

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biología Molecular**

**IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA NS1 DEL VIRUS DE  
LA GRIPE EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN  
GÉNICA Y EN LA MORFOGÉNESIS VIRAL**

Memoria presentada por **Urtzi Garaigorta  
de Dios** para optar al grado de Doctor en  
Ciencias.

Abril, 2007

Esta Tesis ha sido realizada en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la dirección del **Dr. Juan Ortín Montón.**

**El desarrollo de esta Tesis ha sido posible gracias a una beca del Plan de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Ciencia y Tecnología.**

## SUMMARY

The genome of influenza A virus consists of a set of eight single stranded RNA molecules of negative polarity. These RNAs encode 11 viral different proteins. Their replication and transcription take place in the nucleus of infected cells using viral ribonucleoprotein complexes (RNPs) as templates. Two of the viral primary transcripts, can be spliced and lead to the expression of two alternative protein products (M1 and M2 from RNP 7; NS1 and NEP from RNP 8). NS1 is a non structural protein that is located in the nucleus at early times post infection and it is also present in the cytoplasm, associated to polysomes, at late times. It is an RNA binding protein that functions as an antagonist of interferon induction during the infection. A number of previous studies have suggested that NS1 is an important viral factor that regulates the viral and cellular gene expression. NS1 is implicated in the mRNA splicing and nucleocytoplasmic transport as well as the stimulation of viral mRNA translation. All of these functions are the result of the interactions of NS1 not only with viral but also with cellular RNAs and proteins.

To study the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of viral transcripts we set up a transient *in vivo* system, in which RNP 8 is replicated and transcribed by the activity of recombinant RNA and proteins. The encoded NS1 protein inhibits the splicing of its collinear transcript. This regulation is mediated by the N-terminal region of the protein but does not involve its RNA-binding activity. We also show that NS1 protein preferentially blocks the nucleo-cytoplasmic transport of the collinear RNP 8 transcript in an RNA-binding dependent manner.

To study the NS1 functions during viral infection the phenotype of an influenza recombinant virus (11C) with point mutations in NS1 protein was analyzed. Mutant 11C contained 3 mutations that led to amino acid exchanges, V18A, R44K and S195P. This virus is a temperature sensitive so the experiments had been made at both permissive (32° C) and restrictive (39° C) temperatures. The transcription, replication, viral gene expression and viral particle formation was analyzed. These studies have shown that the function affected in 11C mutant is required late in the infection and suggest a role for NS1 protein in a late event in virus morphogenesis.

*Índice*

---



---

<b>ÍNDICE</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
<b>1. EL VIRUS DE LA GRIPE.</b>	<b>17</b>
1.1. Historia.	17
1.2. Clasificación y nomenclatura.	17
1.3. La partícula viral.	19
1.3.1. El genoma y los RNAs virales presentes en la célula infectada.	19
1.3.2. Las proteínas virales.	20
<b>2. EL CICLO DE INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE.</b>	<b>22</b>
2.1. La entrada y desensamblaje viral.	22
2.2. Los procesos de transcripción y replicación del RNA viral.	23
2.3. Proceso de maduración de los pre-mRNA virales.	25
2.3.1. Procesos de maduración de pre-mRNAs celulares.	25
2.3.2. Proceso de <i>splicing</i> viral.	28
2.3.3. Proceso de poliadenilación de los mRNAs virales.	29
2.4. Transporte de los RNA mensajeros virales y su traducción citoplasmática.	29
2.5. Transporte de las RNPs al citoplasma, formación y liberación de nuevas partículas virales.	30
<b>3. LA PROTEÍNA NS1.</b>	<b>31</b>
3.1. Estructura y dominios de la proteína NS1.	31
3.2. NS1 como modulador de la expresión génica.	33
3.2.1. Funciones nucleares.	34
3.2.2. Funciones citosólicas.	38
3.3. NS1: un factor de virulencia clave durante la infección.	41
3.3.1. NS1 como antagonista del sistema interferón.	41
3.3.2. NS1 inhibe la activación de PKR.	44
3.3.3. NS1 inhibe la activación de la vía 2'-5' OAS/RNasaL.	45
3.3.4. NS1 interacciona con distintas vías de señalización.	46
<b>OBJETIVOS</b>	<b>47</b>

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>51</b>
<b>MATERIALES BIOLÓGICOS.</b>	<b>53</b>
1. Líneas celulares eucariotas.	53
2. Estirpes bacterianas.	53
3. Virus.	53
4. Plásmidos.	53
5. Anticuerpos.	54
<b>MÉTODOS.</b>	<b>55</b>
1. Manipulación de DNA y clonajes.	55
1.1. Construcción de los plásmidos mutantes de la serie pHHNS.	55
1.1.1. Plásmido pHHdelNS1.	55
1.1.2. Plásmido pHHVicNS R38A/K41A.	56
1.1.3. Plásmidos pHHVicNS V18A/R44K y pHHVicNS S195P.	56
1.2. Construcción de los plásmidos de la serie pGEM.	57
2. Cultivos celulares.	57
2.1. Mantenimiento de cultivos celulares.	57
2.2. Infecciones.	57
2.3. Transfecciones y reconstituciones de RNPs.	58
2.4. Fraccionamiento subcelular núcleo/citosol.	58
3. Técnicas virológicas.	59
3.1. Generación de <i>stocks</i> de trabajo.	59
3.2. Titulación de virus mediante ensayo de placa.	59
3.3. Aislamiento de virus a partir de placa.	59
3.4. Curvas de crecimiento.	60
3.5. Purificación de virus.	60
3.6. Experimentos de cambio de temperatura ( <i>shift up/shift down</i> ).	60
3.7. Rescate de virus recombinantes con mutaciones puntuales.	61
3.8. Microscopia electrónica de células infectadas.	62
3.9. Rescate de título viral mediante el uso de neuraminidasa exógena.	62
3.10. Infecciones mixtas.	63
4. Análisis de RNAs.	63
4.1. Purificación de RNA.	63
4.1.1. Aislamiento de RNA a partir de viriones.	63
4.1.2. Aislamiento de RNA total celular.	63



4.1.3. Aislamiento de RNA de fracciones nucleares y citosólicas.	64
4.2. Purificación de RNA mensajero (mRNA) por cromatografía de oligo-dT-celulosa.	64
4.3. Análisis de la estabilidad de mRNAs virales.	64
4.4. Detección y cuantificación del RNA.	65
4.4.1. Hibridación Dot-Blot.	65
4.4.2. Ensayo de protección a ribonucleasas.	66
4.4.3. RT-PCR.	66
5. Análisis de proteínas.	67
5.1. Marcaje metabólico <i>in vivo</i> de proteínas virales.	67
5.2. Deglicosilación de proteínas presentes en extractos celulares.	67
5.3. Inmunofluorescencia.	67
5.4. <i>Western Blot</i> .	68
5.5. Inmunoprecipitación.	68
6. Preparación de sondas para detección de RNAs.	69
6.1. Sondas de DNA.	69
6.1.1. Preparación del molde 28S.	69
6.1.2. Síntesis de la sonda 28S por PCR asimétrica.	69
6.2. Sondas de RNA.	69
6.2.1.- Molde para las ribosondas de NP, M, NA y marcador de recuperación de la cromatografía oligo-dT-celulosa.	69
6.2.2. Molde para la ribsonda de los ensayos de protección a ribonucleasas.	70
6.2.3. Transcripciones <i>in vitro</i> de las ribosondas.	70
6.2.4. Purificación de las ribosondas.	71
<b>RESULTADOS</b>	<b>73</b>
<b>1. IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA NS1 EN LOS PROCESOS DE MADURACIÓN Y TRANSPORTE DE LOS mRNAs DERIVADOS DE SU PROPIO SEGMENTO.</b>	<b>75</b>
1.1. Utilización del sistema de reconstitución de RNPs para expresar diferentes replicones derivados del segmento NS.	75
1.1.1. Análisis de la síntesis de las proteínas NS1 y NEP a partir de los distintos replicones.	76
1.1.2. Análisis de la acumulación y localización de las distintas formas de NS1.	78
1.2. Estudio de la estabilidad de los mRNAs del segmento NS.	80

- 1.3. Estudio de la implicación de la proteína NS1 en el *splicing* de su propio transcrito. 81
- 1.4. Estudio de la implicación de la proteína NS1 en el transporte núcleo-citosol de los mRNAs de NS1 y NEP. 84

**2. ANÁLISIS GENOTÍPICO Y FENOTÍPICO DE UN VIRUS TERMOSENSIBLE (11C) CON MUTACIONES PUNTUALES EN LA PROTEÍNA NS1. 87**

- 2.1. Implicación de distintas regiones de la proteína NS1 en el fenotipo *ts*. 88
- 2.2. Estudio del crecimiento del mutante 11C en líneas celulares deficientes en el sistema interferón. 90
- 2.3. Análisis de la síntesis y acumulación de proteínas virales 91
- 2.3.1. Estudio de la síntesis de las principales proteínas virales: NP, NS1, M1 y NEP. 91
- 2.3.2. Estudio de la acumulación de las principales proteínas virales: NP, NS1, M1 y M2. 92
- 2.4. Análisis de la localización subcelular de la proteína NS1 mutante. 94
- 2.5. Análisis de la expresión y localización de las glicoproteínas virales de membrana. 95
- 2.5.1. Estudio de la expresión y localización de HA. 95
- 2.5.2. Estudio de la expresión y localización de NA. 97
- 2.6. Análisis de los procesos de replicación y transcripción. 98
- 2.6.1. Estudio de la replicación viral de los segmentos NA, NP y M. 99
- 2.6.2.- Estudio de la transcripción viral de los segmentos NA, NP y M. 100
- 2.6.3. Estudio del transporte núcleo-citosol de los mRNAs de NA y NP. 101
- 2.7. ¿Es una función temprana o tardía la responsable del fenotipo *ts* en el virus mutante 11C? 102
- 2.8. Análisis de la formación de partículas virales progenie. 105
- 2.8.1. Análisis bioquímico de la presencia de partículas virales en el sobrenadante de células infectadas. 105
- 2.8.2. Análisis de la formación de partículas virales mediante microscopía electrónica. 106
- 2.8.3. Experimentos de rescate de título viral por tratamiento con neuraminidasa exógena. 107
- 2.9. ¿Se comporta el virus mutante 11C como dominante negativo? 109

---

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>111</b>
<b>1. LA PROTEÍNA NS1: REGULADOR DE LA EXPRESIÓN GÉNICA CELULAR Y VIRAL DURANTE LA INFECCIÓN.</b>	<b>113</b>
1.1. Regulación de los procesos de transcripción y replicación del RNA viral.	114
1.2. ¿Es NS1 un inhibidor general del <i>splicing</i> ?	115
1.3. ¿Bloquea NS1 el transporte núcleo-citoplásmico de mRNAs celulares y virales?	117
1.4. La proteína NS1 estimula la traducción de mRNAs virales.	122
<b>2. ¿PUEDE NS1 PARTICIPAR DE MANERA ACTIVA EN LA MORFOGÉNESIS VIRAL SIENDO UNA PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL?</b>	<b>123</b>
<b>3. LA PROTEÍNA NS1 ESTÁ IMPLICADA EN LA PATOGÉNESIS Y VIRULENCIA DURANTE LA INFECCIÓN.</b>	<b>128</b>
<b>4. NS1: UN ENIGMA DENTRO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE.</b>	<b>131</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>133</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>137</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>155</b>



## ***Abreviaturas***



A:	Adenosina
aa:	Aminoácido
A.C.:	Antes de Cristo
Ac <sub>2</sub> Mg:	Acetato magnésico
AcNH <sub>4</sub> :	Acetato amónico
AgT-t:	Antígeno T grande/t pequeño
ATCC:	<i>American Type Culture Collection</i>
C:	Citosina
cDNA:	DNA complementario
CPSF:	<i>Cleavage and polyadenylation specificity factor</i>
cRNA:	RNA complementario
cRNP:	RNP complementaria
CTD:	<i>Carboxy terminal domain</i>
Ctrl.:	Control
Cys:	Cisteína
DE:	Dominio Efector
DEPC:	Dietil pirocarbonato
Desv. Std:	Desviación Estándar
DMEM:	<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
DNA:	Ácido desoxiribonucleico
DNAss:	DNA de esperma de salmón
DNasa:	Desoxiribonucleasa
dsRNA:	RNA de doble cadena
C-terminal:	Carboxilo terminal
DTT:	DL-Ditiotreitol
ESE:	<i>Exonic Splicing Enhancers</i>
G:	Guanosina
h:	Hora
HA:	Hemaglutinina
His:	Histidinas
hnRNP:	<i>Heterogeneous Nuclear RNP</i>
hpi:	Horas post-infección
HPRI:	Inhibidor de RNAsa de placenta humana
hpt:	Horas post-transfección

## Abreviaturas 12

---

IgG:	Inmunoglobulina G
IF:	Inmunofluorescencia
IFN:	Interferón
IP:	Inmunoprecipitación
ISG:	<i>Interferon Stimulated Gene</i>
KDa:	Kilodaltón
log:	Logaritmo
M:	Molar
mdi:	Multiplicidad de infección
Met:	Metionina
MgCl <sub>2</sub> :	Cloruro magnésico
min:	Minuto
mRNA:	RNA mensajero
mU:	Miliunidad
NA:	Neuraminidasa
NEP:	<i>Nuclear export protein</i>
NES:	Señal de exportación nuclear
NLS:	Señal de localización nuclear
NP:	Nucleoproteína
NS:	<i>Non Structural</i>
nt:	Nucleótido
N-terminal:	Amino terminal
OA:	Oligo Adenilato
OAS:	Oligo (A) Sintetasa
ORF:	<i>Open Reading Frame</i> o Fase de lectura abierta
PABPI y II:	Proteína de unión a Poly (A) I y II
PAP:	Poli (A) polimerasa
pb:	Pares de bases
pe.:	Por ejemplo
PBS:	Tampón fosfato salino
PBSc:	PBS completo
PCR:	Reacción en cadena de polimerasa
PKR:	Proteína kinasa R
PM:	Peso Molecular



---

PML NB:	<i>PML Nuclear Body</i>
PolIII:	Polimerasa II celular
pre-mRNA:	Precursor de RNA mensajero
RBD:	Dominio de unión a RNA
RISC:	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
RNA:	Ácido ribonucleico
RNasa:	Ribonucleasa
RNP:	Ribonucleoproteína
rpm:	Revoluciones por minuto
rRNA:	RNA ribosomal
RT-PCR:	Retrotranscripción y reacción en cadena de polimerasa
SAB:	Seroalbúmina
SdS:	Dodecil sulfato sódico
SFB:	Suero fetal bovino
siRNA:	RNA pequeño interferente
snRNA:	<i>Small Nuclear RNA</i>
snRNP:	<i>Small Nuclear Ribonucleoprotein</i>
<i>splicing</i> :	Procesamiento de RNAs mensajeros
ss:	Señal de <i>splicing</i>
ssRNA:	RNA de cadena sencilla
SV40:	Virus 40 del simio
T:	Timidina
TA:	Temperatura ambiente
<i>ts</i> :	Termosensible
U:	Uridina
UFP:	Unidades formadoras de placa
UTR:	Región no traducida
Vic:	Cepa A/Victoria/3/75
VRC:	Complejos de vanadil ribonucleósido
vRNA:	RNA genómico viral
vRNP:	RNP viral
WB:	<i>Western blot</i>
WSN:	Cepa A/WSN/33
wt:	Tipo silvestre



## ***Introducción***

---



## 1. ELVIRUS DE LA GRIPE.

### 1.1. Historia.

La gripe es una enfermedad respiratoria aguda, altamente contagiosa, que parece haber afectado al ser humano desde tiempos inmemorables. No resulta difícil encontrar en documentos históricos anotaciones de la aparición repentina de enfermedades respiratorias que persisten durante unas pocas semanas y desaparecen con la misma rapidez con la que aparecieron. Así, una de las primeras citas de una posible epidemia gripal fue realizada por Hipócrates en el año 412 A.C. Posteriormente ha habido numerosos episodios de gripe en la Edad Media, y por supuesto en la época moderna.

Si bien la gripe ha causado millones de muertos a lo largo de los siglos, la pandemia de 1918 (La Gripe Española) fue una de las más graves. Se calcula que murieron entre 20 y 40 millones de personas en todo el mundo. Esta gran mortalidad aceleró las investigaciones con el objetivo de identificar el agente causal de la enfermedad. A comienzos de los años 30, Richard E. Shope sugirió que el agente causal de la gripe debía ser un virus ya que podía transmitirse a través de filtros (Shope, 1931). En 1933, Wilson Smith, Sir Christopher Andrewes y Sir Patrick Laidlaw realizaron el primer aislamiento de un virus de la gripe a partir de una persona infectada (Smith, 1933).

Desde aquel primer aislamiento hasta hoy en día, son miles los estudios que se han realizado con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la biología del virus y de obtener un antiviral o vacuna eficaces contra el mismo. Todos estos trabajos han contribuido en mayor o menor medida al conocimiento que se tiene de la enfermedad en sí y de su agente etiológico: el Virus Influenza.

### 1.2. Clasificación y nomenclatura.

El virus de la gripe pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* dentro del grupo V de la clasificación de Baltimore (Baltimore, 1971). Mientras que el nombre de la familia proviene de su capacidad hemaglutinante o de unión a mucus (del griego *myxo*), el nombre del género influenza (en latín *influentia*) significa epidémico y fue utilizado originalmente por relacionar el origen de epidemias con influencias astrológicas.

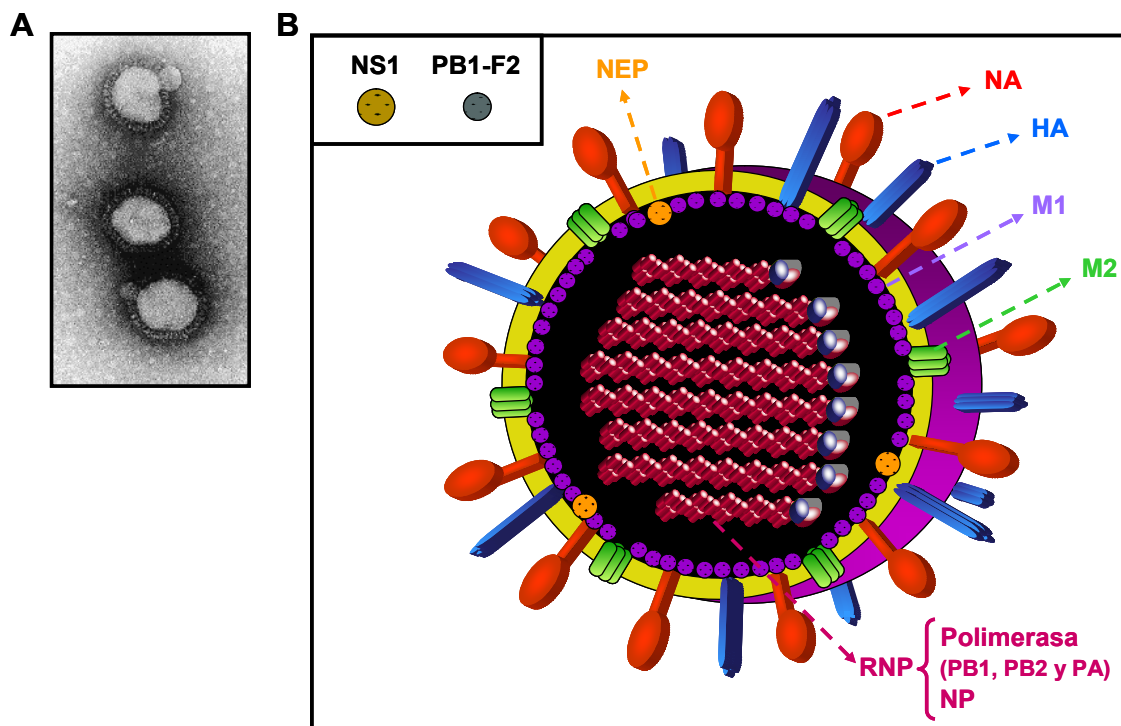
La familia *Orthomyxoviridae* incluye varios géneros: *Influenzavirus A*, que infecta humanos, otros mamíferos y una gran variedad de aves; *influenzavirus B*, que

## Introducción 18

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*, con el virus de la anemia del salmón como principal exponente. Todos los miembros de la familia son virus con envuelta lipídica y presentan un genoma segmentado formado por moléculas de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa.

Los géneros A, B y C se distinguen entre sí por las diferencias antigénicas presentes en las moléculas de nucleoproteína (NP) y en la proteína mayoritaria de la matriz, M1. Además, los *influenzavirus* tipo A se dividen en subtipos basándose en la naturaleza antigénica de las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). En cuanto a su nomenclatura, incluye el hospedador de origen, la localización geográfica del aislado, el número de cepa y el año de aislamiento. La descripción antigénica de la hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) viene dado entre paréntesis, pe: A/Swine/Iowa/15/30 (H1N1). Por convención, cuando el hospedador de origen es el ser humano no se incluye, pe: A/Victoria/3/75 (H3N2).

A lo largo de esta memoria, únicamente se va a hacer referencia a cepas de virus tipo A ya que son las que afectan con mayor gravedad a las personas y constituyen el principal modelo de estudio del laboratorio.



**Figura 1. La partícula viral.** Panel A. Micrografía de viriones purificados obtenida por microscopía electrónica. Panel B. Representación esquematizada de la partícula viral donde se indican las proteínas estructurales del virus. Las proteínas no estructurales se muestran en un recuadro en el lado superior izquierdo del panel.

### 1.3. La partícula viral.

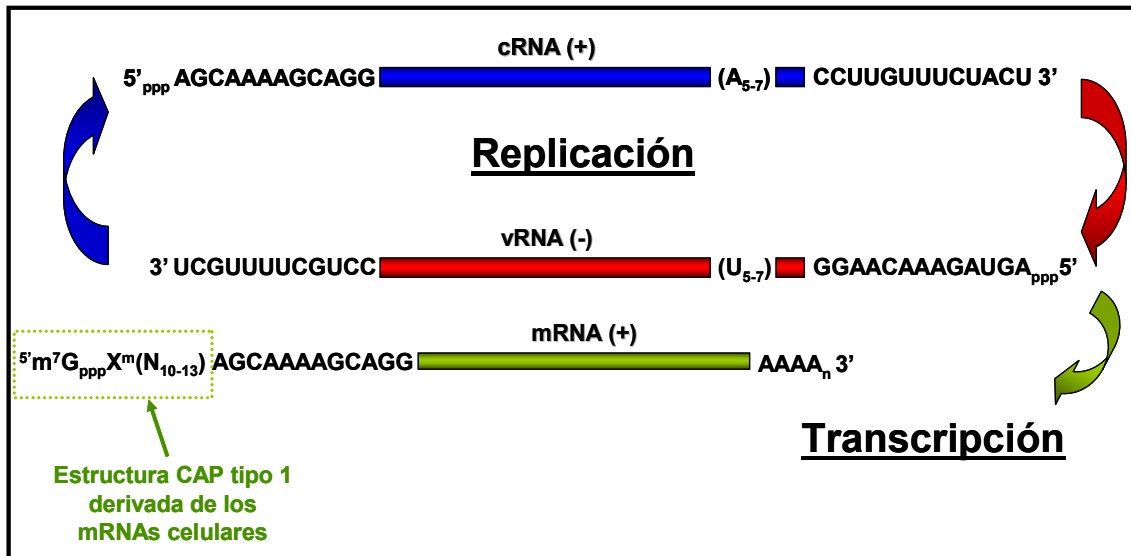
Las partículas del virus de la gripe presentan una morfología pleiomórfica aunque con tendencia a adquirir formas esféricas, ovaladas o filamentosas según la cepa y el tipo de célula hospedadora (Horne et al., 1960; Hoyle et al., 1961). Tienen un diámetro comprendido entre 80 y 120 nm y como ya se ha dicho anteriormente, presentan una envuelta lipídica que deriva de la membrana plasmática de las células infectadas (Compans and Chopin, 1975).

#### 1.3.1. El genoma y los RNAs virales presentes en la célula infectada.

El virus de la gripe A presenta un genoma segmentado formado por 8 moléculas de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa (Inglis et al., 1976). El genoma completo comprende alrededor de 13500 nucleótidos, según la cepa, y codifica un total de 11 proteínas. Cada segmento da lugar a una única proteína excepto los segmentos 2, 7 y 8 que codifican dos proteínas cada uno como se describe más adelante.

Durante la infección por el virus de la gripe se pueden encontrar 3 tipos de RNAs virales distintos, que se generan por la actividad del complejo transcriptasa-replicasa viral (Figura 2):

RNA genómico o viral (vRNA): Es el RNA viral propiamente dicho, por lo tanto de cadena sencilla y polaridad negativa. Es el RNA que se encapsida en forma de ribonucleoproteínas o RNPs durante la formación de la progenie viral. Presenta un extremo 5' trifosfato y un 3'-OH (Young and Content, 1971). Además, contiene secuencias cortas en ambos extremos, de 13 nucleótidos en 5' y 12 en 3', que no sólo están presentes en todos los segmentos sino que se conservan invariables a lo largo de todas las cepas de tipo A (Desselberger et al., 1980), excepto en la posición 4 donde puede haber un cambio de uridina (U) a citosina (C). Debido a que dichas secuencias son parcialmente complementarias e invertidas forman una estructura en mango de sartén o *panhandle* que conforma el promotor para los procesos de transcripción y replicación del RNA viral (Hsu et al., 1987). La polimerasa viral interacciona con el *panhandle*, mientras que el resto del RNA está cubierto por monómeros de nucleoproteína (NP) (Klumpp et al., 1997) formando las ribonucleoproteínas virales o vRNPs (Martín-Benito et al., 2001; Tiley et al., 1994). Cerca del extremo 5' se encuentra la señal de poliadenilación formada por un tramo corto de 5 a 7 U (Luo et al., 1991).



**Figura 2. RNAs virales presentes en la célula infectada.** Se representan los tres tipos de RNAs que se pueden encontrar en las células infectadas por el virus de la gripe: vRNA, cRNA y mRNA. Se muestran los extremos 3' y 5' del vRNA y cRNA que están conservados a lo largo de todos los segmentos, así como la estructura cap tipo I del mRNA viral. Se indican también los procesos de replicación y transcripción.

**RNA complementario (cRNA):** Es un RNA de polaridad positiva con una longitud idéntica al vRNA ya que es complementario a éste. Se genera como consecuencia del proceso de replicación viral en el que participa de forma activa constituyendo el intermediario replicativo necesario para la síntesis de nuevas moléculas de vRNA. Al igual que el vRNA siempre se encuentra en forma de cRNPs, que a diferencia de las vRNPs nunca se exportan fuera del núcleo de la célula (Shapiro et al., 1987).

**RNA mensajero (mRNA):** Al igual que el cRNA, es un RNA de polaridad positiva pero de menor longitud que éste. Se genera como consecuencia del proceso de transcripción viral y nunca se encuentra acompañado con moléculas de NP. En su extremo 5' presenta una estructura cap tipo I que deriva de pre-mRNAs celulares (Krug et al., 1979) y en el extremo 3' una secuencia poly (A) de longitud variable. Estas dos modificaciones hacen que los mRNAs virales sean estructuralmente indistinguibles de los celulares.

### 1.3.2. Las proteínas virales.

Como ya se ha dicho anteriormente, el virus codifica un total de 11 proteínas., de las que 9 son estructurales y 2 no lo son, por lo tanto sólo se encuentran en células infectadas (Figura 1).



En la envuelta lipídica del virión se encuentran ancladas las dos glicoproteínas del virus: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). La HA forma un homotrímero que interacciona con el ácido siálico presente en la membrana celular para permitir la entrada del virus (Weis et al., 1988). Además, gracias a un cambio conformacional en su estructura permite la fusión de la envuelta del virus y la membrana lisosomal. En cuanto a la NA, es un homotetrámero (Colman et al., 1983; Varghese et al., 1983) cuya función es eliminar el ácido siálico presente en las glicoproteínas de la membrana celular, permitiendo así la liberación de los nuevos viriones al espacio extracelular y evitando su agregación. Dentro de los virus tipo A se han descrito 16 subtipos de HA y 9 de NA. La combinación de los distintos subtipos determina la gran variabilidad presente dentro de los virus tipo A, y afecta también el rango de hospedador, así como la patogenicidad y virulencia de las distintas cepas (Yamada et al., 2006). Además de estas dos glicoproteínas y también anclada en la envuelta del virus, se encuentra la proteína M2 que está presente en forma de homotetrámero (Holsinger and Lamb, 1991). Forma canales iónicos (Pinto et al., 1992) y su actividad es de gran importancia para la correcta infectividad de las partículas virales.

Inmediatamente por debajo de la envuelta lipídica se encuentra la matriz estructural del virión que está formada por dos proteínas, M1 y NEP. La proteína M1 es la más abundante del virión y constituye un antígeno específico de tipo muy importante. Interacciona tanto con los tallos citoplasmáticos de las proteínas de la envuelta como con las RNPs (Enami and Enami, 1996; McCown and Pekosz, 2006; Ye et al., 1987). En cuanto a la proteína NEP (*Nuclear Export Protein*), es la proteína viral menos abundante del virión y está implicada en la exportación nuclear de las RNPs progenie al citoplasma (O'Neill et al., 1998). En dicho proceso participa también la proteína M1 mediante interacción directa con NEP (Yasuda et al., 1993).

En el interior de la matriz estructural se encuentran las RNPs. Estos complejos ribonucleoprotéicos contienen el genoma del virus junto con la polimerasa viral y moléculas de NP (Klumpp et al., 1997). La polimerasa viral es una RNA polimerasa RNA dependiente formada por las subunidades PB1, PB2 y PA. Aunque las tres son necesarias para formar un complejo activo tanto para la transcripción como la replicación del RNA viral, se han asignado funciones específicas a cada una de las subunidades. Así, PB1 es la que tiene la actividad polimerizante propiamente dicha (Kobayashi et al., 1996) y contiene también actividad endonucleotídica (Li et al., 2001a). La subunidad PB2 es una proteína de unión a cap (Blaas et al., 1982), mientras

que PA es una fosfoproteína (Sanz-Ezquerro et al., 1998) con actividad proteasa (Hara et al., 2001; Perales et al., 2000). La proteína NP es muy abundante en el virión y constituye junto con M1 uno de los antígenos específicos de tipo que sirven para distinguir los virus tipo A, B y C. Forma parte estructural tanto de las vRNPs como de las cRNPs protegiendo y recubriendo el RNA a lo largo de toda su extensión (Klumpp et al., 1997). Pero además de la función estructural parece ser un factor clave para el proceso de replicación del RNA viral (Shapiro and Krug, 1988).

Las dos proteínas no estructurales son PB1-F2 y NS1. La proteína PB1-F2 está codificada por el segmento 2 y se genera a partir del mismo mRNA que PB1, ya que este mRNA presenta otra fase de lectura abierta (ORF) alternativa a la de PB1 (Chen et al., 2001). Es una proteína que se ha descubierto recientemente y de la que se conoce muy poco. Se ha descrito su localización preferencial en las mitocondrias de la célula infectada y se la ha relacionado con procesos de apoptosis durante la infección (Chen et al., 2001; Zamarin et al., 2005; Zamarin et al., 2006).

En cuanto a la proteína NS1, más adelante se detallarán sus características y las funciones que se le atribuyen.

## 2. EL CICLO DE INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE.

El virus de la gripe, al igual que el resto de virus es un parásito intracelular obligado, por lo que necesita desarrollarse dentro de la célula a la que infecta. Allí, gracias a distintas estrategias consigue manipular muchos de los procesos celulares en su propio beneficio y desarrollar de esa forma su ciclo vital. El ciclo de infección del virus de la gripe presenta una duración de unas 8h y está muy bien regulado tanto a nivel temporal como espacial. Así, se pueden distinguir una serie de etapas como: la entrada del virus; la expresión génica, que incluye los procesos de transcripción viral así como la maduración de los transcritos y su traducción; la replicación del RNA viral y por último la formación y liberación de las nuevas partículas virales.

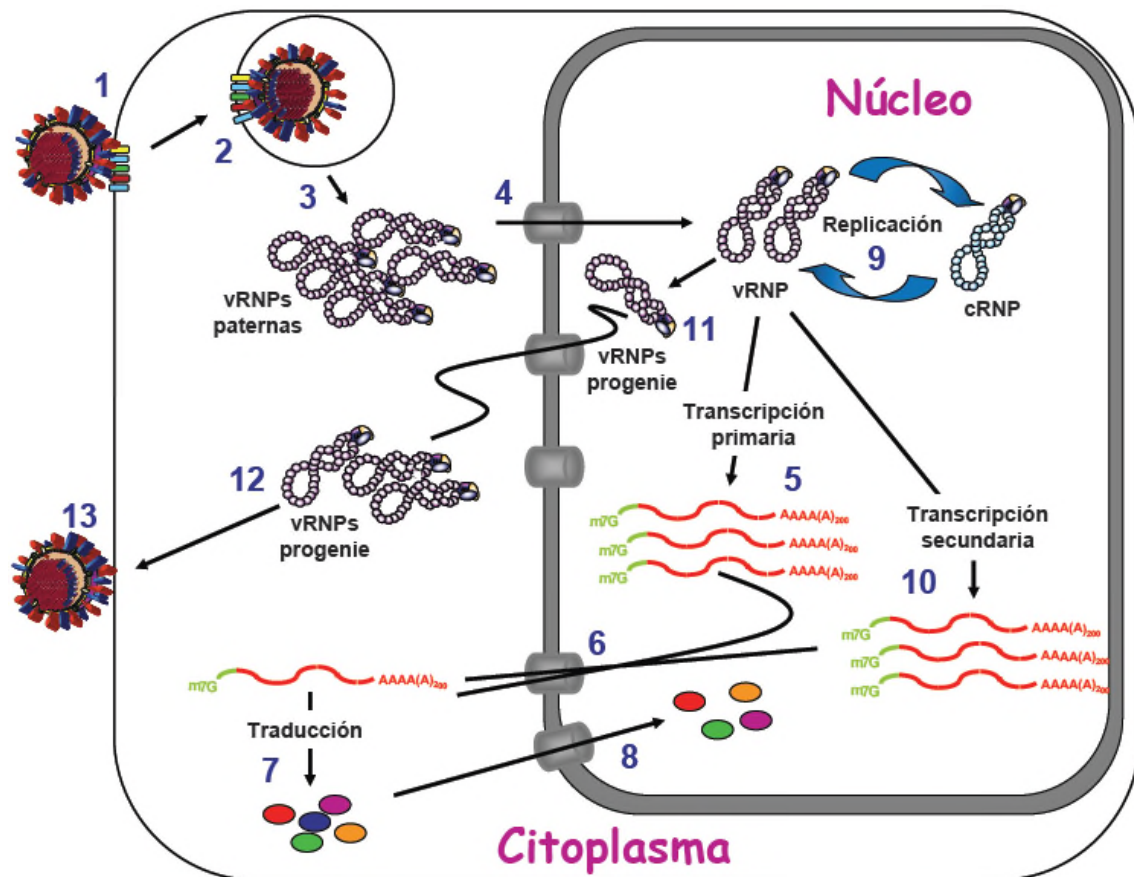
### 2.1. La entrada y desensamblaje viral.

La infección comienza con la interacción del virus con la célula diana (Figura 3, paso 1). Este hecho suele ocurrir en las células del tracto respiratorio tanto superior

como inferior por medio del ácido siálico presente en glicoproteínas y glicolípidos que constituye el receptor del virus (Weis et al., 1988). Son las moléculas de HA presentes en la envuelta del virión las responsables de la interacción. Aunque la afinidad de la HA por su receptor es baja, las múltiples interacciones de baja afinidad son las responsables de la alta avidéz que presenta el virus por la superficie celular y que permite su entrada en la célula. La entrada resulta ser por un mecanismo de viropexis o endocitosis mediada por receptor (de Fazekas, 1948), en el que el contacto del virus con su receptor provoca una invaginación de la membrana y la internalización de las partículas virales en unas vesículas revestidas de clatrina (Figura 3, paso 2). La clatrina desaparece ante la unión del lisosoma formándose los endolisosomas. El pH interno de dichas vesículas se va acidificando progresivamente y, gracias al canal iónico que forma la proteína M2, el interior del virión también sufre esa acidificación (Helenius, 1992; Pinto et al., 1992). Este hecho produce una desestabilización de la interacción entre las RNPs y la proteína M1. Además, el pH ácido provoca un cambio conformacional en la HA (Stegmann et al., 1987a; Stegmann et al., 1987b) favoreciendo la fusión de la envuelta del virión y la membrana endolisosomal. Todos estos eventos permiten que las RNPs se liberen al citoplasma (Figura 3, paso 3) y se dirijan rápidamente al núcleo de la célula (Wang et al., 1997) (Figura 3, paso 4) donde tendrán lugar los procesos de transcripción y replicación del genoma viral (Figura 3, pasos 5, 9 y 10).

## **2.2. Los procesos de transcripción y replicación del RNA viral.**

Una vez que las RNPs han atravesado la membrana nuclear y se encuentran en el núcleo comenzarán los procesos de transcripción y replicación del RNA viral. Ambos son llevados a cabo por la polimerasa viral, siempre en el contexto de la RNP (revisado en Elton et al., 2005). La síntesis de los mRNAs virales requiere que la maquinaria de transcripción celular dirigida por la RNA polimerasa II (RNA PolII) esté funcionando de manera activa (Lamb and Choppin, 1977; Spooner and Barry, 1977). Esto se debe a que la polimerasa viral utiliza estructuras cap tipo I de los pre-mRNAs celulares que están siendo sintetizados activamente, como cebadores para la síntesis de sus propios mensajeros (Plotch et al., 1979; Plotch et al., 1981). Además de esta dependencia funcional, en estos últimos años también se ha descrito una dependencia estructural, ya que la polimerasa viral se ha encontrado asociada de manera específica a la RNA PolII celular, más concretamente a su CTD (Engelhardt et al., 2005).



**Figura 3. Esquema del ciclo vital del virus de la gripe.** Se muestran todos los pasos de la infección ordenados numéricamente. 1. Adsorción. 2. Fusión de membranas. 3. Desencapsidación. 4. Transporte de las vRNPs al núcleo. 5. Transcripción primaria. 6. Transporte de mRNAs al citoplasma. 7. Traducción. 8. Transporte de proteínas virales al núcleo. 9. Replicación del RNA viral. 10. Transcripción secundaria. 11. Transporte de las vRNPs progenie al citoplasma. 12. Transporte de las vRNPs progenie hacia la membrana celular. 13. Encapsidación y formación de viriones progenie.

Una vez que se ha acumulado una cantidad suficiente de NP soluble en el núcleo, comienza la replicación del RNA viral (Shapiro and Krug, 1988). Para ello la polimerasa viral copia el molde vRNA generando moléculas de cRNA que son encapsidadas por monómeros de NP formando las cRNPs. Estas cRNPs sirven como intermediarios replicativos para la síntesis de nuevas vRNPs progenie que pueden servir de molde para nuevas rondas de transcripción secundaria (Figura 3, paso 10), y eventualmente son encapsidadas en los viriones progenie (Figura 3, pasos 11, 12 y 13).

Se han identificado factores celulares que interaccionan con la polimerasa viral y/o las RNPs y que podrían estar modulando su actividad transcripcional o replicativa (Huarte et al., 2001; Mayer et al., 2007; Momose et al., 2001; Momose et al., 1996; Momose et al., 2002; Naito et al., 2007; O'Neill and Palese, 1995; Shimizu et al., 1994).

Además, se ha propuesto la participación de la proteína viral NS1 en la modulación de ambos procesos como se explica más adelante.

### 2.3. Proceso de maduración de los pre-mRNA virales.

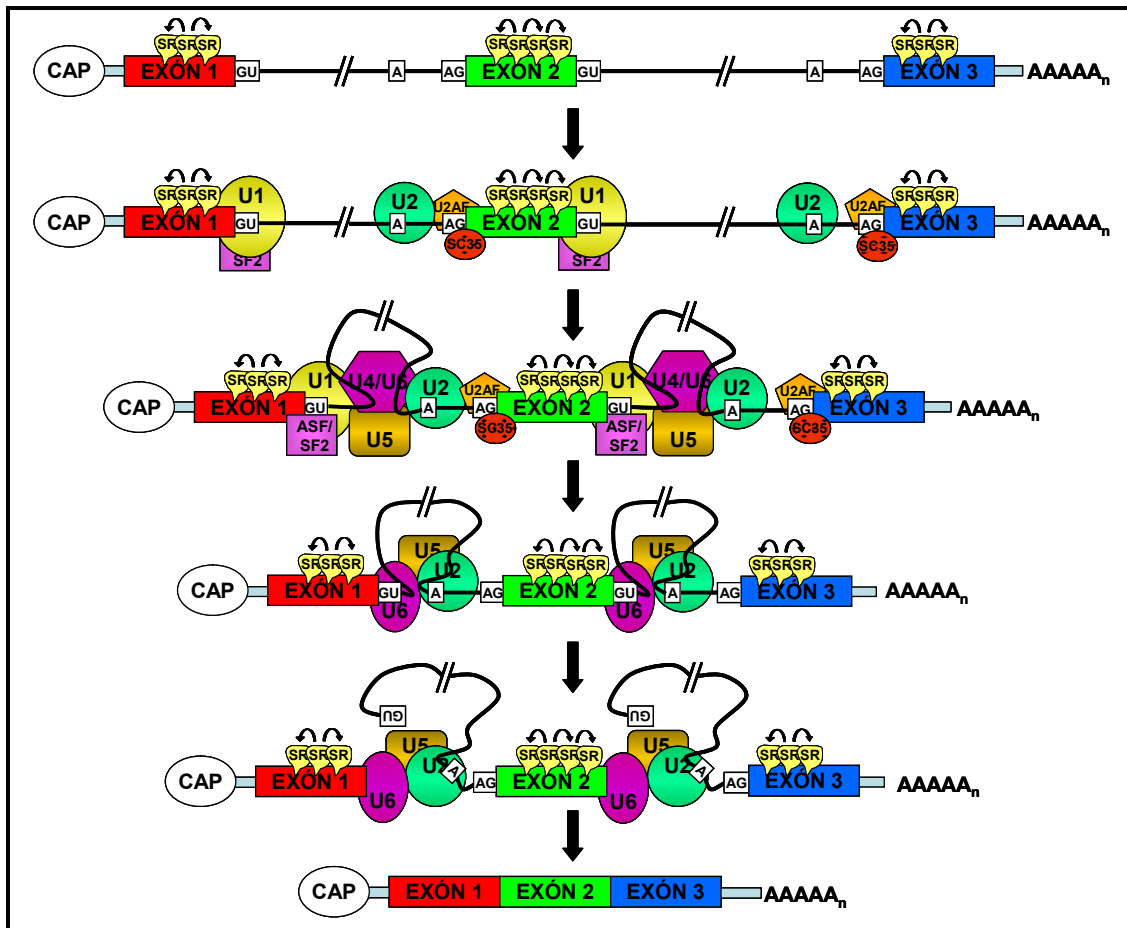
Los pre-mRNAs virales, al igual que los celulares, sufren modificaciones co-transcripcionales para dar lugar a los mRNAs maduros que posteriormente son transportados hacia el citoplasma.

#### 2.3.1. Procesos de maduración de pre-mRNAs celulares.

Para poder estudiar los mecanismos a través de los cuales tiene lugar la maduración de los pre-mRNAs virales, resulta imprescindible analizar primero los procesos de maduración que sufren los pre-mRNAs celulares: la eliminación de secuencias intrónicas o *splicing*, y el corte y poliadenilación del extremo 3'. Ambos procesos ocurren de manera co-transcripcional, de tal forma que la maquinaria celular involucrada en ellos se encuentra asociada a la RNA PolIII activa (McCracken et al., 1997; Steinmetz, 1997).

En cuanto al proceso de *splicing* consiste en la eliminación de las secuencias intrónicas de tal forma que los distintos exones quedan unidos entre sí (Figura 4). La definición de exón dentro del pre-mRNA depende en gran medida de su localización (revisado en Berget, 1995). Así, el primer exón se define por la presencia del cap en el extremo 5' del pre-mRNA y por la señal donadora de *splicing* 5' (5'ss) presente en el intrón adyacente en dirección 3'. El último exón viene determinado por la señal aceptora de *splicing* 3' (3'ss) presente en el intrón adyacente en dirección 5' y por la secuencia poly (A) del extremo 3' del pre-mRNA. Sin embargo, la definición de los exones intermedios depende de la interacción de distintos factores proteicos tanto en el exón como en los intrones que lo rodean. Así, proteínas SR se unen de manera cooperativa a los motivos ESE (*Exonic Splicing Enhancers*) presentes en el exón. Este hecho facilita las interacciones de la ribonucleoproteína U1 (snRNP U1) al sitio 5'ss y de la U2 al sitio de ramificación o *branch point*. Además, los factores U2AF y SC35 se unen a la región 3'ss, mientras que el factor ASF/SF2 lo hace sobre el sitio 5'ss. Todas estas interacciones determinan la presencia de los distintos exones, por lo que de una manera indirecta delimitan la localización de los intrones a eliminar. Una vez que se han unido todos esos factores se forma el *spliceosome*. Para ello las snRNPs U4/U6 y U5 se

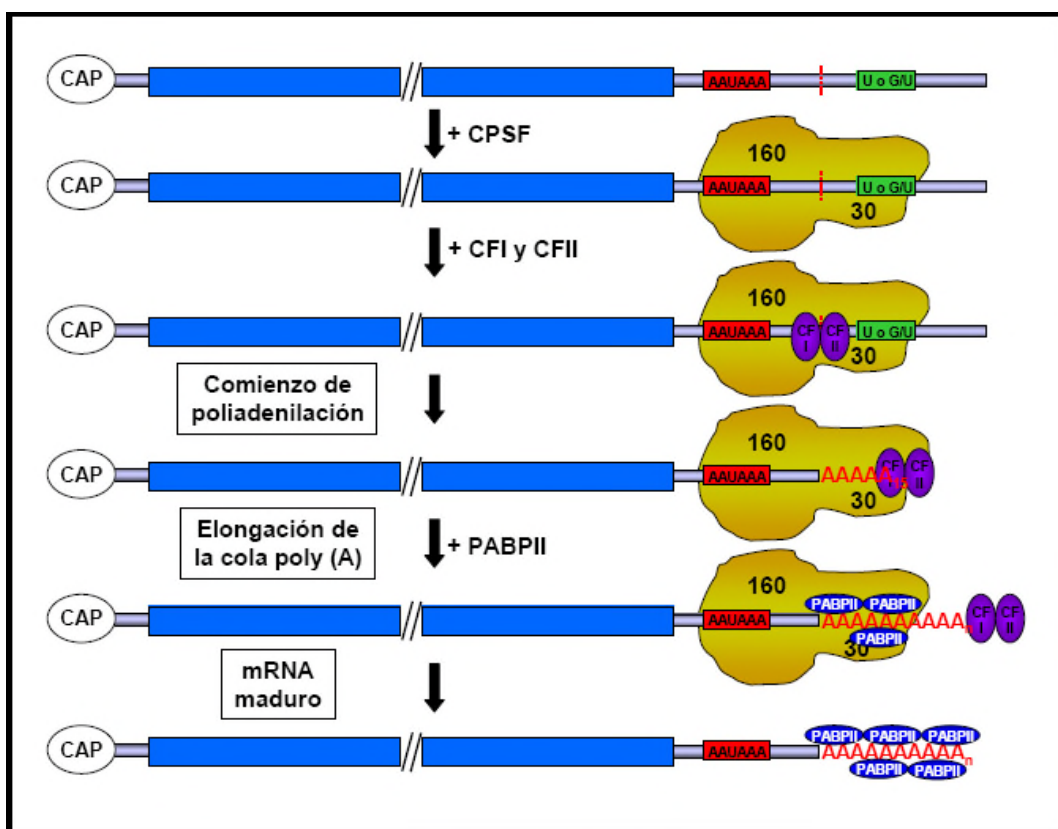
unen al complejo previamente formado y esto permite que los extremos 5' y 3' de un mismo intrón se aproximen físicamente. Tras la liberación de las snRNPs U1 y U4 tiene lugar el corte del extremo 5' del intrón permitiendo la formación del *lariat*. Posteriormente, se da un segundo corte que produce la liberación del intrón permitiendo la unión de los dos exones consecutivos.



**Figura 4.** Esquema del procesamiento de intrones de los pre-mRNAs celulares. Se muestran las estructuras 5' cap y 3' poly (A) del mRNA. Se indican también las señales 5' (GU) y 3' (AG) así como el punto de ramificación o *branch point* (A). Durante el procesamiento por *splicing* se van uniendo de manera ordenada todos los componentes que componen el *spliceosome* dando lugar finalmente al corte y empalme de los exones.

Además de este proceso de eliminación de intrones, los mRNAs transcritos por la RNA PolIII celular tienen que sufrir una última modificación en su extremo 3' que consiste en la adición de una cola poly (A) (Figura 5). Para ello resulta clave la participación de un factor denominado CPSF, de *Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*, mediante sus subunidades de 30 y 160 kDa. Este factor reconoce dos secuencias en los pre-mRNAs: (i) un hexámero conservado de secuencia AAUAAA situado entre 10 y 30 nucleótidos dirección 5' del punto de corte, y (ii) una zona rica en

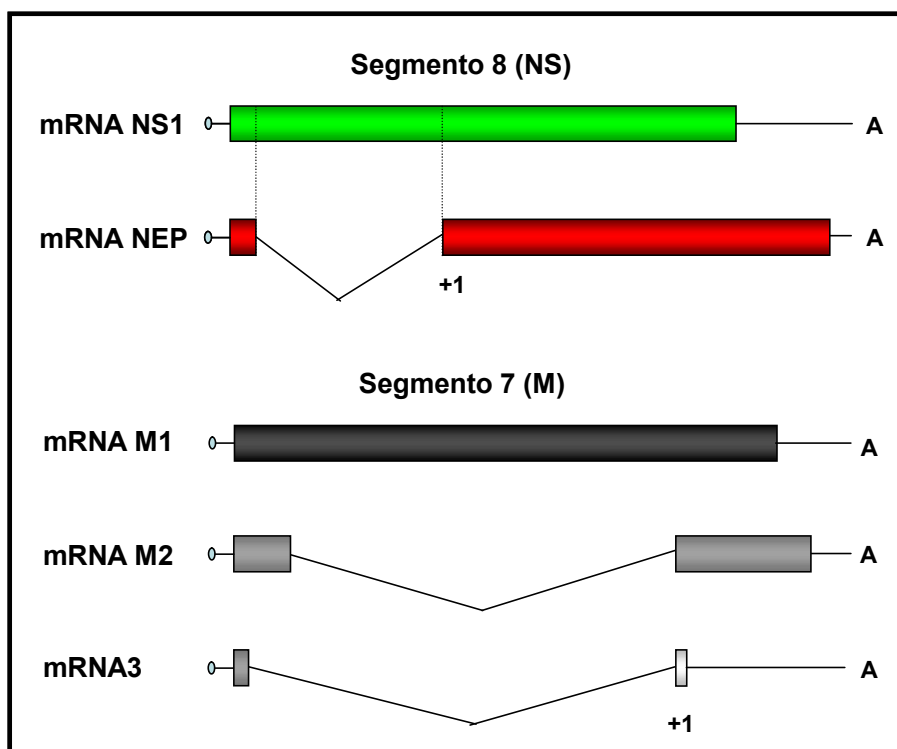
U o G/U por debajo del punto de corte (Gilmartin et al., 1995). Dicho reconocimiento es necesario para que tenga lugar el corte y poliadenilación. Primeramente ocurre el corte endonucleolítico para lo cual los factores CFI y CFII son imprescindibles (Takagaki et al., 1989). Una vez realizado el corte, la poli (A) polimerasa (PAP) se une a CPSF, reconoce el extremo 3' cortado y comienza a sintetizar una cola corta de 15-20 As. En ese momento se le une la proteína II de unión a poly (A) (PABPII) aumentando la procesividad de la PAP de tal forma que la síntesis de la cola poly (A) continúa hasta que se genera una cola larga de alrededor de 200 As (Wahle and Keller, 1996).



**Figura 5. Esquema del corte y poliadenilación de pre-mRNAs celulares.** Los pre-mRNAs celulares presentan dos secuencias que determinan la correcta localización de los factores necesarios para el procesamiento 3': el hexámero AAUAAA (enmarcado en rojo) y una secuencia rica en residuos U o G/U (enmarcado en verde). Se indica el punto de corte mediante una línea roja y discontinua. Se muestra la incorporación gradual de los factores que intervienen: las subunidades 30 y 160 kDa de CPSF, los factores CF I y II, y la proteína PABPII.

### 2.3.2. Proceso de *splicing* viral.

Como ya se ha comentado anteriormente dos de los segmentos virales, el 7 y el 8, sufren un procesamiento de *splicing* (Inglis et al., 1979; Inglis and Brown, 1981; Lamb and Choppin, 1983; Lamb et al., 1980; Lamb et al., 1981). Mientras que el segmento 8 da lugar a dos mRNAs maduros distintos, que codifican las proteínas NS1 y NEP, la transcripción del segmento 7 genera tres mRNAs, dos de los cuales expresan las proteínas M1 y M2. El mRNA3 tiene una escasa capacidad codificante, de tan sólo 9 aminoácidos (aa), y su producto de traducción no se ha detectado hasta el momento (Figura 6).



**Figura 6. Esquema de los mRNAs derivados de los segmentos 7 y 8.** Los mRNAs colineales de los segmentos 7 y 8 codifican las proteínas virales NS1 y M1 respectivamente, mientras que los transcritos que han sufrido un procesamiento por *splicing* dan lugar a las proteínas NEP y M2. El segmento 7 da lugar mediante un procesamiento alternativo a un tercer mensajero de escasa capacidad codificante denominado mRNA3.

El proceso de *splicing* se encuentra estrechamente regulado durante la infección del virus, de tal forma que la relación de acumulación de los mRNAs NS1/NEP y M1/M2 varía a lo largo del ciclo de infección (revisado en Palese and Shaw, 2006). La relación entre los mRNAs de M1 y M2 disminuye a lo largo de la infección, esto es, aumenta la eficiencia del *splicing* (Valcárcel et al., 1991).



El virus no codifica ninguna maquinaria proteica capaz de realizar la complicada función de procesar los intrones, por lo que usa la maquinaria celular de *splicing*. Esto hace que el virus haya seleccionado estrategias para manipular o regular de alguna forma esa maquinaria en su propio beneficio.

### **2.3.3. Proceso de poliadenilación de los mRNAs virales.**

A diferencia de lo que ocurre con el proceso de *splicing*, en el que el virus tiene que utilizar la maquinaria celular, el procesamiento del extremo 3' de los mRNAs virales no tiene nada que ver con lo que ocurre en los mRNAs celulares. Los vRNAs tienen su propia señal de poliadenilación cercana a su extremo 5' (Robertson et al., 1981). Dicha señal está compuesta por un tramo de 5 a 7 Us. Durante la síntesis del mRNA viral y cuando la polimerasa llega hasta esa señal, la copia de manera reiterada generando una cola larga poly (A) característica de los mRNAs virales. Por lo tanto en la adquisición de la cola poly (A) el virus es completamente independiente de la maquinaria celular, hecho muy importante como se verá más adelante.

## **2.4. Transporte de los RNA mensajeros virales y su traducción citoplasmática.**

Una vez que los mRNAs virales han sufrido las modificaciones indicadas, son exportados del núcleo para que tenga lugar su traducción citoplasmática (Figura 3, pasos 6 y 7). Se ha descrito que los mRNAs virales se transportan de manera muy rápida y eficaz a través de la membrana nuclear (Shapiro et al., 1987). Se desconoce hasta el momento cual o cuales son las vías de exportación que siguen los mRNAs virales aunque se ha relacionado su transporte con la asociación a la maquinaria transcripcional celular (Amorim et al., 2007). Se cree que los mRNAs sin señales de *splicing* se podrían transportar por una vía diferente a la de los mRNAs que sí tienen dichas señales, tal y como ocurre con los mRNAs celulares (Stutz and Izaurralde, 2003). Además, se desconoce si los transcritos virales primarios que contienen señales de *splicing* y los que han sufrido *splicing* se transportan por una vía común o diferente.

Una vez localizados en el citoplasma, los mRNAs virales se traducen dando lugar a las distintas proteínas virales. Para ello el virus utiliza la maquinaria de traducción celular en su propio beneficio, aumentando la traducción de los mRNAs virales e inhibiendo la de los celulares (*shut off*) (Garfinkel and Katze, 1992) como se describe más adelante.

### 2.5. Transporte de las RNPs al citoplasma, formación y liberación de nuevas partículas virales.

Una vez que se han acumulado una gran cantidad de vRNPs progenie en el núcleo de la célula, éstas son exportadas al citoplasma y transportadas a la membrana plasmática donde tendrá lugar su empaquetamiento para formar parte de la progenie viral (Figura 3, pasos 11, 12 y 13). Este fenómeno ocurre en las etapas tardías de la infección (5 o 6 hpi). Las proteínas NEP y M1 desempeñan una función clave en la salida de las RNPs al citoplasma. Por una parte, la proteína NEP junto con la NP presente en las RNPs, interacciona con proteínas del poro nuclear siguiendo la vía de CRM-1 (Elton et al., 2001; O'Neill et al., 1998); por otra parte, M1 hace de puente de unión entre la RNP y la proteína NEP (Martin and Helenius, 1991).

Cuando las RNPs han abandonado el núcleo y se encuentran en el citoplasma son transportadas hacia la membrana celular a través de los microfilamentos de actina (Avalos et al., 1997). Allí, en regiones concretas ricas en colesterol denominadas *lipid rafts*, se encuentran las glicoproteínas virales HA y NA (Nayak et al., 2004; Scheiffele et al., 1999; Simpson-Holley et al., 2002). La encapsidación de las RNPs parece ser dirigida por la proteína M1 (Gomez-Puertas et al., 1999). Trabajos recientes involucran al tallo citoplasmático de M2 en dicha función, ya que su interacción con M1 tiene lugar a dicho nivel (Iwatsuki-Horimoto et al., 2006; McCown and Pekosz, 2006). La liberación de las partículas se da mediante un proceso de *budding* o gemación y finaliza con la acción catalítica de la NA que degrada el ácido siálico de receptores y glicoproteínas virales, permitiendo la dispersión de los virus y evitando su agregación en la membrana celular (Palese et al., 1974).

El empaquetamiento del genoma viral requiere de la incorporación de 8 RNPs distintas; sólo así se consiguen viriones infectivos. Numerosas evidencias permiten la aceptación de un modelo de empaquetamiento dirigido que propone la existencia de un proceso de selección de las 8 RNPs que se encapsidan. Por una parte, la cantidad de cada vRNP en los viriones es equimolar aunque su acumulación en las células infectadas pueda variar (Smith and Hay, 1982). Además, vRNAs defectivos interferentes compiten de manera muy específica con la incorporación de su vRNA homólogo y no así en el de otros vRNAs (Duhaut and McCauley, 1996; Nayak et al., 1982). Más recientemente, varios trabajos han descrito que secuencias en *cis* presentes

en las regiones codificantes de los genes NA (Fujii et al., 2003), HA (Watanabe et al., 2003), NS (Fujii et al., 2005), y las subunidades PB1, PB2 y PA (Liang et al., 2005; Muramoto et al., 2006), son necesarias para un correcto empaquetamiento de las RNPs. Otro resultado que apoya una incorporación selectiva de las 8 RNPs es el publicado por Noda y colaboradores, en el que mediante cortes seriados de viriones y técnicas de tomografía, observan una distribución constante de las RNPs en forma de anillo, en el que 7 de ellas se encuentran alrededor de una RNP central (Noda et al., 2006). Todos estos resultados indican que el mecanismo de empaquetamiento de las 8 RNPs vendría dado por señales en *cis* presentes no sólo en las regiones no codificantes de los vRNAs sino también en las zonas 3' y 5' adyacentes a ellas y que forman parte de las zonas codificantes. Pero además de estas señales en *cis* es posible que factores en *trans* también estén implicados en este mecanismo, ya que un mutante en la subunidad PA de la polimerasa viral presenta defectos en la formación de partículas virales (Regan et al., 2006).

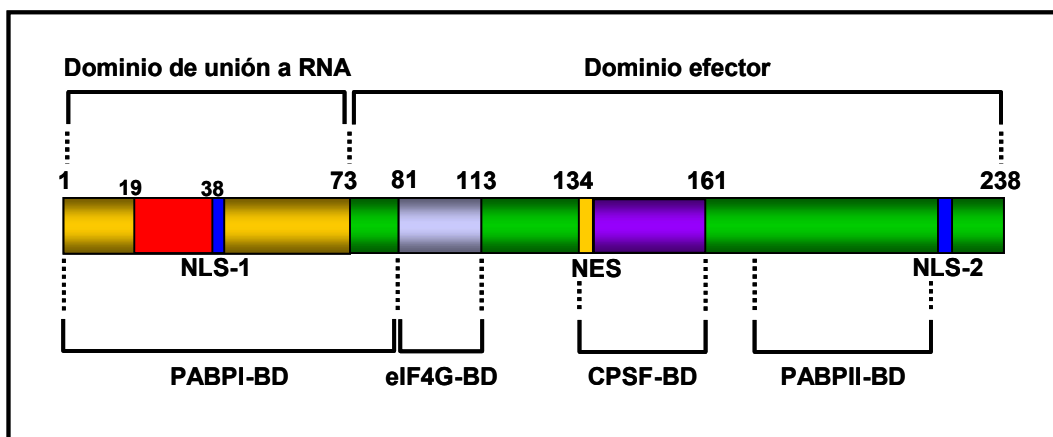
### **3. LA PROTEÍNA NS1.**

La proteína NS1 está codificada por el segmento 8 y se sintetiza como consecuencia de la traducción del transcrito colineal de éste. Se produce desde los primeros momentos de la infección localizándose principalmente en el núcleo (Briedis et al., 1981), aunque a tiempos más tardíos se puede encontrar también en el citoplasma asociada a polisomas (de la Luna et al., 1995; Falcón et al., 1999). Es una proteína no estructural cuyas funciones están muy relacionadas con los mecanismos que tiene el virus para evadir la respuesta inmune celular así como para regular los procesos tanto celulares como virales que necesita el virus para desarrollar su ciclo vital. Para poder analizar todos estos aspectos de NS1 es necesario explicar primero cómo es su estructura y su organización en dominios.

#### **3.1. Estructura y dominios de la proteína NS1.**

NS1 es una proteína pequeña con un tamaño variable de entre 230 y 238 aa según la cepa de virus de la que provenga. Aún siendo una proteína tan pequeña se la ha implicado en numerosas funciones tal y como se describe más adelante. Como se

muestra en la **Figura 7**, se ha descrito un dominio de unión a RNA localizado en la parte N-terminal de la proteína, entre los aminoácidos 1 a 73 (Qian et al., 1995). Desde hace unos años se conoce la estructura tridimensional de ese dominio que se organiza formando tres  $\alpha$ -hélices (Chien et al., 1997; Liu et al., 1997). Esta región coincide con el dominio de dimerización de la proteína (Nemeroff et al., 1995). Se ha determinado que una zona rica en residuos básicos localizada en torno a los aminoácidos 19 a 38 forma realmente el motivo de unión a RNA (Qian et al., 1994). Por experimentos de mutagénesis se sabe también que los residuos 38R y 41K son los responsables directos de la unión a RNA. Además se ha observado que dicha actividad depende directamente de su homodimerización ya que mutantes en residuos implicados en la dimerización eliminan su capacidad de unir RNA (Nemeroff et al., 1995; Wang et al., 1999). Se ha demostrado que no presenta una especificidad de secuencia (Chien et al., 2004) y hasta el momento se ha confirmado su capacidad de unión a muy distintos tipos de RNA: al rRNA 28S (Yoshida et al., 1981), a RNA de doble cadena o dsRNA (Hatada and Fukuda, 1992; Wang et al., 1999), a la región 5' no traducida (5' UTR) de los mRNAs virales y a RNAs con secuencias poly (A) (Garfinkel and Katze, 1993; Qiu and Krug, 1994), al vRNA y cRNA (Hatada and Fukuda, 1992; Hatada et al., 1997; Hatada et al., 1992) y a los U6 snRNA y U6atac snRNAs (Lu et al., 1994; Qiu et al., 1995; Wang and Krug, 1998).



**Figura 7. Esquema de la proteína NS1 y sus dominios de interacción.** Se muestra el dominio N-terminal de unión a RNA (en dorado) que contiene el motivo de unión a RNA (en rojo). El dominio efector (en verde) ocupa las dos terceras partes C-terminales. Se indican también los dominios de interacción con los factores celulares PABPI, eIF4G, CPSF y PABP-II, así como las señales de localización (NLS-1 y NLS-2) y exportación nuclear (NES).

Además del dominio de unión a RNA, la proteína NS1 contiene otro gran dominio que ocupa las dos terceras partes C-terminales de la proteína y que se ha denominado dominio efector (DE) (Qian et al., 1994; Wang and Krug, 1996). Su nombre hace referencia a que se ha relacionado la presencia de dicho dominio con la capacidad de NS1 para realizar muchas de las funciones que se le atribuyen, si bien hay algunos datos contradictorios como se verá más adelante. Recientemente se ha obtenido su estructura cristalográfica (Bornholdt and Prasad, 2006).

Como ya se ha dicho anteriormente, NS1 presenta una localización variable a lo largo del ciclo de infección y esto es debido a que presenta tanto señales de localización (NLS) como de exportación nuclear (NES). Tiene dos NLS distintas formadas por residuos de naturaleza básica: una en el dominio de unión a RNA (aa 34-38) y la otra en la zona C-terminal (aa 203-237) (Greenspan et al., 1988). En cuanto a la NES se encuentra en el dominio efector, entre los residuos 138 y 147, y es una zona rica en leucinas que parece estar regulada por una secuencia adyacente (aa 148-161) que la mantiene inactiva (Li et al., 1998).

Ya por último, NS1 es un proteína que puede sufrir modificaciones post-traduccionales de tipo fosforilación (Privalsky and Penhoet, 1981). Esta fosforilación tiene lugar siempre en residuos de treonina y es específica de cepa, hasta el punto de que hay cepas donde nunca se ha detectado su fosforilación (Petri et al., 1982). Se ha propuesto que la fosforilación no sólo de NS1, sino también de NP y M1, depende del tipo celular (Conti et al., 1980). Aunque los estudios de fosforilación de NS1 comenzaron hace ya bastantes años, hoy en día se sigue sin conocer la relevancia funcional de estas modificaciones durante la infección.

### **3.2. NS1 como modulador de la expresión génica.**

Para que el virus pueda desarrollar de manera correcta su ciclo vital dentro de la célula hospedadora tiene que regular muy eficazmente todos los procesos relacionados con la expresión génica tanto a nivel celular como viral. Con este objetivo el virus ha seleccionado estrategias para hacerse cargo de la maquinaria celular que necesita así como para evitar ser detectado por el sistema inmune innato de la célula. A este respecto la proteína NS1 es un factor de regulación clave durante de la infección (Garcia-Sastre, 2001; Krug et al., 2003; Ortín, 1998) afectando a la expresión génica celular y viral así como a la respuesta mediada por interferón. Gracias a su localización doble, en el

núcleo y en el citoplasma, desarrolla funciones en ambos compartimentos celulares (Figura 8).

### 3.2.1. Funciones nucleares.

#### Modulación del proceso de *splicing*.

En la célula infectada los transcritos colineales de los segmentos 7 y 8 sufren un procesamiento de sus intrones en lo que se conoce como *splicing*, siendo el del segmento 8 el más estudiado. En los primeros estudios al respecto se observó que durante la infección el procesamiento de los mRNAs de NS1 y M1 para dar lugar a los de NEP y M2, respectivamente, sólo tenía lugar en un 5 o 10% de los casos (Lamb et al., 1980; Lamb et al., 1981) y que iba aumentando según progresaba el ciclo viral (Valcárcel et al., 1991). Esto es, la abundancia relativa de los mRNA que sufren *splicing* con respecto de los mRNA primarios de los que provienen aumenta a tiempos tardíos de la infección. Estos datos indicaban la existencia de un mecanismo de regulación muy eficaz que permite una producción temporal y precisa de cada mRNA (Palese and Shaw, 2006).

El *splicing* del mRNA de NS1 se ha estudiado muy extensamente tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*. Basado en experimentos *in vitro*, se propuso que el mRNA de NS1 no sufría ningún procesamiento debido a que el sitio 3' aceptor de *splicing* no se encontraba accesible a la maquinaria de procesamiento celular (Plotch and Krug, 1986) y a que tenía lugar un bloqueo después de la formación del complejo 55S de *splicing* (Agris et al., 1989). Apoyando dicha teoría, Nemeroff y colaboradores identificaron unas secuencias en *cis*, presentes tanto en el intrón como en el exón 3' del mRNA de NS1, que parecían inhibir su procesamiento *in vitro* (Nemeroff et al., 1992). Sin embargo, datos previos obtenidos *in vivo* a partir de infecciones con virus mutantes *ts* (Smith and Inglis, 1985) y de experimentos de expresión del gen NS a partir de su cDNA mediante plásmidos con promotores de la RNA PolIII, mostraron que el mRNA de NS1 podía sufrir *splicing* (Lamb and Lai, 1984; Portela et al., 1986) y que éste podía ser bloqueado en *trans* por la expresión de NS1 (Fortes et al., 1994). En el mismo tipo de experimentos se describió también la capacidad que tiene NS1 de regular negativamente el procesamiento de genes marcadores coexpresados con él (Fortes et al., 1994; Lu et al., 1994).

Por otra parte, el hecho de que NS1 pudiera regular el *splicing* de genes coexpresados con él así como el *splicing* alternativo del AgT-t de SV40 (Fortes et al.,

1994), hizo pensar que podría haber una conexión directa entre NS1 y la maquinaria del procesamiento celular. Apoyando esta hipótesis, experimentos de inmunofluorescencia indicaron que la expresión de NS1 por transfección o en infección producía una alteración en el patrón subnuclear de distintos componentes celulares de la maquinaria de *splicing* como SC35 y las snRNPs (Fortes et al., 1995). Además, se describió la interacción entre NS1 y U6 snRNA (componente de la U6 snRNP) en células infectadas (Lu et al., 1994), lo que sirvió para proponer un modelo general de inhibición del *splicing* basado en dicha interacción. La unión de NS1 a U6 snRNA evitaría la formación de los complejos U6-U2 y U6-U4 necesarios para el procesamiento (Qiu et al., 1995). De la misma forma NS1 interacciona con el componente U6atac snRNA que participa en el *splicing* de señales AT-AC (no convencionales) inhibiendo la formación del complejo U12-U6atac y por tanto el procesamiento del intrón correspondiente (Wang and Krug, 1998). En relación a la conexión de NS1 con la maquinaria de *splicing*, se describió también su interacción con la proteína NS1-BP. Esta proteína que está involucrada en el procesamiento de intrones y colocaliza con SC35 en *speckles*, se relocaliza durante la infección (Wolff et al., 1998). A la vista de estos datos se propuso que NS1 es un regulador general del *splicing* afectando tanto a genes virales como celulares.

Además de todos estos estudios que implican a NS1 como regulador negativo del *splicing*, otros trabajos han propuesto que la inhibición del *splicing* de pre-mRNAs celulares es una consecuencia de la inhibición del procesamiento del extremo 3' de los mismos, como se explica más adelante (Li et al., 2001b; Noah et al., 2003).

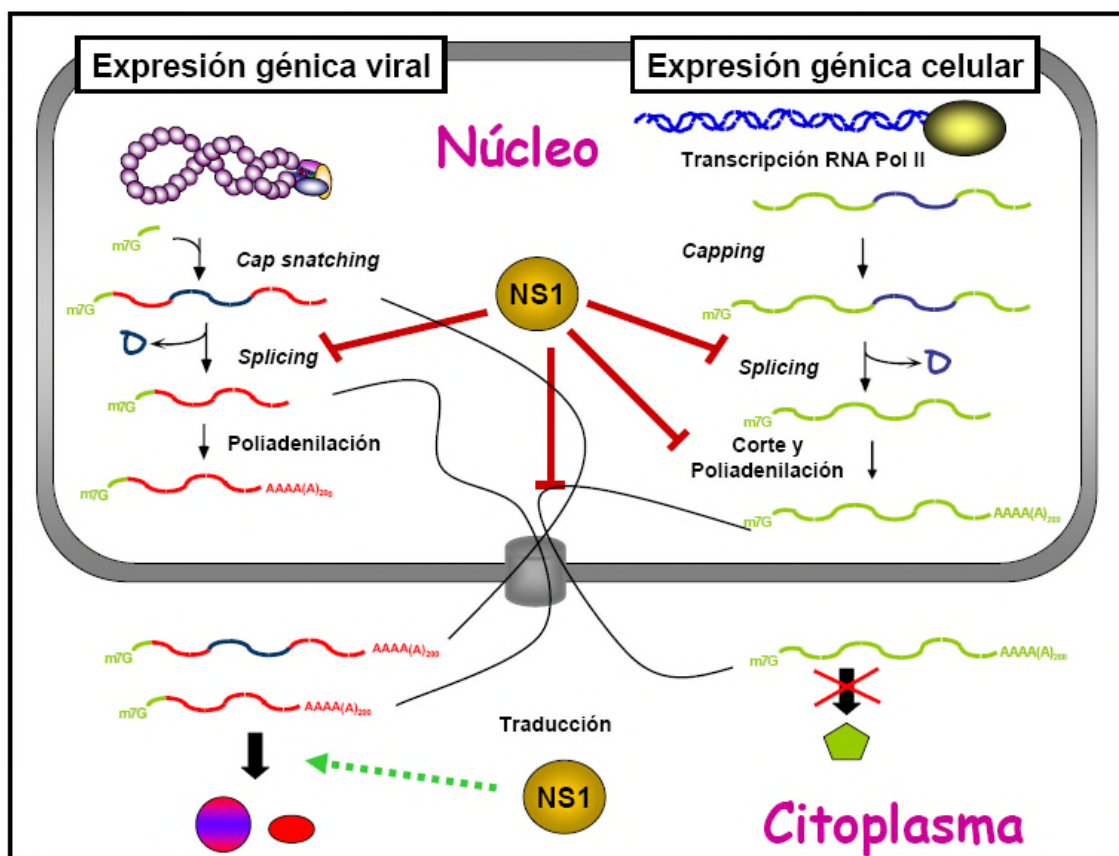
#### Inhibición del procesamiento del extremo 3' de pre-mRNAs celulares.

Otra de las funciones que se le atribuyen a NS1 es la de inhibir el correcto procesamiento del extremo 3' de pre-mRNAs celulares. Los pre-mRNAs celulares tienen que sufrir una modificación en su extremo 3' que consiste en un corte y posterior poliadenilación del RNA. Este proceso es clave para que los pre-mRNAs maduren y puedan ser transportados correctamente al citoplasma donde tiene lugar su traducción. En este contexto el factor CPSF desempeña un papel fundamental como ya se ha explicado anteriormente (Figura 5).

Hace unos años, con la finalidad de descubrir nuevas interacciones de la proteína NS1 con factores celulares, Nemeroff y colaboradores realizaron ensayos de doble híbrido en levadura. De esta forma describieron la interacción de NS1 con la subunidad 30 kDa de CPSF tanto *in vitro* como en infección y confirmaron que dicha interacción

inhibe el corte y poliadenilación de los pre-mRNAs *in vitro* e *in vivo* (Nemeroff et al., 1998). Además, se describió la interacción de NS1 con el factor celular PABPII tanto *in vitro* como *in vivo* y se observó que NS1 era capaz de inhibir su función (Chen et al., 1999). Todos estos resultados explican la inhibición del procesamiento 3' de pre-mRNAs celulares que lleva a cabo NS1. Hay que destacar que los mRNAs virales no sufren dicha inhibición debido a que su procesamiento 3' no sigue el mismo mecanismo que los celulares (Poon et al., 1998; Poon et al., 1999).

En cuanto a la relación entre la inhibición del procesamiento 3' y la regulación del *splicing* mencionada anteriormente, se propuso que la definición del exón 3' en los transcritos con un único intrón venía dada por la presencia de la cola poly (A) (revisado en Berget, 1995). Por lo tanto, la inhibición del procesamiento del extremo 3' mediada por NS1 inhibiría indirectamente el *splicing* de dichos transcritos (Li et al., 2001b). De esta forma el *splicing* de los transcritos virales no se vería afectado.



**Figura 8.** Esquema de la regulación de la expresión génica por parte de la proteína NS1. Derecha: transcripción y procesamiento de los transcritos celulares. Izquierda: transcripción y maduración de los mRNAs virales. NS1 inhibe los procesos de *splicing* celular y viral, el corte y poliadenilación y transporte de los mRNAs celulares mientras que induce la traducción de los virales frente a los celulares.



### Inhibición del transporte de mRNAs.

Además de la inhibición del *splicing* y el procesamiento 3' de los pre-mRNAs celulares, NS1 realiza otra función fundamental que contribuye a la regulación de la expresión génica celular: inhibe el transporte de los mRNAs poliadenilados. Las primeras evidencias se obtuvieron a partir de experimentos de expresión de NS1 por medio de plásmidos con promotores de la RNA PolIII. En estos experimentos se observó una retención clara y generalizada de los mRNAs en el núcleo (Fortes et al., 1994; Qian et al., 1994; Qiu and Krug, 1994). Así, los primeros análisis del transporte de los mRNAs de NS1 y NEP indicaron que había una retención nuclear del mRNA de NS1, pero no de NEP, con lo que propusieron que el transporte de mRNAs podía verse afectado por el proceso de *splicing* (Alonso-Caplen and Krug, 1991). Más adelante se propuso que no sólo los mRNAs de NS1 y NEP (Alonso-Caplen et al., 1992), sino cualquier mRNA celular o viral, se retenía en el núcleo como consecuencia de la expresión de la proteína NS1 (Fortes et al., 1994). Aunque se sugirió que la causa de dicha retención podía ser la capacidad que tenía NS1 para unir RNAs con secuencias poly (A) (Qiu and Krug, 1994), los mismos autores poco después propusieron que, además del dominio de unión a RNA también era necesario el dominio efector (Qian et al., 1994). Sin embargo, otros autores confirmaron que únicamente el dominio N-terminal de la proteína NS1 era necesario para la retención nuclear de los mRNAs durante la infección (Marión et al., 1997a). Finalmente, se ha propuesto que la retención de los pre-mRNAs celulares podía ser debida indirectamente a la inhibición del procesamiento del extremo 3' previamente descrito (Chen et al., 1999; Nemeroff et al., 1998; Noah et al., 2003). Además de este posible mecanismo, recientemente se ha descrito la interacción de NS1 con proteínas de la vía de exportación nuclear. Se ha observado que NS1 forma un complejo con las proteínas NXF1/TAP, p15/NXT, Rae1/mrnp41, y E1B-AP5 inhibiendo su función en el transporte de mRNAs celulares (Satterly et al., 2007a).

### Modulación de la actividad de la polimerasa viral.

Durante los procesos de transcripción y replicación viral la actividad de la polimerasa del virus está estrechamente regulada, en parte por factores celulares. Sin embargo, hay datos que sugieren la participación activa de NS1 en dicha regulación. Por una parte mediante el dominio de unión a RNA NS1 es capaz de interaccionar tanto con el vRNA (Hatada and Fukuda, 1992; Hatada et al., 1997; Hatada et al., 1992) como con la estructura del *panhandle* (Hatada and Fukuda, 1992) y el mRNA (Marión et al.,

1997b). Por otra parte, se ha demostrado la interacción de NS1 con la polimerasa y/o las RNPs durante la infección (Marión et al., 1997b). Además, se ha descrito que un virus mutante de delección en la proteína NS1 (NS1-81) tiene afectada la replicación de algunos genes virales (Falcón et al., 2004). Todos estos resultados hacen pensar que NS1 podría estar involucrado en la modulación de la actividad de la polimerasa aunque se desconoce el mecanismo concreto y su relevancia funcional en la infección.

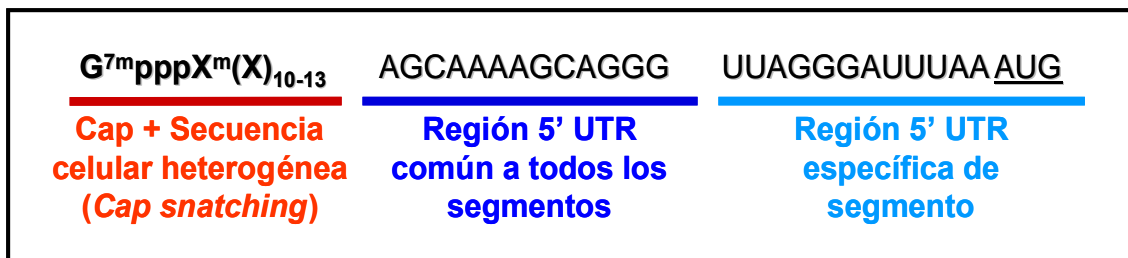
### 3.2.2. Funciones citosólicas.

#### Activación traduccional de mRNAs virales.

Durante la infección la traducción de proteínas celulares disminuye enormemente mientras que se favorece la síntesis de las virales. A este fenómeno se le conoce con el nombre de *shut off* celular y se produce porque el virus se hace con el control traduccional de la célula (Park and Katze, 1995). Algunos autores han propuesto que a lo largo de la infección los mRNAs celulares citosólicos sufren una degradación (Beloso et al., 1992; Inglis, 1982; Zurcher et al., 2000) que explicaría la disminución de la síntesis de proteínas celulares. Sin embargo, otros autores no detectan dicha degradación (Garfinkel and Katze, 1992; Katze and Krug, 1984; Katze and Krug, 1990). Estudios realizados por Zürcher y colaboradores descartan que la inhibición del corte y poliadenilación de mRNAs celulares, el bloqueo en el transporte de mRNAs así como la activación de PKR influyan de forma alguna en el denominado *shut off* celular (Zurcher et al., 2000). Por otra parte, estudios realizados con virus que carecen de la proteína NS1 (delNS1) descartan la participación de NS1 en la disminución de la síntesis de proteínas celulares observada durante la infección (Salvatore et al., 2002).

Como ya se ha comentado anteriormente, durante la infección por el virus tiene lugar una traducción selectiva de los mRNAs virales frente a los celulares (Garfinkel and Katze, 1992). Esta selectividad tiene que estar muy bien regulada ya que los mRNAs virales resultan indistinguibles de los celulares debido a sus modificaciones 5' cap y 3' poly (A). Parece ser que esta selectividad viene dirigida en gran medida por el extremo 5' UTR de los mRNAs virales (Garfinkel and Katze, 1993). Dentro del extremo 5' UTR (Figura 9), hay una primera secuencia corta que es común a todos los mRNAs virales y que determina la selectividad y estimulación traduccional frente a los celulares. Adyacente a esta secuencia existe otra de longitud variable entre segmentos y que es la encargada de modular la estimulación traduccional. Gracias a la presencia de estas secuencias diferenciadas la traducción de algunos mRNAs virales como NP, NS1,

M1, HA y NA es más eficiente que la de otros mRNAs (de la Luna et al., 1995; Enami et al., 1994). Además de estas secuencias en *cis* presentes en los mRNAs virales, se han identificado factores que están implicados en la selectividad y estimulación traduccional. Así, se ha demostrado que NS1 se localiza en polisomas durante la infección y que su presencia favorece la incorporación de ribosomas a los mRNAs virales transfectados (de la Luna et al., 1995). Esto implica a NS1 en la estimulación traduccional favoreciendo la iniciación de la traducción (de la Luna et al., 1995; Enami et al., 1994). También se ha descrito la interacción de NS1 con el extremo 5' UTR de los mRNAs virales (Park and Katze, 1995) así como con los factores eIF4G (Aragón et al., 2000) y PABPI (Burgui et al., 2003) durante la infección. Estas interacciones hacen posible un mecanismo de circularización de los mRNAs virales en el que el complejo formado por NS1, PABPI y eIF4G favorecería la reiniciación de los mRNAs virales. Experimentos realizados con virus termosensibles con mutaciones en la proteína NS1 han mostrado que presentan problemas en la expresión de las proteínas virales tardías M1, NS1 y HA apoyando la propuesta de la participación de NS1 como estimulador traduccional (Falcón et al., 2004; Hatada et al., 1990). Por otra parte, muy recientemente se ha propuesto la participación de la polimerasa viral en la selección preferencial de los mRNAs virales (I. Burgui, enviado a publicación).



**Figura 9. Esquema de la región 5' UTR de los mRNAs virales.** Se muestra la estructura cap tipo I con una secuencia celular heterogénea de 10 a 13 nt (en rojo) en el extremo 5' del mRNA viral. También se indican la región 5' UTR común a todos los segmentos (en azul oscuro) y la región específica de cada segmento (en azul claro) así como el AUG iniciador de la proteína (subrayado).

Por último, además de estos factores virales, se han identificado proteínas celulares que podrían estar implicadas en la traducción preferencial de los mRNAs virales. Se ha observado las interacciones del autoantígeno La (Park and Katze, 1995) y el factor GRSF-1 (Kash et al., 2002; Park et al., 1999) con la secuencia 5' UTR de mRNAs virales, aunque se desconocen las implicaciones de dichas interacciones en el

contexto de la infección. Muy recientemente se ha propuesto que el factor inhibidor de PKR, P58IPK, podría regular la traducción de los mRNAs virales mediante un mecanismo dependiente de PKR e independiente de la quinasa PERK (Goodman et al., 2007).

### Interacción con la proteína celular hStaufen.

De experimentos de doble híbrido se ha descrito también la interacción de NS1 con la proteína humana hStaufen. Dicha interacción se ha confirmado tanto *in vitro* como en experimentos de infección *in vivo* (Falcón et al., 1999).

Staufen es una proteína de unión a RNA que se ha implicado en la localización de mRNAs durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*, permitiendo la correcta formación del eje antero-posterior del embrión temprano (St Johnston et al., 1991). Se ha visto que en células humanas se encuentra asociada a polisomas y retículo endoplásmico (Marión et al., 1999) y que forma parte de grandes complejos en neuritas de neuroblastos diferenciados. Dichos complejos contienen tanto RNAs como proteínas de distinta naturaleza como son: proteínas de traducción, relacionadas con la regulación del citoesqueleto, motoras, así como proteínas nucleares (Villacé et al., 2004).

En relación a la interacción entre hStaufen y NS1, no se conoce hasta el momento su relevancia funcional aunque hay que señalar que al igual que hStaufen, NS1 también se localiza en polisomas y que se le ha implicado en un aumento traduccional específico de los mRNAs virales. Además, por ensayos de inmunofluorescencia se ha observado la colocalización de hStaufen y las RNPs en el citoplasma de las células infectadas (datos no publicados del laboratorio). A este respecto hay que recordar la interacción descrita entre NS1 y las RNPs citoplasmáticas observada mediante inmunoprecipitación en células infectadas (Marión et al., 1997b). Todos estos datos sugieren una relación funcional entre NS1 y hStaufen.

### Inhibición del sistema de silenciamiento celular mediado por RNA interferente.

El silenciamiento mediado por RNA es un mecanismo de regulación génica muy extendido en organismos eucariotas, desde plantas hasta mamíferos (Denli and Hannon, 2003). Una característica común a todos los mecanismos de silenciamiento mediado por RNA es la producción de pequeños RNAs de 21 a 26 nt de longitud a partir de moléculas de dsRNA. Este proceso está mediado por la endoribonucleasa Dicer (Hamilton and Baulcombe, 1999; Hammond et al., 2000). Los RNAs pequeños interferentes (siRNAs) controlan la especificidad del silenciamiento gracias a su homología con el mRNA diana que será degradado por el complejo RISC (RNA-

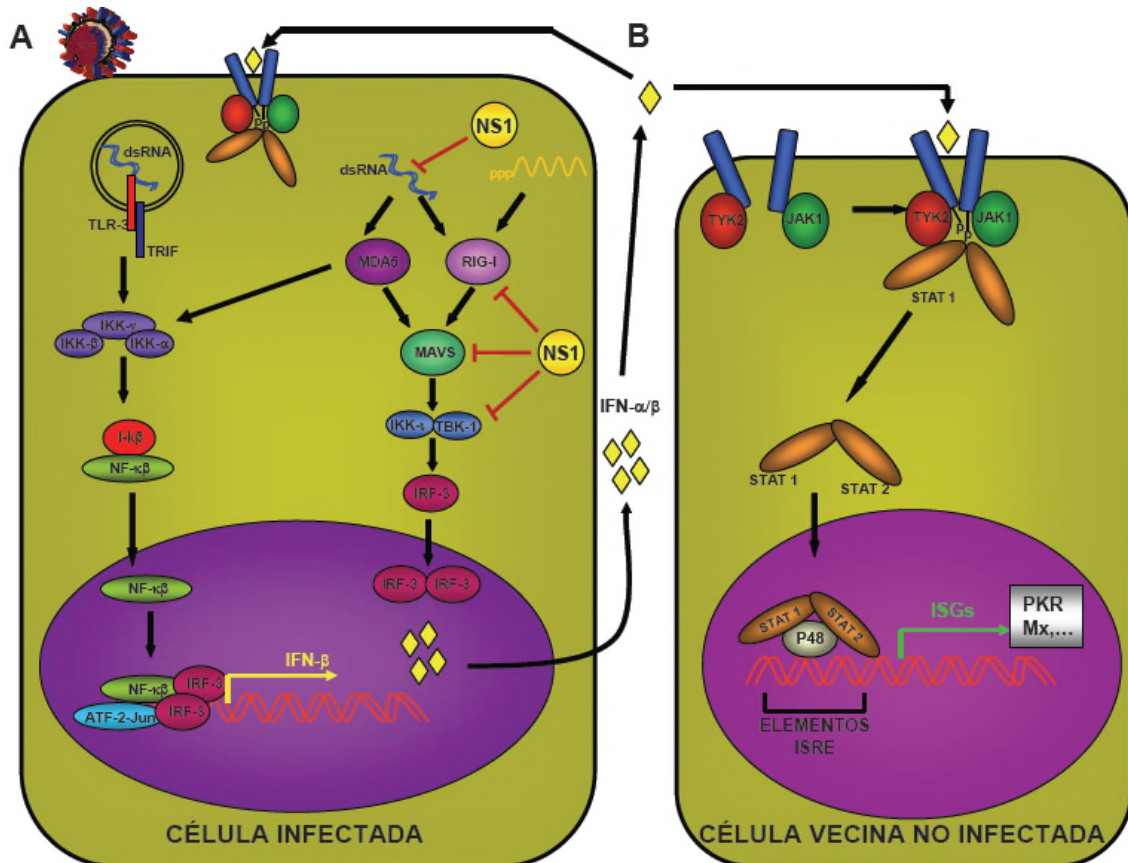
*induced silencing complex*) (Schwarz et al., 2002). Distintos trabajos han demostrado que el silenciamiento génico actúa como mecanismo antiviral tanto en las células de plantas (Li and Ding, 2001) como en las de animales (Li et al., 2002). Uno de los mecanismos para impedir el silenciamiento mediado por RNA es el de evitar la formación de los siRNAs. Así, se ha visto que proteínas virales con capacidad de unir dsRNA, como E3L de Vaccinia y NS1 de gripe, son capaces de inhibir la activación del silenciamiento en *Drosophila* gracias a que secuestran las moléculas de dsRNA impidiendo su procesamiento por Dicer (Li et al., 2004). Por otra parte, trabajos realizados en plantas han demostrado que NS1 tiene capacidad de inhibir el sistema de silenciamiento mediante su unión directa a los siRNAs (Bucher et al., 2004; Delgadillo et al., 2004). Estos resultados han hecho pensar que NS1 podría funcionar como supresor del silenciamiento en mamíferos. Sin embargo, un estudio reciente indica que la expresión de NS1 en células de mamífero no evita la activación del sistema de silenciamiento mediado por RNA que se activa frente a genes marcadores (Kok and Jin, 2006). Apoyando la idea de que en las infecciones por gripe NS1 no actúa como un supresor del sistema de silenciamiento, Weber y colaboradores han publicado que durante la infección por virus RNA de banda negativa no se detectan moléculas de dsRNA (Weber et al., 2006). Por lo tanto, si no se produce dsRNA tampoco haría falta que el virus seleccionara un mecanismo de supresión del silenciamiento mediado por RNA.

### **3.3. NS1: un factor de virulencia clave durante la infección.**

#### **3.3.1. NS1 como antagonista del sistema interferón.**

El primer mecanismo de defensa que se activa en la célula para hacer frente a la infección por patógenos es el basado en el sistema del interferón (Figura 10). Éste es un sistema muy complejo que, mediante diferentes sensores como TLR-3, RIG-I, MDA-5 y otros, es capaz de detectar la presencia de virus o productos derivados de la replicación de estos (revisado en Goutagny et al., 2006). Normalmente estos sensores se activan por la detección de moléculas de dsRNA que provienen de la replicación viral (revisado en Kato et al., 2006). Sin embargo, muy recientemente se ha descrito que RIG-I se puede activar también por RNA de cadena simple (ssRNA) con extremos 5' trifosfato (Pichlmair et al., 2006). Una vez activados los sensores y mediante su interacción con distintas proteínas adaptadoras, transductoras de la señal (TRIF, MAVS,

TBK1, IKK-i,...), tiene lugar la activación de las cascadas en las que participan. Todos estos eventos concluyen con la activación de factores de transcripción del tipo NFκB, ATF-2/c-Jun, IRF3 y/o IRF7 que estimulan la transcripción de genes del sistema de IFNαβ (revisado en Stark et al., 1998). Este proceso constituye la respuesta primaria del sistema celular innato frente a las infecciones (Figura 10, panel A).



**Figura 10. Respuesta del sistema celular innato a la infección por gripe y su regulación por parte de NS1.** Panel A: Representación de la respuesta primaria del sistema celular innato frente a infecciones. Se indican las proteínas sensoras de la señal (TLR-3, MDA5 y RIG-I), las proteínas adaptadoras o transductoras de la señal (TRIF, MAVS, TBK1,...) así como los factores de transcripción relevantes (IRF-3, NF-κb, ATF-2-Jun). La activación de estas cascadas concluye con la inducción de la expresión del IFN α/β. También se señalan los niveles a los que la proteína NS1 podría interferir funcionando como antagonista del sistema interferón. Panel B: Representación de la respuesta secundaria del sistema celular innato inducida por la presencia de IFN α/β en el medio. Se muestran los receptores de IFN, las proteínas adaptadoras JAK1 y TYK2 así como los factores de transcripción STAT1 y STAT2. La activación de esta cascada induce la expresión de genes denominados ISGs (*Interferon Stimulated Genes*).

Como consecuencia de esa expresión de genes, las células infectadas secretan interferón (IFN) al medio, el cual activa las vías de señalización JAK y STAT mediante unión a sus receptores tanto en las propias células infectadas como en las adyacentes no

infectadas. La activación de dichas cascadas permite a las células adquirir un estado antiviral caracterizado por la expresión de genes inducidos por IFN conocidos como ISGs (*Interferon Stimulated Gene*). Esta activación de genes ISG constituye la respuesta secundaria (Figura 10, panel B) y está mediada por la inducción previa de la síntesis de IFN (revisado en Stark et al., 1998). Al igual que otros virus, el de la gripe ha seleccionado mecanismos para evitar o controlar la activación del sistema del interferón. A este respecto parece que NS1 desempeña un papel clave actuando como antagonista de la respuesta mediada por interferón. Se ha observado que un virus carente de la proteína NS1 (virus delNS1) únicamente puede crecer en células que tienen comprometida la respuesta mediada por interferón, como ocurre en las células Vero o las células de ratón NIH 3T3 PKR<sup>-/-</sup> (García-Sastre et al., 1998). En experimentos de infección realizados con el virus delNS1 se ha observado una mayor activación y localización nuclear de los factores de transcripción IRF3 (Talon et al., 2000) y NFκB (Wang et al., 2000) en comparación con su virus paterno, PR8, que sí expresa la proteína NS1. Estos resultados correlacionan con la detección de una mayor expresión del mRNA de IFNβ en las células infectadas por dicho virus (Solorzano et al., 2005; Talon et al., 2000; Wang et al., 2000). Además, los experimentos realizados con el virus delNS1 y virus con deleciones en la proteína NS1 han mostrado una correlación entre la síntesis de mRNA de IFNβ y su atenuación *in vivo* (Bergmann et al., 2000; Solorzano et al., 2005). Así mismo, experimentos realizados con distintas cepas de gripe tipo A tanto humanas como aviarias, indican que existe una correlación inversa entre la capacidad de controlar la inducción de IFNβ y su atenuación *in vivo* (Cauthen et al., 2007; Hayman et al., 2006).

Se ha propuesto que el mecanismo de inhibición del sistema IFN vendría dado por la capacidad de NS1 de “secuestrar” las moléculas de dsRNA evitando así la activación de los sensores mencionados anteriormente (Talon et al., 2000). Sin embargo, resultados obtenidos en experimentos de infección con un virus mutante en NS1 con la capacidad de unión a RNA muy afectada, indican que dicha actividad de unión a RNA no sería necesaria (Donelan et al., 2003). Recientemente se ha observado la interacción directa entre NS1 y el sensor RIG-1 (Mibayashi et al., 2007; Pichlmair et al., 2006). Por otra parte se ha descrito que la infección con el virus delNS1 induce no sólo la síntesis de IFNβ sino también la de RIG-I, MDA5 y MAVS (Opitz et al., 2006). Experimentos de silenciamiento de dichos factores han demostrado que la activación del sistema IFN en

respuesta a la infección por gripe viene mediada al menos en parte por el sensor RIG-I pero no por MDA5 (Guo et al., 2006; Mibayashi et al., 2007; Opitz et al., 2006). Estos mismos experimentos indican que NS1 interfiere a nivel de RIG-I, TPK1 y MAVS evitando la activación de éstos.

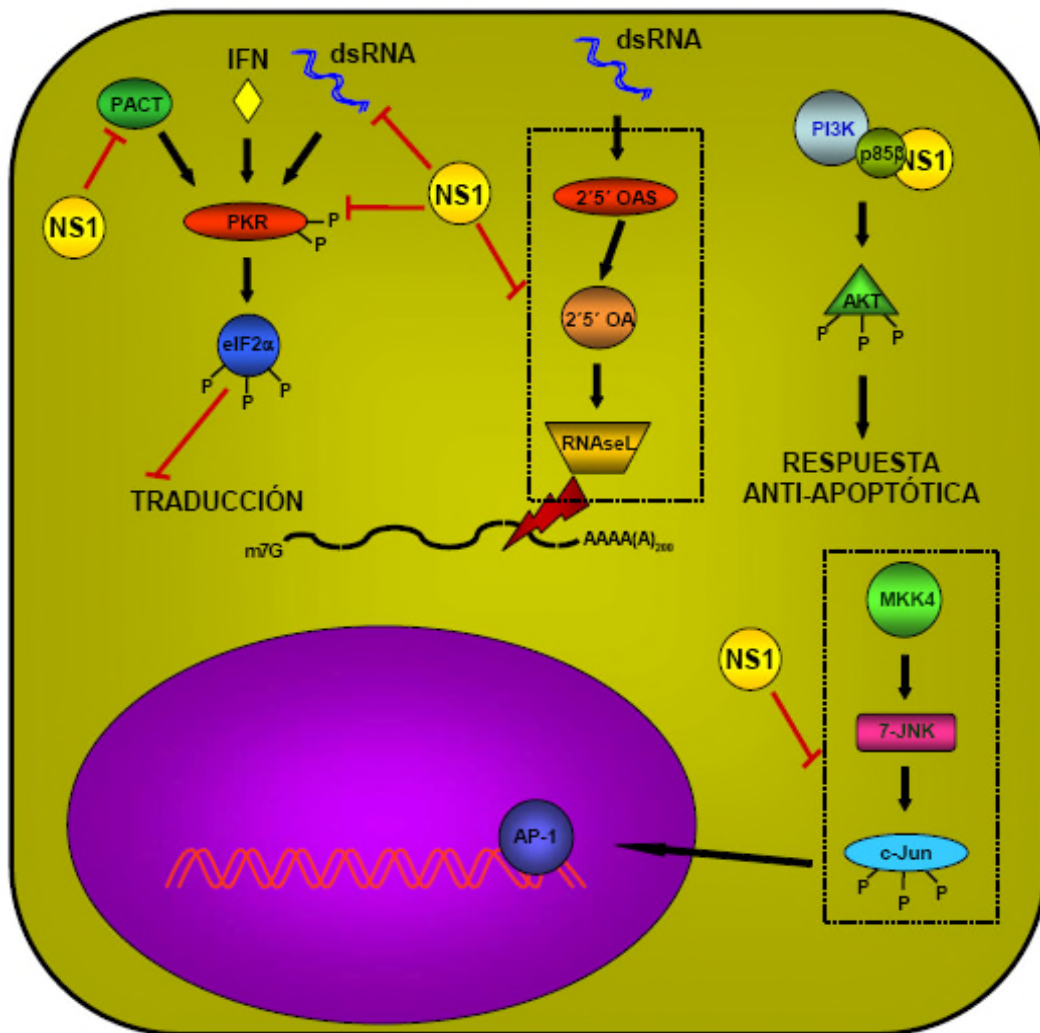
### 3.3.2. NS1 inhibe la activación de PKR.

Una de las vías de defensa frente a la infección por patógenos que presentan las células eucariotas está basada en la inhibición de la maquinaria traduccional de la célula que se encuentra infectada. Este sistema implica la actuación de una quinasa denominada PKR que se activa por unión a dsRNA o por interacción con el factor PACT (Clemens and Elia, 1997; Galabru and Hovanessian, 1987) y también en respuesta a IFN $\beta$  (Sen, 2000). La activación de PKR produce primero una autofosforilación y posteriormente la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  del factor eIF2, inhibiendo el reciclaje de la forma eIF2-GDP (inactiva) a eIF2-GTP (activa). Como consecuencia de ello se inhibe la traducción celular.

En los primeros momentos de la infección por gripe este sistema basado en PKR se activa (Katze, 1992) pero rápidamente es inhibido por la acción de algún producto viral (Katze et al., 1986; Katze et al., 1988). Se han propuesto varios mecanismos que explican dicha inhibición y alguno de ellos implica la actuación de la proteína NS1. Se ha sugerido que el aumento en la expresión del factor inhibidor de PKR, P58IPK, que se induce durante la infección, podría ser el responsable de que PKR se mantenga inactivo (Lee et al., 1994). Por otra parte, en cuanto a los trabajos que han involucrado a NS1 en la inhibición de PKR, algunos proponen la unión a dsRNA como mecanismo de acción de NS1 (Hatada et al., 1999; Lu et al., 1995). Sin embargo, también se propone un mecanismo directo en el que NS1 interacciona con PKR inhibiendo la actividad de ésta, aunque hay discrepancias al respecto (Falcón et al., 1999; Li et al., 2006; Min et al., 2007; Tan and Katze, 1998). Además, resultados obtenidos a partir de experimentos *in vitro* sugieren la interacción de NS1 con el factor PACT (Li et al., 2006). Basados en dicha interacción los autores de ese trabajo proponen que NS1 podría inhibir la activación de PKR inducida no sólo por dsRNA sino también por PACT. Por otra parte, en experimentos de infección de ratones PKR<sup>+/+</sup> con el virus del NS1 se ha observado que éste presenta un fenotipo muy atenuado, mientras que en la infección de ratones PKR<sup>-/-</sup> presenta una virulencia muy similar al virus paterno PR8, que sí expresa la proteína NS1 (Bergmann et al., 2000). Por lo tanto, parece claro que



independientemente del mecanismo que esté implicado en la inhibición de la activación de PKR, la proteína NS1 está involucrada y que de esta forma el virus mantiene funcional la maquinaria traduccional que necesita para la síntesis de proteínas virales (Figura 11).



**Figura 11. Bloqueo de cascadas de señalización por parte de NS1.** Se indican las cuatro cascadas de señalización sobre las que actúa NS1: la cascada de PKR, la de 2'-5'-oligoadenilato sintasa, la de PI3K y la de JNK/c-Jun.

### 3.3.3. NS1 inhibe la activación de la vía 2'-5' OAS/RNasaL.

La expresión del factor antiviral 2'-5' OAS (2'-5' oligo (A) synthetase), al igual que PKR, se induce por la presencia de IFNβ. Dicho factor se activa en presencia de dsRNA e induce la síntesis de 2'-5' OA (2'-5' oligo adenylate), el cual activa a la RNasaL que degrada los mRNAs. Esta vía constituye otra defensa importante frente a

infecciones y se ha observado que aunque la infección por el virus de la gripe la activa, la acción de NS1 permite controlarla (Min and Krug, 2006). Experimentos de infección con un virus mutante en la proteína NS1 indican que NS1 inhibe la activación de la vía 2'-5' OAS/RNasaL inducida por la respuesta a IFN (Min and Krug, 2006) y sugieren que de esta forma el virus evitaría la degradación masiva de los mRNAs entre los que se incluyen los virales.

### 3.3.3. NS1 interacciona con distintas vías de señalización.

La infección por el virus de la gripe activa ciertas cascadas de señalización entre las que se encuentran la vía MKK4/7-JNK (Kujime et al., 2000; Lin et al., 2001; Ludwig et al., 2001) y la vía de PI3K (Hale et al., 2006).

Mediante experimentos de infección con el virus del NS1 se ha observado que la replicación viral estimula la actividad transcripcional del factor AP-1 y sus genes diana, mediante la vía MKK4/7-JNK (Ludwig et al., 2001). Se ha descrito también que la expresión de NS1 inhibe la activación de la vía JNK así como la fosforilación del factor c-Jun (Ludwig et al., 2002). Además, se ha relacionado la activación de la vía JNK/c-Jun con la inducción de la apoptosis, hecho que también puede ocurrir en células infectadas por gripe (Kujime et al., 2000; Schultz-Cherry et al., 1998; Schultz Cherry et al., 2001). Aunque no se conoce el mecanismo de acción de NS1 sobre esta vía parece que su inhibición evitaría la entrada en apoptosis de la célula infectada.

En cuanto a la vía de señalización de la PI3K, se ha descrito la interacción de NS1 con la subunidad reguladora p85 $\beta$  de PI3K durante la infección (Hale et al., 2006; Shin et al., 2007). Además, se ha observado que tanto la infección como la expresión aislada de NS1 inducen la fosforilación del factor Akt mediada por la vía de la PI3K. Estos resultados junto con el dato de que el virus del NS1 no induce la fosforilación de Akt (Ehrhardt et al., 2006) sugieren la participación de NS1 en la activación de la vía de señalización PI3K-Akt. Un estudio reciente indica que dicha activación mediaría una respuesta anti-apoptótica (Ehrhardt et al., 2007) y evitaría así que la célula infectada entre en una vía de muerte celular programada.

***Objetivos***

---



## **OBJETIVOS**

Son muchas las funciones que se le han atribuido a la proteína NS1 durante la infección por el virus de la gripe. Se ha propuesto su implicación en la inhibición de la respuesta mediada por interferón así como en la regulación de la expresión génica a muy distintos niveles entre los que se incluyen los procesos de *splicing*, el procesamiento del extremo 3' de mRNAs celulares, la retención de mRNAs poliadenilados y la estimulación traduccional de los mRNAs virales. Sin embargo, muchas de estas funciones se han descrito en sistemas experimentales alejados de la infección, por lo que se hace muy difícil valorar su relevancia real. Es por ello que en el laboratorio hemos intentado estudiar la implicación de NS1 en algunas de las funciones, previamente descritas, durante la infección. Con este objetivo Ana Falcón en el laboratorio desarrolló un sistema de rescate de virus termosensibles que permitió la generación de una batería de virus con mutaciones puntuales en la proteína NS1. El estudio de estos mutantes serviría para aclarar la relevancia de algunas de las funciones atribuidas a NS1 durante la infección e incluso describir nuevas posibles funciones.

Con estos antecedentes nos propusimos los siguientes Objetivos concretos:

1. Estudiar el fenotipo de un virus termosensible, el 11C, con mutaciones puntuales en la proteína NS1.
2. Establecer un sistema transitorio de transcripción/replicación viral que permitiera el estudio de los procesos de *splicing* y transporte de mRNAs virales.
3. Estudiar la implicación de la proteína NS1 en los procesos de *splicing* y transporte núcleo-citoplásmico de los mRNAs derivados de su propio segmento.



## ***Materialles y Métodos***

---





## MATERIALES BIOLÓGICOS

### 1. Líneas celulares eucariotas.

- MDCK: células de riñón de perro cedidas por T. Zürcher y obtenidas de la ATCC.
- HEK-293T: células embrionarias humanas de riñón cedidas por T. Zürcher y J.C. de la Torre (DuBridge et al., 1987).
- NIH 3T3 PKR<sup>-/-</sup>: fibroblastos de ratón que fueron cedidos por C. Weissmann (Yang et al., 1995).
- Vero: células de mono verde adaptadas a crecer sin suero obtenidas de la ATCC (Diaz et al., 1988).

### 2. Estirpes bacterianas.

- *E. coli* DH5 $\alpha$  [genotipo *supE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*]: fue la cepa bacteriana utilizada para la amplificación de todos los plásmidos.

### 3. Virus.

- Virus recombinantes derivados de la cepa de campo A/Victoria/3/75 con los genes HA y M de la cepa adaptada a crecer en cerebro de ratón A/WSN/33: HA/MWSN-3P/NP*vicNS*-wt, -11C, -V18A/R44K y -S195P (Garaigorta et al., 2005).
- Virus WSN A<sub>6</sub>: virus recombinante cedido por G. Brownlee y que deriva de la cepa WSN. Presenta defectos en la poliadenilación del gen neuraminidasa (Poon et al., 2000).

### 4. Plásmidos.

- Los plásmidos pCMVPB1, pCMVPB2, pCMVPA y pCMVNP, que codifican los cDNAs de las subunidades de la polimerasa y NP de la cepa Victoria fueron construidos y cedidos por J. Ortega (Falcón et al., 2004).
- El plásmido pHH21 fue cedido por G. Hobom y los plásmidos derivados de éste, con los vRNAs de los segmentos de la cepa A/WSN/33 clonados bajo el promotor

de la RNA polimerasa I humana fueron cedidos por Y. Kawaoka ([Neumann et al., 1999](#)).

- Los plásmidos derivados del pHH21, con los vRNAs de los segmentos de la cepa A/Victoria/3/75, así como los plásmidos pHHNS181 y pHHNS11C fueron construidos y cedidos por A. Falcón y Y. Fernández ([Falcón et al., 2004](#)).

- Los plásmidos pGNP, pGEM-M1-5 y pGEM-NA-2 fueron cedidos por A. Portela ([Mena et al., 1994](#); [Mena et al., 1996](#)).

- El plásmido pBSK As fue cedido por F. Gebauer.

- Los plásmidos pHHdelNS1, pHHNSV18A/R44K, pHHNSS195P, pHHNSR38A/K41A, pGEM-M1 EcoRI/ClaI y pGEM-NA AccI se obtuvieron a lo largo de esta Tesis y su construcción se describe más adelante.

### 5. Anticuerpos.

Los anticuerpos primarios usados fueron los siguientes:

- NS1 5395: suero policlonal de conejo generado frente a la proteína recombinante His-NS1 purificada a partir de bacteria. Se usó para análisis por Western-Blot (WB) a la dilución 1:500 ([Marión et al., 1997a](#)).

- NS1 rat1: suero policlonal de rata generado frente a la proteína His-NS1 purificada en bacteria. Se usó para análisis por inmunofluorescencia (IF) a la dilución 1:1000.

- NP rat1: suero policlonal de rata cedido por I. Salanueva y generado frente a la proteína His-NP purificada en bacteria. Se usó para análisis por WB e IF a la dilución 1:2000 en ambos casos.

- H179: monoclonal de ratón anti hemaglutinina (HA) de la cepa WSN cedido por A. Douglas. Se usó para análisis por IF a la dilución 1:100.

- M234/1/G10: monoclonal de ratón anti neuraminidasa (NA) de la cepa Victoria. Fue generado y cedido por A. Portela ([Lopez et al., 1986](#); [Suárez et al., 1992](#)). Se usó para análisis por IF a la dilución 1:50 y también para análisis por inmunoprecipitación (IP).

- E10: monoclonal de ratón dirigido frente a un epítipo amino-terminal común para las proteínas M1 y M2. Fue cedido por A. García-Sastre ([Bourmakina and Garcia-Sastre, 2005](#); [Salvatore et al., 2002](#)) y se usó para análisis por WB a la dilución 1:200.

- NEP 979: suero policlonal de conejo cedido por J.A. López de Turiso y generado frente a la proteína NEP purificada a partir de bacteria. Se usó para análisis por IP.

- Actina: monoclonal de ratón anti  $\beta$ -actina (Sigma). Se usó para análisis por WB a la dilución 1:2000.

Los anticuerpos secundarios usados para WB se obtuvieron de Sigma y fueron:

- Cabra anti conejo unido a peroxidasa de rábano a la dilución 1:10000.
- Conejo anti rata unido a peroxidasa de rábano a la dilución 1:7000.
- Cabra anti ratón unido a peroxidasa de rábano a la dilución 1:3000.

Los anticuerpos secundarios para IF (Invitrogen) se usaron a la dilución 1:400 y fueron:

- Alexa 594 anti conejo
- Alexa 594 anti rata
- Alexa 488 anti ratón

## **MÉTODOS**

### **1. Manipulación de DNA y clonajes.**

#### **1.1. Construcción de los plásmidos mutantes de la serie pHHNS.**

##### **1.1.1. Plásmido pHHdelNS1.**

Para obtener el plásmido que diera lugar al vRNA molde de delNS1, que fuera capaz de expresar la proteína NEP pero no NS1, se realizó una mutagénesis dirigida sobre el plásmido original pHHVicNS. Se introdujeron dos mutaciones puntuales que generan dos codones de parada consecutivos al comienzo del intrón: R19Stop y K20Stop. Para ello se utilizó el kit comercial QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene según las indicaciones del fabricante. Para la PCR se usaron los oligos NS1mut1 y NS1mut2. Una vez obtenido el plásmido pHHdelNS1 se secuenció para confirmar la presencia de las mutaciones introducidas.

NS1mut1	5' GCTTCCTTTGGCATGTC <b>TGATA</b> ACAAATTGTAGACCAAGAACTAGG 3'
NS1mut2	5' CCTAGTTCTTGGTCTACAATTTGTT <b>ATCAG</b> ACATGCCAAAGGAAGC 3'

**Tabla 1.** Oligonucleótidos usados para la obtención del plásmido mutante pHHdelNS1 por mutagénesis dirigida. En negrita se muestran los cambios de nucleótido introducidos.

### 1.1.2. Plásmido pHHVicNS R38A/K41A.

Con la finalidad de generar un plásmido que diera lugar a la expresión de una proteína NS1 con el dominio de unión a RNA no funcional, se realizó una mutagénesis dirigida sobre el plásmido original pHHVicNS introduciendo las mutaciones R38A y K41A. Para ello se utilizó el kit comercial QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene según las indicaciones del fabricante. Para la PCR se usaron los oligos NS1mut3 y NS1mut4. Una vez obtenido el plásmido pHHVicNS1 R38A/K41A se secuenció para confirmar la presencia de las mutaciones introducidas.

NS1mut3	5' TCGGCTTCGCG <b>C</b> AGATCAG <b>G</b> CGTCCCTAAGG 3'
NS1mut4	5' CCTTAGGGAC <b>G</b> CCTGATCT <b>G</b> CGCGAAGCCGA 3'

**Tabla 2.** Oligonucleótidos usados para la obtención del plásmido mutante pHHVicNS R38A/K41A por mutagénesis dirigida. En negrita se muestran los cambios de nucleótido introducidos.

### 1.1.3. Plásmidos pHHVicNS V18A/R44K y pHHVicNS S195P.

Se partió del plásmido original pHHVicNS11C que contiene las mutaciones V18A/R44K/S195P. Dicho plásmido se digirió con las enzimas de restricción NcoI y NheI obteniéndose dos fragmentos de 456 y 3272 pares de bases cada uno. Se purificaron dichos fragmentos a partir de gel de agarosa junto con los fragmentos equivalentes provenientes de la digestión del plásmido pHHVicNS. Se procedió a la ligación del fragmento de mayor tamaño del pHHVicNS con el fragmento pequeño del pHHNS11C con el fin de obtener el plásmido mutante pHHVicNS V18A/R44K. De la misma forma se procedió a la ligación del fragmento de mayor tamaño del pHHNS11C con el fragmento pequeño del pHHVicNS obteniéndose el plásmido mutante pHHVicNS S195P.

## **1.2. Construcción de los plásmidos de la serie pGEM.**

Los plásmidos de la serie pGEM como pGEM-M1 EcoRI/ClaI y pGEM-NA AccI se generaron mediante un procedimiento de subclonaje. El plásmido pGEM-M1-5 se digirió con las enzimas de restricción ClaI y EcoRI, se rellenaron los extremos por incubación con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I y se circularizó por ligación. De este modo se eliminaron unas secuencias pertenecientes al genoma de SV40 que podrían interferir en los posteriores análisis. Al nuevo plásmido se le denominó pGEM-M1 EcoRI/ClaI.

Utilizando la misma estrategia se generó el plásmido pGEM-NA AccI. Para ello se utilizó el plásmido pGEM-NA digerido con la enzima de restricción AccI.

## **2. Cultivos celulares.**

### **2.1. Mantenimiento de cultivos celulares.**

Las líneas celulares MDCK y NIH 3T3 PKR<sup>-/-</sup> se cultivaron en medio DMEM suplementado con aminoácidos no esenciales y suero fetal bovino (SFB) al 5%. La línea celular HEK-293T se cultivó en medio DMEM suplementado con aminoácidos no esenciales y SFB al 10%. Por último, la línea celular Vero se cultivó en el medio comercial AIMV suplementado con aminoácidos no esenciales. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37° C y con 5% de CO<sub>2</sub>.

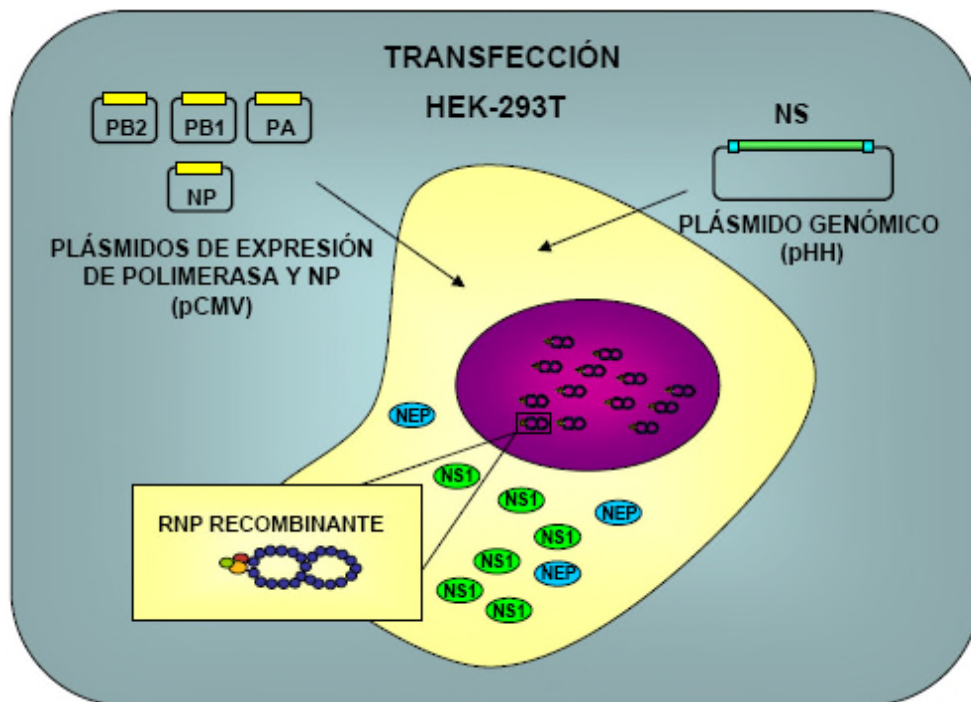
### **2.2. Infecciones.**

Las infecciones de células con los diferentes virus, tanto silvestres como recombinantes, se realizaron a una multiplicidad de infección (mdi) de 10 (alta multiplicidad) unidades formadoras de placa por célula (UFP/célula) o 10<sup>-3</sup> (baja multiplicidad), según se indique en cada experimento. Todas las infecciones se realizaron sobre monocapas de células en una confluencia en torno al 100% y subcultivadas el día anterior. Los inóculos de virus se prepararon en tampón PBS completo (PBSc) suplementado con 5 µg/ml de seroalbúmina bovina (SAB). Se retiró el medio de cultivo de las células, se realizó un lavado con PBSc y se añadió el inóculo viral. Se mantuvo el inóculo durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) para que tuviera lugar la adsorción del virus. Tras la hora de incubación se retiró el inóculo de

virus y se incubaron las células con medio DMEM libre de suero durante el tiempo y a la temperatura indicados en cada experimento. En los experimentos a baja multiplicidad de infección dicho medio se suplementó con 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de tripsina.

### 2.3. Transfecciones y reconstituciones de RNPs.

Tal y como se muestra en la [Figura 12](#), se cotransfectaron células HEK-293T con una mezcla de plásmidos que codifican las subunidades de la polimerasa (pCMVPB1, pCMVPB2 y pCMVPA), NP (pCMVNP) y el vRNA molde del que se trate (pHH\*) en una relación en masa de 1:1:0,2:4:0,2. La mezcla de plásmidos se transfectó mediante coprecipitación con fosfato cálcico ([Graham and van der Eb, 1973](#); [Wigler et al., 1977](#)).



**Figura 12. Reconstitución de RNPs recombinantes.** Se cotransfectaron células HEK-293T con los plásmidos de expresión de polimerasa viral y NP (pCMVs) junto con el plásmido pHH correspondiente en cada caso. Las transfecciones para los experimentos de *splicing* se realizaron usando el método de fosfato cálcico.

### 2.4. Fraccionamiento subcelular núcleo/citosol.

Para obtener extractos nucleares y citosólicos, se recogieron las células en tampón PBSc y se centrifugaron 5 min a 2500 rpm. Se realizó un lisado de células mediante un

tampón isotónico (150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris HCl pH 8.5) suplementado con 0.5% NP40, 2 mM VRC y 1 mM DTT. Se realizaron dos extracciones y centrifugaciones consecutivas tras las cuales se obtuvieron las fracciones citosólica en el sobrenadante y nuclear en el precipitado.

### **3. Técnicas virológicas.**

#### **3.1. Generación de *stocks* de trabajo.**

Se infectaron monocapas de células MDCK a baja mdi ( $10^{-2}$  o  $10^{-3}$  UFP/célula). Tras 36-40 horas de incubación a la temperatura correspondiente (32 o 37° C) y cuando el efecto citopático observado alcanzaba el 50% de la monocapa, se recogieron los sobrenadantes. Se centrifugaron durante 5 minutos a 4° C y 1400 rpm y los sobrenadantes se recogieron y se guardaron congelados a -80° C.

#### **3.2. Titulación de virus mediante ensayo de placa.**

Se infectaron monocapas de células MDCK con diluciones decimales seriadas de virus preparadas en tampón PBSc suplementado con 5 µg/ml SAB y se incubaron durante un mínimo de 48h a la temperatura correspondiente en cada caso y en un medio semisólido que contenía DMEM, 0.7% agar, 1% DEAE-dextrano y 2.5 µg/ml de tripsina. Cuando las placas de virus resultaron visibles, las células se fijaron con 10% formaldehído, se tiñeron con una solución de cristal violeta y se hizo un recuento de las placas.

Para el cálculo del título viral se utilizó la siguiente formula:

$$\text{TÍTULO} = \text{N}^{\circ} \text{ de placas} \times \frac{1}{\text{Factor de dilución}} \times \frac{1}{\text{Volumen de inóculo vírico (ml)}}$$

#### **3.3. Aislamiento de virus a partir de placa.**

Se realizó un ensayo de placa y se seleccionó la dilución en la que las placas de virus estuvieran suficientemente separadas entre sí. Se utilizaron pipetas Pasteur de cristal con filtro para picar clones aislados. Cada clon se resuspendió en 500 µl de PBSc

suplementado con 5 µg/ml de SAB y dicha dilución se usó para inocular una nueva monocapa de células MDCK y poder generar así una *stock* de virus a partir de un único clon.

### 3.4. Curvas de crecimiento.

Se infectaron monocapas de células MDCK, Vero o NIH 3T3 PKR<sup>-/-</sup> a la multiplicidad especificada en cada experimento y se recogieron alícuotas del sobrenadante a distintos tiempos post-infección. Posteriormente, se analizó la infectividad de dichos sobrenadantes realizando las correspondientes titulaciones tal y como se indica en el apartado 3.2 de Materiales y Métodos.

### 3.5. Purificación de virus.

Los sobrenadantes de células infectadas se clarificaron centrifugándolos 10 min a 4° C y 10000 rpm. Posteriormente fueron sedimentados a través de un gradiente de capas de sacarosa del 50% y 33% en TNE (100mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 7.5) durante 1 hora a 4° C y 40000 rpm en el rotor SW41. Se recogió la interfase del 50 al 33%, se diluyó en tampón TNE y se centrifugó a través de un colchón de sacarosa al 33% en TNE durante 1 hora a 4° C y 40000 rpm en el rotor SW41. El sedimento se resuspendió en tampón Laemmli para su análisis por geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

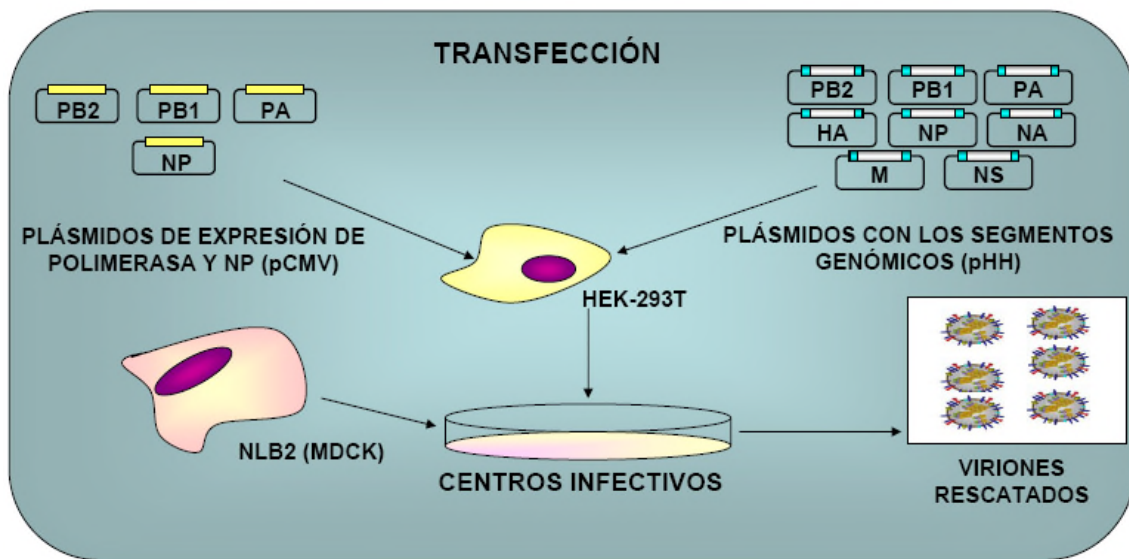
### 3.6. Experimentos de cambio de temperatura (*shift up/shift down*).

Se infectaron monocapas de células con virus mutante y control a alta mdi. La mitad de los cultivos se incubaron a temperatura permisiva (32° C) y la otra mitad a temperatura restrictiva (39° C). A distintos tiempos post-infección los cultivos incubados a 32° C se transfirieron a 39° C, mientras que los que se incubaron inicialmente a 39° C se transfirieron a 32° C. Todos los cultivos se mantuvieron en incubación hasta que se cumplió un ciclo infectivo. En ese momento se recogieron los sobrenadantes y se analizó su infectividad a temperatura permisiva.

En paralelo con los experimentos de *shift up/shift down* se infectaron monocapas subconfluentes de células y se fijaron a cada tiempo de cambio de temperatura para su



posterior análisis por inmunofluorescencia tal y como se explica en el apartado 5.3 de Materiales y Métodos.



**Figura 13. Rescate de virus recombinantes por medio de la cotransfección de plásmidos.** Se cotransfectaron células HEK-293T con los ocho plásmidos que codifican los segmentos virales (pHH) y los plásmidos de expresión de polimerasa viral y NP (pCMVs). De esta forma si en una única célula se encuentran todos estos elementos, se da la reconstitución de las ocho RNPs virales que al replicar y transcribir darán lugar a todos los productos virales necesarios para la obtención de una progenie viral.

### 3.7. Rescate de virus recombinantes con mutaciones puntuales.

Se utilizó el protocolo descrito (Neumann et al., 1999) pero adaptado y modificado para rescatar la cepa A/Victoria/3/75 tal y como se resume en la **Figura 13**. Brevemente, se cotransfectaron células HEK-293T con los plásmidos pHHvic con los genes PB1, PB2, PA, NP, NA y NS1 así como los pHHWSN correspondientes a HA y M. Por actuación de la RNA polimerasa I celular estos plásmidos dan lugar a los ocho segmentos virales. Además, se cotransfectaron los plásmidos pCMV-PB1, -PB2, -PA y -NP que dan lugar a la expresión de las tres subunidades de la polimerasa viral y NP. La transfección se llevó a cabo a 32° C y usando el reactivo comercial FuGene (Roche) según las indicaciones del fabricante. A las 16 horas post-transfección se tripsinizaron las células transfectadas y se cultivaron junto con un exceso de células MDCK en medio DMEM sin suero y suplementado con 2,5 µg/ml de tripsina. Cuando el efecto citopático fue de alrededor de un 50%, se recogió el sobrenadante, se realizó un ensayo de placa y se aislaron clones individuales como se describe en los apartados 3.2 y 3.3 de Materiales y Métodos. Se prepararon lotes de trabajo de dichos clones, a partir de los

cuales se aisló el RNA, se amplificó el segmento NS de cada clon por RT-PCR y se secuenció tal y como se describe en los apartados 4.1.1 y 4.4.3 de Materiales y Métodos.

### **3.8. Microscopia electrónica de células infectadas.**

Se infectaron monocapas de células MDCK con virus mutante o control a alta mdi. La mitad de los cultivos se incubaron a temperatura permisiva (32° C) y la otra mitad a temperatura restrictiva (39° C). A los tiempos indicados en cada caso, se lavaron las células y se les añadió una solución fijadora compuesta por una mezcla de 2% Glutaraldehído y 1% Ác. Tánico en 0.4 M HEPES pH 7.12. Se mantuvieron con dicha solución fijadora durante 1 hora a TA, tras la cual se recogieron las células y se centrifugaron 3 min a TA y 10000 rpm. Se eliminó la solución fijadora y se realizaron 3 lavados con el tampón 0.4 M HEPES pH 7.12. Tras este proceso de fijación se continuó con un protocolo clásico de inclusión, corte, tinción y visualización por microscopía electrónica previamente descrito ([Salanueva et al., 1999](#)). Brevemente, una vez lavadas las células se las sometió a un proceso de post-fijación con una mezcla de 1% tetróxido de osmio y 0.8% ferricianida potásica en agua destilada durante 1 hora a 4° C. Tras 4 lavados con el tampón 0.4 M HEPES pH 7.12, las muestras se trataron con 2% acetato de uranilo, se lavaron nuevamente y se sometieron a deshidratación realizando lavados de 10 min a 4° C con concentraciones crecientes de acetona (50, 70, 90 y 100%). Posteriormente se incluyeron en una resina epoxi EML-812 (Taab Laboratorios) durante un día a TA. La polimerización de las muestras incluidas en la resina se realizó durante 3 días a 60° C. Las secciones ultrafinas (20 a 30 nm de grosor) obtenidas en el ultramicrotomo se recogieron sobre rejillas cubiertas de plástico y láminas de carbón, y su tinción se realizó con acetato de uranilo saturado y citrato de plomo. Tras el secado, las muestras se estudiaron usando un microscopio electrónico JEOL 1200 EX II.

### **3.9. Rescate de título viral mediante el uso de neuraminidasa exógena.**

Para el rescate de virus deficiente en neuraminidasa, se infectaron cultivos de células MDCK a multiplicidad de infección de  $10^{-3}$  UFP/célula y se incubaron en DMEM suplementado con 2.5 µg/ml de tripsina y 0.5 mU/ml de neuraminidasa de

*Clostridium perfringens* (Sigma). Los sobrenadantes se recogieron cuando el efecto citopático era aparente y se titularon a temperatura permisiva.

### **3.10. Infecciones mixtas.**

Se infectaron monocapas de células MDCK al mismo tiempo con dos virus con la finalidad de estudiar si el virus mutante se comportaba como dominante negativo frente al virus control. Para asegurarse de que las células que hubieran sido infectadas por el virus control también lo estaban siendo por el virus mutante, se infectaron las monocapas a una multiplicidad de 2 con el virus control y de 10 con el virus mutante. Tras los tiempos indicados en cada experimento se recogieron los sobrenadantes y se analizó su infectividad por ensayo de placa tal y como se indica en el apartado 3.2 de Materiales y Métodos.

## **4. Análisis de RNAs.**

### **4.1. Purificación de RNA.**

#### **4.1.1. Aislamiento de RNA a partir de viriones.**

Los viriones presentes en el sobrenadante de células infectadas previamente se incubaron durante 1 hora a 37° C en TNE, 0.5% SdS y proteinasa K (1 µg/ml). A continuación, las muestras se fenolizaron dos veces y precipitaron con 2.5 volúmenes de etanol absoluto durante una noche a -20° C. Al día siguiente los precipitados se lavaron en dos ocasiones con 2.5 volúmenes de etanol al 75%, se secaron en el *speed-vac* y se resuspendieron en un tampón que contenía 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 U/µl del inhibidor de RNAsas HPRI (Amersham) y 50 mM Tris HCl pH 7.5. Se trataron las muestras con DNasa libre de RNAsas (1U/µg DNA) durante 1h a 37° C, se volvieron a fenolizar dos veces y se precipitaron con etanol tal y como se ha descrito anteriormente.

#### **4.1.2. Aislamiento de RNA total celular.**

El RNA total celular se extrajo usando el reactivo ULTRASPEC RNA Isolation Reagent (Biotechx) siguiendo en todo momento las indicaciones del fabricante.

### **4.1.3. Aislamiento de RNA de fracciones nucleares y citosólicas.**

Las fracciones nuclear y citosólica se obtuvieron como se indica en el apartado 2.4 de Materiales y Métodos. El RNA de la fracción citosólica se aisló como se describe en el apartado 4.1.1, mientras que el de la fracción nuclear se obtuvo utilizando el reactivo ULTRASPEC RNA Isolation Reagent (Biotech).

### **4.2. Purificación de RNA mensajero (mRNA) por cromatografía de oligo-dT-celulosa.**

La purificación del mRNA total se realizó mediante cromatografía de afinidad a una resina de oligo-dT celulosa (Sigma). Las muestras de RNA total obtenidas previamente y resuspendidas en H<sub>2</sub>O DEPC se llevaron hasta 0.5% sarcosil y se mantuvieron a 100° C durante 3 min. A continuación se llevaron a un buffer con concentraciones finales de 0.5 M ClNa, 0.5% sarcosil y 10 mM Tris HCl pH 7.5. Tras equilibrar la resina en el mismo tampón se aplicó la muestra, se incubó 1 min y se centrifugó 1 min a 1500 rpm. Lo que no quedó retenido en este primer paso se volvió a aplicar a la resina y al segundo sobrenadante lo denominamos fracción poly A<sup>-</sup>. Tras varios lavados con el tampón de unión, se eluyó el mRNA en dos pasos: primero se aplicó 1% sarcosil y tras su incubación y centrifugación se añadió un volumen equivalente de H<sub>2</sub>O DEPC. Dichas eluciones se mezclaron y se las denominó fracción poly A<sup>+</sup>.

En los experimentos de análisis del *splicing*, en los que la pureza del mRNA es un factor crítico, la fracción poly A<sup>+</sup> se sometió a un nuevo paso de cromatografía sobre oligo-dT-celulosa para intentar purificar el mensajero lo máximo posible.

### **4.3. Análisis de la estabilidad de mRNAs virales.**

Para estudiar la estabilidad de los mRNAs de NS1 y NEP se realizó una transfección de los plásmidos necesarios para la reconstitución de RNPs tal y como se explicó en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos. Tras 36h de reconstitución, se cambió el medio a las células añadiendo DMEM suplementado con 50 µg/ml de Actinomicina D (Sigma). A los distintos tiempos post-tratamiento indicados, se prepararon extractos de RNA total celular y se purificó el mRNA para analizar la

acumulación de los mRNAs de NS1 y NEP siguiendo las indicaciones de los apartados 4.1.2 y 4.2 de Materiales y Métodos.

Con la finalidad de controlar de alguna forma el factor de recuperación de la extracción del RNA y la cromatografía oligo-dT-celulosa se añadió a todas las muestras una cantidad conocida de un RNA transcrito *in vitro* que contiene una secuencia poly A<sup>+</sup>, tal y como se explica más adelante.

#### **4.4. Detección y cuantificación del RNA.**

##### **4.4.1. Hibridación Dot-Blot.**

Los RNAs purificados como se ha descrito se mezclaron con un buffer desnaturizante que contenía 10XSSC y 7.5% formaldehído (Sigma) y preparado en H<sub>2</sub>O DEPC. Una vez hervidas las muestras, se fijaron en un filtro de nylon y se hibridaron usando sondas específicas para cada caso preparadas tal y como se explicará en el apartado 6 de Materiales y Métodos.

Para la hibridación, se incubó el filtro en un tampón de prehibridación (6XSSC, 0.5% SdS, 5X Denhardt's, 40% Formamida desionizada (Sigma) y 100 µg/ml DNAss en H<sub>2</sub>O DEPC) a 37° C durante al menos 2h. Posteriormente se desnaturizó la sonda manteniéndola a 100° C durante 3 min y se añadió sobre el tampón de prehibridación. La incubación se mantuvo durante toda la noche a 37° C. Al día siguiente se recuperó la sonda no hibridada y se realizaron lavados usando diferentes tampones de lavado según cada hibridación. En todas las hibridaciones se comenzó haciendo lavados de 30 min a 37° C con un tampón que contenía 6XSSC y 0.5% SdS en H<sub>2</sub>O DEPC. Tras realizar exposiciones con pantallas de Phosphorimager se evaluó la necesidad de seguir realizando lavados dependiendo de la relación señal/ruido. En los casos en los que se necesitó realizar lavados más estrictos se utilizaron tampones con una menor concentración tanto de sales como de detergente hasta llegar al tampón 0.5XSSC y 0.1% SdS en H<sub>2</sub>O DEPC. Una vez alcanzado este punto y si la relación señal/ruido seguía siendo baja, se realizaron lavados con dicho tampón pero subiendo la temperatura de manera gradual hasta alcanzar los 65° C. En todo el proceso de lavados entre uno y otro se monitorizó la relación señal/ruido realizando exposiciones con pantallas de Phosphorimager.

#### 4.4.2. Ensayo de protección a ribonucleasas.

Los RNAs purificados como se ha descrito se precipitaron junto a un exceso molar de una sonda específica. Tras lavar los precipitados, se resuspendieron en un buffer de hibridación (80% formamida desionizada, 0.4 M NaCl, 5 mM EDTA, 40 mM Pipes pH 6.4) y se cubrieron las mezclas con aceite mineral. Se incubaron primero durante 5 min a 85° C y posteriormente a 50° C durante toda una noche. Al día siguiente se realizó un tratamiento mixto con las ribonucleasas RNAsa A y RNAsa T1 durante 2h a 37° C en un tampón que contenía 0.3 M NaCl, 5 mM EDTA y 10 mM Tris HCl pH 7.5. Ambas ribonucleasas cortan RNA de cadena simple, pero mientras que la RNAsa A lo hace después de citosinas (C) y uridinas (U), la RNAsa T1 corta después de guaninas (G). Tras un tratamiento con proteinasa K y SdS, fenolización y precipitación tal y como se describe en el apartado 4.1.1 de Materiales y Métodos, los RNAs se resuspendieron en tampón de formamida (Bionova) y se analizaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-6 M Urea y posterior autoradiografía.

#### 4.4.3. RT-PCR.

Se utilizó la técnica de RT-PCR con la finalidad de obtener el cDNA del segmento 8 a partir del RNA aislado de los virus recombinantes. Dicho cDNA fue usado posteriormente para comprobar las mutaciones introducidas en los virus mutantes. Se utilizó el kit Titan One Tube RT-PCR System (Roche) y oligonucleótidos específicos para amplificar el segmento 8 del virus, siguiendo siempre las recomendaciones del fabricante. Los oligonucleótidos utilizados se presentan en la siguiente tabla.

3' term NS (-)	5' ACAAGGGTGT TTTTATCAT 3'
5' term NS (+)	5' AGCAAAAGCAGGGTGACAAA 3'

**Tabla 3.** Oligonucleótidos usados para la amplificación del segmento 8 de la cepa A/Victoria/3/75 por RT-PCR.

La técnica de RT-PCR se utilizó también para la obtención de un molde de cDNA de rRNA 28S que se utilizaría posteriormente para generar una sonda marcada radiactivamente tal y como se explica en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos.

## **5. Análisis de proteínas.**

### **5.1. Marcaje metabólico *in vivo* de proteínas virales.**

El marcaje *in vivo* de proteínas virales se llevó a cabo según el protocolo previamente descrito (Zurcher et al., 2000). Brevemente, las células fueron infectadas o transfectadas para la reconstitución de RNPs, según cada experimento. A distintos tiempos post-infección o transfección se lavaron las células y se mantuvieron durante 30 min en medio DMEM carente de los aminoácidos metionina y cisteína. A continuación, se incubaron las células durante 1h con el mismo medio suplementado con <sup>35</sup>S-Met/Cys (200 µCi/ml). Tras el marcaje, se recogieron los extractos totales en tampón Laemmli y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida y autoradiografía.

En los experimentos de inmunoprecipitación de proteínas marcadas *in vivo*, se recogieron las células en tampón PBSc, se prepararon extractos en tampón TNE-1% NP40 y se continuó con el protocolo tal y como se describe en el apartado 5.5 de Materiales y Métodos.

### **5.2. Deglicosilación de proteínas presentes en extractos celulares.**

En algunos experimentos, tras el marcaje *in vivo* de proteínas virales se realizó un tratamiento de deglicosilación. Para ello se recogieron las células en tampón PBSc y se prepararon extractos en tampón TNE-1% NP40. Se les añadió un tampón denominado *Glycoprotein Denaturing Buffer* (New England Biolabs) y se desnaturalizaron las muestras hirviéndolas durante 10 min. Se incubaron los extractos con la enzima PNGase F (New England Biolabs) durante 3h a 37° C según las indicaciones del fabricante y se analizaron los resultados por electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior autoradiografía.

### **5.3. Inmunofluorescencia.**

Se prepararon cultivos de MDCK o HEK 293-T sobre cristales de 10 mm de diámetro. Tras su infección o transfección, las células se lavaron con PBSc, se fijaron durante 20 min con formaldehído al 3% a TA y se permeabilizaron con 0.5% Triton X-100 durante 5 min. Las células se bloquearon con PBS 3% SAB y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes en cada experimento durante 1h a TA. Tras realizar 3 lavados con PBS 0.05% SAB, se incubaron con anticuerpos secundarios

marcados con fluoróforos durante otra hora a TA y en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con PBSc y las preparaciones se montaron con ProLong (Invitrogen). Las imágenes se tomaron con un microscopio de fluorescencia Leica.

Para el experimento de detección por inmunofluorescencia de la HA presente en la superficie celular, se fijaron cultivos de células durante 20 min a TA con formaldehído al 3% y se realizó la inmunofluorescencia sin someter a las células al tratamiento de permeabilización previo.

### **5.4. Western Blot.**

Los extractos totales de células se separaron mediante electroforesis en gel de SdS-poliacrilamida y se transfirieron a membranas de Immobilon, las cuales se saturaron con 3% SAB o 3% leche desnatada en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante 1 h a TA. Después de realizar 3 lavados de 20 minutos cada uno con PBS-0.25% Tween 20, se incubaron otra hora con IgG de cabra anti-conejo, anti-ratón o anti-rata conjugados con peroxidasa. Tras realizar otros 3 lavados de 20 minutos con PBS-0.25% Tween 20 se revelaron mediante quimioluminiscencia (Amersham).

### **5.5. Inmunoprecipitación.**

Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo según el protocolo descrito previamente ([Falcón et al., 1999](#)). Brevemente, por una parte se prepararon extractos solubles de células infectadas, transfectadas o controles sin tratamiento, usando el tampón TNE con 1% NP-40. Por otra parte, se preformaron los complejos de la resina, proteína A-Sepharosa, y el anticuerpo específico. Finalmente, se incubaron los extractos con los complejos de anticuerpo preformados. Tras 10 lavados con el mismo tampón de incubación, el material unido se eluyó con tampón Laemmli y las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y autoradiografía.



## 6. Preparación de sondas para detección de RNAs.

### 6.1. Sondas de DNA.

#### 6.1.1. Preparación del molde 28S.

Se aisló RNA total de células MDCK usando el reactivo ULTRASPEC RNA Isolation Reagent siguiendo las especificaciones del fabricante. Dicha muestra de RNA celular se utilizó como molde para la amplificación de un fragmento de alrededor de 100 pb de DNA por RT-PCR tal y como se explica en el apartado 4.4.3 de Materiales y Métodos. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de un fragmento correspondiente al RNA 28S, que se muestran en la siguiente tabla.

28S 3'	5' GACGAGGCATTTGGCTACCTTA 3'
28S 5'	5' TTCTGCCAGTGCTCTGAATGT 3'

**Tabla 4.** Oligonucleótidos usados para la amplificación de un fragmento de 100 pb del RNA 28S por RT-PCR.

#### 6.1.2. Síntesis de la sonda 28S por PCR asimétrica.

La sonda 28S se generó por copia reiterada del molde utilizando un único oligo de PCR en presencia de  $\alpha^{32}\text{P}$ -dTTP. El oligonucleótido usado fue el 28S 3' (Tabla 4), de secuencia idéntica al mRNA 28S.

### 6.2. Sondas de RNA.

#### 6.2.1. Molde para las ribosondas de NP, M, NA y marcador de recuperación de la cromatografía oligo-dT-celulosa.

Se linearizaron los plásmido pGNP, pGEM-M1 EcoRI/ClaI y pGEM-NA AccI con el enzima de restricción EcoRI o HindIII según se quisiera obtener un molde para transcribir con la RNA polimerasa SP6 o T7. En el caso del plásmido pBSK As, se linearizó usando el enzima de restricción KpnI para ser transcrito posteriormente con la RNA polimerasa T3. Se purificaron los plásmidos digeridos extrayéndolos a partir de gel de agarosa y se les sometió a un tratamiento con proteinasa K, SdS, fenolización y

posterior precipitación con etanol absoluto tal y como se describe en el apartado 4.1.1 de Materiales y Métodos.

### **6.2.2. Molde para la ribosonda de los ensayos de protección a ribonucleasas.**

Se amplificó por PCR un fragmento de 192 nucleótidos de longitud perteneciente a la secuencia del gen NS. Para ello se usó como molde el plásmido pHHVicNS y los oligonucleótidos denominados T3-X-NS 133-16 y 5'NS (+).

T3-X-NS 133-116	5' <i>CAATTAACCCTCACTAAAGGG</i> <u>CATAGTCCAGATGCATCGGA</u> <u>CCGTAGCCGATCAAGGAATGGG</u> 3'
5' term NS (+)	5' AGCAAAAGCAGGGTGACAAA 3'

**Tabla 5.** Oligonucleótidos usados para la amplificación de un fragmento del gen de NS por PCR. Los nucleótidos en cursiva indican la secuencia del promotor de la RNA polimerasa T3, mientras que la zona subrayada indica la presencia de una secuencia irrelevante y que no tiene complementariedad con el plásmido molde.

### **6.2.3. Transcripciones *in vitro* de las ribosondas.**

La transcripción *in vitro* de ribosondas marcadas radiactivamente se llevó a cabo usando los moldes descritos anteriormente en los apartados 6.2.1 y 6.2.2 de Materiales y Métodos. Para la detección de los vRNAs virales se usaron los moldes digeridos con el enzima HindIII y transcritos con la RNA polimerasa T7, mientras que para la detección de los mRNAs se utilizaron los moldes digeridos con EcoRI y transcritos con la RNA polimerasa Sp6. Para generar tanto la ribosonda de los experimentos de ensayo de protección a ribonucleasas como la del factor de recuperación de la cromatografía sobre oligo-dT-celulosa, se utilizó la RNA polimerasa T3.

Todas las reacciones de transcripción *in vitro* se realizaron a 37° C durante 2h en un tampón de transcripción comercial (Roche) común para las tres RNA polimerasas. La mezcla de reacción contenía: H<sub>2</sub>O DEPC, entre 300 y 600 ng de molde de DNA, tampón de transcripción 1X (6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 2 mM espermidina, 40 mM Tris-HCl pH 8), 0.5 mM de una mezcla de ATP, CTP y UTP, 10 μM GTP, 20 unidades del inhibidor de RNAsas HPRI, 10 unidades de la RNA polimerasa T7, T3 o SP6 (Roche) y 25 μCi de α<sup>32</sup>P-GTP (400mCi/pmol).

#### **6.2.4. Purificación de las ribosomas.**

Todas las ribosomas generadas anteriormente se sometieron a un tratamiento con 10 unidades de DNAsa libre de RNAsas durante 1h a 37° C. Posteriormente se fenolizaron y se purificaron a través de columnas preparadas con la resina Sephadex G50-80 (Sigma) y saturadas con 100 µg de RNA de levadura.

Además de dicha purificación, la ribosoma utilizada para los ensayos de protección a ribonucleasas se purificó más exhaustivamente mediante extracción a partir de gel desnaturante de poliacrilamida-6 M Urea. Para ello se escindió la zona de gel correspondiente a la banda de la ribosoma y se incubó en un tampón de extracción (0.5 M AcNH<sub>4</sub>, 10 mM Ac<sub>2</sub>Mg y 0.1% SdS en H<sub>2</sub>O DEPC) durante una noche a 37° C. Tras centrifugación durante 5 min a 12000 rpm a TA se recogió el sobrenadante y se precipitó con etanol absoluto tal y como se describe en el apartado 4.1.1 de Materiales y Métodos.



## ***Resultados***

---

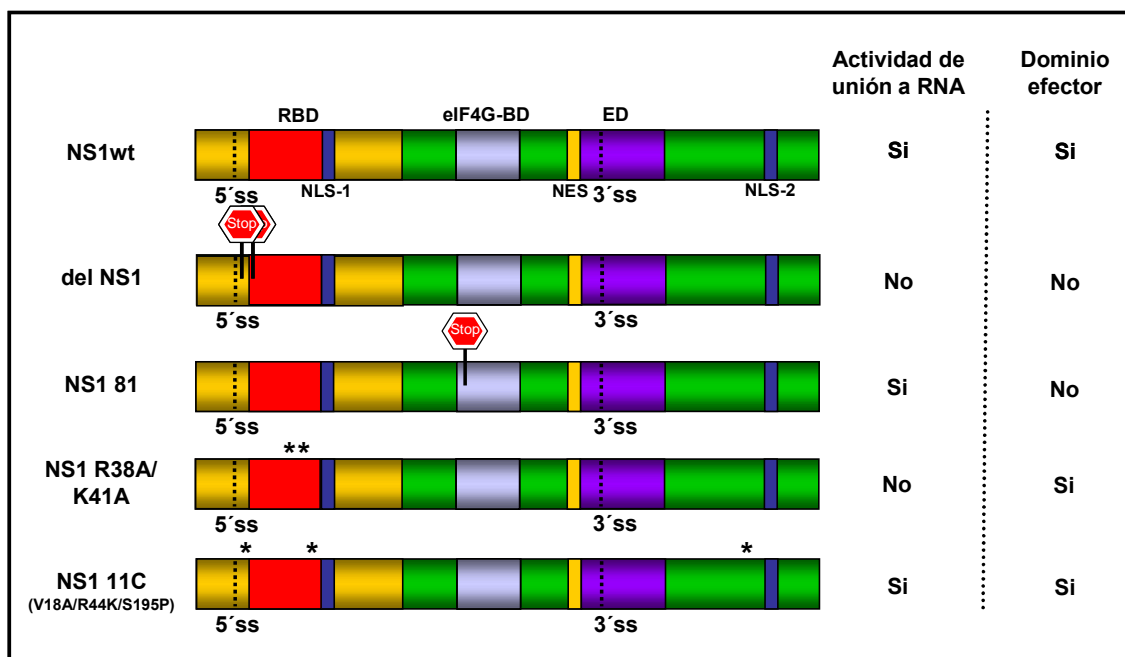


## 1. IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA NS1 EN LOS PROCESOS DE MADURACIÓN Y TRANSPORTE DE LOS mRNAs DERIVADOS DE SU PROPIO SEGMENTO

A lo largo de las últimas tres décadas son muchos los trabajos que han tenido como objetivo estudiar la implicación de la proteína NS1 en los procesos de maduración y transporte tanto de mRNAs celulares como virales. La gran mayoría de los experimentos se han realizado en sistemas muy alejados de la infección como son ensayos *in vitro* o sobreexpresión de genes marcadores junto con NS1, usando para ello plásmidos con promotores de la RNA PolII celular. Todos estos estudios han generado una gran cantidad de resultados, algunos de los cuales resultan contradictorios. Con estos antecedentes, en el laboratorio hemos intentado analizar la implicación de NS1 en esos procesos utilizando para ello sistemas más cercanos a la infección.

### 1.1. Utilización del sistema de reconstitución de RNPs para expresar diferentes replicones derivados del segmento NS.

Con el objetivo final de responder a la cuestión de si la proteína NS1 regula la maduración y el transporte de los mRNAs derivados de su propio segmento, se utilizó el sistema de reconstitución de RNPs. Este sistema consiste en la cotransfección de los plásmidos que expresan la polimerasa viral y NP junto con el plásmido que da lugar al vRNA molde, tal y como se describe en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos (Figura 12). De esta forma se establece un sistema de transcripción-replicación viral transitorio que permite estudiar los procesos de transcripción, replicación y expresión génica virales sin tener en cuenta otros procesos que tienen lugar durante la infección (Mena et al., 1996; Ortega et al., 2000). Por lo tanto, nos permite trabajar en un sistema experimental más sencillo que la infección *per se*, pero reflejando lo que ocurre en el sistema de infección durante los pasos de transcripción y replicación. Mediante la utilización de diferentes replicones del segmento NS hemos evaluado la implicación de la proteína NS1 en el *splicing* de sus transcritos primarios, así como en el transporte núcleo-citosólico de los mRNAs derivados de éstos. En la Figura 14 se muestra de manera esquematizada cada uno de los replicones utilizados para el estudio. También se muestran sus características principales respecto de unión a RNA y actividad del dominio efector.



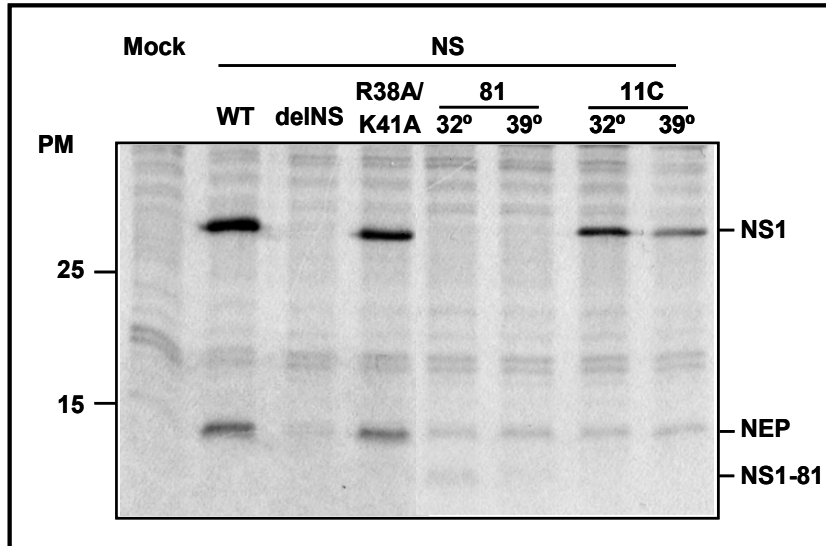
**Figura 14. Estructura y características de las distintas proteínas NS1 expresadas a partir de los replicones NS.** Se indica la localización del dominio de unión a RNA (RBD), dominio efector (ED), dominio de unión a eIF4G (eIF4G-BD), las señales de localización nuclear (NLS-1 y NLS2), la señal de exportación nuclear (NES) y los sitios de splicing (5'-ss y 3'-ss). Se indican también las posiciones de los codones stop introducidos por mutación en los replicones delNS1 y NS 81. Las mutaciones presentes en los replicones R38A/K41A y 11C se indican mediante asteriscos.

### 1.1.1. Análisis de la síntesis de las proteínas NS1 y NEP a partir de los distintos replicones.

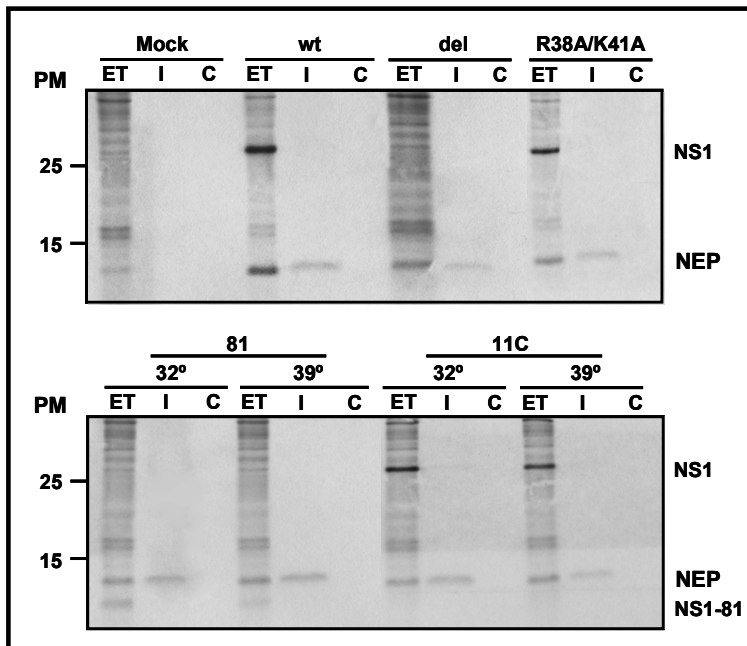
Antes de realizar el estudio de los RNAs derivados de cada replicón se analizó el correcto comportamiento de los replicones en lo que a la expresión de los mismos se refiere, comenzando por la síntesis de las proteínas NS1 y NEP. Se llevaron a cabo reconstituciones de RNPs con cada tipo de replicón y tras 36 horas se realizó un pulso de marcaje radiactivo con  $^{35}\text{S}$ -Met/Cys, tal y como se describe en el apartado 5.1 de Materiales y Métodos. Los resultados mostrados en la **Figura 15** indicaron la aparición de dos bandas en la muestra del replicón wt que no estaban presentes en la muestra *Mock* y que por su movilidad se correspondían con las proteínas NS1 y NEP. Como era de esperar, se observó una síntesis correcta de la proteína NS1 en todos los replicones excepto en el replicón delNS1. Además, la síntesis de NS1 resultaba ser de niveles comparables en todos los casos. Hay que destacar que la proteína deletada NS1 81, que deriva de la expresión del replicón NS 81, contiene muy bajo número de residuos de Met y Cys, y de ahí el menor marcaje observado.



**Figura 15. Síntesis de las proteínas codificadas por los distintos replicones NS.** Se transfectaron o pseudotransfectaron (Mock) monocapas de células HEK-293T subconfluentes con los plásmidos adecuados para establecer la reconstitución de RNPs de los distintos



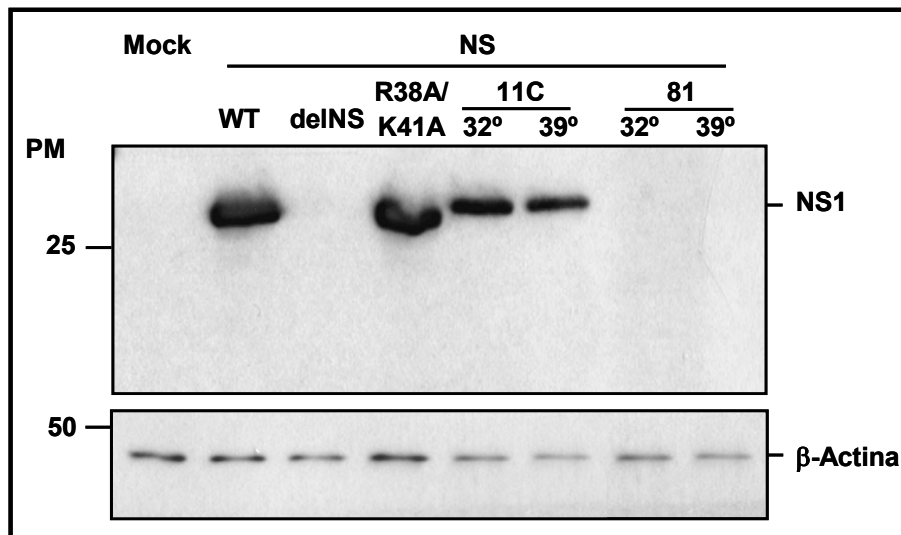
replicones. A las 36 hpt se realizó un marcaje metabólico con <sup>35</sup>S Met-Cys durante 1h y se prepararon extractos totales de células. Dichos extractos se analizaron mediante electroforesis en gels de poliacrilamida y posterior autoradiografía. Las células que contenían los replicones NS 81 y 11C se incubaron tanto a temperatura permisiva (32° C) como restrictiva (39° C). La posición de las proteínas virales NS1 y NEP se indica en la parte derecha del panel, mientras que la movilidad de los marcadores de peso molecular (PM) se muestra en la parte izquierda.



**Figura 16. Síntesis de la proteína NEP codificada por los distintos replicones NS.** Se transfectaron o pseudotransfectaron (Mock) monocapas de células HEK-293T subconfluentes con los plásmidos adecuados para establecer la reconstitución de RNPs de los distintos replicones. A las 36 hpt se realizó un marcaje metabólico con <sup>35</sup>S Met-Cys durante 1h y se prepararon extractos solubles de células. Se inmunoprecipitaron los extractos usando un anticuerpo específico frente a

NEP y un anticuerpo irrelevante como control. Dichos inmunoprecipitados se analizaron mediante electroforesis en gels de poliacrilamida y posterior autoradiografía. Las células que contenían los replicones NS 81 y 11C se incubaron tanto a temperatura permisiva (32° C) como restrictiva (39° C). La posición de las proteínas virales NS1 y NEP se indica en la parte derecha del panel, mientras que la movilidad de los marcadores de peso molecular (PM) se muestra en la parte izquierda. ET, extractos totales; I, inmunoprecipitado con anticuerpo frente a NEP; C, inmunoprecipitado con anticuerpo control.

Para confirmar la correcta expresión de la proteína NEP, se analizó su presencia en inmunoprecipitados de cultivos donde se habían reconstituido RNPs de los distintos replicones, tal y como se describe en los apartados 5.1 y 5.5 de Materiales y Métodos. Para ello se utilizaron un anticuerpo específico frente a la proteína NEP y un anticuerpo irrelevante como control. Tal y como se observa en la **Figura 16** la síntesis de NEP fue correcta y de niveles comparables en todos los casos excepto en el replicón delNS, en el que se sintetizaba una menor cantidad de NEP. Esta diferencia podría deberse a que dicho replicón no expresa la proteína NS1, que ha sido implicada en el aumento de la traducibilidad de los mRNAs virales. Por lo tanto, al no expresar NS1 indirectamente expresaría menos NEP.

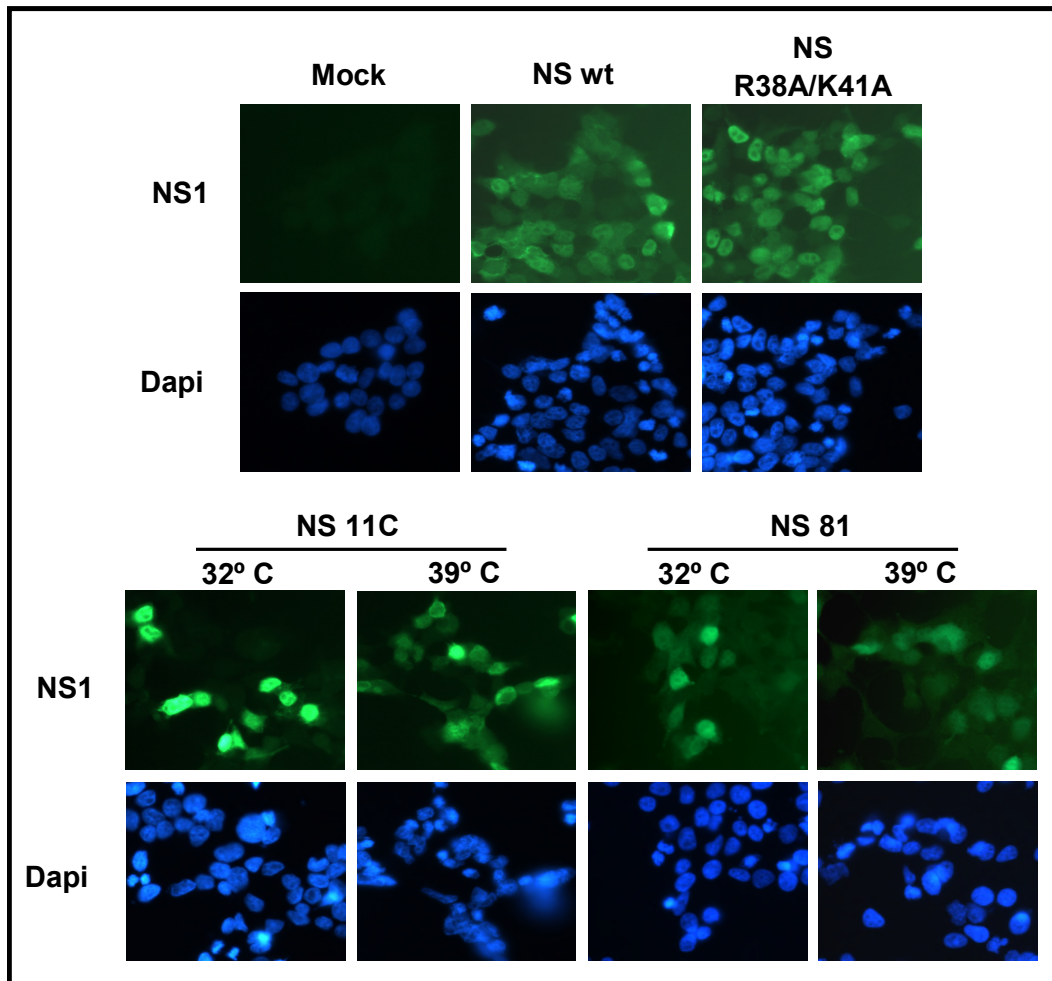


**Figura 17. Acumulación de la proteína NS1 codificada por los distintos replicones NS.** Se transfectaron o pseudo-transfectaron (Mock) monocapas de células HEK-293T subconfluentes con los plásmidos adecuados para establecer la reconstitución de RNPs de los distintos replicones. A las 36 hpt se prepararon extractos totales de células y se analizó la acumulación de la proteína NS1 por WB usando un anticuerpo policlonal específico frente a la proteína NS1. Como control de carga se realizó un WB con un anticuerpo monoclonal frente a  $\beta$ -actina. Las células que contenían los replicones NS 81 y 11C se incubaron tanto a temperatura permisiva (32° C) como restrictiva (39° C). La posición de las proteínas NS1 y  $\beta$ -actina se indica en la parte derecha del panel, mientras que la movilidad de los marcadores de peso molecular (PM) se muestra en la parte izquierda. El anticuerpo utilizado frente a NS1 no detecta la proteína deletada NS1 81.

### 1.1.2. Análisis de la acumulación y localización de las distintas formas de NS1.

Una vez confirmada la correcta síntesis de las proteínas NS1 y NEP, se analizó también la acumulación y localización subcelular de NS1. Para ello se realizaron experimentos de reconstitución de RNPs con cada uno de los replicones y tras 36 horas

se analizó la acumulación y localización de NS1 por WB e IF respectivamente, tal y como se describe en los apartados 5.4 y 5.3 de Materiales y Métodos. Al igual que se observaba en los experimentos de síntesis, los niveles de NS1 eran comparables en todos los casos (Figura 17). Cabe destacar que el anticuerpo utilizado frente a la proteína NS1 es incapaz de detectar la proteína truncada NS1 81 por lo que no podemos confirmar que se acumule en las mismas cantidades que la proteína NS1 silvestre.



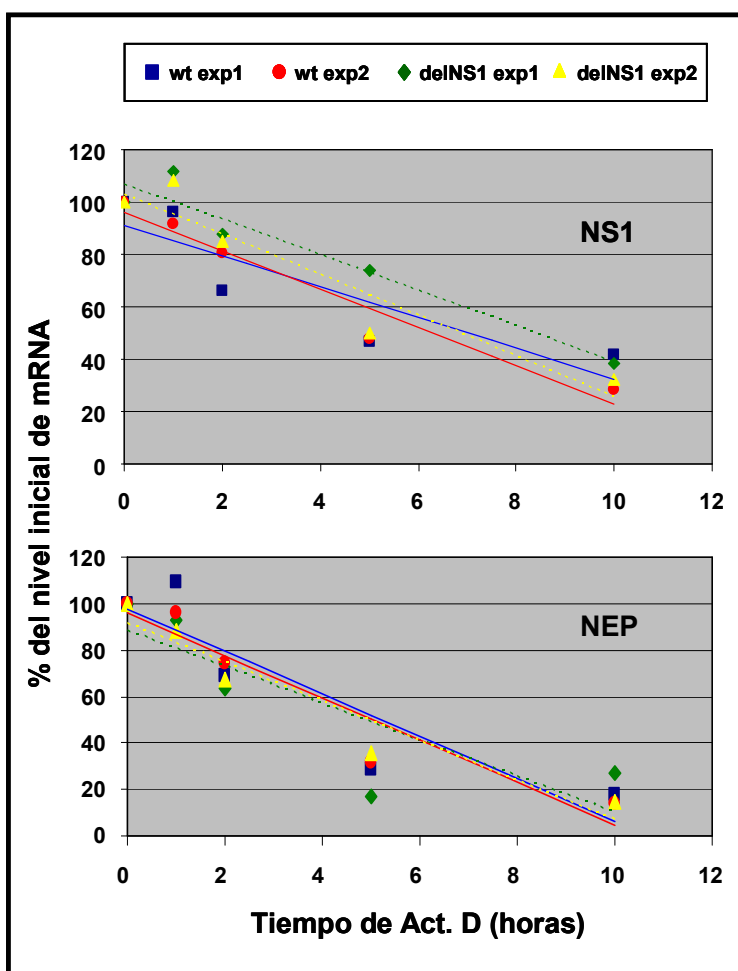
**Figura 18. Localización intracelular de la proteína NS1 expresada a partir de los distintos replicones NS.** Se transfectaron o pseudo-transfectaron (Mock) monocapas de células HEK-293T subconfluentes con los plásmidos necesarios para establecer la reconstitución de RNPs de los distintos replicones. A las 36 hpt se fijaron los cultivos y se procesaron para análisis por IF usando un anticuerpo policlonal frente a la proteína NS1. Se realizó un doble marcaje de los cultivos con Dapi para teñir el núcleo de las células. Los cultivos que contenían los replicones NS 81 y 11C se incubaron tanto a temperatura permisiva (32° C) como restrictiva (39° C).

En cuanto al análisis por IF de la expresión de NS1, los resultados mostraron que una gran proporción de las células en los cultivos expresaban la proteína NS1 correctamente y que no había diferencias significativas entre ellos (Figura 18). Además,

se pudo confirmar que en todos los casos NS1 estaba presente tanto en el núcleo como en el citosol de las células. La confirmación de que la localización de NS1 era en gran parte nuclear es de gran importancia ya que las funciones de *splicing* y transporte requieren de su presencia en el núcleo.

### 1.2. Estudio de la estabilidad de los mRNAs del segmento NS.

Antes de abordar el estudio de la posible función que la proteína NS1 podía desempeñar en la regulación de los procesos de maduración y transporte de los mRNAs derivados del segmento 8, se quiso analizar si la expresión de NS1 podía alterar la estabilidad tanto del mRNA de NS1 como el de NEP.



**Figura 19. Estabilidad de los mRNAs virales de NS1 y NEP.** Se transfectaron monocapas de células HEK-293T subconfluentes con los plásmidos apropiados para establecer la reconstitución de las RNPs wt y delNS1. A las 36 hpt se añadió actinomycin D a los cultivos y a los distintos tiempo post-tratamiento indicados en la figura se aisló el RNA total. Se purificó la fracción poly (A) mediante cromatografía de oligo-dT-celulosa y la cantidad de mRNA de NS1 y NEP se cuantificó mediante ensayo de protección a RNAsas con una sonda que permitía distinguir ambos mRNAs. Se muestran los resultados de dos experimentos independientes.

Para ello se realizaron experimentos de reconstitución de RNPs usando los replicones wt o delNS1. A las 36h post-transfección se realizó un tratamiento con Actinomycin D y a los tiempos post-tratamiento indicados se aisló el RNA total celular. La fracción poly (A) de dichas muestras se analizó mediante ensayo de protección a

RNAsas utilizando para ello una ribosonda que permitía distinguir entre los transcritos colineal (mRNA de NS1) y procesado (mRNA de NEP) tal y como se describe en los apartados 4.3 y 4.4.2 de Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la **Figura 19**. Los valores para las vidas medias de ambos mRNAs, mostrados en la **Tabla 6**, indicaron que la presencia o ausencia de la proteína NS1 no alteraba la estabilidad de dichos mRNAs. Por lo tanto, la acumulación relativa de los mRNAs de NS1 y NEP podía ser usada como medida de la eficacia de *splicing*.

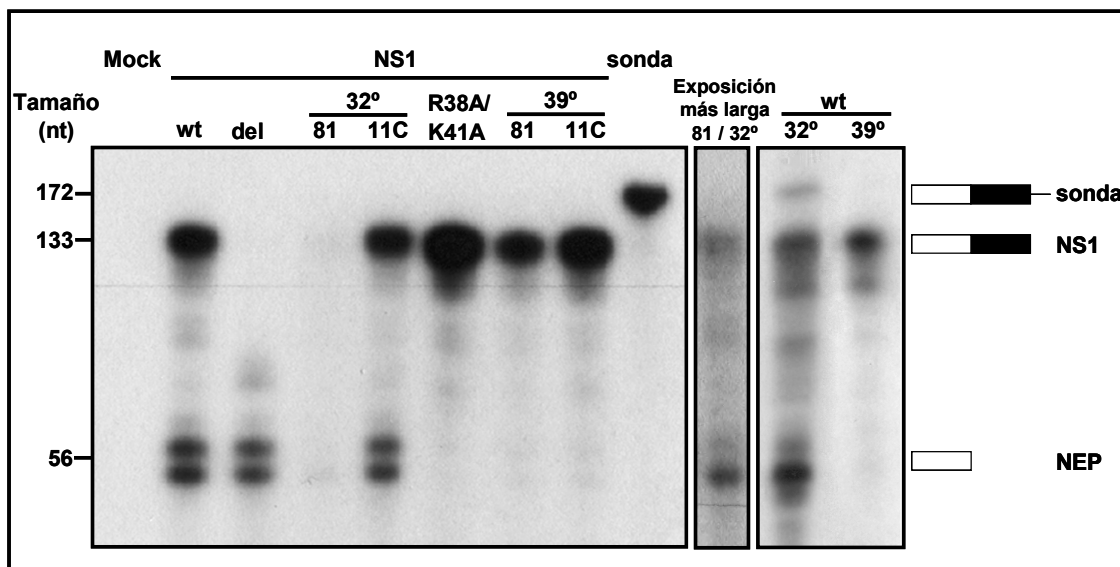
	mRNA NS1	mRNA NEP
wt exp 1	7 h	5,2 h
wt exp 2	6,3 h	5 h
delNS1 exp 1	8,3 h	4,9 h
delNS1 exp 2	6,8 h	4,9 h

**Tabla 6. Vida media de los mRNAs de NS1 y NEP.** Su calculo se realizó a partir de los datos obtenidos en los experimento de estabilidad de los mRNAs en presencia y ausencia de la proteína NS1.

### 1.3. Estudio de la implicación de la proteína NS1 en el *splicing* de su propio transcrito.

Para estudiar la implicación de la proteína NS1 en la regulación del proceso de *splicing* de su propio transcrito, se utilizó el sistema de reconstitución de RNPs y la batería de replicones descrita anteriormente. Tras 36h de reconstitución se aisló el RNA total celular y se purificó el mRNA por medio de la cromatografía oligo-dT-celulosa tal y como se describe en los apartados 4.1.1 y 4.2 de Materiales y Métodos. El mRNA presente en dichas muestras se analizó y cuantificó por medio del ensayo de protección a RNAsas utilizando para ello la misma ribosonda que en el caso del estudio de la estabilidad de los mRNAs. Los resultados, que se muestran en la **Figura 20** y la **Tabla 7**, indicaron que cuando se expresó el replicón NS wt, alrededor del 47% del mRNA total detectado correspondía al de NEP. Sin embargo, el resultado de la expresión del replicón delNS1 mostró un cambio muy dramático en la eficiencia del *splicing*, hasta el punto en que en ausencia de la proteína NS1 la acumulación del mRNA de NEP

aumentaba hasta alcanzar valores de alrededor del 98% y hacer casi indetectable la acumulación del mRNA de NS1. Este resultado indica que NS1 es un regulador negativo del *splicing* de su propio mRNA.



**Figura 20. Efecto de las mutaciones de la proteína NS1 en la acumulación de los mRNAs de NS1 y NEP.** Se transfectaron o pseudo-transfectaron (Mock) monocapas de células HEK-293T subconfluentes con los plásmidos apropiados para establecer la reconstitución de RNPs de los distintos replicones NS. Los cultivos que contenían los replicones NS 81 y 11C se incubaron tanto a temperatura permisiva como restrictiva. A las 36 hpt se extrajo el RNA total y se purificó el RNA poly (A) mediante cromatografía de oligo-dT-celulosa. Se determinaron las cantidades de los mRNAs de NS1 y NEP por ensayo de protección a RNAsas usando para ello una sonda complementaria al primer exón y a parte del intrón. Los fragmentos de protección se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-urea, se revelaron por autoradiografía y se cuantificaron a través del phosphorimager. Los resultados del mutante NS 81 a la temperatura permisiva se muestran en la parte de la derecha tras una exposición de mayor duración. La movilidad de la sonda y los fragmentos de protección se indica en la parte de la derecha y la posición de marcadores de peso molecular en la izquierda.

A la vista de este resultado se analizó si alguno de los dos dominios principales de NS1, el dominio N-terminal de unión a RNA o el dominio efector C-terminal, era el responsable de dicha regulación. Para ello, se estudió el fenotipo de *splicing* que presentaban los replicones mutantes en dichos dominios (NS R38A/K41A y NS 81). El replicón NS 81 da lugar a la expresión de una proteína NS1 que carece de la secuencia peptídica 81-238 y por lo tanto no contiene el dominio efector. Sin embargo, el replicón NS R38A/K41A contiene dos mutaciones puntuales previamente descritas que eliminan la capacidad de NS1 para unir RNA (Li et al., 2001b; Wang et al., 1999). El virus mutante NS1 81 presenta un fenotipo *ts* (Falcón et al., 2004), por lo que los estudios del replicón que derivan de él se realizaron tanto a temperatura permisiva (32° C) como

restrictiva (39° C). La proporción de mRNA que había sufrido *splicing* a 32° C fue de alrededor del 74%, muy similar a la observada con el replicón wt a 32° C (70%), por lo que se puede concluir que la región N-terminal de NS1 es suficiente para producir la regulación del *splicing*, o lo que es lo mismo, que el dominio efector no es necesario para dicha función. En cuanto a la proporción de mRNAs de NS1 y NEP a 39° C, el replicón NS 81 mostró un comportamiento muy similar al replicón wt. En ambos casos el *splicing* estaba claramente inhibido, indicando que dicho efecto observado a 39° C no era debido a la delección presente en la proteína NS1 81.

Replicón NS	mRNA NS1	mRNA NEP	Desv. Std
wt	53	47	4.2
wt (32° C)	30	70	8.9
wt (39° C)	93	7	3.7
delNS1	2	98	1.2
81 (32° C)	26	74	5
81 (39° C)	85	15	8.7
R38A/K41A	>98	<2	1.2
11C (32° C)	51	49	4.6
11C (39° C)	>91	<9	3.2

**Tabla 7. Acumulación de los mRNAs de NS1 y NEP.** Los datos se muestran como porcentaje del mRNA total de los transcritos NS para cada replicón. Se presentan la media y desviación estándar (Desv. Std) de 3 experimentos independientes.

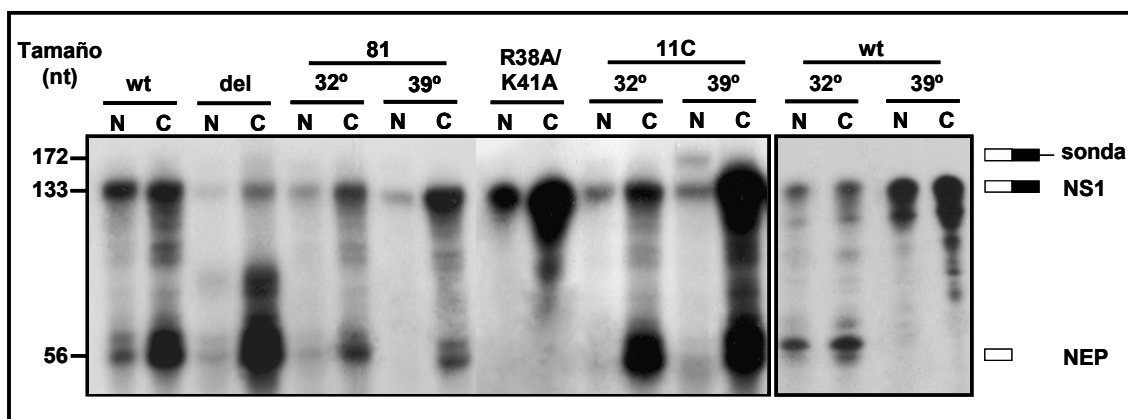
Al ver que el dominio efector no parecía ser el responsable de la regulación del *splicing*, se analizó la acumulación de los mRNAs de NS1 y NEP en el replicón NS R38A/K41A. De esta forma se podría estudiar si la capacidad de unión a RNA de NS1 era necesaria para dicha función. Los resultados mostraron que prácticamente no se producía *splicing* alguno, ya que alrededor del 98% del mRNA detectado correspondía al de NS1. Por lo tanto, este resultado permite concluir que la capacidad de unión a RNA de NS1 no es necesaria para la regulación del proceso de *splicing* de su propio segmento.

Por último, se estudió el comportamiento del replicón NS 11C que proviene del virus mutante 11C (V18A, R44K y S195P) y cuyo análisis fenotípico se analiza más adelante (ver segundo capítulo de resultados de esta Tesis). Al igual que el virus NS1 81, el 11C también presenta un fenotipo *ts* por lo que los estudios del replicón NS 11C se realizaron tanto a temperatura permisiva como restrictiva. Tal y como se muestra en la [Figura 20](#) y la [Tabla 7](#), la acumulación relativa de los mRNAs de NS1 y NEP en el replicón NS 11C, fue muy similar a la descrita previamente para el replicón wt, independientemente de la temperatura.

### 1.4. Estudio de la implicación de la proteína NS1 en el transporte núcleo-citosol de los mRNAs de NS1 y NEP.

Es sabido que en las células de mamífero los procesos de transcripción, maduración y transporte núcleo-citoplasma de los mRNAs están íntimamente relacionados. Además, se ha descrito la dependencia estructural y funcional de la transcripción viral con respecto de la maquinaria de transcripción celular ([Amorim et al., 2007](#); [Chan et al., 2006](#); [Engelhardt et al., 2005](#)). Con estos antecedentes y en vista de las alteraciones en el patrón de *splicing* observadas mediante la expresión de los distintos replicones de NS, se analizó el patrón de distribución núcleo-citoplasma de los mRNAs de NS1 y NEP en el sistema anteriormente descrito. Para ello, se reconstituyeron RNPs con los distintos replicones de NS en células HEK-293T y tras 36h se realizó un fraccionamiento núcleo-citosólico tal y como se describe en el apartado 4.1.3 de Materiales y Métodos. Se aisló el mRNA de dichas fracciones mediante cromatografía de oligo-dT-celulosa y se cuantificaron los mRNAs de NS1 y NEP por ensayo de protección a RNAsas. Los resultados se muestran en la [Figura 21](#) y la [Tabla 8](#). Tal y como se observa para el replicón wt, la exportación del mRNA de NEP (84%) resultó más eficiente que la del transcrito colineal NS1 (57%). Cuando se analizó el replicón delNS1 se observó que el mRNA de NS1 se exportaba con mayor eficacia que en el caso del wt, 82% frente al 57%. Al expresar el replicón NS R38A/K41A se observó que el mRNA de NS1 se exportaba muy eficientemente (84%) alcanzando los mismos niveles que el replicón delNS. Por lo tanto, se puede concluir que NS1 bloquea el transporte de su propio mRNA y que dicha regulación requiere de la actividad de unión a RNA de NS1 ya que la proteína NS1 derivada del replicón NS R38A/K41A es incapaz de unir RNA.





**Figura 21. Efecto de las mutaciones de la proteína NS1 en el transporte núcleo-citoplásmico de los mRNAs de NS1 y NEP.** Se transfectaron monocapas de células HEK-293T subconfluentes con los plásmidos apropiados para establecer la reconstitución de RNPs de los distintos replicones NS. Los cultivos que contenían los replicones NS 81 y 11C se incubaron tanto a temperatura permisiva como restrictiva. A las 36 hpt se realizó un fraccionamiento núcleo-citosol, se extrajo el RNA total de cada una de las fracciones y se purificó el RNA poly (A) mediante cromatografía de oligo-dT-celulosa. Se determinaron las cantidades de los mRNAs de NS1 y NEP por ensayo de protección a RNAsas usando para ello una sonda complementaria al primer exón y a parte del intrón. Los fragmentos de protección se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-urea, se revelaron por autoradiografía y se cuantificaron a través del phosphorimager. La movilidad de la sonda y los fragmentos de protección se indica en la parte de la derecha y la posición de marcadores de peso molecular en la izquierda.

Replicón NS	mRNA NS1			mRNA NEP		
	Núcleo	Citoplasma	Desv. Std	Núcleo	Citoplasma	Desv. Std
wt	43	57	5.6	16	84	3.1
wt (32° C)	42	58	4.6	28	68	4.2
wt (39° C)	43	57	5	n.d	n.d	-
delNS1	18	82	4.2	6	94	2.5
81 (32° C)	33	67	2.5	26	74	4.1
81 (39° C)	13	87	4.8	<4	>96	1.5
R38A/K41A	16	84	3.7	n.d	n.d	-
11C (32° C)	28	72	4.1	<4	>96	2.1
11C (39° C)	6	94	1.5	<2	>98	1.2

**Tabla 8. Distribución núcleo-citosol de los mRNAs de NS1 y NEP.** Los datos se muestran como porcentaje del total de cada tipo de mRNA para cada replicón. Se presentan la media y desviación estándar (Desv. Std) de 3 experimentos independientes. n.d. no detectable.

## Resultados 86

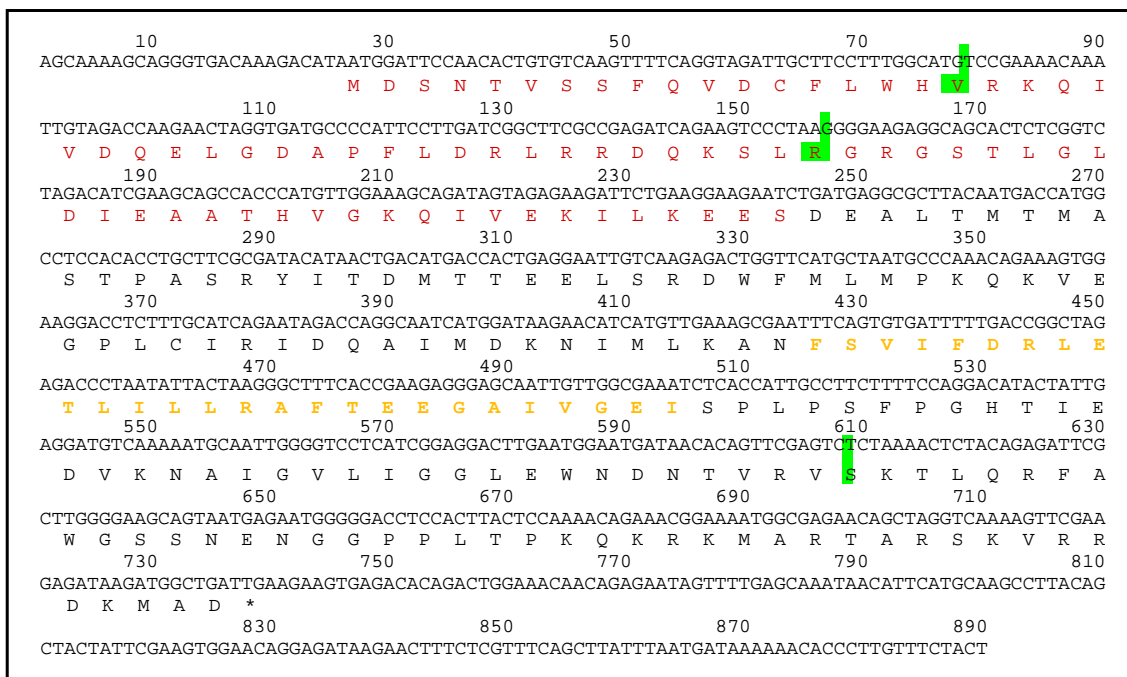
---

El análisis de los replicones NS 81 y 11C mostró en ambos casos un fenotipo *ts* para el transporte del mRNA de NS1, ya que a temperatura permisiva se comportaban como el wt (67 y 72% respectivamente), mientras que a temperatura restrictiva presentaban una mayor eficiencia en su transporte (87 y 94% respectivamente). Contrariamente a los resultados del *splicing* de NS1, el transporte del mRNA de NS1 en el replicón wt a temperatura restrictiva no estaba afectado (57%), confirmando que los mutantes NS 81 y 11C resultaban ser mutantes *ts* para el bloqueo en el transporte del mRNA de NS1.

## 2. ANÁLISIS GENOTÍPICO Y FENOTÍPICO DE UN VIRUS TERMOSENSIBLE (11C) CON MUTACIONES PUNTUALES EN LA PROTEÍNA NS1

Al comienzo de esta Tesis, en el laboratorio se disponía de una genoteca de virus mutantes termosensibles (*ts*). Dichos virus recombinantes contenían mutaciones puntuales en la proteína NS1 y fueron generados mediante una estrategia a gran escala para el rescate de virus mutantes termosensibles. Todos ellos fueron rescatados en un entorno genético mixto de las cepas Vic y WSN. Así, los genes de la polimerasa (PB1, PB2 y PA), NP, NA y NS pertenecían a la cepa Vic, mientras que los genes correspondientes a HA y M provenían de la cepa WSN.

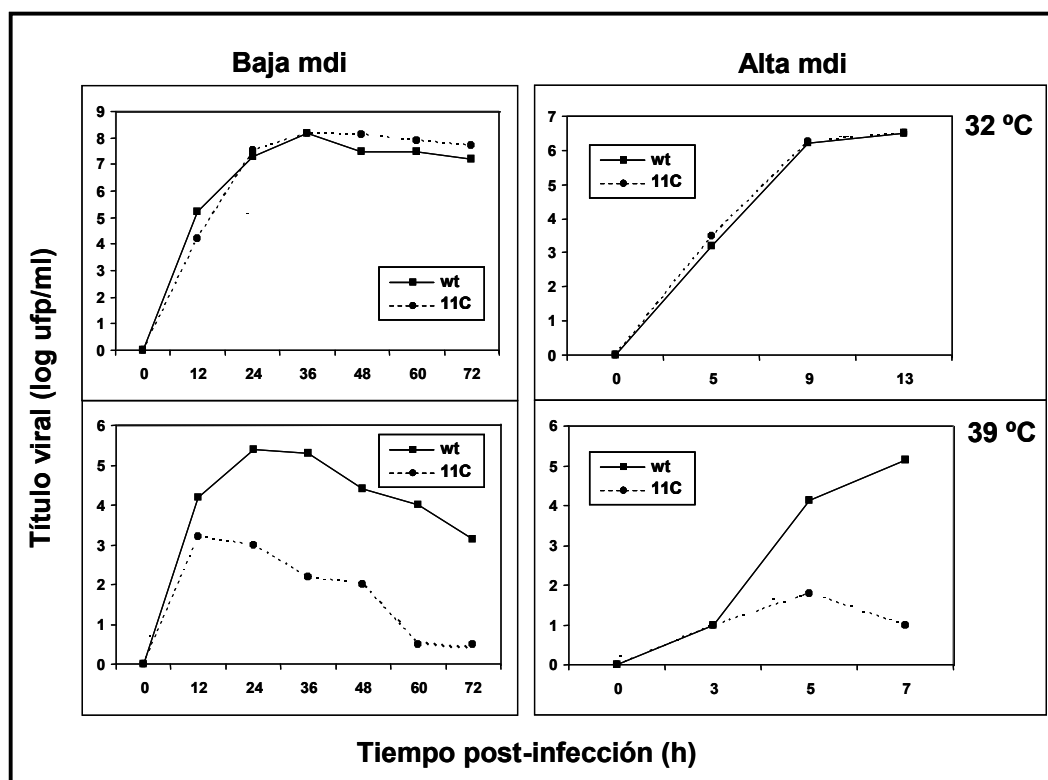
Uno de los mutantes, el virus 11C, se seleccionó para ser caracterizado en detalle. La razón principal para su elección fue que presentaba un marcado fenotipo *ts* en cuanto a su crecimiento a distintas temperaturas en células en cultivo. En la **Figura 22**, se muestran las tres mutaciones puntuales presentes en la proteína NS1 de dicho virus: V18A, R44K y S195P.



**Figura 22.** El virus termosensible 11C presenta tres cambios de aminoácido en la proteína NS1. El RNA del segmento NS del virus mutante fue clonado y secuenciado. Las posiciones en las que se encontraron sustituciones de aminoácido se indican mediante barras de color verde y son: V18A, R44K y S195P. La región de la proteína involucrada en la unión a RNA se muestra en rojo mientras que el dominio efector se indica en amarillo.

## 2.1. Implicación de distintas regiones de la proteína NS1 en el fenotipo *ts*.

Para comenzar el análisis fenotípico del virus mutante 11C, se estudió su crecimiento en células en cultivo tanto a temperatura permisiva (32° C) como restrictiva (39° C). Dicho crecimiento se comparó con el de un virus recombinante control que contenía una NS1 silvestre (wt) de la cepa Vic y que había sido rescatado en el mismo entorno mixto que el virus mutante 11C. Para ello, se infectaron células MDCK a baja o alta multiplicidad de infección (mdi) con ambos virus. Se incubaron tanto a 32° como 39° C y a distintos tiempos post-infección se recogieron muestras de los sobrenadantes y se analizó su infectividad a temperatura permisiva. Los resultados se presentan en la **Figura 23**.

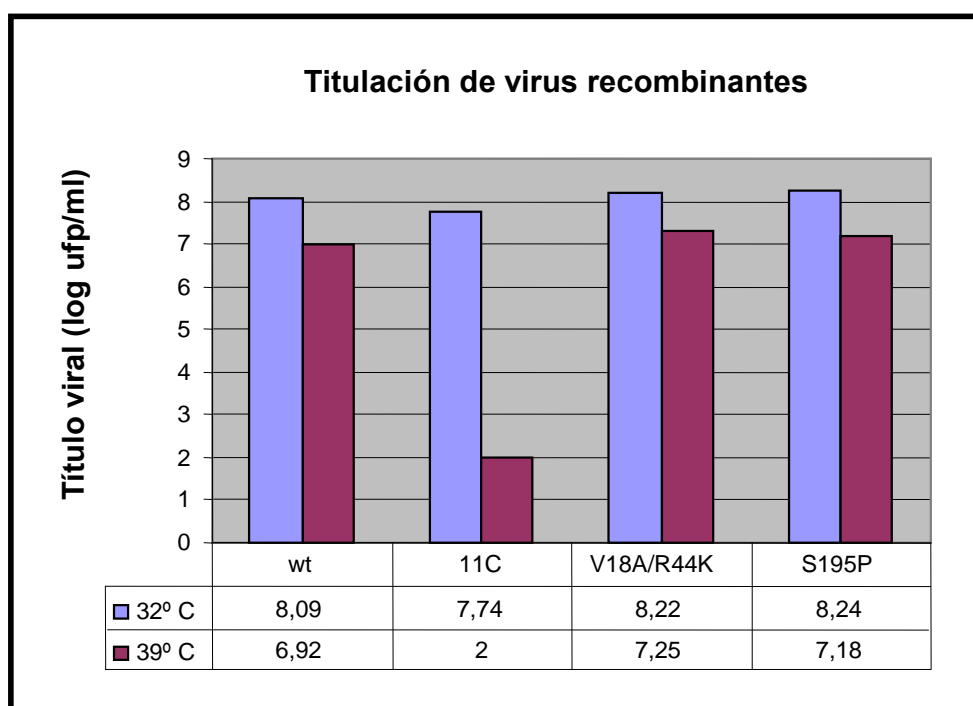


**Figura 23.** Análisis del fenotipo termosensible del virus mutante 11C. Se infectaron monocapas de células MDCK tanto con el virus recombinante control (wt) como el mutante 11C a baja multiplicidad de infección ( $10^{-3}$  ufp/célula) o a alta ( $10$  ufp/célula) y se incubaron a 32° y 39° C. A los tiempos indicados, se obtuvieron muestras de cada sobrenadante y se determinó la infectividad de cada una de ellas mediante ensayo de placa a temperatura permisiva.

Tanto en las cinéticas de alta como baja mdi, se observó una clara diferencia en el crecimiento del virus mutante 11C con respecto del virus recombinante control a temperatura restrictiva. Así, las cinéticas a baja mdi mostraron que, mientras que el

crecimiento del virus control a 39° C (Fig. 23, NS1 wt) presentaba una disminución en el título viral de 2 logaritmos (log), en el caso del virus mutante 11C (Fig. 23, NS1 11C) esta diferencia llegaba a ser de hasta 5 log. También se observaron diferencias muy similares en los experimentos a alta mdi. Todos estos datos indicaban la naturaleza *ts* del virus.

En la cinética a baja mdi de ambos virus a 39° C, se observó que una vez alcanzados los valores máximos, el título viral disminuía rápidamente. Este fenotipo se conoce con el nombre de termolabilidad y posiblemente es debido al entorno genético mixto en el que fueron rescatados los dos virus.



**Figura 24. Análisis del crecimiento de los virus recombinantes V18A/R44K y S195P a las distintas temperaturas.** Se realizó el rescate de los nuevos virus recombinantes V18A/R44K y S195P junto con los virus 11C y control (wt) a temperatura permisiva (32° C). Cuando el efecto citopático resultó ser de aproximadamente el 50% se recogieron los sobrenadantes y mediante ensayo de placa se aislaron clones de los distintos virus rescatados. Se prepararon *stocks* de trabajo y se determinó la infectividad de cada uno de ellos mediante ensayo de placa tanto a temperatura permisiva (32° C) como restrictiva (39° C).

Resulta destacable el hecho de que el virus mutante 11C presenta tres cambios de aminoácido (V18A, R44K y S195P) en la proteína NS1, tal y como se muestra en la Figura 22. Las dos primeras mutaciones implican cambios de tipo conservador y una de ellas, la mutación R44K, está presente en algunas cepas silvestres. Sin embargo, la

mutación S195P no se encuentra registrada dentro de las secuencias de cepas silvestres publicadas en las bases de datos y además implica un cambio drástico de la estructura secundaria predicha de la proteína (datos no mostrados). Con el objetivo de investigar si ésta última mutación era la única responsable del fenotipo *ts*, se rescataron dos nuevos virus en el mismo entorno genético que el mutante 11C. El primero de ellos contenía las mutaciones V18A y R44K, mientras que el segundo de los virus presentaba la mutación S195P. Contrariamente a las predicciones de estructura secundaria de las nuevas proteínas NS1 mutantes y tal y como se muestra en la [Figura 24](#), los dos nuevos virus generados resultaron ser fenotípicamente wt por lo que se ha de concluir que al menos una de las dos primeras mutaciones y la tercera son necesarias para el fenotipo *ts*.

### **2.2. Estudio del crecimiento del mutante 11C en líneas celulares deficientes en el sistema interferón.**

Como ya se ha explicado en el apartado de Introducción, una de las funciones que se atribuye a la proteína NS1 es actuar como antagonista del sistema interferón ([García-Sastre et al., 1998](#)). Ya que las mutaciones presentes en el virus 11C afectan únicamente a la proteína NS1, quisimos descartar la posibilidad de que los problemas de crecimiento que presentaba el virus a temperatura restrictiva pudieran deberse a defectos en la inhibición del sistema interferón. Para analizar esta posibilidad se estudió el crecimiento de los virus 11C y control en células Vero y NIH 3T3 PKR<sup>-/-</sup> a ambas temperaturas. Las células Vero tienen afectado el sistema inmune innato y por tanto no presentan una correcta respuesta mediada por interferón ([Diaz et al., 1988](#)). En cuanto a la línea celular NIH 3T3 PKR<sup>-/-</sup> ([Yang et al., 1995](#)), es deficiente en el gen que codifica la proteína PKR por lo que son células afectadas en la respuesta a la presencia de RNA de doble cadena.

Se infectaron ambas líneas celulares con el virus mutante 11C y virus control a alta mdi, tanto a temperatura permisiva como restrictiva. A distintos tiempos post-infección se recogieron muestras de los sobrenadantes y se determinó su infectividad en cultivos de células MDCK a temperatura permisiva. Tal y como se muestra en la [Tabla 9](#) correspondiente a los resultados de las infecciones en células Vero, mientras que el crecimiento del virus mutante a 32° C era similar al del virus wt, a 39° C se observó una disminución en el título final del virus mutante de alrededor de 1.5 log comparándolo con el del virus wt. En cuanto a los resultados con las células NIH 3T3 PKR<sup>-/-</sup>, el virus

wt mostró problemas de crecimiento muy severos a temperatura restrictiva por lo que no se pudo concluir nada al respecto (datos no mostrados).

Vero	Tiempo (hpi)	wt	11C
32° C	0	$< 5 \cdot 10^1$	$< 5 \cdot 10^1$
	7	$< 5 \cdot 10^1$	$< 5 \cdot 10^1$
	10	$1,2 \cdot 10^4$	$10^5$
39° C	0	$< 5 \cdot 10^1$	$< 5 \cdot 10^1$
	5	$< 5 \cdot 10^1$	$< 5 \cdot 10^1$
	9	$2,5 \cdot 10^3$	$< 5 \cdot 10^1$
	11	$5 \cdot 10^4$	$10^3$

**Tabla 9. Cinética de crecimiento de los virus recombinante control (wt) o mutante 11C en células Vero.** Se infectaron monocapas de células Vero tanto con el virus recombinante control (wt) como el mutante 11C a alta multiplicidad de infección (10 ufp/célula) y se incubaron a 32° y 39° C. A los tiempos indicados se obtuvieron muestras de cada sobrenadante y se determinó la infectividad de cada una de ellas mediante ensayo de placa a temperatura permisiva. Los resultados se expresan en ufp/ml.

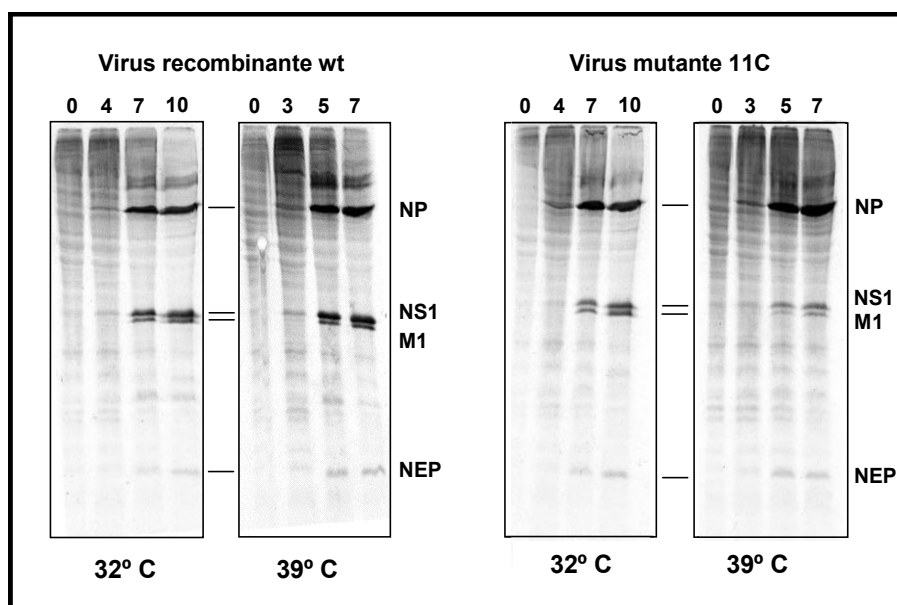
Hay que destacar que la línea celular NIH 3T3 PKR<sup>-/-</sup> proviene de ratón y que los virus utilizados para este estudio no replican adecuadamente en células de ratón; por otra parte, tampoco están adaptados a crecer en células Vero. Es por ello que los títulos virales determinados en ambas líneas celulares fueron muy inferiores a los obtenidos en células susceptibles como la línea celular MDCK (Figura 23).

### 2.3. Análisis de la síntesis y acumulación de proteínas virales.

#### 2.3.1. Estudio de la síntesis de las principales proteínas virales: NP, NS1, M1 y NEP.

Numerosos trabajos previos han involucrado a la proteína NS1 en el aumento de la traducción específica de ciertas proteínas virales (Egorov et al., 1998; Falcón et al., 2004). Con estos antecedentes resultaba muy interesante estudiar como podían estar

afectando las mutaciones de la proteína NS1 11C a nivel de la síntesis de proteínas virales. Con dicho objetivo se infectaron células MDCK con los virus 11C o recombinante control a ambas temperaturas, 32° y 39° C, y se realizaron pulsos de marcaje radiactivo a distintos tiempos post-infección, tal y como se describe en el apartado 5.1 de Materiales y Métodos. Los resultados que se muestran en la **Figura 25** indicaron que el virus recombinante control presentaba tasas de síntesis de proteínas virales similares a ambas temperaturas, mientras que el virus 11C mostraba una disminución en la síntesis de las proteínas M1 y NS1 a temperatura restrictiva. No ocurría lo mismo con las proteínas NEP y NP; mientras que los niveles de NEP eran similares a ambas temperaturas, la síntesis de NP resultó ser más eficiente a 39° C.



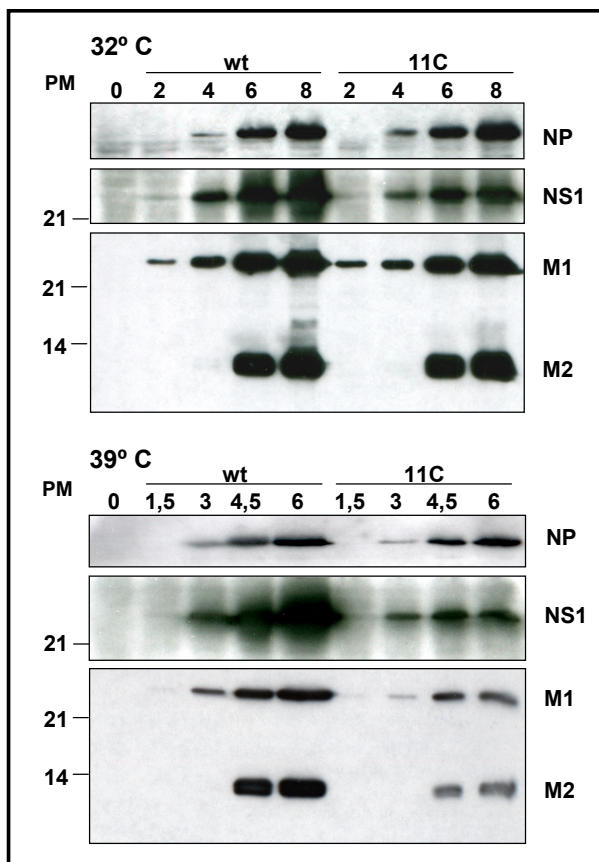
**Figura 25. Síntesis de proteínas virales en células infectadas por los virus recombinante control (wt) o mutante 11C.** Se infectaron monocapas de células a 10 ufp/célula con los virus recombinante control (wt) o mutante 11C. Los cultivos se incubaron a 32 o 39° C y a los tiempos indicados se realizó un marcaje metabólico con <sup>35</sup>S Met-Cys tal y como se explica en Materiales y Métodos. Se prepararon extractos totales de cada cultivo y se analizó la presencia de las principales proteínas virales mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y autoradiografía. La posición de las proteínas virales se indica en la parte derecha de cada panel.

### 2.3.2. Estudio de la acumulación de las principales proteínas virales: NP, NS1, M1 y M2.

En vista de estos resultados, se analizó también la acumulación de algunas proteínas virales a lo largo de la infección por el virus mutante o recombinante control a ambas temperaturas. La acumulación de proteínas virales no resultó estar afectada a



temperatura permisiva (Figura 26). Sin embargo, la cantidad de las proteínas NS1, M1 y M2 a temperatura restrictiva era menor en células infectadas por el mutante 11C.



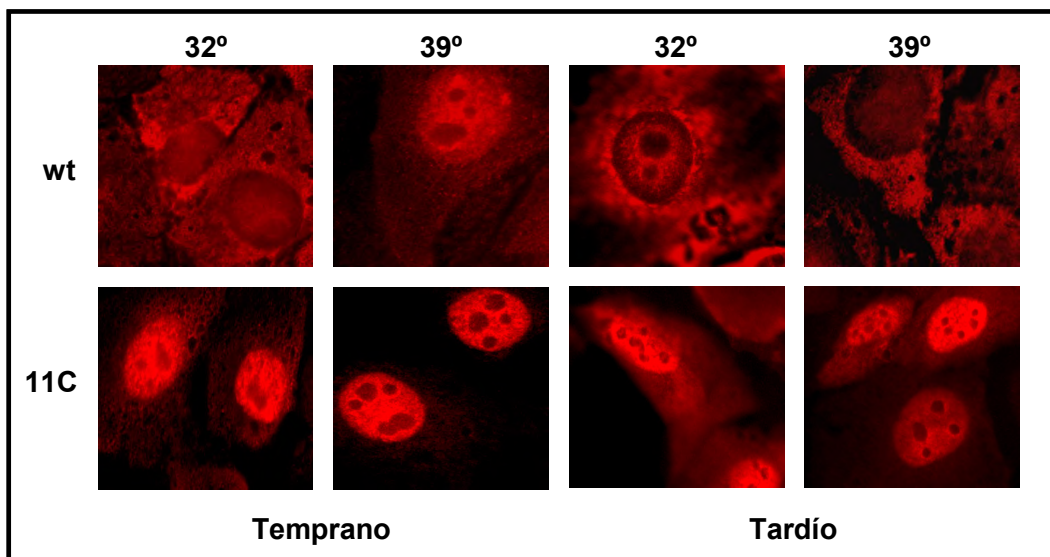
**Figura 26. Acumulación de proteínas virales en células infectadas por los virus recombinante control (wt) o mutante 11C.** Se infectaron monocapas de células MDCK a una mdi de 10 ufp/célula tanto con el virus control (wt) como el mutante 11C. Los cultivos se incubaron tanto a temperatura permisiva como restrictiva y se prepararon extractos totales a los tiempos indicados en cada caso. Se analizó la acumulación de las proteínas NP, NS1, M1 y M2 por WB con anticuerpos específicos. La posición de las proteínas virales se indica en la parte derecha de la figura y la movilidad de los marcadores de peso molecular (PM) en la izquierda.

Se analizaron geles con una carga de material adecuada para la cuantificación de la señal de cada una de las bandas correspondientes a las proteínas virales. Cuando se comparó la acumulación de proteínas virales a temperatura restrictiva, los resultados indicaron que en células infectadas por el virus 11C la acumulación de las proteínas M1 y M2 estaba afectada en 6 y 8 veces, respectivamente, en comparación con células infectadas por el virus wt. En el caso de la proteína NS1, la cantidad de NS1 presente en células infectadas por el mutante era dos veces menor a la temperatura restrictiva que a la permisiva. Sin embargo, la acumulación de NP a temperatura restrictiva fue dos veces superior en las células infectadas por el mutante en comparación con el virus wt.

Todos estos resultados de acumulación de proteínas virales confirmaban los resultados obtenidos anteriormente en el análisis de la síntesis de proteínas.

**2.4. Análisis de la localización subcelular de la proteína NS1 mutante.**

Una de las características de la proteína NS1 es su localización subcelular a lo largo del ciclo de infección. La proteína contiene tanto señales de localización (NLS) como de exportación nuclear (NES) (Greenspan et al., 1988; Li et al., 1998). Es por ello que a tiempos tempranos de la infección NS1 se localiza en el núcleo, mientras que a tiempos más tardíos se encuentra mayoritariamente en el citoplasma. Es sabido que la regulación de la NES de NS1 depende de la fosforilación de residuos río abajo de dicha señal. Si tenemos en cuenta que la mutación S195P presente en el virus 11C produce la desaparición de un sitio potencial de fosforilación, resultaba muy interesante estudiar la localización subcelular de esta NS1 mutante a lo largo de la infección.



**Figura 27. Localización intracelular de la proteína mutante NS1 11C.** Se infectaron monocapas de células MDCK subconfluentes con los virus recombinante control (wt) o mutante 11C a alta mdi, tanto a temperatura permisiva como restrictiva. A 4 y 9 hpi (32° C) o 3 y 7 hpi (39° C) se fijaron las células y se analizó la expresión de NS1 por IF usando un anticuerpo policlonal específico. Como control se usaron células sin infectar, las cuales no mostraron ninguna señal de fluorescencia (datos no mostrados).

Con dicha finalidad, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia sobre células MDCK infectadas por el virus 11C o recombinante control, tanto a temperatura permisiva como restrictiva. Los resultados se presentan en la **Figura 27**, e indicaron una retención nuclear de la proteína NS1 mutante a tiempos tardíos de la infección. Este fenotipo era característico del virus 11C ya que no se pudo observar en ningún caso con el virus control. La retención nuclear de NS1 presente en las células infectadas por el virus 11C tenía lugar tanto a temperatura restrictiva como a temperatura permisiva. Por

lo tanto, este resultado no podía ser responsable del fenotipo *ts* por sí sólo, aunque podía estar contribuyendo a ello.

## **2.5. Análisis de la expresión y localización de las glicoproteínas virales de membrana.**

### **2.5.1. Estudio de la expresión y localización de HA.**

Estudios previos habían demostrado que en ciertas cepas de virus la expresión de la proteína M2 es importante para la protección de la HA durante su procesamiento y transporte hacia la membrana celular (Ohuchi et al., 1994; Takeuchi and Lamb, 1994). Para confirmar si la menor acumulación de la proteína M2 en células infectadas por el virus mutante a temperatura restrictiva podía estar afectando a la expresión y localización de la HA, se analizó su síntesis y localización tal y como se describe en los apartados 5.2 y 5.3 de Materiales y Métodos. Debido a que la HA es una glicoproteína, fue necesario un tratamiento de deglicosilación que permitiera la correcta identificación de la banda específica en los geles de poliacrilamida. El tratamiento de deglicosilación reveló la aparición de una nueva banda de movilidad intermedia entre la de NP y polimerasa, correspondiente a la HA (Figura 28, paneles +PNGaseF). De esta forma se pudo comparar de una manera fiable la síntesis de HA en células infectadas por ambos virus y a ambas temperaturas. Los resultados indicaron que su expresión en células infectadas por el mutante a temperatura restrictiva no estaba afectada.

En cuanto a su localización en membrana, se comparó el marcaje anti-HA en células previamente permeabilizadas o no permeabilizadas. Al realizar la tinción en células sin tratamiento de permeabilización previo, nos asegurábamos que el marcaje observado era debido a la HA presente en la membrana ya que el anticuerpo no puede penetrar al interior de la célula. Los resultados que se presentan en la Figura 29, mostraron, en todos los casos, una correcta localización de HA en la membrana celular.

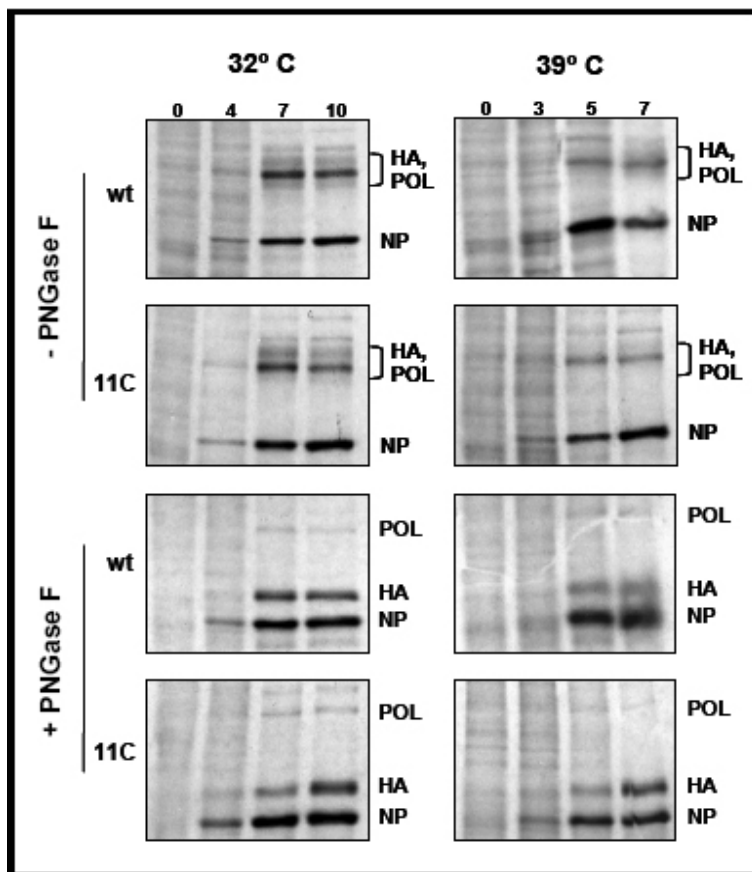
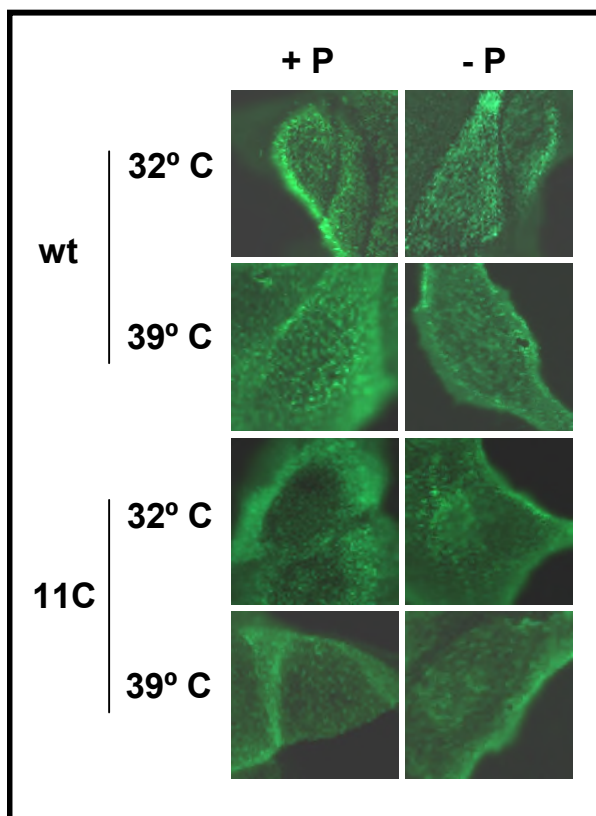


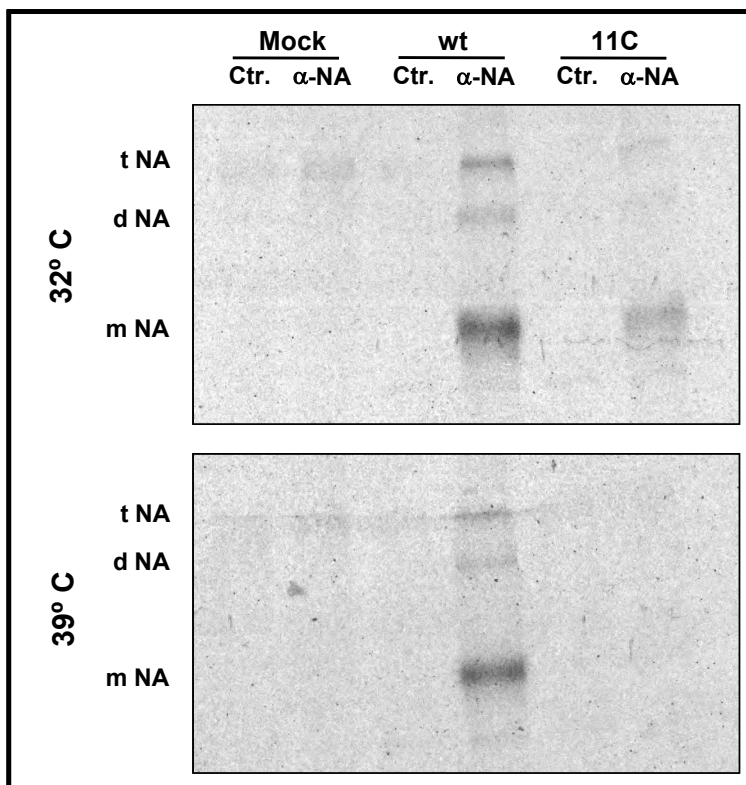
Figura 28. Expresión de HA en células infectadas con los virus recombinante control (wt) o mutante 11C. Se infectaron monocapas de células MDCK a 10 upf/célula con ambos virus tanto a temperatura permisiva como restrictiva. A los tiempos que se indican en la parte superior de cada carril, se realizó un marcaje metabólico con <sup>35</sup>S Met-Cys. Los extractos celulares se sometieron (+PNGase F) o no (-PNGase F) a un tratamiento de deglicosilación con la enzima PNGase F y el producto se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida y autoradiografía. La posición de las principales proteínas virales se indica en el lado derecho de las imágenes.

Figura 29. Localización de HA en células infectadas por los virus recombinante control (wt) o mutante 11C. Se infectaron monocapas de células a una mdi de 10 ufp/célula con los virus control (wt) o mutante a ambas temperaturas de 32° y 39° C. A 8 hpi (32° C) o 6 hpi (39° C) se fijaron los cultivos con paraformaldehído. La mitad de los cultivos se permeabilizaron con Triton X100 (+P), mientras que la otra mitad no (-P). Los cultivos se analizaron por IF con el anticuerpo monoclonal H179, específico contra HA de la cepa WSN. Como control se usaron células sin infectar, las cuales no presentaron señal de fluorescencia alguna (datos no mostrados).



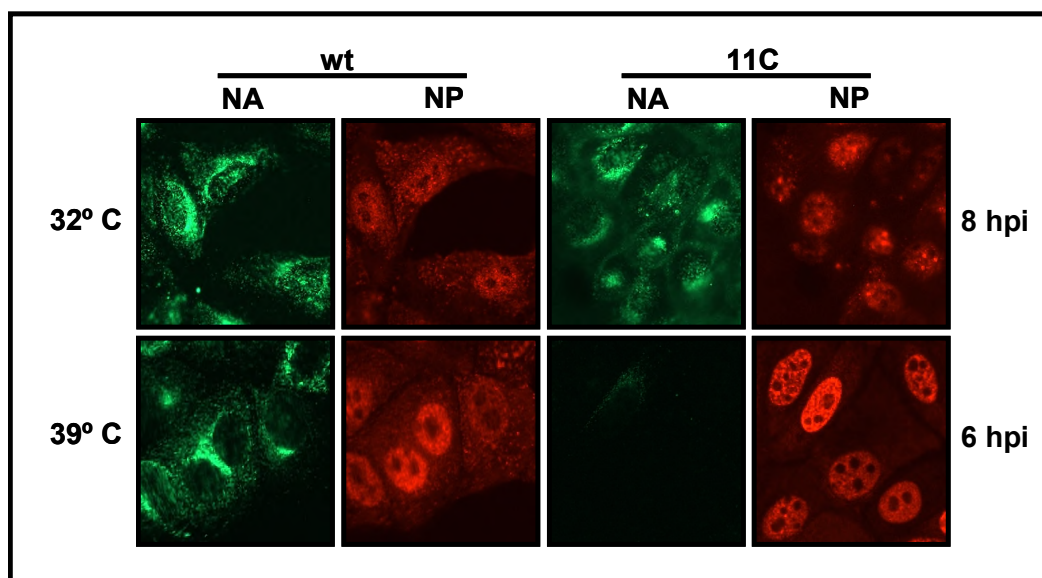
### 2.5.2. Estudio de la expresión y localización de NA.

Para analizar la expresión de la otra glicoproteína de membrana, NA, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación usando un anticuerpo monoclonal específico frente a NA o un anticuerpo control, tal y como se describe en el apartado 5.5 de Materiales y Métodos. Para ello, se infectaron células MDCK a alta mdi con los virus mutante o control, tanto a 32° como a 39° C. Tras un marcaje metabólico continuo de 8 o 10 horas (según la temperatura de incubación) se realizaron las inmunoprecipitaciones correspondientes. Los resultados se presentan en la **Figura 30**. Se observó una ligera disminución en la expresión de NA en las células infectadas por el virus mutante a temperatura permisiva. Dicha diferencia se vio fuertemente aumentada en las células infectadas con el virus mutante a temperatura restrictiva, hasta el punto de que no fue posible detectar la presencia de NA en el inmunoprecipitado.



**Figura 30. Expresión de NA en células infectadas con los virus recombinante control (wt) o mutante 11C.** Se infectaron monocapas de células MDCK con los virus recombinante control (wt) o mutante a una mdi de 10 ufp/célula. Se incubaron los cultivos tanto a temperatura permisiva como restrictiva. Durante el tiempo de infección se realizó un marcaje metabólico continuo con  $^{35}\text{S}$  Met-Cys. A las 10 hpi (32° C) o 8 hpi (39° C) se prepararon extractos celulares y se inmunoprecipitaron con el anticuerpo monoclonal anti-NA M234/1/G10 ( $\alpha$ -NA) y un anticuerpo control (Ctr). La proteína inmunoprecipitada se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida y autoradiografía. La posición de las bandas de NA se indica en la parte izquierda de las imágenes: mNA monómero de NA; dNA dímero de NA y tNA tetrámero de NA

Este resultado se confirmó mediante estudios de inmunofluorescencia tal y como se muestra en la **Figura 31**, donde se pudo apreciar un marcaje de NA muy tenue en las células infectadas por el mutante a temperatura restrictiva comparándolo con las infectadas por el virus wt. Como control de que todas las células realmente habían sido infectadas se realizó un doble marcaje con un anticuerpo frente a NP. Tal y como se muestra en los paneles anti-NP, el nivel y evolución de la infección fue muy similar en todos los casos.



**FIGURA 31. Localización de NA en células infectadas con los virus recombinante control (wt) o mutante 11C.** Se infectaron monocapas de células a una mdi de 10 ufp/célula con ambos virus. Se incubaron los cultivos tanto a temperatura de 32° C como a 39° C. A 8 hpi (32° C) o 6 hpi (39° C) se fijaron los cultivos con paraformaldehído y se analizaron por inmunofluorescencia con el anticuerpo M234/1/G10, monoclonal específico de NA, y un anticuerpo de rata específico de NP. Como control se usaron células sin infectar, las cuales no mostraron ninguna señal de fluorescencia (datos no mostrados).

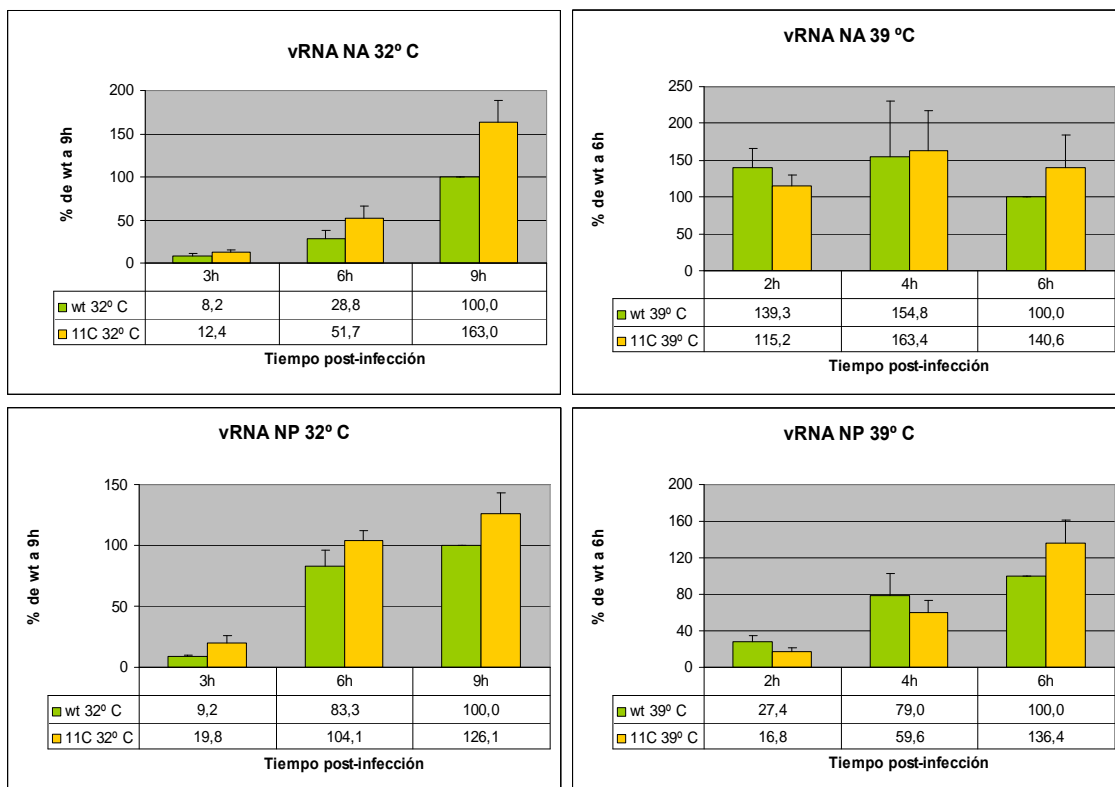
### 2.6. Análisis de los procesos de replicación y transcripción.

La gran disminución en la expresión de NA observada previamente en las células infectadas por el virus mutante a temperatura restrictiva, podía ser el resultado de problemas en los procesos de replicación, transcripción, transporte del mRNA o de su traducción. Con la intención de analizar cual de estos procesos podía estar afectado, se estudió la acumulación de vRNA y mRNA del gen de NA, como medida de los procesos de replicación y transcripción, respectivamente. Además, se analizó la

distribución de los mRNAs en las fracciones nuclear y citosólica para estudiar el transporte del mRNA. Como controles se analizaron también los RNAs de los genes NP y M.

### 2.6.1. Estudio de la replicación viral de los segmentos NA, NP y M.

Se obtuvo el RNA total de las células infectadas por el virus 11C o el virus wt, o pseudo-infectadas, a distintos tiempos post-infección y se cuantificó por hibridación en *dot-blot* como se indica en los apartados 4.1.2 y 4.4.1 de Materiales y Métodos. Los tiempos a los que se extrajo el RNA a temperatura permisiva fueron 3, 6 y 9 hpi y a temperatura restrictiva fueron 2, 4 y 6 hpi.

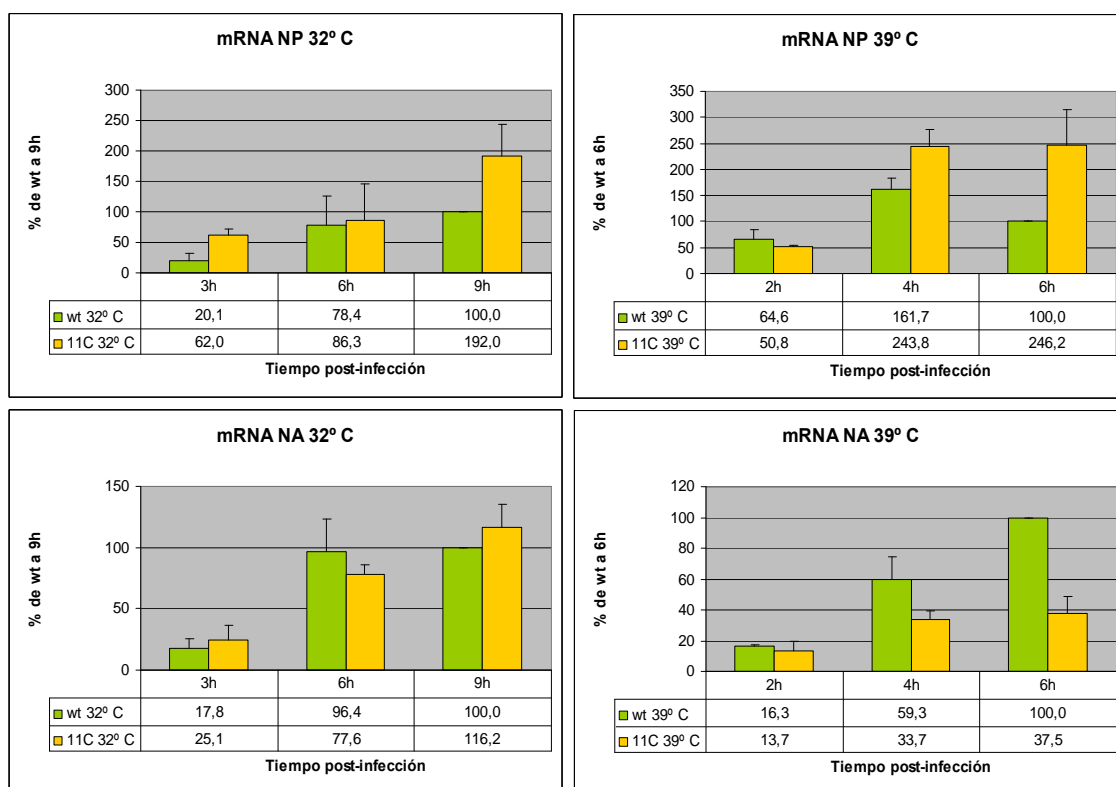


**Figura 32. Acumulación de vRNA de los segmentos NA y NP en células infectadas por los virus recombinante control (wt) o mutante.** Se infectaron monocapas de células MDCK a una mdi de 10 ufp/célula con el virus control (wt) o el mutante 11C a ambas temperaturas, 32° y 39° C. A los tiempos indicados se aisló el RNA total y se utilizó para hibridación por *dot blot* usando ribosondas de polaridad positiva específicas de NA y NP. La carga de RNA en los filtros se normalizó por hibridación con una sonda específica para la determinación del rRNA 18S. Los resultados representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes y se muestran como porcentaje del valor obtenido en el último tiempo del virus wt.

Los resultados del análisis del vRNA de los segmentos NA y NP (Figura 32) mostraron que la acumulación de ambos vRNAs en células infectadas por el virus 11C era muy similar a los niveles observados en las células infectadas por el virus control, tanto a temperatura permisiva como restrictiva, sin apreciarse diferencias significativas. Se obtuvieron resultados muy similares cuando se analizó la acumulación del vRNA del gen M en células infectadas por ambos virus (datos no mostrados).

**2.6.2.- Estudio de la transcripción viral de los segmentos NA, NP y M.**

De la misma forma que en el caso anterior, se obtuvo el RNA total de las células infectadas por los virus 11C o wt, o pseudo-infectadas, a distintos tiempos post-infección y se cuantificó por hibridación en *dot-blot* como se describe en los apartados 4.1.2 y 4.4.1 de Materiales y Métodos. Los tiempos a los que se extrajo el RNA fueron los mismos que en el caso del estudio de la replicación.



**Figura 33. Acumulación de mRNA de los segmentos NA y NP en células infectadas por los virus recombinante control (wt) o mutante.** Se infectaron monocapas de células MDCK a una mdi de 10 ufp/célula con el virus control (wt) o el mutante 11C a ambas temperaturas, 32° y 39° C. A los tiempos indicados se aisló el RNA total y se utilizó para hibridación por *dot blot* usando ribosondas de polaridad negativa específicas de NA y NP. La carga de RNA en los filtros se normalizó por hibridación con una sonda específica para la determinación del rRNA 18S. Los resultados representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes y se muestran como porcentaje del valor obtenido en el último tiempo del virus wt.

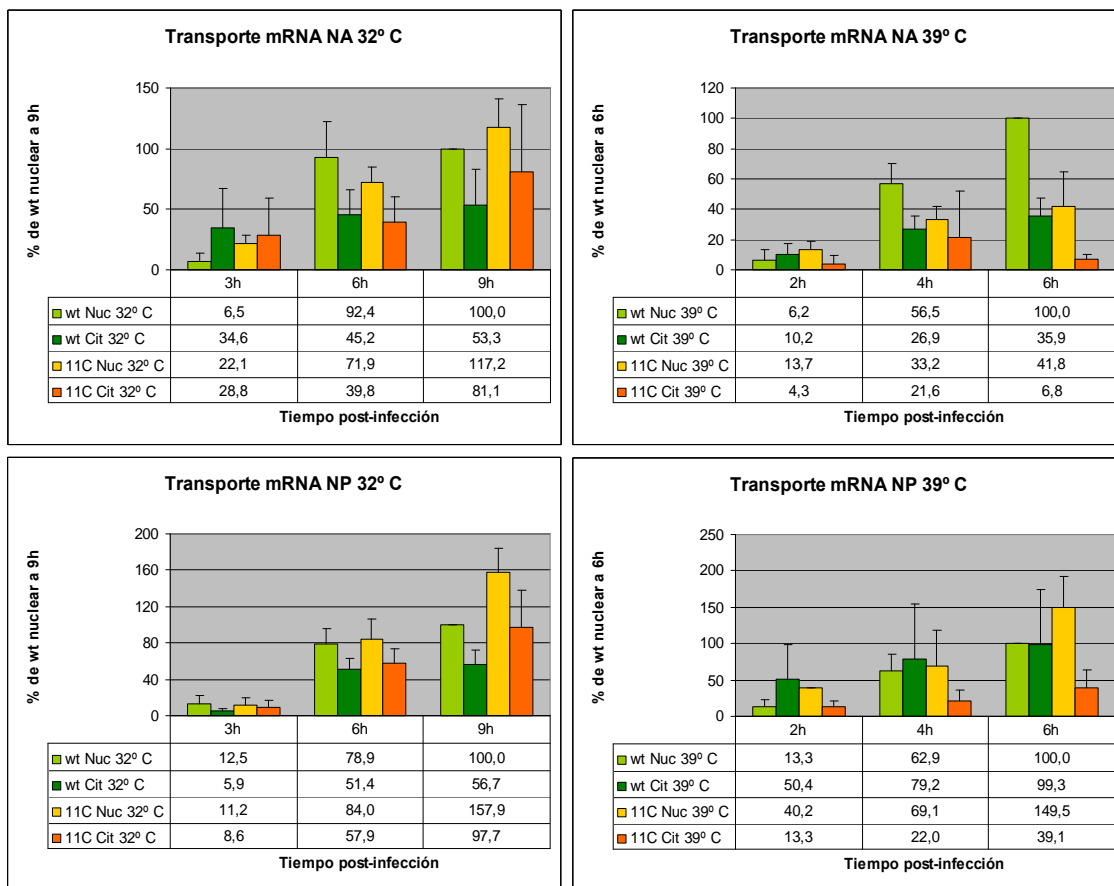


Los resultados del análisis de los mRNAs de NA y NP se muestran en la **Figura 33**. A diferencia de lo observado para el vRNA, la acumulación del mRNA de NA resultó estar afectada en dos o tres veces en las células infectadas por el virus 11C a temperatura restrictiva. Sin embargo la acumulación del mRNA de NP, llevado como control, resultó ser ligeramente mayor en las células infectadas por el mutante en comparación con el virus wt a ambas temperaturas. Por último, cuando se analizó la acumulación del mRNA de M, usado como control de otro gen tardío, no se observaron diferencias con respecto al virus wt independientemente de la temperatura (datos no mostrados).

Tanto los resultados de los mRNAs de NA como de NP corroboraban los resultados anteriormente obtenidos en los análisis de la síntesis y acumulación de dichas proteínas (**Figuras 30 y 25 y 26, respectivamente**). No resultaba así en el caso de M ya que no habiendo diferencias a nivel de transcripción y replicación, sí que las había a nivel de acumulación de las proteínas M1 y M2 (**Figura 26**).

### **2.6.3. Estudio del transporte núcleo-citosol de los mRNAs de NA y NP.**

Se analizó también el transporte núcleo-citosólico de los mRNAs de NA y NP como control. Para ello se obtuvo el RNA total de las fracciones nuclear y citosólica de las células infectadas por los virus 11C o wt, o pseudo-infectadas, a distintos tiempos post-infección y se cuantificó por hibridación en *dot-blot* como se describe en los apartados 4.1.3 y 4.4.1 de Materiales y Métodos. Los tiempos a los que se extrajo el RNA a temperatura permisiva fueron 3, 6 y 9 hpi y a temperatura restrictiva fueron 2, 4 y 6 hpi. Los resultados del análisis del mRNA nuclear y citosólico de NA y NP, que se presentan en la **Figura 34** mostraron que, tanto el virus 11C como el virus wt tienen un ligero defecto en el transporte del mRNA de NA a temperatura restrictiva. En cuanto al transporte del mensajero de NP, el virus 11C mostraba una ligera retención nuclear a temperatura restrictiva en comparación con la temperatura permisiva, resultado que no se observaba en el virus wt.

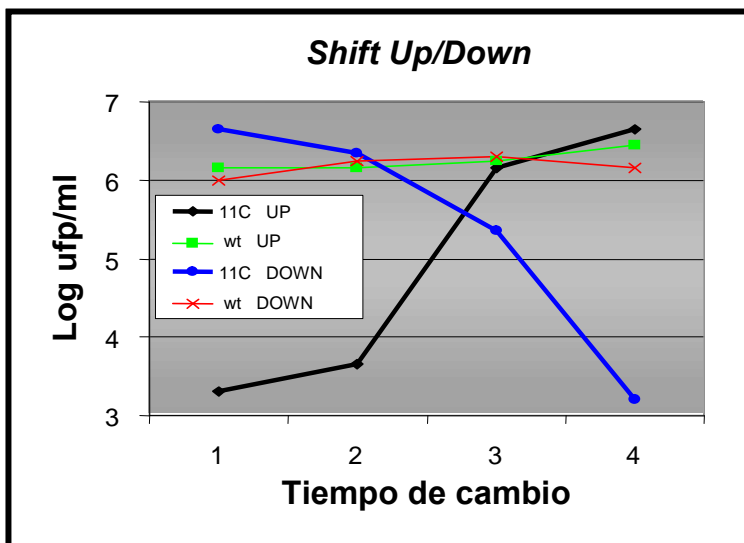


**Figura 34. Transporte núcleo-citosólico del mRNA de los segmentos NA y NP en células infectadas por los virus recombinante control (wt) o mutante.** Se infectaron monocapas de células MDCK a una mdi de 10 ufp/célula con el virus control (wt) o el mutante 11C a ambas temperaturas, 32° y 39° C. A los tiempos indicados se realizó un aislamiento núcleo-citosólico. Se purificó el RNA de cada fracción y se utilizó para hibridación por *dot blot* usando ribosondas de polaridad negativa específicas de NA y NP. La normalización de la carga de RNA se realizó bien por hibridación con una sonda específica para detectar el rRNA 18S (para las muestras de las fracciones citosólicas) o por cuantificación de los precursores de los rRNAs 18S y 28S (para las muestras de las fracciones nucleares). Los resultados representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes y se muestran como porcentaje del valor obtenido en el último tiempo del virus wt.

### 2.7. ¿Es una función temprana o tardía la responsable del fenotipo *ts* en el virus mutante 11C?

Para determinar el momento preciso durante la infección en el que la función alterada en el virus mutante 11C era requerida, se llevaron a cabo experimentos de genética clásica denominados *shift-up* y *shift-down*. Se infectaron monocapas de células MDCK a alta mdi tanto con el virus mutante como wt, a ambas temperaturas, 32° y 39° C. A distintos tiempos post-infección los cultivos se transfirieron de una temperatura a la otra, de tal forma que aquellos que comenzaron su incubación a 32° C lo finalizaron a

39° y al revés. Los tiempos a los cuales se realizaron los cambios de temperatura se eligieron según la duración del ciclo del virus a cada una de las temperaturas. Así, los cultivos que se incubaron a 32° C sufrieron los cambios de temperatura a los tiempos de 2, 4 y 6 hpi, mientras que aquellos que se incubaron a 39° C se transfirieron a los tiempos de 1.5, 3 y 4.5 hpi. Después de que todos los cultivos se mantuvieron en incubación durante un ciclo de infección (8 hpi a 32° C y 6 hpi a 39° C), se recogieron los sobrenadantes y se determinó su infectividad a temperatura permisiva. El título final obtenido a partir de las células infectadas por el virus control fue similar en todos los casos (Figura 35), independientemente del momento en el que se realizara el cambio de temperatura. Este resultado era esperable debido a que el virus control no presentaba ningún fenotipo *ts* y además nos confirmaba que el tiempo final al que fueron recogidos los sobrenadantes era equivalente en todos los casos y que se correspondía con la duración del ciclo de infección a cada temperatura.

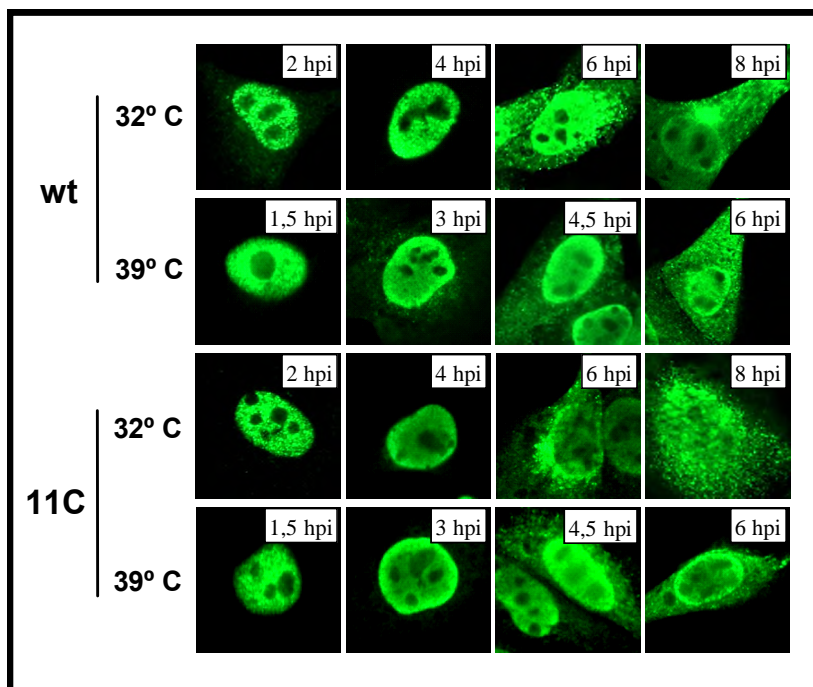


**Figura 35. Experimento de cambio de temperatura.** Se infectaron monocapas de células MDCK con los virus control (wt) o mutante a una mdi de 10 upf/célula y se incubaron inicialmente a 32° o 39° C. A las 2, 4 y 6 hpi (32° C) o 1.5, 3 y 4.5 hpi (39° C), se transfirieron los cultivos de una temperatura a la otra y se mantuvieron en incubación hasta las 8 hpi (32° C) o 6 hpi (39° C). Se determinó el título viral de cada uno de los sobrenadantes mediante ensayo de placa a temperatura permisiva.

La representación gráfica de los datos obtenidos a partir de la infectividad de los sobrenadantes de las células infectadas por el virus 11C, mostró las curvas de aumento y disminución de título viral, que se corresponden con los experimentos de *shift-up* y *shift-down* respectivamente. Así, en los experimentos de *shift-up* (desde 32° a 39° C), los cultivos transferidos a tiempos tempranos dieron lugar a bajos títulos virales, mientras que aquellos transferidos en tiempos tardíos, rindieron títulos más altos. Al

revés, en los experimentos de *shift-down* (desde 39° a 32° C), los cultivos transferidos a tiempos tempranos dieron lugar a altos títulos, mientras que aquellos que se transfirieron tardíamente rindieron bajos títulos virales. El punto de corte de ambas curvas indicaba el momento del ciclo en el que la función alterada era requerida. Dicho punto de corte tenía lugar cerca del tercer momento de cambio (6 hpi a 32° C y 4.5 hpi a 39° C), indicando que la función de NS1 afectada por las mutaciones era requerida en un momento tardío de la infección.

Al mismo tiempo que los cultivos eran transferidos de una temperatura a la otra, se fijaron cultivos infectados de forma paralela para realizar análisis de inmunofluorescencia. De esta forma se pretendía monitorizar el progreso de la infección mediante la visualización de la proteína NP como marcador de las RNPs. Los resultados se muestran en la **Figura 36**. Se observó que en el momento en el que la función de NS1 afectada era requerida, una parte considerable de la NP y por tanto de las RNPs, se localizaba en el citoplasma. Además, la acumulación (**Figura 25**) y el patrón de distribución (**Figura 36**) de NP a lo largo de la infección resultó ser muy similar en todos los puntos indicando que el transporte núcleo-citoplasma de las RNPs progenie no estaba afectado en las células infectadas por el virus 11C a temperatura restrictiva.

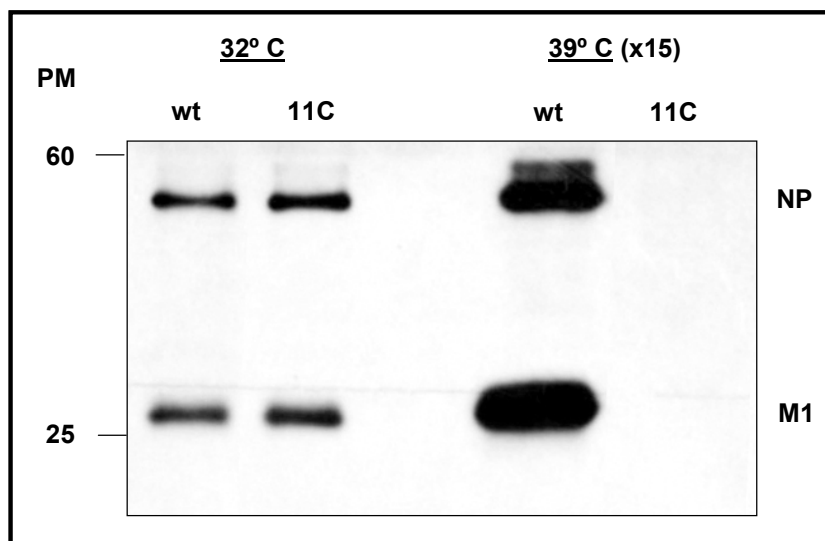


**Figura 36. Experimento de cambio de temperatura.** Se infectaron monocapas subconfluentes de células MDCK a una mdi de 10 ufp/ célula con los virus recombinante control (wt) o mutante 11C. A los tiempos indicados en la figura, los cultivos se fijaron y procesaron mediante IF usando anticuerpos específicos frente a NP como marcador de la localización de las RNPs. Como control se usaron células sin infectar, las cuales no mostraron ninguna señal de fluorescencia (datos no mostrados).

## 2.8. Análisis de la formación de partículas virales progenie.

### 2.8.1. Análisis bioquímico de la presencia de partículas virales en el sobrenadante de células infectadas.

Debido a que la acumulación de las proteínas NA y M2 estaba disminuida en las células infectadas por el mutante 11C a temperatura restrictiva, se quiso analizar la influencia de cada uno de estos factores en la producción de partículas virales progenie. Por una parte, la menor expresión de NA podía estar dificultando la liberación de las partículas virales progenie al sobrenadante. Por otra parte, la disminución en la acumulación de M2 podía estar determinando una menor infectividad de las partículas virales presentes en el sobrenadante. Para diferenciar entre ambas posibilidades, se purificaron las partículas virales presentes en los sobrenadantes de cultivos de células infectadas por el virus mutante o control a ambas temperaturas, y se analizó bioquímicamente la presencia de las proteínas virales M1, M2 y NP tal y como se describe en los apartados 3.5 y 5.4 de Materiales y Métodos.

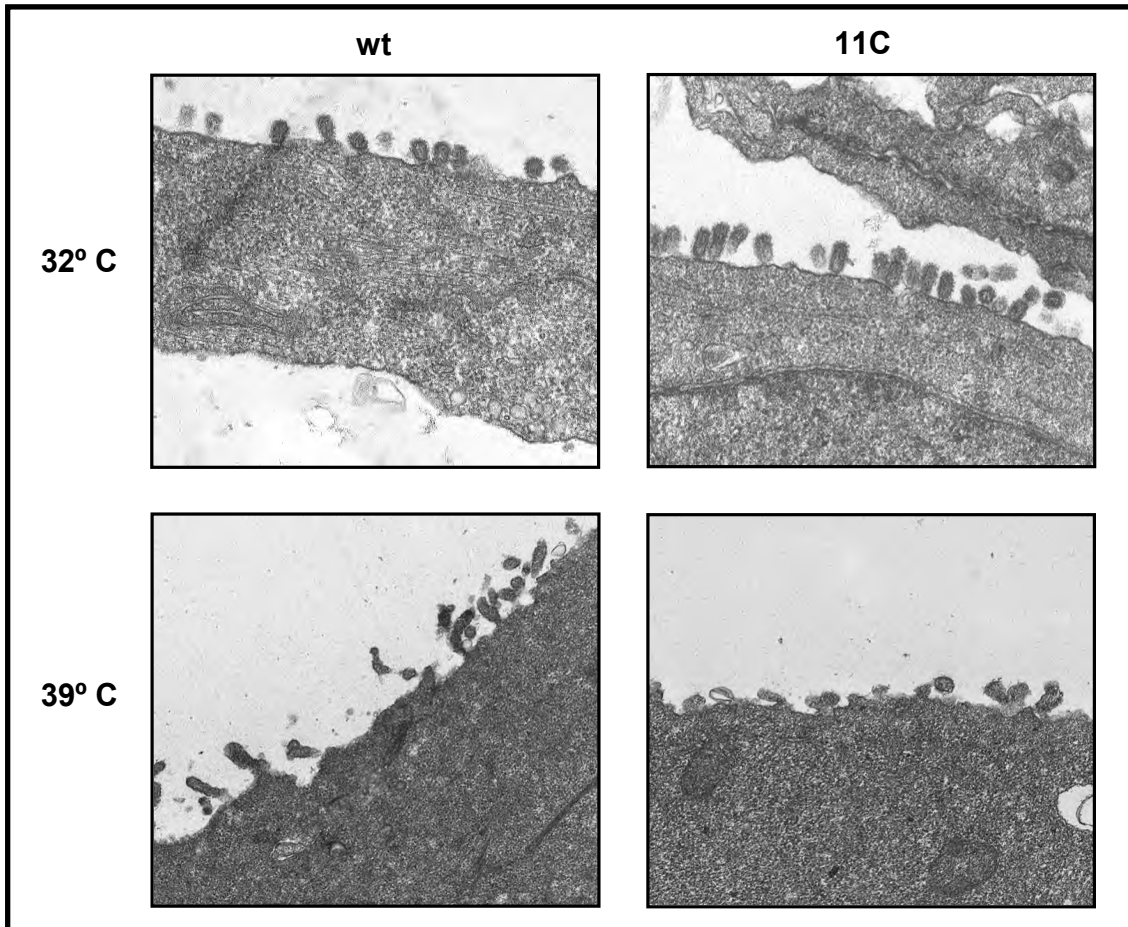


**Figura 37. Producción de partículas virales en células infectadas por los virus recombinante control (wt) o mutante 11C.** Se infectaron monocapas de células MDCK a 10 ufp/célula con virus control (wt) o mutante. A las 9 hpi se recolectaron los sobrenadantes y se purificaron por centrifugación las partículas virales presentes en ellos, tal y como se indica en Materiales y Métodos. Los purificados se analizaron por WB con una mezcla de anticuerpos específicos contra M1, M2 y NP. La posición de las bandas correspondientes a NP y M1 se indica en la parte derecha de la figura mientras que la movilidad de los marcadores de peso molecular (PM) se muestra a la izquierda. En los carriles correspondientes a las muestras obtenidas a temperatura restrictiva se analizó material proveniente de 15 veces más cantidad de células.

Los resultados mostrados en la **Figura 37** indicaron que a temperatura permisiva se obtenía la misma cantidad de proteínas virales en el sobrenadante de células infectadas con el virus wt y el virus mutante 11C. Sin embargo, a temperatura restrictiva no se pudo detectar proteína viral alguna en el sobrenadante de las células infectadas por el mutante, incluso cuando se analizó 15 veces más cantidad de material. En ningún caso se llegó a detectar la presencia de la proteína M2, seguramente debido al bajo número de copia con el que está presente en los viriones. Estos resultados indicaban que no se liberaban partículas virales al sobrenadante de las células infectadas por el virus mutante a temperatura restrictiva, sugiriendo defectos en la formación de partículas virales, en su liberación o en ambas.

### **2.8.2. Análisis de la formación de partículas virales mediante microscopia electrónica.**

Para intentar discernir entre estas dos posibilidades se realizaron experimentos de microscopia electrónica en células infectadas con los virus mutante o wt a ambas temperaturas. De esta forma se podría determinar la presencia de los viriones de nueva formación en la membrana plasmática de las células. Tal y como se observa en la **Figura 38**, los viriones progenie son visibles en la membrana de las células infectadas tanto con el virus wt como el virus mutante a temperatura permisiva. Sin embargo, a temperatura restrictiva no se pudieron observar viriones incluso en las células infectadas con el virus control a pesar de que su crecimiento a temperatura restrictiva sólo estaba afectado en un log en comparación con la temperatura permisiva (**Figura 23, paneles a alta mdi**). Este resultado negativo podía deberse simplemente a una falta de sensibilidad de la técnica ya que por otros procedimientos como el análisis de la infectividad de las partículas presentes en los sobrenadantes o el análisis de la expresión de proteínas virales, sí que éramos capaces de detectar las partículas virales.



**Figura 38. Microscopía electrónica de células infectadas por los virus recombinante control (wt) o mutante 11C.** Se infectaron monocapas de células MDCK a 10 ufp/célula con ambos virus tanto a temperatura de 32° como 39° C. A 8 hpi (32° C) o 6 hpi (39° C) se lavaron y fijaron las células con una solución que contenía Glutaraldehído 2 % y Ác. Tánico 1 % en 0.4 M Hepes pH 7.12 durante 1h a temperatura ambiente. Tras el tratamiento de fijación se volvieron a lavar las células y se continuó con un protocolo clásico de inclusión, corte, tinción y visualización por microscopía electrónica previamente descrito (Salanueva et al., 1999).

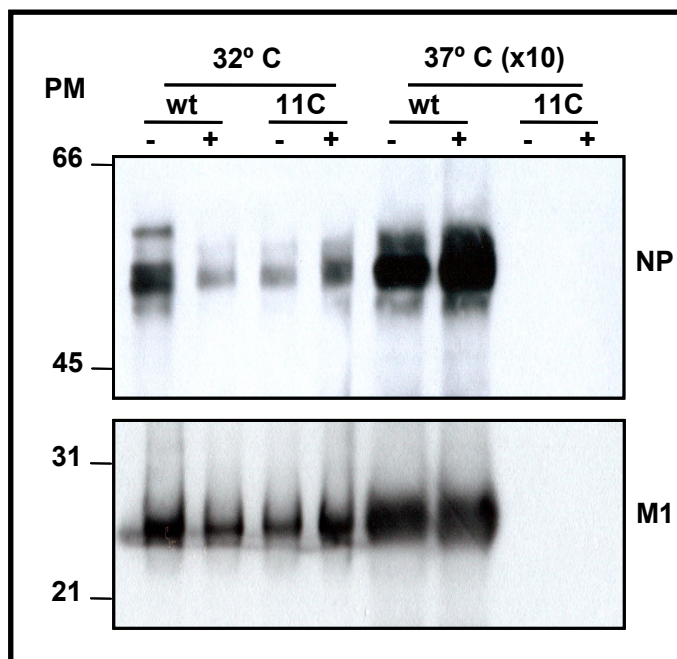
### 2.8.3. Experimentos de rescate de título viral por tratamiento con neuraminidasa exógena.

Ya que los experimentos de microscopía electrónica no ayudaron mucho a distinguir entre las dos posibilidades, se realizaron experimentos de rescate de título viral con tratamiento exógeno con NA bacteriana, tal y como se describe en el apartado 3.7 de Materiales y Métodos. Si la baja expresión de NA fuera la única responsable del fenotipo *ts* del virus 11C, al suplementar el medio de cultivo con NA bacteriana se esperaría un rescate del título viral. Como control se usó el virus WSN A<sub>6</sub> que contiene una secuencia oligo (A) en vez de oligo (U) en el sitio de poliadenilación del segmento de NA, por lo que resulta deficiente en la expresión de la proteína NA. Los resultados

indicaron que el fenotipo *ts* del virus mutante 11C no podía ser rescatado de esta forma (Tabla 10). Solamente se consiguió aumentar en un log el título viral del mutante mediante el tratamiento con NA exógena, mientras que el título del virus control aumentó en 3 unidades logarítmicas. Además, en estas condiciones tampoco fuimos capaces de detectar proteínas del virión en el sobrenadante de las células infectadas con el mutante a temperatura restrictiva tal y como se muestra en la Figura 39.

	wt		11C		WSN A <sub>6</sub>	
NA bacteriana	-	+	-	+	-	+
32° C	10 <sup>8</sup>	8*10 <sup>7</sup>	5*10 <sup>7</sup>	4*10 <sup>7</sup>	6*10 <sup>2</sup>	7*10 <sup>5</sup>
39° C	2*10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	6*10 <sup>2</sup>	5*10 <sup>3</sup>	5*10 <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup>

**Tabla 10. Experimento de rescate de título viral usando neuraminidasa exógena.** Se infectaron monocapas de células MDCK a 10<sup>-3</sup> upf/célula con los virus recombinante control (wt), mutante 11C o WSN A<sub>6</sub> y se incubaron tanto a temperatura permisiva como restrictiva. El medio de cultivo se suplemento (+) o no (-) con neuraminidasa bacteriana y cuando se observó efecto citopático en el virus control se recogieron los sobrenadantes y se analizó la infectividad de cada sobrenadante en nuevas monocapas de células MDCK a temperatura permisiva.



**Figura 39. Experimentos de rescate de título viral usando neuraminidasa exógena.** Se infectaron monocapas de células MDCK a 10<sup>-3</sup> upf/célula con los virus recombinantes control (wt) o mutante 11C y se incubaron tanto a temperatura permisiva como restrictiva. El medio de cultivo se suplementó (+) o no (-) con neuraminidasa bacteriana y cuando se observó efecto citopático en el virus wt se recogieron los sobrenadantes. Se purificaron las partículas virales presentes en los sobrenadantes y se analizó la presencia de proteínas virales por WB. La posición de las proteínas NP y M1 se indica en la parte derecha de la imagen y la movilidad de los marcadores de peso molecular (PM) en la izquierda. En el caso de las muestras procedentes de temperatura restrictiva se analizó el material procedente de 10 veces más cantidad de células.



### 2.9. ¿Se comporta el virus mutante 11C como dominante negativo?

Para terminar con la caracterización del virus mutante 11C nos propusimos estudiar su comportamiento como dominante negativo en un sistema de doble infección. Para ello se realizaron infecciones mixtas de células MDCK a una mdi de 2 ufp/célula con el virus wt y de 10 ufp/célula con el virus mutante 11C con el objetivo de que todas las células que hubieran sido infectadas por el virus wt lo hubieran sido también por el mutante. A 6 hpi (39° C) y 8 hpi (32° C) se recogieron los sobrenadantes y se analizó la infectividad de los mismos a temperatura permisiva. Los resultados que se presentan en la **Tabla 11** mostraron que, al menos para la función de formación de partículas, el virus mutante 11C no se comportaba como dominante negativo.

	<b>wt</b>	<b>wt + 11C</b>	<b>11C</b>
<b>32° C</b>	10 <sup>6</sup>	1,5*10 <sup>7</sup>	5*10 <sup>6</sup>
<b>39° C</b>	10 <sup>5</sup>	2*10 <sup>5</sup>	5*10 <sup>2</sup>

**Tabla 11. Experimento de doble infección.** Se infectaron monocapas de células MDCK con los virus control (wt) a una mdi de 2 ufp/célula y mutante 11C a 10 ufp/célula al mismo tiempo para asegurarse de que las células que hubieran sido infectadas por el virus wt también lo estaban siendo por el virus 11C. Se incubaron los cultivos tanto a temperatura permisiva como restrictiva y a 8 hpi (32° C) y 6 hpi (39° C) se recogieron los sobrenadantes y se analizó su infectividad por ensayo de placa a temperatura permisiva. Como control se llevaron infecciones simples realizadas en paralelo con ambos virus, en el caso de wt a 2 ufp/célula y con el 11C a 10 ufp/célula.



***Discusión***

---



El virus de la gripe es un parásito intracelular obligado y por lo tanto necesita desarrollar su ciclo vital en el interior de la célula. Para ello ha seleccionado mecanismos que le permiten hacerse con el control de muchos de los procesos celulares en su propio beneficio. De esta forma es capaz de regular la expresión génica tanto celular como viral, regulación en la que la proteína NS1 parece desempeñar un papel fundamental.

## **1. LA PROTEÍNA NS1: REGULADOR DE LA EXPRESIÓN GÉNICA CELULAR Y VIRAL DURANTE LA INFECCIÓN.**

Ya desde los primeros momentos de la infección el virus pone en marcha mecanismos que controlan la expresión génica celular y viral. Así, durante la transcripción viral, la polimerasa del virus actúa directamente sobre los mRNAs celulares robándoles el *cap* (Krug et al., 1979), que utiliza como cebador para la síntesis de los mRNAs virales (Plotch et al., 1981). Aunque de una manera indirecta, éste sería el primer mecanismo de regulación de la expresión génica celular que el virus pone en marcha al infectar una célula.

Pero además del mecanismo de *cap snatching* el virus ha seleccionado otras estrategias de regulación de la expresión génica celular, que en muchos casos implican la participación de la proteína NS1. Así, se ha implicado a NS1 en la regulación de los procesos de *splicing* (Fortes et al., 1994; Lu et al., 1994), el procesamiento del extremo 3' de pre-mRNAs (Chen et al., 1999; Nemeroff et al., 1998) y la retención nuclear de mRNAs poliadenilados (Fortes et al., 1994; Qiu and Krug, 1994).

Por otro lado, durante la infección por el virus de la gripe, la expresión génica viral está estrechamente regulada tanto espacial como temporalmente. A este respecto la proteína NS1, con su doble localización en el núcleo y en el citoplasma, desempeña un papel muy importante en procesos como la transcripción y replicación viral (Falcón et al., 2004; Marión et al., 1997b), el *splicing* de los segmentos 7 y 8 (Fortes et al., 1994; Lamb et al., 1980; Lamb et al., 1981), y el aumento de la traducción específica de mRNAs virales tardíos (de la Luna et al., 1995; Enami et al., 1994; Falcón et al., 2004; Hatada et al., 1990).

### 1.1. Regulación de los procesos de transcripción y replicación del RNA viral.

A lo largo de los años ha quedado establecido que el cambio de actividad transcripcional a replicativa tiene lugar a tiempos tempranos de la infección (Barrett et al., 1979; Hay et al., 1982) y requiere la presencia de NP soluble en el núcleo (Barrett et al., 1979; Hay et al., 1982; Shapiro and Krug, 1988). También, se sabe que ambos procesos son llevados a cabo por las RNPs virales (revisado en Elton et al., 2005) y que tienen lugar en contacto directo con la maquinaria de transcripción celular (Engelhardt et al., 2005). Sin embargo, todavía no está claro el mecanismo de regulación de ambos procesos. Trabajos de los años 90 han sugerido una posible función de la proteína NS1 en dicha regulación. Así, existen virus *ts* con mutaciones en NS1 que presentan problemas en la transcripción viral. Estas alteraciones pueden ser revertidas por mutaciones en las subunidades de PA y/o PB2 en la polimerasa viral (Ludwig et al., 1995; Scholtissek and Spring, 1982). Además, se ha descrito la interacción de NS1 con las vRNPs, vRNA, la estructura del *panhandle* y el mRNA viral (Hatada et al., 1997; Hatada et al., 1992; Marión et al., 1997b). Por otro lado, un virus mutante de delección en la proteína NS1 (NS1-81) tiene afectada la replicación de algunos genes virales (Falcón et al., 2004). Resultados obtenidos en esta Tesis apoyan la idea de que NS1 podría estar involucrado en la modulación de la actividad de la polimerasa viral. Así, los datos obtenidos con el virus mutante 11C muestran una alteración en la actividad transcripcional del gen de NA (Figura 33). Estos resultados parecen contradictorios con los datos derivados del virus mutante NS1-81, ya que en un caso los defectos afectan el proceso de transcripción y en el otro el de replicación. Sin embargo, estas alteraciones podrían reflejar problemas de estas proteínas NS1 mutantes en la interacción con las RNPs o polimerasa virales (Marión et al., 1997b). Muy recientemente se ha caracterizado un virus mutante puntual en la proteína NS1 que presenta defectos en la regulación temporal de la síntesis de los vRNA y mRNA de genes tardíos (Min et al., 2007). Por lo tanto, todos estos datos sugieren que NS1 podría estar implicada no sólo en el balance entre transcripción y replicación del RNA viral sino también en la regulación temporal de ambos procesos, aunque se desconoce el mecanismo concreto.

## 1.2. ¿Es NS1 un inhibidor general del *splicing*?

Como ya se ha indicado en la Introducción, los segmentos 7 y 8 del virus sufren un procesamiento por *splicing* dando lugar a 3 y 2 mRNAs distintos, respectivamente (Lamb et al., 1980; Lamb et al., 1981). Esta producción de mRNAs tiene que estar estrechamente regulada para que el ciclo vital del virus se cumpla correctamente. En dicha regulación parece jugar un papel importante la proteína NS1.

Durante mucho tiempo ha habido cierta controversia sobre la participación de NS1 en la regulación del proceso de *splicing* tanto de pre-mRNAs celulares como virales. Así, algunos autores describieron la presencia de señales en *cis* en el mRNA de NS1 que inhibían su procesamiento (Nemeroff et al., 1992) sugiriendo que NS1 no participa en *trans* en la regulación del *splicing* de su propio transcrito primario. Apoyando la hipótesis de que NS1 no regula el procesamiento de intrones virales, un virus carente de la proteína NS1 (delNS1) no parece mostrar ninguna alteración en la expresión de las proteínas M1 y M2 (Salvatore et al., 2002). Hay que señalar a este respecto, que en ningún caso se analizó la acumulación de los mRNAs correspondientes, su transporte núcleo-citoplásmico, ni su tasa de traducibilidad por lo que es difícil valorar la significación de dichos resultados en cuanto a la implicación de NS1 en el proceso de *splicing*.

Sin embargo, muchos otros estudios sugieren la participación de NS1 no sólo en la regulación del *splicing* de pre-mRNAs virales, sino también en la de los celulares. Estos trabajos han servido para proponer distintos modelos que intentan explicar dicha regulación. Así, en un primer modelo basado en experimentos *in vitro* se propuso que la unión de NS1 a una secuencia específica presente en el U6 snRNA impediría la formación de los complejos U6-U2 y U6-U4 necesarios para el correcto procesamiento de los intrones (Lu et al., 1994; Qiu et al., 1995). Según Lu y colaboradores, NS1 inhibiría de manera generalizada el *splicing* mediante su unión al U6 snRNA, afectando sólo a los genes celulares y no a los virales (Lu et al., 1994). Uno de los problemas que presenta este modelo de inhibición generalizada es que no explica las diferencias inducidas por NS1 sobre el uso preferencial de los sitios de *splicing* en el proceso de *splicing* alternativo (Fortes et al., 1994). Por otro lado, los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis no son compatibles con dicho modelo ya que en el sistema de transcripción/replicación utilizado, NS1 inhibe el procesamiento del intrón presente en el mRNA viral de NS1 (Figura 20 y Tabla 7). Además, se ha observado que dicha

inhibición es independiente tanto del dominio efector (Figura 20; NS1 81) como de la capacidad de unión a RNA de NS1 (Figura 20; NS1 R38A/K41A), en contradicción con lo propuesto en trabajos previos en los que se implicaba a ambos dominios de NS1 en la regulación del *splicing* (Lu et al., 1994). Por lo tanto, nuestros resultados van en contra de lo postulado previamente por otros autores que proponen que NS1 no estaría implicada en la regulación del *splicing* de los mRNAs virales.

Más adelante, se sugirió un nuevo modelo en el que la acción inhibitoria de NS1 sobre el *splicing* sería una consecuencia indirecta de otra de las funciones de NS1, más concretamente la de inhibición del procesamiento del extremo 3' de los pre-mRNAs celulares. La interacción del dominio efector de NS1 con la subunidad 30 kDa de CPSF impide el correcto corte y poliadenilación de los pre-mRNAs celulares (Nemeroff et al., 1998). Teniendo en cuenta que el último exón de un pre-mRNA viene definido por la secuencia poly (A) localizada en el extremo 3' (Berget, 1995) y que NS1 bloquea la correcta formación de dicha señal, indirectamente inhibiría el procesamiento del intrón (Li et al., 2001b). Este modelo explicaría que los mRNAs celulares sufrieran dicha inhibición mientras que los virales no (Lu et al., 1994), ya que la obtención de la cola poly (A) de los pre-mRNAs virales tiene lugar por un mecanismo diferente al celular e implica la copia reiterada de una señal de Us por parte de la polimerasa viral (Poon et al., 1999). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta Tesis tampoco se explican por este modelo ya que en nuestro sistema, la expresión de NS1 inhibe el *splicing* de su propio mRNA (Figura 20 y Tabla 7). Además, un mutante que carece del dominio efector (NS1 81), incapaz de interactuar con el factor CPSF, produce la misma inhibición que la NS1 wt. Por lo tanto, aunque nuestros resultados no permiten excluir que la inhibición de la formación del extremo 3' de los pre-mRNAs celulares pueda afectar de una manera indirecta a su *splicing*, parece más probable que NS1 actúe mediante un mecanismo más general que permita la inhibición del *splicing* tanto de genes celulares como virales. A este respecto, se ha descrito la interacción de NS1 con el factor de *splicing* NS1-BP (Wolff et al., 1998) que podría explicar una inhibición general. Además, el hecho de que la expresión de NS1 o la infección con el propio virus induzca cambios en la localización de las snRNPs (Fortes et al., 1995) apoya la hipótesis de un mecanismo de inhibición más general. La deslocalización durante la infección de las snRNPs, que son complejos clave para que tenga lugar el *splicing*, conduciría a una inhibición del procesamiento de los intrones tanto celulares como virales. Otro posible mecanismo que además explicaría la modificación en la elección



de los sitios de *splicing* alternativo inducido por la expresión de NS1 (Fortes et al., 1994), implicaría la desregulación del estado de fosforilación de proteínas SR implicadas en el *splicing*.

Aún con todos estos datos, todavía hoy, no está claro cuál es el mecanismo mediante el que NS1 regula el *splicing* de los pre-mRNAs celulares y virales, aunque todo parece indicar que requiere de su interacción con componentes de la maquinaria celular responsable. De esta forma NS1 produciría una inhibición generalizada pero no total del *splicing*, permitiendo así que tuviera lugar la maduración de una fracción de los pre-mRNAs virales derivados de los segmentos M y NS. Independientemente del mecanismo implicado, parece claro que al menos en el sistema transitorio de transcripción/replicación de RNPs, la inhibición del *splicing* del transcrito primario de NS estaría producida por la región N-terminal de la proteína NS1 y no requeriría de las interacciones NS1-RNA (Figura 20 y Tabla 7). Para recabar información mecánica sobre el proceso, Maite Pérez va a realizar experimentos en el sistema de transcripción/replicación viral utilizando otro tipo de replicones. La expresión del replicón de M junto con los replicones mutantes de NS permitirá estudiar la implicación de NS1 en la regulación no sólo del *splicing* del segmento M, sino también en la selección del sitio de *splicing* alternativo. Además, el estudio de replicones de genes pseudovirales con intrones de diversa naturaleza permitirá profundizar en el mecanismo de acción de NS1 en el proceso de *splicing*.

### 1.3. ¿Bloquea NS1 el transporte núcleo-citoplásmico de mRNAs celulares y virales?

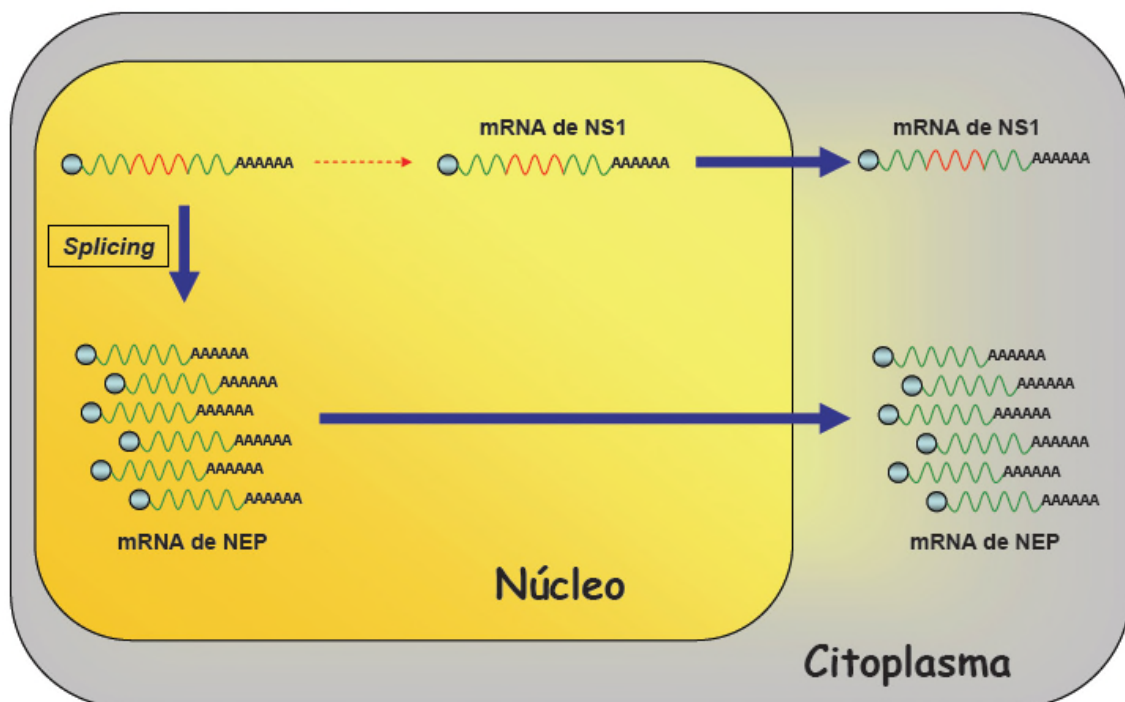
Otra de las funciones nucleares que se le asigna a NS1 en relación con la modulación de la expresión génica celular, es el bloqueo que induce en el transporte núcleo-citosólico de los mRNAs celulares. Como ya se ha indicado en la Introducción, la simple expresión de NS1 a partir de su cDNA es suficiente para inhibir el transporte núcleo-citosólico de los mRNAs celulares (Fortes et al., 1994; Qian et al., 1994; Qiu and Krug, 1994). Uno de los primeros modelos propuestos para explicar dicho bloqueo hacía referencia a la capacidad que tiene NS1 de unir secuencias poly (A) (Qiu and Krug, 1994) provocando así la retención de los mismos. Sin embargo, si éste fuera el mecanismo de acción, no está claro cómo NS1 u otro factor viral, selecciona la retención de los mRNAs celulares frente a los virales, ya que estos últimos se

transportan muy eficazmente al citoplasma durante la infección (Shapiro et al., 1987). Una posibilidad sería que NS1 reconociera de manera diferencial las secuencias poly (A) generadas por la acción de la polimerasa viral frente a las generadas por la PAP celular, aunque es más probable que la presencia de la polimerasa en el extremo 5' UTR del mRNA viral sea el responsable de su normal transporte a través de la membrana nuclear (véase más adelante).

El virus de la gripe, por medio de NS1, es capaz de regular la expresión génica celular a otro nivel de la maduración de los mRNAs. Este mecanismo tiene que ver con la capacidad que presenta NS1 de interactuar con la subunidad 30 kDa del factor celular CPSF (Nemeroff et al., 1998), implicado en el procesamiento del extremo 3' de pre-mRNAs celulares. Su interacción directa tiene lugar a través del dominio efector de NS1, siendo éste suficiente para llevar a cabo su función inhibitoria. La interacción de NS1 con el factor CPSF impide la correcta síntesis de la cola poly (A) de los pre-mRNAs celulares. Como consecuencia de ello los pre-mRNAs no finalizan su maduración, se inhibe su transporte al citoplasma y son degradados en el interior del núcleo. Por lo tanto, este mecanismo permitiría inhibir la expresión de genes celulares sin afectar a la de los virales. Pero además, se ha descrito la inhibición que NS1 ejerce sobre la función de PABPII mediante su interacción directa (Chen et al., 1999). Esta interacción produciría el bloqueo en el transporte de cualquier mRNA que hubiera escapado a la acción de NS1 sobre la inhibición en la formación del extremo 3'. Este modelo propone que la exportación de los mRNAs virales no estaría afectada debido a que su cola poly (A) se produce por la polimerasa viral en un mecanismo diferente al de corte y poliadenilación de los mRNAs celulares (Poon et al., 1999). Sin embargo, existe otra posibilidad que explicaría la retención de los mRNAs celulares en el núcleo. Este modelo se basa en la conexión física y funcional de los procesos de transcripción, *splicing*, procesamiento del extremo 3' y transporte de los mRNAs celulares (Steinmetz, 1997; Stutz and Izaurralde, 2003). Si NS1 además de afectar al procesamiento del extremo 3' como ya se ha comentado anteriormente, produjera un desacoplamiento entre dichos procesos podría bloquear de manera indirecta el transporte de los mRNAs celulares. Además, recientemente se ha descrito la interacción de NS1 con componentes de la vía de exportación de mRNAs TAP/p15 (Satterly et al., 2007b) que explicaría el bloqueo en el transporte de mRNAs celulares que han sufrido un procesamiento de sus intrones (que constituye la gran mayoría de los mRNAs celulares). Los resultados obtenidos por Satterly y colaboradores están en desacuerdo con el modelo basado en la

inhibición del factor CPSF, ya que la sobreexpresión de factores de la vía de exportación TAP/p15 es capaz de revertir el fenotipo de bloqueo inducido por NS1. Si el modelo de CPSF fuera correcto, el hecho de sobreexpresar factores de la vía TAP/p15 no debería de revertir el fenotipo ya que los pre-mRNAs seguirían sufriendo la inhibición en su maduración y por lo tanto, su retención nuclear. Este último estudio publicado recientemente aumenta aún más las dudas sobre cuál es el mecanismo que explica la inhibición producida por NS1 sobre el transporte de los mRNAs celulares.

### A. En ausencia de NS1

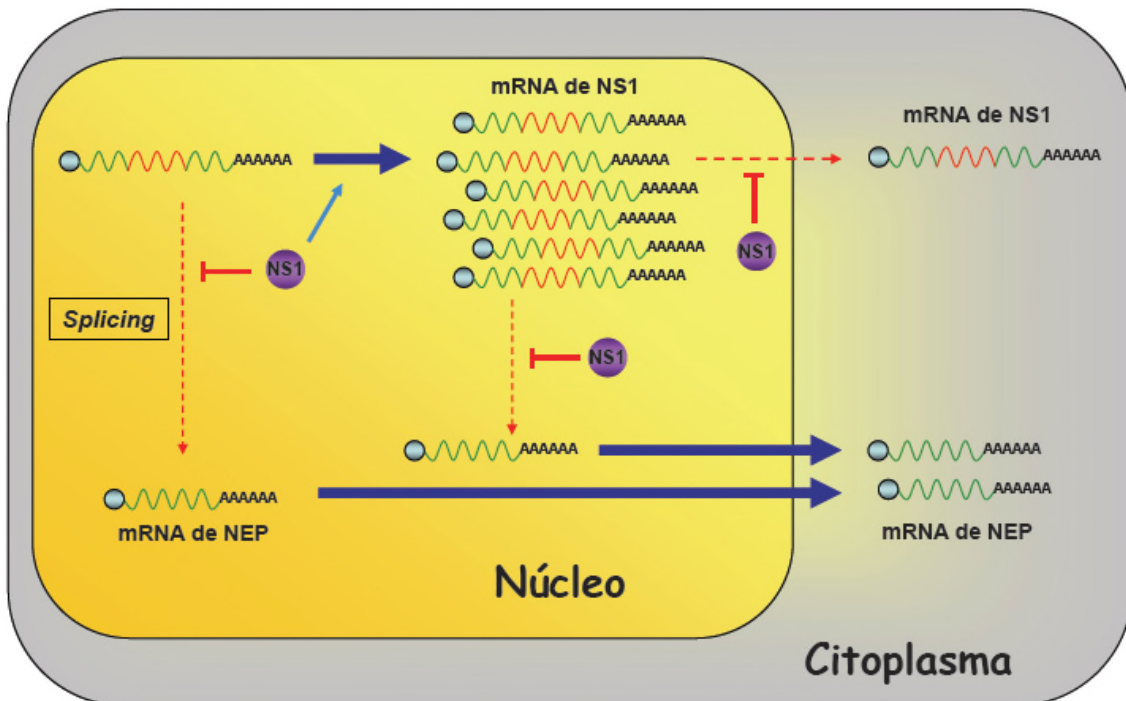


**Figura 40. Modelo de regulación de los procesos de *splicing* y transporte de mRNAs virales por parte de NS1.** Con flechas azules se muestran los procesos favorecidos mientras que con las rojas y discontinuas se indican los pasos inhibidos o afectados. Panel A. Esquema de los procesos en ausencia de la proteína NS1. Panel B. Esquema en presencia de la proteína NS1 wt. Panel C. Esquema en presencia de la proteína NS1 mutante en la unión a RNA.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el sistema de reconstitución de RNPs a lo largo de esta Tesis, indican que existe un bloqueo en el transporte de mRNAs virales, al menos del mRNA de NS1. Así, la expresión de NS1 a partir del replicón NS produce el bloqueo preferencial del mRNA de NS1, que no ha sufrido *splicing*, en comparación con el de NEP, que sí ha sido procesado. Además, los resultados obtenidos a partir del replicón NS R38A/K41A sugieren que la actividad de unión a RNA es necesaria para dicho bloqueo (Figura 21 y Tabla 8). Estos resultados apuntan a que además del

bloqueo en la exportación de mRNAs celulares que han sufrido *splicing*, ya sea por inhibición del procesamiento de los extremos 3' (Nemeroff et al., 1998) o bien por la acción sobre la vía de exportación TAP/p15 (Satterly et al., 2007b), NS1 bloquea la exportación de su propio mRNA viral, que no ha sufrido *splicing*, por un mecanismo que implica la unión a RNA. Se desconoce hasta el momento el mecanismo responsable de esta retención nuclear, aunque recientemente se ha descrito que la exportación nuclear de algunos mRNAs virales, incluido el de NS1, requiere su asociación a la maquinaria de transcripción celular (Amorim et al., 2007). Así, una vez que tiene lugar el *cap snatching*, NS1 podría actuar promoviendo el desacoplamiento físico y funcional entre la transcripción viral y el complejo de la RNA PolII celular. Este hecho interferiría en la asociación de las proteínas *shuttling* hnRNPs sobre los transcritos virales, bloqueando así su transporte. Esta interferencia no tendría lugar en el mRNA de NEP, que sí sufre *splicing*, porque éste se asociaría a la vía de exportación comúnmente utilizada por los mRNAs que han sufrido un procesamiento y que depende del complejo EJC/TAP-p15 (Stutz and Izaurralde, 2003).

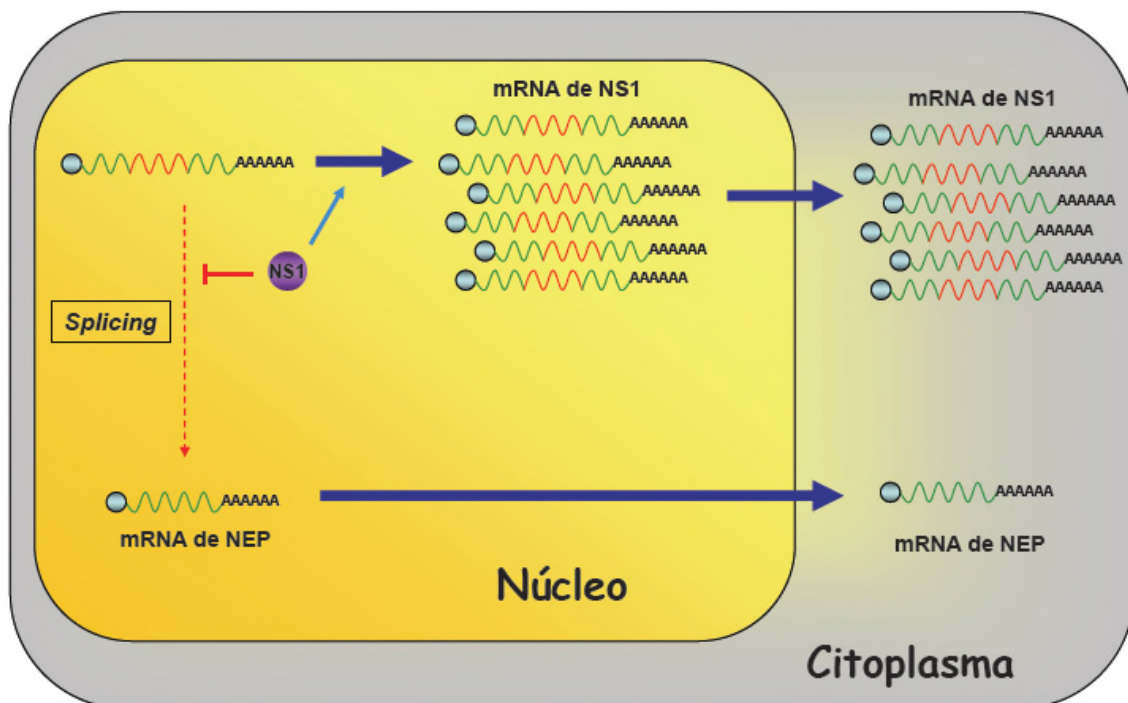
### B. En presencia de NS1



**Figura 40. Modelo de regulación de los procesos de *splicing* y transporte de mRNAs virales por parte de NS1.** Con flechas azules se muestran los procesos favorecidos mientras que con las rojas y discontinuas se indican los pasos inhibidos o afectados. Panel A. Esquema de los procesos en ausencia de la proteína NS1. Panel B. Esquema en presencia de la proteína NS1 wt. Panel C. Esquema en presencia de la proteína NS1 mutante en la unión a RNA.

La retención nuclear del mRNA de NS1 podría suponer un mecanismo para aumentar las posibilidades de este transcrito primario de formar un complejo de *splicing* en el contexto general de inhibición de *splicing* descrito anteriormente. Una completa inhibición del procesamiento del transcrito colineal de NS resultaría fatal para la infección ya que no se sintetizaría proteína NEP alguna, por lo que el virus habría tenido que seleccionar un mecanismo de escape para impedir el bloqueo completo del *splicing* de los mRNAs virales. Esta hipótesis es compatible con los fenotipos observados en el análisis genético realizado con los mutantes. Cuando no se expresa la proteína NS1 (delNS1), no se produce ninguna inhibición del *splicing* y tiene lugar una correcta exportación de los mRNAs tanto de NEP como de NS1 (Figura 40; panel A). Si la proteína NS1 está presente, tiene lugar tanto la inhibición del *splicing* como del transporte del mRNA de NS1 (Figura 40; panel B). Sin embargo, cuando se expresa un mutante en el dominio de unión a RNA de NS1 (NS1 R38A/K41A) la inhibición en el *splicing* se mantiene pero se elimina el bloqueo en la exportación debido a que no tiene lugar el reconocimiento del RNA y permite una eficiente exportación del transcrito primario de NS (Figura 40; panel C).

### C. En presencia de NS1 mutante en la unión a RNA



**Figura 40. Modelo de regulación de los procesos de *splicing* y transporte de mRNAs virales por parte de NS1.** Con flechas azules se muestran los procesos favorecidos mientras que con las rojas y discontinuas se indican los pasos inhibidos o afectados. Panel A. Esquema de los procesos en ausencia de la proteína NS1. Panel B. Esquema en presencia de la proteína NS1 wt. Panel C. Esquema en presencia de la proteína NS1 mutante en la unión a RNA.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en el sistema de reconstitución de RNPs indican que además de la inhibición del procesamiento y transporte de los mRNAs celulares descrita años atrás, NS1 regula también el *splicing* y el transporte núcleo citosólico de su propio transcrito colineal. Estos resultados implicarían que la inhibición del *splicing* y exportación nuclear tiene lugar por distintos mecanismos y al menos diferentes en parte a los que NS1 utiliza para alterar el metabolismo de los mRNAs celulares.

### 1.4. La proteína NS1 estimula la traducción de mRNAs virales.

Una vez que los mRNAs virales han sido transportados al citoplasma tiene lugar su traducción, siendo este el último proceso importante en la regulación génica tanto celular como viral en el que podría participar la proteína NS1. Como ya se ha indicado varias veces a lo largo de esta Tesis, los mRNAs virales resultan estructuralmente indistinguibles de los mRNAs celulares y sin embargo son traducidos muy eficazmente en comparación con los celulares. Por lo tanto, el virus ha tenido que seleccionar algún mecanismo que le permita diferenciar lo propio de lo celular. Parece ser que NS1 no estaría involucrada en dicha selección, ya que el virus delNS1 presenta una traducción normal de sus mRNAs en células deficientes en la respuesta mediada por interferón (García-Sastre et al., 1998). Recientemente, se ha propuesto que la polimerasa viral podría desempeñar dicha función (I. Burgui, enviado a publicación) y que NS1 simplemente ayudaría en la estimulación siendo prescindible para la selección previa.

Distintos trabajos han demostrado que los mRNAs celulares citoplasmáticos son degradados rápidamente durante la infección (Beloso et al., 1992; Inglis, 1982), aunque se desconoce el mecanismo concreto. Además, la síntesis de proteínas celulares se inhibe como consecuencia de la infección, en lo que se conoce como *shut off* celular. Se ha demostrado que la proteína NS1 no es la responsable de dicho fenómeno ya que un virus carente de la proteína NS1 (delNS1) es capaz de inhibir la síntesis de proteínas celulares de la misma forma que lo hace el virus wt (Salvatore et al., 2002). De todas formas, parece ser que NS1 está involucrada en el aumento traduccional de los mRNAs virales, más concretamente, estimulando el nivel de iniciación de los mismos (de la Luna et al., 1995; Enami et al., 1994). Así, se ha propuesto que NS1, gracias a su interacción con los factores celulares eIF4GI (Aragón et al., 2000) y PABPI (Burgui et al., 2003) y con el 5' UTR de los mRNAs virales (Garfinkel and Katze, 1993; Park and

Katze, 1995), podría estimular la reiniciación. De experimentos con virus *ts* se ha propuesto que dicha estimulación tendría lugar sobre todo en genes tardíos (Hatada et al., 1990) quizás debido a la localización citoplasmática de NS1 a tiempos tardíos de la infección. Apoyando dicha propuesta se ha observado que virus *ts* con mutaciones de delección en la proteína NS1 presentan defectos en la síntesis y acumulación de proteínas virales tardías (Falcón et al., 2004). Los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis con el virus mutante 11C, confirman la implicación de NS1 en la estimulación de la traducción de los mRNAs virales. Aunque la síntesis (Figuras 25 y 30) y acumulación (Figuras 26 y 30) de las proteínas M1, M2 y sobre todo NA está afectada, la expresión de HA es completamente normal (Figura 28). Estos resultados indican que habría una regulación específica de secuencia por parte de NS1 en cuanto a su función en la estimulación de la traducción.

Por otra parte, las interacciones descritas entre NS1 y la polimerasa viral (Marión et al., 1997b), NS1 y la proteína hStaufen (Falcón et al., 1999), así como la colocalización citoplasmática descrita entre hStaufen y la polimerasa y/o RNPs virales (resultados no publicados del laboratorio), hacen posible sugerir un modelo en el que los tres factores estén implicados en la traducción preferencial de los mRNAs virales frente a los celulares. No hay que olvidar que una de las funciones asignadas a hStaufen es la de transportar mRNAs específicos para que se traduzcan en el momento y lugar adecuados. Así, el virus podría poner en marcha un mecanismo de regulación de la expresión génica basado en la interacción de NS1 con la proteína hStaufen y su implicación en la traducción.

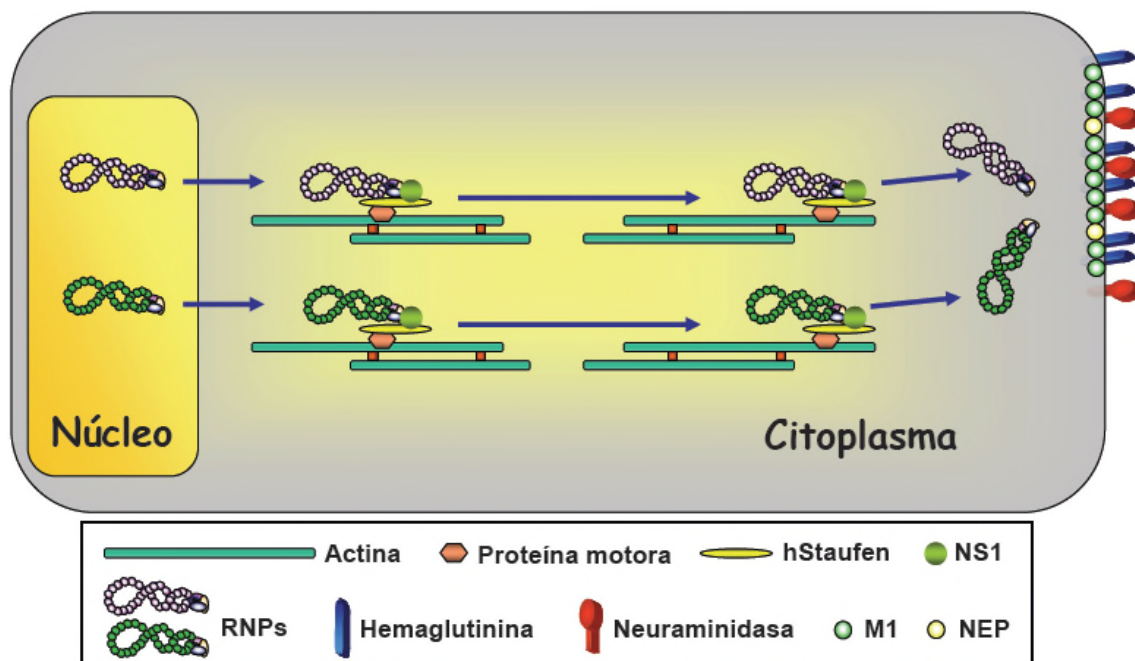
## **2. ¿PUEDE NS1 PARTICIPAR DE MANERA ACTIVA EN LA MORFOGÉNESIS VIRAL SIENDO UNA PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL?**

Una vez que la replicación del RNA y la expresión génica virales han tenido lugar, y para completar el ciclo vital del virus, se pone en marcha el proceso de morfogénesis viral. Para ello las RNPs progenie deben de exportarse desde el núcleo hacia el citoplasma. Una vez allí, son transportadas hacia la membrana celular donde tiene lugar la encapsidación de las mismas y la formación y liberación de los nuevos viriones. Al

igual que todos los procesos anteriores, la morfogénesis tiene que estar muy bien regulada.

Analizando cada paso del proceso de morfogénesis, hasta el momento se sabía que las proteínas NEP y M1 son factores virales clave para el transporte de las vRNPs progenie a través del poro nuclear (Elton et al., 2001; Martin and Helenius, 1991; O'Neill et al., 1998). Una vez en el citoplasma parece que las RNPs son transportadas a través de microfilamentos de actina (Avalos et al., 1997) hasta la membrana celular. Se ha descrito que el empaquetamiento de las 8 RNPs tiene lugar mediante un mecanismo preciso y ordenado en el que están involucradas secuencias presentes en la región codificante de cada segmento de RNA viral (Fujii et al., 2005; Fujii et al., 2003; Liang et al., 2005; Muramoto et al., 2006; Noda et al., 2006; Watanabe et al., 2003). Sin embargo, se desconoce si existe una participación de factores proteicos celulares y/o virales en todos estos procesos.

**A. Transporte de RNPs aisladas**



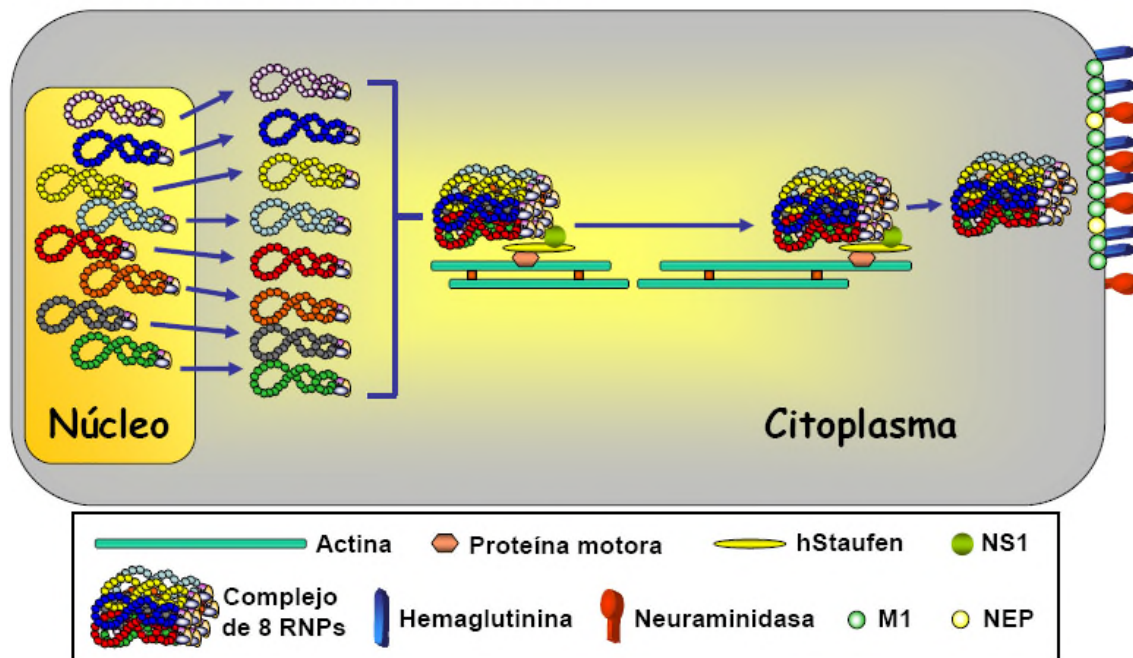
**Figura 41. Modelo del transporte de las RNPs hacia la membrana plasmática e implicación de NS1 y hStaufen.** Se muestran esquemáticamente los factores que podrían intervenir en el transporte a través de los microfilamentos de actina. Panel A. Esquema del transporte de RNPs aisladas. Panel B. Esquema del transporte de complejos de 8 RNPs.

Los resultados obtenidos a partir del análisis fenotípico del virus mutante 11C sugieren una posible implicación de la proteína NS1 en algunos de los pasos de la



morfogénesis viral. Por una parte, el fenotipo más dramático observado con el virus 11C fue el bloqueo casi total de la producción de partículas virales (Figura 37) aunque la expresión génica viral estaba sólo ligeramente afectada. Este resultado correlacionaba con la observación de que la función de NS1 alterada era requerida en una etapa tardía de la infección tal y como mostraban los experimentos de *shift up/shift down* (Figura 35). Así, la síntesis y acumulación de NP (Figuras 25 y 26) y la exportación de las RNPs (Figura 36) era correcta a temperatura restrictiva. Estos resultados sugieren que NS1 no estaría implicada en el transporte núcleo-citoplásmico de las RNPs y que por lo tanto, el proceso afectado por NS1 sería temporalmente posterior.

### B. Transporte del conjunto de 8 RNPs



**Figura 41. Modelo del transporte de las RNPs hacia la membrana plasmática e implicación de NS1 y hStaufen.** Se muestran esquemáticamente los factores que podrían intervenir en el transporte a través de los microfilamentos de actina. Panel A. Esquema del transporte de RNPs aisladas. Panel B. Esquema del transporte de complejos de 8 RNPs.

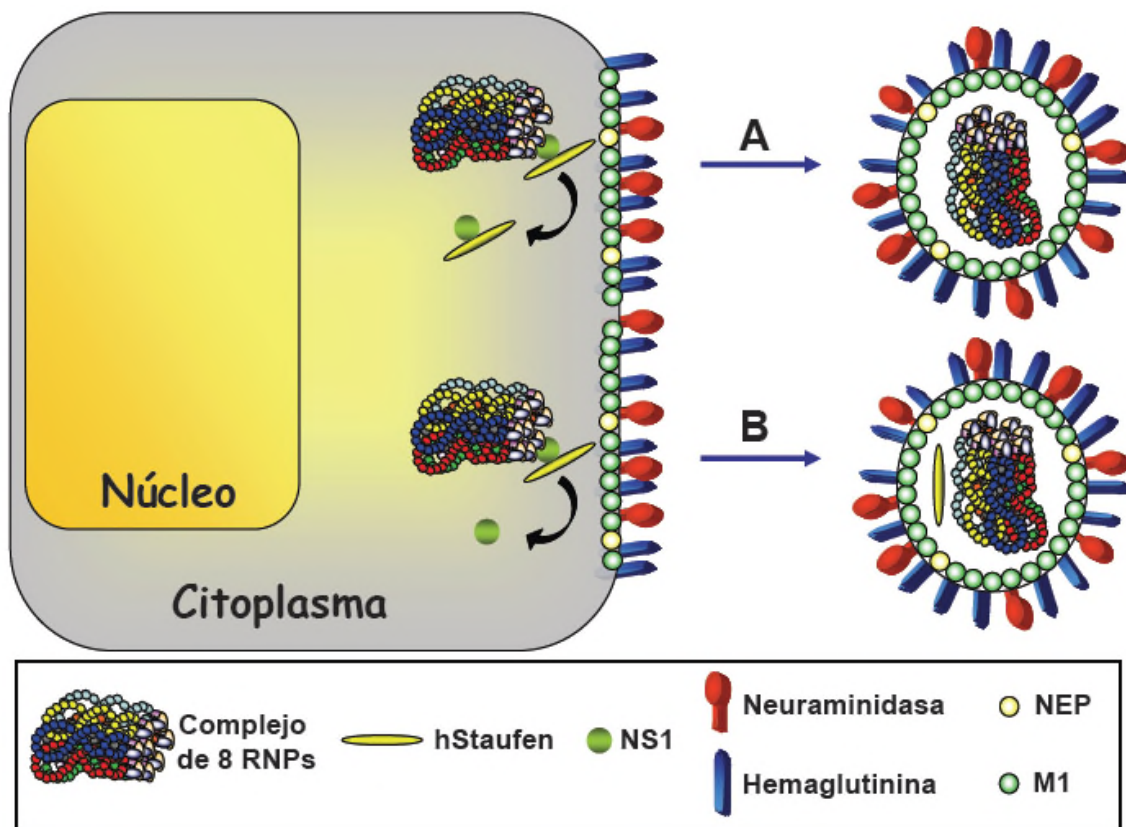
El defecto en la expresión de NA podría contribuir al fenotipo *ts* del virus 11C. Por una parte, se había propuesto que las colas citoplasmáticas de HA y NA podrían desempeñar un papel importante en la formación de viriones (revisado en Colman, 1989). Así, un defecto en la expresión de cualquiera de ellas podría derivar en problemas en la producción de partículas virales. Sin embargo, estudios posteriores sugirieron que ni la cola citoplasmática de HA ni la de NA son esenciales para la

morfogénesis (Garcia-Sastre and Palease, 1995; Jin et al., 1997; Mitnaul et al., 1996). Por otra parte, la disminución en la expresión de NA observada en el virus mutante 11C podría afectar a la liberación de las partículas virales. Sin embargo, el hecho de que el título viral no pudiera ser rescatado con la adición de NA bacteriana al medio de cultivo (Tabla 10), indica que el fenotipo *ts* observado no es solamente debido a problemas en la expresión de NA y sugiere que la proteína NS1 está implicada en un evento tardío en la morfogénesis de las partículas virales. Dicho evento tendría lugar antes de la liberación de los viriones pero después de la exportación de las RNPs desde el núcleo al citoplasma. Por lo tanto, NS1 estaría implicada en el transporte de las RNPs hacia la membrana plasmática, en la encapsidación para formar los nuevos viriones o en ambas etapas.

En cuanto al transporte de las RNPs hacia la membrana plasmática, no se puede excluir que NS1 pudiera estar involucrada en ello. Hay que tener en cuenta por una parte, que NS1 interacciona con la proteína celular hStaufen en el citoplasma (Falcón et al., 1999) y que se ha encontrado localizada a hStaufen en grandes gránulos citoplasmáticos que contienen tanto proteínas del citoesqueleto como proteínas motoras, entre otras (Villacé et al., 2004). Además, se ha observado una colocalización entre hStaufen y las RNPs en el citoplasma durante la infección (datos no publicados del laboratorio). Todos estos datos permiten proponer un modelo en el que tanto NS1 como hStaufen podrían estar implicadas en el transporte de las RNPs hacia la membrana celular a través de los microfilamentos de actina, aunque no hay datos que lo confirmen (Figura 41; paneles A y B).

Por otro lado, evidencias recientes indican que la incorporación de las RNPs en los viriones es específica y que secuencias localizadas en la región codificante desempeñan un papel muy importante en dicho empaquetamiento (Fujii et al., 2005; Fujii et al., 2003; Liang et al., 2005; Muramoto et al., 2006; Watanabe et al., 2003). El fenotipo observado con el virus mutante 11C es compatible con una posible función de NS1 en el proceso de empaquetamiento. Esta posibilidad está apoyada por la interacción descrita entre NS1 y las RNPs virales durante la infección (Marión et al., 1997b). De hecho, la implicación de proteínas con capacidad de unión a RNA en el empaquetamiento de genomas con múltiples componentes de RNA ya se ha descrito previamente en la formación de viriones de HIV-1 (Chatel-Chaix et al., 2004; Mouland et al., 2000). En este sistema, la asociación del RNA genómico viral con la proteína viral Gag y la proteína celular hStaufen es importante para la producción de virus infeccioso. En este

sentido, hay que recordar la asociación entre NS1 y la proteína hStaufen (Falcón et al., 1999; Marión et al., 1999), por lo que podría proponerse un mecanismo similar al observado con el virus HIV-1. En dicho modelo NS1 podría hacer de nexo entre la proteína hStaufen y las RNPs de tal forma que podría dirigir la selección y empaquetamiento del conjunto de 8 RNPs que se incorporan en el virión. No se sabe si las 8 RNPs que se encapsidan formando el virión son transportadas hacia la membrana en forma de un complejo de RNPs (Figura 41; panel B) o si son seleccionadas en las proximidades de la membrana plasmática. Independientemente del mecanismo, este modelo podría explicar ambas posibilidades. No hay que olvidar que NS1 es una proteína no estructural por lo que, una vez seleccionado el conjunto de 8 RNPs tendría que liberarse de dicha unión y permitir que tuviera lugar el empaquetamiento.



**Figura 42. Modelo de empaquetamiento de las RNPs en la morfogénesis viral.** Se muestran dos variables del mismo modelo en los que participarían las proteínas NS1 y hStaufen. A. Variable en la que ni NS1 ni hStaufen se incorporarían en el virión. B. Variable en la que hStaufen se incorporaría en el virión de manera similar a como lo hace en la morfogénesis de HIV-1.

Recientemente se ha descrito que un virus mutante en la subunidad PA de la polimerasa presenta un defecto en la formación de partículas virales (Regan et al., 2006)

similar al observado con el mutante 11C. Este fenotipo sería compatible con el modelo propuesto en el que la unión de NS1 a las RNPs, por ejemplo vía polimerasa viral, dirigiría el empaquetamiento de las mismas. Por lo tanto, mutaciones en PA o NS1 podrían debilitar dicha interacción que conduciría a defectos en la formación de la progenie viral.

Por último, no se puede descartar formalmente que el fenotipo observado en el virus mutante 11C venga dado en *cis* por las mutaciones presentes en el vRNA de NS, y no en *trans*. Sin embargo, sería poco probable que fuera así, ya que las 3 mutaciones presentes en el gen NS del virus 11C dan lugar a cambios de aminoácido en la proteína NS1 y además dichos mutaciones se localizan fuera de las señales de empaquetamiento descritas para el gen NS (Fujii et al., 2005).

### 3. LA PROTEÍNA NS1 ESTÁ IMPLICADA EN LA PATOGÉNESIS Y VIRULENCIA DURANTE LA INFECCIÓN.

En los últimos años son muchos los trabajos que se han realizado en torno a la relación entre NS1 y la patogénesis viral durante la infección, tanto a nivel celular como a nivel de organismo. Además, debido a los últimos brotes de gripe causados por la cepa H5N1, se están poniendo muchos esfuerzos en el estudio tanto de la virulencia y patogénesis viral como de los factores implicados en ellas.

Distintos trabajos han demostrado la implicación de NS1 como factor de virulencia durante la infección. Así, virus mutantes en la proteína NS1 presentan un fenotipo atenuado tanto en su crecimiento en células en cultivo como en infecciones en modelos animales (Bergmann et al., 2000; Cauthen et al., 2007; Donelan et al., 2003; Egorov et al., 1998; Falcón et al., 2005; García-Sastre et al., 1998; Hayman et al., 2007; Hayman et al., 2006; Solorzano et al., 2005). Sin embargo, hay cierta discrepancia acerca de los mecanismos a través de los cuales NS1 participa en la patogénesis viral. Por una parte, se ha propuesto que la modulación de la virulencia producida por NS1 es una consecuencia indirecta de la acción de NS1 sobre la expresión génica celular. De esta forma, NS1 evitaría la expresión de genes constitutivos pero también, la de todos los genes que se inducen como respuesta a la infección. Por lo tanto, la inhibición de los procesos de corte y poliadenilación y *splicing*, así como la retención nuclear de mRNAs

celulares inducido por NS1 directamente en la célula infectada, evitaría la expresión de genes involucrados tanto en el sistema de interferón como en las cascadas de señalización de apoptosis. Apoyando esta hipótesis se ha descrito la colocalización de la proteína NS1 en los PMLs (Sato et al., 2003) y la disgregación de los mismos a lo largo de la infección (I. Salanueva, datos no publicados). Los PML NBs (PML *nuclear bodies*) son unas estructuras subnucleares en las que tiene lugar la expresión de genes relacionados con la respuesta a interferón. Por lo tanto, la localización de NS1 en los PMLs y su disgregación sugieren un mecanismo indirecto de interferencia en el sistema del interferón.

Por otro lado, se ha propuesto otro modelo basado en la interacción directa entre NS1 y componentes del sistema de defensa celular innato. Apoyando esta hipótesis se han caracterizado las interacciones de NS1 con factores celulares como PKR (Min et al., 2007; Tan and Katze, 1998), RIG-I (Mibayashi et al., 2007; Pichlmair et al., 2006), y la subunidad p85 $\beta$  de PI3K (Hale et al., 2006; Shin et al., 2007). Además, se ha descrito que NS1 controla la activación de algunas de las cascadas de señalización como la de JNK/c-Jun (Kujime et al., 2000; Ludwig et al., 2002; Schultz-Cherry et al., 1998; Schultz Cherry et al., 2001) y PI3K (Hale et al., 2006; Shin et al., 2007). La activación de estas dos cascadas induce la entrada en apoptosis de las células, por lo que se ha sugerido que la acción inhibitoria de NS1 sobre la activación de dichas cascadas produciría una respuesta anti-apoptótica beneficiosa desde el punto de vista viral, que permitiría la progresión de la infección. En cuanto a la inhibición de la activación de PKR está claro que constituye un factor de virulencia muy importante durante la infección, ya que de esta forma el virus mantiene activa la maquinaria traduccional celular que necesita para la síntesis de las proteínas virales. Muy recientemente se ha implicado a los residuos 123 a 127 de NS1 en el control de la activación de PKR (Min et al., 2007). A este respecto, parece que las mutaciones V18A/R44K/S195P presentes en la proteína NS1 del virus 11C no serían las responsables de su función en contrarrestar la respuesta a interferón, ya que en las células Vero se mantiene, al menos parcialmente, el fenotipo *ts* del virus (Tabla 9).

Finalmente, existe cierta discrepancia en cuanto a la relevancia funcional de la interacción descrita entre NS1 y RIG-I, así como de la importancia de la activación de RIG-I durante la infección. En primer lugar, se ha propuesto que RIG-I se activaría por medio de su interacción con dsRNA producido como consecuencia de la replicación viral (Kato et al., 2006). Sin embargo, un trabajo reciente pone en duda la presencia de

dsRNA durante la infección por gripe, sugiriendo que en este caso la activación de RIG-I vendría dada por su interacción con ssRNA con extremos 5' trifosfato o lo que es lo mismo por los extremos del vRNA (Pichlmair et al., 2006). Aunque durante la infección por gripe se sintetiza una gran cantidad de vRNA, éste siempre está en forma de vRNPs y sus extremos originan una estructura en *panhandle* que se encuentra cubierta por la polimerasa viral. Por lo tanto, se hace muy difícil pensar en la activación de RIG-I mediante este mecanismo. Aún así, cabría la posibilidad de que durante la replicación viral tuvieran lugar errores que liberaran moléculas de ssRNA con extremos 5' trifosfato. Aún en esa situación anómala, esas moléculas se encontrarían físicamente en el núcleo, alejadas de la localización citoplasmática habitual de RIG-I. Sin embargo, experimentos de sobreexpresión (Guo et al., 2006) o silenciamiento (Opitz et al., 2006) del factor RIG-I durante la infección con gripe indican una implicación de dicho factor en el control de la patogenicidad viral. Todas estas contradicciones hacen muy difícil valorar la importancia de RIG-I en el control de la infección por gripe.

De todos los estudios realizados al respecto parece un hecho que NS1 constituye un factor de virulencia clave durante la infección. Sin embargo, no está nada claro si es por acción directa, como consecuencia de la regulación de la expresión génica celular o si por el contrario es la suma de ambos mecanismos. La limitación más importante que ha dificultado su estudio, y por tanto el esclarecimiento de dicho dilema, es que hasta el momento no se han encontrado virus mutantes en NS1 que simplemente tengan afectado bien su función en la regulación de la expresión génica celular o su función como antagonista del sistema interferón y cascadas asociadas. Con el objetivo de aclarar esta cuestión en el laboratorio se está comenzando un proyecto que pretende generar una batería de virus mutantes en la función de control de la respuesta a interferón. De esta forma, además de poder valorar la implicación de NS1 en dicha función en un modelo de infección, se podrá abordar un análisis genético del mismo.

#### **4. NS1: UN ENIGMA DENTRO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE**

Poniendo en perspectiva todo lo analizado hasta el momento hay una pregunta muy importante que queda en el aire, sin contestar y que constituye el enigma de NS1: ¿cómo es posible que NS1 esté implicada en funciones tan diversas y al mismo tiempo sea una proteína prescindible en la infección?

Como ya he comentado anteriormente, esta es la pregunta que nos hacemos todos los que trabajamos en NS1 y que esperamos que en un futuro, quizás en otra Tesis posterior a ésta, tenga una respuesta. Hasta entonces seguirá siendo un enigma...





***Conclusiones***

---



## CONCLUSIONES

- 1.- Se ha establecido un sistema de transcripción/replicación viral transitorio que permite el estudio de la acumulación de los mRNAs de NS1 y NEP así como su transporte núcleo-citosólico.
- 2.- La proteína NS1 inhibe el *splicing* de los transcritos derivados de su propio segmento. Para ello es necesaria la región N-terminal pero no la actividad de unión a RNA.
- 3.- La proteína NS1 bloquea el transporte núcleo-citosólico de su propio mRNA de una manera dependiente de su actividad de unión a RNA.
- 4.- El virus mutante 11C presenta una retención nuclear de la proteína NS1 independientemente de la temperatura.
- 5.- La expresión de la proteína neuraminidasa está fuertemente afectada en las células infectadas por el virus mutante 11C a temperatura restrictiva.
- 6.- La función de NS1 afectada en el mutante 11C se requiere a tiempos tardíos de la infección.
- 7.- La producción de partículas virales a temperatura restrictiva en células infectadas por el virus mutante 11C se encuentra fuertemente disminuida, incluso cuando se suplementa el medio de cultivo con neuraminidasa bacteriana.



## ***Bibliografía***

---



- Agris, C.H., Nemeroff, M.E. and Krug, R.M. (1989) A block in mammalian splicing occurring after formation of large complexes containing U1, U2, U4, U5, and U6 small nuclear ribonucleoproteins. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 259-267.
- Alonso-Caplen, F.V. and Krug, R.M. (1991) Regulation of the extent of splicing of influenza virus NS1 mRNA: role of the rates of splicing and of the nucleocytoplasmic transport of NS1 mRNA. *Mol Cell Biol*, **11**, 1092-1098.
- Alonso-Caplen, F.V., Nemeroff, M.E. and Krug, R.M. (1992) Nucleocytoplasmic transport: the influenza virus NS1 protein regulates the transport of spliced NS2 mRNA and its precursor NS1 mRNA. *Genes and Dev.*, **6**, 255-267.
- Amorim, M.J., Read, E.K., Dalton, R.M., Medcalf, L. and Digard, P. (2007) Nuclear Export of Influenza A Virus mRNAs Requires Ongoing RNA Polymerase II Activity. *Traffic*, **8**, 1-11.
- Aragón, T., de la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortín, J. and Nieto, A. (2000) Translation factor eIF4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol. Cel. Biol.*, **20**, 6259-6268.
- 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.
- Baltimore, D. (1971) Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.*, **35**, 235-241.
- Barrett, T., Wolstenholme, A.J. and Mahy, B.W. (1979) Transcription and replication of influenza virus RNA. *Virology*, **98**, 211-225.
- 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.
- Berget, S.M. (1995) Exon recognition in vertebrate splicing. *J Biol Chem*, **270**, 2411-2414.
- Bergmann, M., García-Sastre, A., Carnero, E., Pehamberger, H., Wolff, K., Palese, P. and Muster, T. (2000) Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. *J. Virol.*, **74**, 6203-6206.
- Blaas, D., Patzelt, E. and Keuchler, E. (1982) Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucl. Acids Res.*, **10**, 4803-4812.
- Bornholdt, Z.A. and Prasad, B.V. (2006) X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 559-560.
- Bourmakina, S.V. and Garcia-Sastre, A. (2005) The morphology and composition of influenza A virus particles are not affected by low levels of M1 and M2 proteins in infected cells. *J Virol*, **79**, 7926-7932.
- 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.
- Bucher, E., Hemmes, H., de Haan, P., Goldbach, R. and Prins, M. (2004) The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *J Gen Virol*, **85**, 983-991.
- 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. Gen. Virol.*, **84**, 3263-3274.
- Cauthen, A.N., Swayne, D.E., Sekellick, M.J., Marcus, P.I. and Suarez, D.L. (2007) Amelioration of Influenza Virus Pathogenesis in Chickens Attributed to the Enhanced Interferon-Inducing Capacity of a Virus with a Truncated NS1 Gene. *J Virol*, **81**, 1838-1847.

- Clemens, M.J. and Elia, A. (1997) The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res*, **17**, 503-524.
- Colman, P.M. (ed.). (1989) *Neuraminidase: enzyme and antigen*. Plenum Press, New York.
- 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.
- Compans, R.W. and Chopin, P.W. (1975) Reproduction of Myxoviruses. In Fraenkel-Conrat, H. and Wagner, R.R. (eds.), *Comprehensive Virology*. Plenum Press, New York, Vol. 4, pp. 179-252.
- Conti, G., Natali, A., Valcavi, P. and Schito, G.C. (1980) [Phosphorylation of viral polypeptides in cells infected with influenza virus]. *Boll Ist Sieroter Milan*, **59**, 581-590.
- Chan, A.Y., Vreede, F.T., Smith, M., Engelhardt, O.G. and Fodor, E. (2006) Influenza virus inhibits RNA polymerase II elongation. *Virology*, **351**, 210-217.
- Chatel-Chaix, L., Clement, J.F., Martel, C., Beriault, V., Gatignol, A., DesGroseillers, L. and Mouland, A.J. (2004) Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Mol Cell Biol*, **24**, 2637-2648.
- 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.
- 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.
- Chien, C.Y., Tejero, R., Huang, Y., Zimmerman, D.E., Rios, C.B., Krug, R.M. and Montelione, G.T. (1997) A novel RNA-binding motif in influenza A virus non-structural protein 1. *Nat Struct Biol*, **4**, 891-895.
- Chien, C.Y., Xu, Y., Xiao, R., Aramini, J.M., Sahasrabudhe, P.V., Krug, R.M. and Montelione, G.T. (2004) Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: evidence for a novel RNA-binding mode. *Biochemistry*, **43**, 1950-1962.
- de Fazekas, S., St Groth, S. (1948) Viropexis: The mechanism of influenza virus infection. *Nature*, **162**, 294-296.
- de la Luna, S., Fortes, P., Beloso, A. and Ortín, J. (1995) Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J. Virol.*, **69**, 2427-2433.
- Delgadillo, M.O., Saenz, P., Salvador, B., Garcia, J.A. and Simon-Mateo, C. (2004) Human influenza virus NS1 protein enhances viral pathogenicity and acts as an RNA silencing suppressor in plants. *J Gen Virol*, **85**, 993-999.
- Denli, A.M. and Hannon, G.J. (2003) RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends Biochem Sci*, **28**, 196-201.
- 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*, **8**, 315-328.
- Diaz, M.O., Ziemin, S., Le Beau, M.M., Pitha, P., Smith, S.D., Chilcote, R.R. and Rowley, J.D. (1988) Homozygous deletion of the alpha- and beta 1-interferon genes in human leukemia and derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 5259-5263.



- Donelan, N.R., Basler, C.F. and Garcia-Sastre, A. (2003) A recombinant influenza A virus expressing an RNA-binding-defective NS1 protein induces high levels of beta interferon and is attenuated in mice. *J Virol*, **77**, 13257-13266.
- DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H. and Calos, M.P. (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol*, **7**, 379-387.
- 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.
- Egorov, A., Brandt, S., Sereinig, S., Romanova, J., Ferko, B., Katinger, D., Grassauer, A., Alexandrova, G., Katinger, H. and Muster, T. (1998) Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J. Virol.*, **72**, 6437-6441.
- Ehrhardt, C., Marjuki, H., Wolff, T., Nurnberg, B., Planz, O., Pleschka, S. and Ludwig, S. (2006) Bivalent role of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) during influenza virus infection and host cell defence. *Cell Microbiol*, **8**, 1336-1348.
- Ehrhardt, C., Wolff, T., Pleschka, S., Planz, O., Beermann, W., Bode, J.G., Schmolke, M. and Ludwig, S. (2007) The influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *J Virol*.
- Elton, D., Digard, P., Tiley, L. and Ortín, J. (2005) Structure and function of the influenza virus RNP. In Kawaoka, Y. (ed.), *Current Topics in Influenza Virology*. Horizon Scientific Press, Norfolk.
- Elton, D., Simpson, H.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**, 408-419.
- 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.
- 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.
- 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.
- Falcón, A.M., Fernandez-Sesma, A., Nakaya, Y., Moran, T.M., Ortín, J. and García-Sastre, A. (2005) Attenuation and immunogenicity in mice of temperature-sensitive influenza viruses expressing truncated NS1 proteins. *J. Gen. Virol.*, **86**, 2817-2821.
- Falcón, A.M., Fortes, P., Marión, R.M., Beloso, A. and Ortín, J. (1999) Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2241-2247.
- Falcón, A.M., Marión, R.M., Zürcher, T., Gómez, P., Portela, A., Nieto, A. and Ortín, J. (2004) Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive (A/Victoria/3/75) influenza viruses expressing deleted forms of NS1 protein. *J. Virol.*, **78**, 3880-3888.
- Fortes, P., Beloso, A. and Ortín, J. (1994) Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks RNA nucleocytoplasmic transport. *The EMBO J.*, **13**, 704-712.
- Fortes, P., Lamond, A.I. and Ortín, J. (1995) Influenza virus NS1 protein alters the subnuclear localization of cellular splicing components. *J. Gen. Virol.*, **76**, 1001-1007.

- 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.
- 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.
- Galabru, J. and Hovanessian, A. (1987) Autophosphorylation of the protein kinase dependent on double-stranded RNA. *J Biol Chem*, **262**, 15538-15544.
- Garaigorta, U., Falcon, A.M. and Ortin, J. (2005) Genetic analysis of influenza virus NS1 gene: a temperature-sensitive mutant shows defective formation of virus particles. *J Virol*, **79**, 15246-15257.
- Garcia-Sastre, A. (2001) Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology*, **279**, 375-384.
- García-Sastre, A., Egorov, A., Matassov, D., Brandt, S., Levy, D.E., Durbin, J.E., Palese, P. and Muster, T. (1998) Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*, **252**, 324-330.
- Garcia-Sastre, A. and Palese, P. (1995) The cytoplasmic tail of the neuraminidase protein of influenza A virus does not play an important role in the packaging of this protein into viral envelopes. *Virus Res*, **37**, 37-47.
- 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.
- 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.
- Gilmartin, G.M., Fleming, E.S., Oetjen, J. and Graveley, B.R. (1995) CPSF recognition of an HIV-1 mRNA 3'-processing enhancer: multiple sequence contacts involved in poly(A) site definition. *Genes Dev*, **9**, 72-83.
- 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**, 1635-1645.
- Goodman, A.G., Smith, J.A., Balachandran, S., Perwitasari, O., Proll, S.C., Thomas, M.J., Korth, M.J., Barber, G.N., Schiff, L.A. and Katze, M.G. (2007) The Cellular Protein P58IPK Regulates Influenza Virus mRNA Translation and Replication through a PKR-Mediated Mechanism. *J Virol*, **81**, 2221-2230.
- Goutagny, N., Severa, M. and Fitzgerald, K.A. (2006) Pin-ning down immune responses to RNA viruses. *Nat Immunol*, **7**, 555-557.
- Graham, F.L. and van der Eb, A.J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, **52**, 456-467.
- Greenspan, D., Palese, P. and Krystal, M. (1988) Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein. *J Virol*, **62**, 3020-3026.
- Guo, Z., Chen, L.M., Zeng, H., Gomez, J.A., Plowden, J., Fujita, T., Katz, J.M., Donis, R.O. and Sambhara, S. (2006) NS1 Protein of Influenza A Virus Inhibits the Function of Intracytoplasmic Pathogen Sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol*.
- Hale, B.G., Jackson, D., Chen, Y.H., Lamb, R.A. and Randall, R.E. (2006) Influenza A virus NS1 protein binds p85beta and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 14194-14199.

- Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**, 950-952.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G.J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, **404**, 293-296.
- 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 to Cells*, **6**, 87-97.
- Hatada, E. and Fukuda, R. (1992) Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. *J Gen Virol*, **73**, 3325-3329.
- Hatada, E., Hasegawa, M., Shimizu, K., Hatanaka, M. and Fukuda, R. (1990) Analysis of influenza A virus temperature-sensitive mutants with mutations in RNA segment 8. *J Gen Virol*, **71**, 1283-1292.
- Hatada, E., Saito, S. and Fukuda, R. (1999) Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells. *J Virol*, **73**, 2425-2433.
- Hatada, E., Saito, S., Okishio, N. and Fukuda, R. (1997) Binding of the influenza virus NS1 protein to model genome RNAs. *J. Gen. Virol.*, **78**, 1059-1063.
- Hatada, E., Takizawa, T. and Fukuda, R. (1992) Specific binding of influenza virus NS1 protein to the virus minus-sense RNA in vitro. *J. Gen. Virol.*, **73**, 17-25.
- Hay, A.J., Skehel, J.J. and McCauley, J. (1982) Characterization of influenza virus RNA complete transcripts. *Virology*, **116**, 517-522.
- Hayman, A., Comely, S., Lackenby, A., Hartgroves, L.C., Goodbourn, S., McCauley, J.W. and Barclay, W.S. (2007) NS1 Proteins of Avian Influenza A Viruses Can Act as Antagonists of the Human Alpha/Beta Interferon Response. *J Virol*, **81**, 2318-2327.
- Hayman, A., Comely, S., Lackenby, A., Murphy, S., McCauley, J., Goodbourn, S. and Barclay, W. (2006) Variation in the ability of human influenza A viruses to induce and inhibit the IFN-beta pathway. *Virology*, **347**, 52-64.
- Helenius, A. (1992) Unpacking the incoming influenza virus. *Cell*, **69**, 577-578.
- 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.
- 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 myxoviruses particles by negative staining techniques. *Virology*, **11**, 79-88.
- 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.
- 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.
- Huarte, M., Sanz-Ezquerro, J.J., Roncal, F., Ortin, 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- Inglis, S.C., Carroll, A.R., Lamb, R.A. and Mahy, B.W.J. (1976) Polypeptides specified by the influenza virus genome. I. Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plague virus., **74**, 489-503.
- 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.
- Jin, H., Leser, G.P., Zhang, J. and Lamb, R.A. (1997) Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase cytoplasmic tails control particle shape. *Embo J*, **16**, 1236-1247.
- Kash, J.C., Cunningham, D.M., Smit, M.W., Park, Y., Fritz, D., Wilusz, J. and Katze, M.G. (2002) Selective translation of eukaryotic mRNAs: functional molecular analysis of GRSF-1, a positive regulator of influenza virus protein synthesis. *J Virol*, **76**, 10417-10426.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C.S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T. and Akira, S. (2006) Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, **441**, 101-105.
- Katze, M.G. (1992) The war against the interferon-induced dsRNA activated protein kinase: can viruses win? *J. Interferon Res.*, **12**, 241-248.
- 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.
- 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.
- Katze, M.G. and Krug, R.M. (1990) Translational control in influenza virus-infected cells. *Enzyme*, **44**, 265-277.
- Katze, M.G., Tomita, J., Black, T., Krug, R.M., Safer, B. and Hovanessian, A. (1988) Influenza virus regulates protein synthesis during infection by repressing autophosphorylation and activity of the cellular 68,000-Mr protein kinase. *J Virol*, **62**, 3710-3717.
- 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.
- 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.
- Kok, K.H. and Jin, D.Y. (2006) Influenza A virus NS1 protein does not suppress RNA interference in mammalian cells. *J Gen Virol*, **87**, 2639-2644.
- 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.
- Krug, R.M., Yuan, W., Noah, D.L. and Latham, A.G. (2003) Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology*, **309**, 181-189.

- Kujime, K., Hashimoto, S., Gon, Y., Shimizu, K. and Horie, T. (2000) p38 mitogen-activated protein kinase and c-jun-NH2-terminal kinase regulate RANTES production by influenza virus-infected human bronchial epithelial cells. *J Immunol*, **164**, 3222-3228.
- Lamb, R.A. and Choppin, P.W. (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.
- Lamb, R.A. and Choppin, P.W. (1983) The gene structure and replication of influenza virus. *Annu Rev Biochem*, **52**, 467-506.
- Lamb, R.A., Choppin, P.W., Chanock, R.M. and Lai, C.J. (1980) Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 1857-1861.
- Lamb, R.A. and Lai, C.J. (1984) Expression of unspliced NS1 mRNA, spliced NS2 mRNA, and a spliced chimera mRNA from cloned influenza virus NS DNA in an SV40 vector. *Virology*, **135**, 139-147.
- 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.
- Lee, T.G., Tang, N., Thompson, S., Miller, J. and Katze, M.G. (1994) The 58,000-dalton cellular inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is a member of the tetratricopeptide repeat family of proteins. *Mol Cell Biol*, **14**, 2331-2342.
- Li, H., Li, W.X. and Ding, S.W. (2002) Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science*, **296**, 1319-1321.
- Li, M.L., Rao, P. and Krug, R.M. (2001a) The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *EMBO Journal*, **20**, 2078-2086.
- 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.
- Li, W.X. and Ding, S.W. (2001) Viral suppressors of RNA silencing. *Curr Opin Biotechnol*, **12**, 150-154.
- Li, W.X., Li, H., Lu, R., Li, F., Dus, M., Atkinson, P., Brydon, E.W., Johnson, K.L., Garcia-Sastre, A., Ball, L.A., Palese, P. and Ding, S.W. (2004) Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1350-1355.
- Li, Y., Chen, Z.Y., Wang, W., Baker, C.C. and Krug, R.M. (2001b) The 3'-end-processing factor CPSF is required for the splicing of single-intron pre-mRNAs in vivo. *Rna*, **7**, 920-931.
- Li, Y., Yamakita, Y. and Krug, R.M. (1998) Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4864-4869.
- 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.
- Lin, C., Zimmer, S.G., Lu, Z., Holland, R.E., Jr., Dong, Q. and Chambers, T.M. (2001) The involvement of a stress-activated pathway in equine influenza virus-mediated apoptosis. *Virology*, **287**, 202-213.

- Liu, J., Lynch, P.A., Chien, C.Y., Montelione, G.T., Krug, R.M. and Berman, H.M. (1997) Crystal structure of the unique RNA-binding domain of the influenza virus NS1 protein [letter]. *Nat Struct Biol*, **4**, 896-899.
- Lopez, J.A., Guillen, M., Sanchez, F.A. and Melero, J.A. (1986) An antigen-binding assay to determine the specificity of monoclonal antibodies against influenza virus and mapping of epitopes. *J Virol Methods*, **13**, 255-264.
- 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.
- 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.
- Ludwig, S., Ehrhardt, C., Neumeier, E.R., Kracht, M., Rapp, U.R. and Pleschka, S. (2001) Influenza virus-induced AP-1-dependent gene expression requires activation of the JNK signaling pathway. *J Biol Chem*, **276**, 10990-10998.
- Ludwig, S., Vogel, U. and Scholtissek, C. (1995) Amino acid replacements leading to temperature-sensitive defects of the NS1 protein of influenza A virus. *Arch Virol*, **140**, 945-950.
- Ludwig, S., Wang, X., Ehrhardt, C., Zheng, H., Donelan, N., Planz, O., Pleschka, S., Garcia-Sastre, A., Heins, G. and Wolff, T. (2002) The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors. *J Virol*, **76**, 11166-11171.
- Luo, G.X., Luytjes, W., Enami, M. and Palese, P. (1991) The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J Virol*, **65**, 2861-2867.
- Marión, R.M., Aragón, T., Beloso, A., Nieto, A. and Ortín, J. (1997a) The N-terminal half of the influenza virus NS1 protein is sufficient for nuclear retention of mRNA and enhancement of viral mRNA translation. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4271-4277.
- Marión, R.M., Fortes, P., Beloso, A., Dotti, C. and Ortín, J. (1999) A human sequence homologue of stauferin is an RNA-binding protein that localizes to the polysomes of the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 2212-2219.
- Marión, R.M., Zürcher, T., de la Luna, S. and Ortín, J. (1997b) Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo. *J. Gen. Virol.*, **78**, 2447-2451.
- Martín-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 Reports*, **2**, 313-317.
- Martin, K. and Helenius, A. (1991) Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell*, **67**, 117-130.
- 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.
- 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.

- 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.
- Mena, I., de la Luna, S., Albo, C., Martín, J., Nieto, A., Ortín, J. and Portela, A. (1994) Synthesis of biologically active influenza virus core proteins using a vaccinia-T7 RNA polymerase expression system. *J. Gen. Virol.*, **75**, 2109-2114.
- Mena, I., Vivo, A., Perez, E. and Portela, A. (1996) Rescue of a synthetic chloramphenicol acetyltransferase RNA into influenza virus-like particles obtained from recombinant plasmids. *J Virol*, **70**, 5016-5024.
- Mibayashi, M., Martinez-Sobrido, L., Loo, Y.M., Cardenas, W.B., Gale, M., Jr. and Garcia-Sastre, A. (2007) Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol*, **81**, 514-524.
- Min, J.Y. and Krug, R.M. (2006) The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7100-7105.
- Min, J.Y., Li, S., Sen, G.C. and Krug, R.M. (2007) A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology*.
- Mitnaul, L.J., Castrucci, M.R., Murti, K.G. and Kawaoka, Y. (1996) The cytoplasmic tail of influenza A virus neuraminidase (NA) affects NA incorporation into virions, virion morphology, and virulence in mice but is not essential for virus replication. *J Virol*, **70**, 873-879.
- Momose, F., Basler, C.F., O'Neill, 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.
- Momose, F., Handa, H. and Nagata, K. (1996) Identification of host factors that regulate the influenza virus RNA polymerase activity. *Biochimie*, **78**, 1103-1108.
- 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.
- Mouland, A.J., Mercier, J., Luo, M., Bernier, L., DesGroseillers, L. and Cohen, E.A. (2000) The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation. *J Virol*, **74**, 5441-5451.
- 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.
- 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.
- Nayak, D.P., Hui, E.K. and Barman, S. (2004) Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res*, **106**, 147-165.
- 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.

- 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.
- Nemeroff, M.E., Qian, X.Y. and Krug, R.M. (1995) The influenza virus NS1 protein forms multimers in vitro and in vivo. *Virology*, **212**, 422-428.
- Nemeroff, M.E., Utans, U., Kramer, A. and Krug, R.M. (1992) Identification of *cis*-acting intron and exon sequences in influenza virus NS1 mRNA that inhibit splicing and cause the formation of aberrantly sedimenting presplicing complexes. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 962-970.
- Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D.R., Donis, R., Hoffmann, E., Hobom, G. and Kawaoka, Y. (1999) Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9345-9350.
- Noah, D.L., Twu, K.Y. and Krug, R.M. (2003) Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs. *Virology*, **307**, 386-395.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ohuchi, M., Cramer, A., Vey, M., Ohuchi, R., Garten, W. and Klenk, H.D. (1994) Rescue of vector-expressed fowl plague virus hemagglutinin in biologically active form by acidotropic agents and coexpressed M2 protein. *J Virol*, **68**, 920-926.
- Opitz, B., Rejaibi, A., Dauber, B., Eckhard, J., Vinzing, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Suttorp, N. and Wolff, T. (2006) IFNbeta induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cell Microbiol.*
- Ortega, J., Martín-Benito, J., Zürcher, T., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L. and Ortín, J. (2000) Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J. Virol.*, **74**, 156-163.
- Ortín, J. (1998) Multiple levels of post-transcriptional regulation of Influenza virus gene expression. *Seminars in Virology*, **3**, 335-342.
- Palese, P. and Shaw, M. (2006) Orthomyxoviruses: the viruses and their replication. In Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Fields Virology 5th edition*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Vol. 1, p. in press.
- 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.
- 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.
- 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.



- Perales, B., Sanz-Ezquerro, J.J., Gastaminza, P., Ortega, J., Fernández-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.
- Petri, T., Patterson, S. and Dimmock, N.J. (1982) Polymorphism of the NS1 proteins of type A influenza virus. *J Gen Virol*, **61 (Pt 2)**, 217-231.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Naslund, T.I., Liljestrom, P., Weber, F. and Reis e Sousa, C. (2006) RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*, **314**, 997-1001.
- Pinto, L.H., Holsinger, L.J. and Lamb, R.A. (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, **69**, 517-528.
- Plotch, S.J., Bouloy, M. and Krug, R.M. (1979) Transfer of 5'-terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 1618-1622.
- 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.
- Plotch, S.J. and Krug, R.M. (1986) In vitro splicing of influenza viral NS1 mRNA and NS1-beta-globin chimeras: possible mechanisms for the control of viral mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **83**, 5444-5448.
- Poon, L.L., Fodor, E. and Brownlee, G.G. (2000) Polyuridylated mRNA synthesized by a recombinant influenza virus is defective in nuclear export. *J Virol*, **74**, 418-427.
- Poon, L.L., Pritlove, D.C., Sharps, J. and Brownlee, G.G. (1998) The RNA polymerase of influenza virus, bound to the 5' end of virion RNA, acts in cis to polyadenylate mRNA. *J. Virol.*, **72**, 8214-8219.
- Poon, L.L.M., 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.
- Portela, A., Melero, J.A., de la Luna, S. and Ortin, J. (1986) Construction of cell lines that regulate by temperature the amplification and expression of influenza virus non-structural protein genes. *EMBO J.*, **5**, 2387-2392.
- Privalsky, M.L. and Penhoet, E.E. (1981) The structure and synthesis of influenza virus phosphoproteins. *J Biol Chem*, **256**, 5368-5376.
- Qian, X.-Y., Alonso-Caplen, F. and Krug, R.M. (1994) Two functional domains of the influenza virus NS1 protein are required for regulation of nuclear export of mRNA. *J. Virol.*, **68**, 2433-2441.
- Qian, X.Y., Chien, C.Y., Lu, Y., Montelione, G.T. and Krug, R.M. (1995) An amino-terminal polypeptide fragment of the influenza virus NS1 protein possesses specific RNA-binding activity and largely helical backbone structure. *Rna*, **1**, 956-956.
- Qiu, Y. and Krug, R.M. (1994) The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). *J. Virol.*, **68**, 2425-2432.
- Qiu, Y., Nemeroff, M. and Krug, R.M. (1995) The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. *Rna*, **1**, 304-316.
- Regan, J.F., Liang, Y. and Parslow, T.G. (2006) Defective assembly of influenza A virus due to a mutation in the polymerase subunit PA. *J Virol*, **80**, 252-261.

- Robertson, J.S., Schubert, M. and Lazzarini, R.A. (1981) Polyadenylation sites for influenza mRNA. *J. Virol.*, **38**, 157-163.
- Salanueva, I.J., Carrascosa, J.L. and Risco, C. (1999) Structural maturation of the transmissible gastroenteritis coronavirus. *J Virol*, **73**, 7952-7964.
- Salvatore, M., Basler, C.F., Parisien, J.P., Horvarth, C.M., Bourmakina, S., Zheng, H., Muster, T., Palese, P. and García-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. of Virol.*, **76**, 1206-1212.
- 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 polymerase subunit is a phosphorylated protein. *J. Gen. Virol.*, **79**, 471-478.
- 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.
- Satterly, N., Tsai, P.L., van Deursen, J., Nussenzveig, D.R., Wang, Y., Faria, P.A., Levay, A., Levy, D.E. and Fontoura, B.M. (2007a) Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Satterly, N., Tsai, P.L., van Deursen, J., Nussenzveig, D.R., Wang, Y., Faria, P.A., Levay, A., Levy, D.E. and Fontoura, B.M. (2007b) Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 1853-1858.
- 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.
- Scholtissek, C. and Spring, S. (1982) Extragenic suppression of temperature-sensitive mutations in RNA segment 8 by replacement of different RNA segments with those of other influenza A virus prototype strains. *Virology*, **118**, 28-34.
- Schultz-Cherry, S., Dybdahl-Sissoko, N., McGregor, M. and Hinshaw, V.S. (1998) Mink lung epithelial cells: unique cell line that supports influenza A and B virus replication. *J Clin Microbiol*, **36**, 3718-3720.
- Schultz Cherry, S., Dybdahl Sissoko, N., Neumann, G., Kawaoka, Y. and Hinshaw, V.S. (2001) Influenza virus ns1 protein induces apoptosis in cultured cells. *J Virol*, **75**, 7875-7881.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Haley, B. and Zamore, P.D. (2002) Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways. *Mol Cell*, **10**, 537-548.
- Sen, G.C. (2000) Novel functions of interferon-induced proteins. *Semin Cancer Biol*, **10**, 93-101.
- 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.
- 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.
- Shimizu, K., Handa, H., Nakada, S. and Nagata, K. (1994) Regulation of influenza virus RNA polymerase activity by cellular and viral factors. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5047-5053.

- Shin, Y.K., Liu, Q., Tikoo, S.K., Babiuk, L.A. and Zhou, Y. (2007) Influenza A virus NS1 protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway by direct interaction with the p85 subunit of PI3K. *J Gen Virol*, **88**, 13-18.
- Shope, R.E. (1931) Swine influenza. III. Filtration experiments and etiology. *J Exp Med*, **54**, 373-380.
- 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.
- Smith, D.B. and Inglis, S.C. (1985) Regulated production of an influenza virus spliced mRNA mediated by virus-specific products. *EMBO J*, **4**, 2313-2319.
- Smith, G.L. and Hay, A.J. (1982) Replication of the influenza virus genome. *Virology*, **118**, 96-108.
- Smith, W., Andrewes, C.H. and Laidlaw, P.P. (1933) A virus obtained from influenza patients. *Lancet*, **1**, 66-68.
- Solorzano, A., Webby, R.J., Lager, K.M., Janke, B.H., Garcia-Sastre, A. and Richt, J.A. (2005) Mutations in the NS1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs. *J Virol*, **79**, 7535-7543.
- Spooner, L.L. and Barry, R.D. (1977) Participation of DNA-dependent RNA polymerase II in replication of influenza viruses. *Nature*, **268**, 650-652.
- St Johnston, D., Beuchle, D. and Nusslein, V.C. (1991) Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the Drosophila egg. *Cell*, **66**, 51-63.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. and Schreiber, R.D. (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, **67**, 227-264.
- Stegmann, T., Booy, F.P. and Wilschut, J. (1987a) Effects of low pH on influenza virus. Activation and inactivation of the membrane fusion capacity of the hemagglutinin. *J Biol Chem*, **262**, 17744-17749.
- Stegmann, T., Morselt, H.W., Scholma, J. and Wilschut, J. (1987b) Fusion of influenza virus in an intracellular acidic compartment measured by fluorescence dequenching. *Biochim Biophys Acta*, **904**, 165-170.
- Steinmetz, E.J. (1997) Pre-mRNA processing and the CTD of RNA polymerase II: the tail that wags the dog? *Cell*, **89**, 491-494.
- Stutz, F. and Izaurralde, E. (2003) The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends Cell Biol*, **13**, 319-327.
- Suárez, P., Valcárcel, J. and Ortín, J. (1992) Heterogeneity of the mutation rate of influenza virus: isolation of mutator mutants. *J. Virol.*, **66**, 2491-2494.
- Takagaki, Y., Ryner, L.C. and Manley, J.L. (1989) Four factors are required for 3'-end cleavage of pre-mRNAs. *Genes Dev*, **3**, 1711-1724.
- Takeuchi, K. and Lamb, R.A. (1994) Influenza virus M2 protein ion channel activity stabilizes the native form of fowl plague virus hemagglutinin during intracellular transport. *J Virol*, **68**, 911-919.
- Talon, J., Horvath, C.M., Polley, R., Basler, C.F., Muster, T., Palese, P. and Garcia, S.A. (2000) Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol*, **74**, 7989-7996.
- 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.
- Tiley, L.S., Hagen, M., Mathews, J.T. and Krystal, M. (1994) Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5'-end of the viral RNAs. *J. Virol.*, **68**, 5108-5116.

- Valcárcel, J., Portela, A. and Ortín, J. (1991) Regulated M1 mRNA splicing in influenza virus-infected cells. *J. Gen. Virol.*, **72**, 1301-1308.
- 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.
- Villacé, P., Marión, R.M. and Ortín, J. (2004) The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicate a role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2411-2420.
- Wahle, E. and Keller, W. (1996) The biochemistry of polyadenylation. *Trends Biochem Sci*, **21**, 247-250.
- 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.
- Wang, W. and Krug, R.M. (1996) The RNA-binding and effector domains of the viral NS1 protein are conserved to different extents among influenza A and B viruses. *Virology*, **223**, 41-50.
- Wang, W. and Krug, R.M. (1998) U6atac snRNA, the highly divergent counterpart of U6 snRNA, is the specific target that mediates inhibition of AT-AC splicing by the influenza virus NS1 protein [published erratum appears in RNA 1998 Mar;4(3):348]. *Rna*, **4**, 55-64.
- Wang, W., Riedel, K., Lynch, P., Chien, C.Y., Montelione, G.T. and Krug, R.M. (1999) RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. *Rna*, **5**, 195-205.
- Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A.A. and Garcia Sastre, A. (2000) Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J Virol*, **74**, 11566-11573.
- 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.
- Weber, F., Wagner, V., Rasmussen, S.B., Hartmann, R. and Paludan, S.R. (2006) Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J Virol*, **80**, 5059-5064.
- 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.
- Wigler, M., Silverstein, S., Lee, L.S., Pellicer, A., Cheng, Y. and Axel, R. (1977) Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell*, **11**, 223-232.
- 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.
- Yamada, S., Suzuki, Y., Suzuki, T., Le, M.Q., Nidom, C.A., Sakai-Tagawa, Y., Muramoto, Y., Ito, M., Kiso, M., Horimoto, T., Shinya, K., Sawada, T., Kiso, M., Usui, T., Murata, T., Lin, Y., Hay, A., Haire, L.F., Stevens, D.J., Russell, R.J., Gamblin, S.J., Skehel, J.J. and Kawaoka, Y. (2006) Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature*, **444**, 378-382.

- Yang, Y.L., Reis, L.F., Pavlovic, J., Aguzzi, A., Schafer, R., Kumar, A., Williams, B.R., Aguet, M. and Weissmann, C. (1995) Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. *EMBO J.*, **14**, 6095-6106.
- 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.
- Ye, Z., 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.
- Yoshida, T., Shaw, M.W., Young, J.F. and Compans, R.W. (1981) Characterization of the RNA associated with influenza A cytoplasmic inclusions and the interaction of NS1 protein with RNA. *Virology*, **110**, 87-97.
- Young, R.J. and Content, J. (1971) 5' -terminus of influenza virus RNA. *Nature New Biol.*, **230**, 140-142.
- 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.
- 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.
- Zurcher, T., Marion, R.M. and Ortin, J. (2000) Protein synthesis shut-off induced by influenza virus infection is independent of PKR activity. *J Virol*, **74**, 8781-8784.



***Anexo***

---





