers takes place even in the context of significantly inactive RNAP II (Fig. 3A), indicating that the availability of 5'-capped cellular premessengers is sufficient to allow viral transcription in these conditions. On the other hand, the accumulation of vRNA starts at around 3 to 4 hpi and attains a maximum at around 6 hpi, with a small decrease at late times postinfection. These data are in agreement with our previous results (29) and different reports (23) using reverse transcription-PCR detection of mRNA, cRNA, and vRNA levels in infected cells. Thus, with different recombinant viruses, an increase of mRNA accumulation until the end of the infection has been shown, whereas cRNA and vRNA accumulation reaches a maximum at around 6 hpi. These results indicate that degradation of hypophosphorylated RNAP II that starts at around 4 hpi (Fig. 1A) correlates with the onset of viral transcription and replication.

The viral RNA polymerase complex is sufficient to induce the degradation of RNAP II. The observed degradation of

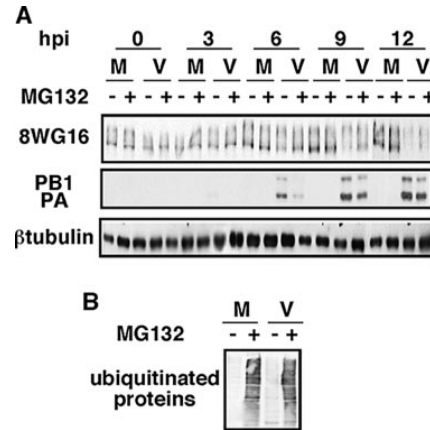


FIG. 5. The proteasome pathway is not involved in the degradation of hypophosphorylated RNAP II. (A) HEK293T cells were mock infected (M) or infected with the VIC strain (V), with (+) or without (-) MG132, and at the indicated hpi hypophosphorylated RNAP II (8WG16) and the designated proteins were detected by Western blotting. (B) Western blot using antiubiquitin antibody of mock-infected cells and cells infected at 10 hpi from panel A.

RNAP II could be the result of either an activity of some viral protein or a cellular proteolytic pathway activated by the infection. Ubiquitin-mediated proteasomal degradation comprises the major proteolytic pathway in eukaryotes. To evaluate its contribution to RNAP II degradation, HEK293T cells were infected or not in the presence or absence of the proteasome inhibitor MG132, which was added 1 h before the infection. At different hpi the levels of accumulation of viral proteins and hypophosphorylated RNAP II were analyzed. The results can be seen in Fig. 5A. The progress of the infection, monitored by observing the appearance of PA and PB1 proteins, was somewhat delayed in the treated cells. In these conditions, almost total degradation of hypophosphorylated RNAP II was observed at 12 hpi, whereas in nontreated cells this effect was observed at 9 hpi. As a control for the effectiveness of the drug, the extracts were probed with antibodies specific for ubiquitin, and an important accumulation of ubiquitinated proteins was observed in the treated cells (Fig. 5B). These results indicate that the proteasome pathway could play some role in influenza virus infection, but it is not responsible for the RNAP II degradation produced by the infection.

Next, we analyzed the contribution of viral proteins to specific RNAP II degradation. We have previously found that the individual expression of the PA subunit causes its own degradation and that of coexpressed proteins and that the 247 N-terminal amino acids are responsible for this activity (50, 52). The use of protease inhibitors, including those of the proteasome pathway, does not inhibit proteolytic activity (data not shown). Similar to RNAP II degradation upon influenza virus infection, no specific cleavage products of the proteins coexpressed with PA can be observed as a result of its proteolytic activity. The mutation of threonine 157 to alanine in the PA molecule (T157A) diminishes the proteolytic activity (43). Taking these data and the reported association of the viral polymerase with RNAP II into account (19), we explored the pos-

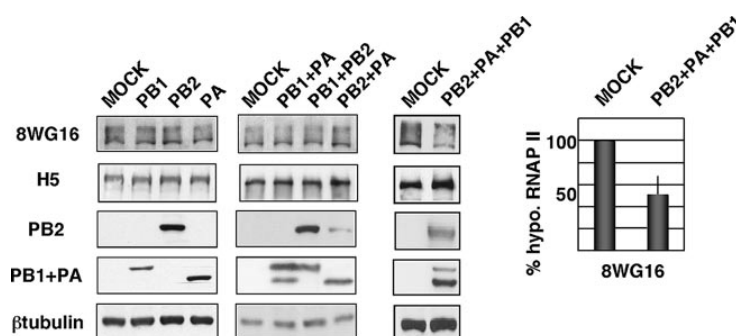


FIG. 6. Reconstituted viral polymerase degrades hypophosphorylated RNAP II. HEK293T cells were transfected with plasmids expressing PA, PB1, or PB2 individually (left), with combinations of two of them (middle), or with plasmids expressing PA, PB1, and PB2 together (right), and at 16 h posttransfection the amounts of hypophosphorylated RNAP II (8WG16), hyperphosphorylated RNAP II (H5), and the indicated proteins were detected by Western blotting. Quantitation of RNAP II degradation under conditions of polymerase reconstitution is shown at the right (means and standard deviations).

sibility that the components of the influenza virus polymerase could produce the degradation of hypophosphorylated RNAP II. HEK293T cells were transfected with plasmids expressing PB1, PB2, or PA or combinations of two plasmids expressing these subunits. After 16 hours of transfection, the amounts of hypophosphorylated and hyperphosphorylated RNAP II were analyzed by Western blotting. The results obtained indicated that neither the individual expression of polymerase subunits nor expression of combinations of two of them induced degradation of hypophosphorylated RNAP II (Fig. 6, left and middle panels). Subsequently, we assayed if the polymerase complex could produce the effect, and hence HEK293T cells were cotransfected with plasmids expressing the three polymerase subunits and processed as above. As can be seen in Fig. 6, *in vivo*-reconstituted influenza virus polymerase was able to degrade hypophosphorylated RNAP II, whereas hyperphosphorylated RNAP II remained unchanged. These transfection experiments were performed three times with similar results, and the quantitation (mean and standard deviation) of RNAP II degradation upon coexpression of the three subunits is shown at the right of Fig. 6. The decrease of hypophosphorylated RNAP II levels due to the expression of the polymerase was smaller than that observed in influenza virus-infected cells. These results are in agreement with the requirement for coexpression of the three subunits in the same cell. In this context, it should be pointed out that, by performing transfection experiments of HEK293T cells with plasmids expressing PA, PB1, and PB2, we have estimated that the percentage of cells coexpressing the three subunits should be between 30 and 60% (data not shown). Consequently the RNAP II coming from cells that do not express the three polymerase subunits will not be degraded and will mask the degradation that takes place in cotransfected cells. Nevertheless, it is also possible that other unidentified viral or virus-induced proteins could be important for this process.

A recombinant influenza virus encoding a PA mutant defective in proteolysis has a delay in RNAP II degradation. To analyze if the proteolytic activity of PA could be responsible for the observed degradation, HEK293T cells were infected with recombinant viruses containing a wild-type or a T157A

PA mutant gene. The virus with the mutant gene contains a less proteolytic PA protein and does not show changes in virally induced cellular protein translation shutoff (29). At different hpi, samples were taken and the levels of hypophosphorylated RNAP II were analyzed. The results in Fig. 7 show that the recombinant virus containing a wild-type PA produced degradation of the hypophosphorylated RNAP II with the same kinetics as that observed with the VIC strain. In contrast, infection with the recombinant virus that expresses the PA protein with a decreased proteolytic activity led to a delayed degradation of hypophosphorylated RNAP II, although at later times postinfection similar degradation was attained. This experiment has been performed three times, and, although there were small variations in the time of the initiation of

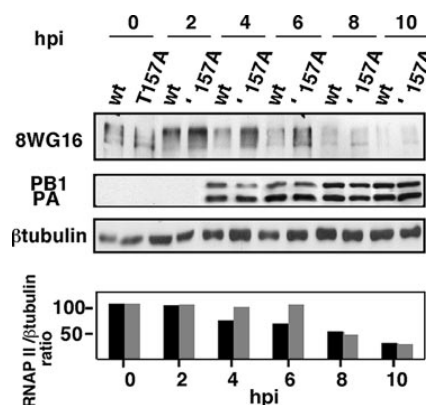


FIG. 7. The PA subunit is involved in hypophosphorylated RNAP II degradation. HEK293T cells were infected with rescued recombinant viruses containing wild-type PA (wt) or T157A mutated PA (T157A), and at different hpi hypophosphorylated RNAP II (8WG16) and the indicated proteins were detected by Western blot assays. (Bottom) Quantitation of hypophosphorylated RNAP II levels during the infection. The ratios of RNAP II/β-tubulin accumulation are shown. Black bars, wt PA; gray bars, PA T157A. Three different experiments were carried out, and a representative experiment is shown.

degradation, it produced the same pattern on all three occasions. To quantitate this effect, the RNAP II and β -tubulin signals obtained in the Western blots were quantitated by densitometry of autoradiographs, and the obtained RNAP II/ β -tubulin ratios from a representative experiment are shown in the bottom part of Fig. 7. Previous results have shown that the recombinant virus containing PA T157A has a delayed transport of PA to the nucleus. While the PA subunit is localized in the nucleus at 4 hpi in the wild-type virus, the PA T157A of the recombinant virus goes to the nucleus at 6 hpi (29). The mutant virus also has a weak reduction in virus growth and a decrease in virus RNA replication (29). Thus, the observed delayed RNAP II degradation could be the consequence of any of these phenotypic alterations or a particular combination of some of them. Nevertheless, Fig. 7 shows that, for example, at 6 hpi, although the levels of PA and PB1 protein accumulation in wild-type and mutant virus-infected cells are similar, there are clearly higher remaining levels of RNAP II in cells infected with the PA T157A virus. These results indicate that the PA protein is directly or indirectly involved in the degradation process and suggest that the proteolytic activity of PA within the viral polymerase complex could contribute to the degradation of the hypophosphorylated RNAP II that occurs during the infection.

DISCUSSION

Virus-induced modulation of RNAP II. Some viruses target RNAP II, either increasing or decreasing the degree of phosphorylation of its CTD. HSV-1 is among those whose infection produces loss of serine 2 phosphorylation (14, 21). HSV-1 utilizes the host RNAP II to transcribe its approximately 80 genes in a coordinately regulated cascade. It has been hypothesized that HSV-1 genes, which are short and not configured in standard nucleosomes, may not be subject to transcriptional pausing caused by inherent signals in the gene and/or the action of negative transcription elongation factors. Thus, they may not need Ser-2 phosphorylation of the CTD (21). Bunyamwera virus also prevents CTD phosphorylation at serine 2 (56), suggesting a block in transition from initiation to elongation during infection. Similar to transcription of influenza virus, transcription of bunyaviruses is dependent on host cell mRNAs, since it depends on a cap-snatching mechanism. As the infection should inhibit cellular transcription, it has been postulated that RNAP II activity is dispensable for bunyaviruses and that the pool of cytoplasmic mRNAs would be sufficient to support the viral transcription that takes place in the cytoplasm of the infected cells.

Influenza virus polymerase binds RNAP II both in its hypophosphorylated and serine 5-hyperphosphorylated forms. As the latter is engaged in transcription initiation, this binding could be a manner of placing the viral polymerase close to the sites of generation of the 5'-capped pre-mRNAs. This association might be mediated by the PA-binding protein hCLE, which acts as an RNAP II transcription factor and binds to the hypo- and hyperphosphorylated RNAP II forms (44). Synthesis of mRNAs decreases upon influenza virus infection concomitantly with degradation of hypophosphorylated RNAP II (Fig. 3A and B). The inhibition of RNAP II activity that produces the disappearance of its hypophosphorylated form could

be the consequence of a decreased recycling of the hypophosphorylated and hyperphosphorylated forms or the result of an uncharacterized mechanism. Nevertheless, the inhibition should affect specially the transcriptional elongation activity, because in this situation there is active synthesis of viral mRNAs, which depends on 5'-capped oligonucleotides (Fig. 4), indicating that cellular transcription initiation persists. These results are in agreement with recent reports showing that during influenza virus infection there is a decreased association of RNAP II with the coding regions, whereas no variations are found in the RNAP II associated with the promoter regions (10). Both treatment with α -amanitin and influenza virus infection cause degradation of hypophosphorylated RNAP II. Nevertheless, in α -amanitin-treated and infected cells, if the drug is added from 3.5 hpi, the accumulation of viral proteins occurs normally (Fig. 3C). Similarly, viral mRNA levels increase from 3 to 4 hpi despite the degradation of hypophosphorylated RNAP II (Fig. 4). These results suggest that upon infection there are cellular transcription complexes that would be inaccessible to the drug and active for initiation reactions, in spite of the fact that hypophosphorylated RNAP II recycling should be impaired due to its degradation. This effect could represent a strategy to allow the generation of 5'-capped oligonucleotides, avoiding the competition of the RNAP II engaged in mRNA elongation. It should produce cellular transcriptional inhibition and might represent an additional contribution to the general shutoff produced by the infection.

The PA polymerase subunit could be involved in the degradation of cellular RNAP II. Different viruses use degradation pathways to impair cellular transcription. Thus, HSV-1 ICP27 protein (14) and poliovirus 3C^{pro} protein (3) are involved in RNAP II Ser-2 and TATA binding protein degradation, respectively. In the case of influenza virus infection the viral polymerase induces the degradation of hypophosphorylated RNAP II (Fig. 6). This is the first case of a viral polymerase that targets cellular RNAP II. Within the polymerase complex, the PA subunit could play a role in this process, as suggested by the delayed effect on RNAP II degradation produced by the mutation of threonine 157 of this subunit (Fig. 7). This residue reduces the proteolytic activity of individually expressed PA and is phosphorylated *in vivo* (43). Although a cellular proteolytic pathway induced by the expression of the viral polymerase could be involved in hypophosphorylated RNAP II degradation, several facts directly implicate the viral polymerase. (i) Proteasome inhibitors delay but do not impede RNAP II degradation. This holdup could be the consequence of the delayed viral protein accumulation observed in this situation (Fig. 5A). (ii) Individually expressed PA has proteolytic activity modulated by threonine 157 (52), which is not sensitive to protease inhibitors (data not shown). (iii) PA also has a weak serine protease activity *in vitro*, which resides on the C-terminal part of the molecule (25). Neither the individually expressed polymerase subunits nor the different dimers associate with RNAP II, whereas the trimeric complex possesses this capacity (19). As PA protease activity does not show specificity when individually expressed, it is possible that its association with the polymerase complex could confer the required specificity, rendering hypophosphorylated RNAP II the physiological target for PA proteolytic activity.

Previous reports have shown that PA protease activity appears to be a general characteristic because both human (VIC and PR8) and avian (FPV, MAL, and HK) strains show this phenotype (40). We have previously shown that in vivo-reconstituted RNPs or recombinant influenza viruses containing PA T157A have defects in RNA replication whereas viral transcription remains unaffected (29, 43). The recombinant virus containing PA T157A also has a reduced pathogenicity in mice, indicating that PA proteolytic activity is important for both viral RNA replication and attenuation. Now we provide data suggesting that the PA T157 residue could also be involved in the degradation of RNAP II. Thus, it is possible that degradation of hypophosphorylated RNAP II is important to allow efficient viral RNA replication. Alternatively, the observed RNAP II degradation could be the consequence of viral RNA replication and the impairment shown by PA T157A recombinant virus the result of a defective viral RNA replication process.

Finally, influenza virus and some other viruses whose expression depends on RNAP II inhibit its activity, either by degradation (influenza virus [this report], HSV-1 [14], and La Crosse virus [48]) or by dephosphorylation of its CTD (Bunyamwera virus [56]). These puzzling viral activities could have been selected to avoid the competition of cellular transcription once it is no longer required and would contribute to the overall pathogenesis exerted by the different viruses.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to J. Ortín, U. Garairgorta, and T. Lutz for critical reviews of the manuscript. The technical assistance of Y. Fernández and N. Zamarreño is gratefully acknowledged.

A. Rodríguez was a fellow from Programa Nacional de Formación de Personal Universitario and A. Pérez-González from the Fondo de Investigaciones Sanitarias. This work was supported by Programa Sectorial de Promoción General del Conocimiento (grant BFU2005-02834).

REFERENCES

- Aragón, T., S. de la Luna, I. Novoa, L. Carrasco, J. Ortín, and A. Nieto. 2000. Eukaryotic translation initiation factor 4G1 is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol. Cell. Biol.* **20**:6259–6268.
- Arrese, M., and A. Portela. 1996. Serine 3 is critical for phosphorylation at the N-terminal end of the nucleoprotein of influenza virus A/Victoria/3/75. *J. Virol.* **70**:3385–3391.
- Banerjee, R., M. K. Weidman, A. Echeverri, P. Kundu, and A. Dasgupta. 2004. Regulation of poliovirus 3C protease by the 2C polypeptide. *J. Virol.* **78**:9243–9256.
- Bárcena, J., D. I. L. S., M. Ochoa, J. A. Melero, A. Nieto, J. Ortín, and A. Portela. 1994. Monoclonal antibodies against the influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. *J. Virol.* **68**:6900–6909.
- Bark-Jones, S. J., H. M. Webb, and M. J. West. 2006. EBV EBNA 2 stimulates CDK9-dependent transcription and RNA polymerase II phosphorylation on serine 5. *Oncogene* **25**:1775–1785.
- Bensaude, O., F. Bonnet, C. Cassé, M.-F. Dubois, V.-T. Nguyen, and B. Palancaud. 1999. Regulated phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Biochem. Cell Biol.* **77**:1–7.
- Biswas, S. K., and D. P. Nayak. 1994. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J. Virol.* **68**:1819–1826.
- Blaas, D., E. Patzelt, and E. Keuchler. 1982. Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucleic Acids Res.* **10**:4803–4812.
- Bouloy, M., S. J. Plotch, and R. M. Krug. 1978. Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:4886–4890.
- Chan, A. Y., F. T. Vreede, M. Smith, O. G. Engelhardt, and E. Fodor. 2006. Influenza virus inhibits RNA polymerase II elongation. *Virology* **351**:210–217.
- Clemens, M. J., M. Bushell, and S. J. Morley. 1998. Degradation of eukaryotic polypeptide chain initiation factor (eIF) 4G in response to induction of apoptosis in human lymphoma cell lines. *Oncogene* **17**:2921–2931.
- Corden, J. L., J. M. Cadena, J. M. Ahearn, and M. E. Dahmus. 1985. A unique structure at the carboxy terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:7934–7938.
- Cujec, T. P., H. Okamoto, K. Fujinaga, J. Meyer, H. Chamberlin, D. O. Morgan, and B. M. Peterlin. 1997. The HIV transactivator TAT binds to the CDK-activating kinase and activates the phosphorylation of the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev.* **11**:2645–2657.
- Dai-Ju, J. Q., L. Li, L. A. Johnson, and R. M. Sandri-Goldin. 2006. ICP27 interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II and facilitates its recruitment to herpes simplex virus 1 transcription sites, where it undergoes proteasomal degradation during infection. *J. Virol.* **80**:3567–3581.
- de la Luna, S., J. Martín, A. Portela, and J. Ortín. 1993. Influenza virus naked RNA can be expressed upon transfection into cells co-expressing the three subunits of the polymerase and the nucleoprotein from SV40 recombinant viruses. *J. Gen. Virol.* **74**:535–539.
- Dejten, B. M., C. St. Angelo, M. G. Katze, and R. M. Krug. 1987. The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in the form of a complex. *J. Virol.* **61**:16–22.
- Durand, L. O., S. J. Advani, A. P. Poon, and B. Roizman. 2005. The carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II is phosphorylated by a complex containing cdk9 and infected-cell protein 22 of herpes simplex virus 1. *J. Virol.* **79**:6757–6762.
- Elton, D., P. Digard, L. Tiley, and J. Ortín. 2005. Structure and function of the influenza virus RNP. In Y. Kawaoka (ed.), *Contemporary topics in influenza virology*. Horizon Scientific Press, Norfolk, VA.
- Engelhardt, O. G., M. Smith, and E. Fodor. 2005. Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J. Virol.* **79**:5812–5818.
- Falcón, A., R. Marión, T. Zürcher, P. Gomez, A. Portela, A. Nieto, and J. Ortín. 2004. Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein. *J. Virol.* **78**:3880–3888.
- Fraser, K. A., and S. A. Rice. 2005. Herpes simplex virus type 1 infection leads to loss of serine-2 phosphorylation on the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Virol.* **79**:11323–11334.
- Garfinkel, M. S., and M. G. Katze. 1993. Translational control by influenza virus. Selective translation is mediated by sequences within the viral mRNA 5'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* **268**:22223–22226.
- Gastaminza, P., B. Perales, A. M. Falcón, and J. Ortín. 2003. Mutations in the N-terminal region of influenza virus PB2 protein affect virus RNA replication but not transcription. *J. Virol.* **77**:5098–5108.
- Gonzalez, S., and J. Ortín. 1999. Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *EMBO J.* **18**:3767–3775.
- Hara, K., M. Shiota, H. Kido, Y. Ohtsu, T. Kashiwagi, J. Iwahashi, N. Hamada, K. Mizoue, N. Tsumura, H. Kato, and T. Toyoda. 2001. Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site. *Genes Cells* **6**:87–97.
- Honda, A., J. Mukaigawa, A. Yokoyama, A. Kato, S. Ueda, K. Nagata, M. Krystal, D. P. Nayak, and A. Ishihama. 1990. Purification and molecular structure of RNA polymerase from influenza virus A/PR8. *J. Biochem. (Tokyo)* **107**:624–628.
- Horisberger, M. A. 1980. The large P proteins of influenza A viruses are composed of one acidic and two basic polypeptides. *Virology* **107**:302–305.
- Huang, T. S., P. Palese, and M. Krystal. 1990. Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J. Virol.* **64**:5669–5673.
- Huarte, M., A. Falcón, Y. Nakaya, J. Ortín, A. García-Sastre, and A. Nieto. 2003. Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses. *J. Virol.* **77**:6007–6013.
- Huarte, M., J. J. Sanz-Ezquerro, F. Roncal, J. Ortín, and A. Nieto. 2001. PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J. Virol.* **75**:8597–8604.
- Isel, C., and J. Karn. 1999. Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation. *J. Mol. Biol.* **290**:929–941.
- Jones, J. C., H. P. Phatmani, T. A. Haystead, J. A. MacDonald, S. M. Alam, and A. L. Greenleaf. 2004. C-terminal repeat domain kinase I phosphorylates Ser2 and Ser5 of RNA polymerase II C-terminal domain repeats. *J. Biol. Chem.* **279**:24957–24964.
- Kimura, N., M. Mishida, K. Nagata, A. Ishihama, K. Oda, and S. Nakada. 1992. Transcription of a recombinant influenza virus RNA in cells that can express the influenza virus RNA polymerase and nucleoprotein genes. *J. Gen. Virol.* **73**:1321–1328.
- Lamb, R. A., and P. W. Choppin. 1977. Synthesis of influenza virus polypeptides in cells resistant to alpha-amanitin: evidence for the involvement of cellular RNA polymerase II in virus replication. *J. Virol.* **23**:816–819.
- Li, M. L., P. Rao, and R. M. Krug. 2001. The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *EMBO J.* **20**:2078–2086.

36. Mahy, B. W., N. D. Hastie, and S. J. Armstrong. 1972. Inhibition of influenza virus replication by α -amanitin: mode of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**:1421–1424.
37. Mahy, B. W. J. 1983. Mutants of influenza virus, p. 192–253. *In* P. Palese and D. W. Kingsbury (ed.), *Genetics of influenza viruses*. Springer Verlag, Wien, Austria.
38. Mark, G. E., J. M. Taylor, B. Broni, and R. M. Krug. 1979. Nuclear accumulation of influenza viral RNA transcripts and the effects of cycloheximide, actinomycin D and α -amanitin. *J. Virol.* **29**:744–752.
39. Morley, S. J., P. S. Curtis, and V. M. Pain. 1997. eIF4G: translation's mystery factor begins to yield its secrets. *RNA* **3**:1085–1104.
40. Naffakh, N., P. Massin, and S. van der Werf. 2001. The transcription/replication activity of the polymerase of influenza A viruses is not correlated with the level of proteolysis induced by the PA subunit. *Virology* **285**:244–252.
41. Nguyen, V. T., F. Giannoni, M. F. Dubois, S. J. Seo, M. Vigneron, C. Kedinger, and O. Bensaude. 1996. In vivo degradation of RNA polymerase II largest subunit triggered by alpha-amanitin. *Nucleic Acids Res.* **24**:2924–2929.
42. Palancade, B., and O. Bensaude. 2003. Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* **270**:3859–3870.
43. Perales, B., J. J. Sanz-Ezquerro, P. Gastaminza, J. Ortega, J. Fernandez-Santarén, J. Ortín, and A. Nieto. 2000. The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis. *J. Virol.* **74**:1307–1312.
44. Pérez-Gonzalez, A., A. Rodríguez, M. Huarte, I. J. Salanueva, and A. Nieto. 2006. hCLE/CGI-99, a human protein that interacts with the influenza virus polymerase, is a mRNA transcription modulator. *J. Mol. Biol.* **362**:887–900.
45. Plotch, S. J., M. Bouloy, I. Ulmanen, and R. M. Krug. 1981. A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* **23**:847–858.
46. Poch, O., I. Sauvaget, M. Delarue, and N. Tordo. 1990. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerases encoding elements. *EMBO J.* **8**:3867–3874.
47. Price, D. H. 2000. P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* **20**:2629–2634.
48. Ruf, M., G. Blakqori, V. Wagner, and F. Weber. 2006. The interferon antagonist NSs of orthobunyaviruses targets the phosphorylated form of RNA polymerase II in a proteasome-dependent manner, p. 150. *Abstr. XIII Int. Conf. Negative Strand Viruses*.
49. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
50. Sanz-Ezquerro, J. J., S. de la Luna, J. Ortín, and A. Nieto. 1995. Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *J. Virol.* **69**:2420–2426.
51. Sanz-Ezquerro, J. J., J. Fernández-Santarén, T. Sierra, T. Aragón, J. Ortega, J. Ortín, G. L. Smith, and A. Nieto. 1998. The PA influenza virus polymerase subunit is a phosphorylated protein. *J. Gen. Virol.* **79**:471–478.
52. Sanz-Ezquerro, J. J., T. Zürcher, S. de la Luna, J. Ortín, and A. Nieto. 1996. The amino-terminal one-third of the influenza virus PA protein is responsible for the induction of proteolysis. *J. Virol.* **70**:1905–1911.
53. Scholtissek, C., and R. Rott. 1970. Synthesis in vivo of influenza plus and minus strand RNA and its preferential inhibition by antibiotics. *Virology* **40**:989–996.
54. Svejstrup, J. Q., P. Vichi, and J.-M. Egly. 1996. The multiple roles of transcription/repair factor TFIIH. *Trends Biochem. Sci.* **21**:346–350.
55. Tamrakar, S., A. J. Kapasi, and D. H. Spector. 2005. Human cytomegalovirus infection induces specific hyperphosphorylation of the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II that is associated with changes in the abundance, activity, and localization of cdk9 and cdk7. *J. Virol.* **79**:15477–15493.
56. Thomas, D., G. Blakqori, V. Wagner, M. Banholzer, N. Kessler, R. M. Elliott, O. Haller, and F. Weber. 2004. Inhibition of RNA polymerase II phosphorylation by a viral interferon antagonist. *J. Biol. Chem.* **279**:31471–31477.
57. Ulmanen, I., B. A. Broni, and R. M. Krug. 1981. Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:7355–7359.
58. Wigler, M., A. Pellicer, S. Silverstein, R. Axel, G. Urlaub, and L. Chasin. 1979. DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:1373–1376.
59. Zhou, M., M. A. Halanski, M. F. Radonovich, F. Kashanchi, J. Peng, D. H. Price, and J. N. Brady. 2000. Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol. Cell. Biol.* **20**:5077–5086.

