

Tesis Doctoral

Estrategia de reprogramación traduccional del virus Junín en infecciones in vitro: estudio de las principales vías de regulación del inicio de la traducción

Linero, Florencia N.

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Linero, Florencia N.. (2011). Estrategia de reprogramación traduccional del virus Junín en infecciones in vitro: estudio de las principales vías de regulación del inicio de la traducción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Linero, Florencia N.. "Estrategia de reprogramación traduccional del virus Junín en infecciones in vitro: estudio de las principales vías de regulación del inicio de la traducción". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica**

“Estrategia de reprogramación traduccional del virus Junín en infecciones in vitro: estudio de las principales vías de regulación del inicio de la traducción”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el Área Química Biológica

Autora: Lic. Florencia N. Linero

Director: Dr. Luis Alberto Scolaro

Consejero de Estudios: Dra. Elsa Beatriz Damonte

**Laboratorio de Virología
Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

Buenos Aires, Mayo 2011

“Estrategia de reprogramación traduccional del virus Junín en infecciones in vitro: estudio de las principales vías de regulación del inicio de la traducción”

Dentro de los factores que determinan el éxito de una infección viral la eficiencia en la traducción de las proteínas del virus constituye un factor clave a la hora de definir tanto la citopatogenicidad como la virulencia de estos agentes. Los virus son parásitos intracelulares obligados, por lo cual dependen completamente de la maquinaria traduccional de la célula hospedadora para sintetizar sus proteínas. Esta dependencia los ha llevado a desarrollar distintas estrategias de reprogramación traduccional a fin de asegurar la competencia efectiva de sus mARNs con los mARNs celulares por la maquinaria de traducción. En este trabajo de tesis doctoral se analizó la estrategia de reprogramación traduccional utilizada por el virus Junín (JUNV) para lograr la traducción de sus mARNs. El estudio se centró fundamentalmente en el proceso de inicio de la traducción, evaluándose la participación del complejo eIF (eIF4E, eIF4A y eIF4GI) y del factor eIF2 y la modulación de sus principales mecanismos de regulación.

En este trabajo se demostró que JUNV es capaz de traducir las proteínas virales aún en ausencia del factor de unión al cap, eIF4E, a pesar de que sus mRNAs presentan dichas estructuras en sus extremos 5'. Esto fue comprobado mediante el empleo de inhibidores de la vía de PI3K/Akt/mTOR, principal vía regulatoria de la traducción dependiente del cap, observándose que la inhibición de PI3K posterior a la entrada del virus no tuvo efectos significativos en la replicación de JUNV. Estos resultados fueron corroborados mediante el tratamiento con la droga rapamicina, un inhibidor del complejo mTOR/raptor, la cual no afectó la síntesis de antígenos virales. La expresión de una proteína dominante negativa de 4E-BP, proteína reguladora de eIF4E, tampoco afectó la replicación de JUNV, reforzando la idea de que el factor eIF4E no sería necesario en la replicación de JUNV. Asimismo, la inhibición de la vía de PI3K/Akt en un cultivo persistentemente infectado con JUNV tampoco afectó la síntesis de los antígenos virales.

Por otro lado, se demostró un bloqueo en la fosforilación de eIF2 α ejercido por JUNV. La fosforilación de este factor constituye uno de los principales mecanismos de la respuesta celular antiviral, mediante el cual la célula induce el bloqueo global de la traducción con el fin de impedir la replicación viral. La consecuencia de esta fosforilación es el secuestro de los factores de inicio de la traducción en estructuras citoplasmáticas denominadas gránulos de estrés (SGs). Los resultados obtenidos demostraron que el bloqueo en la fosforilación de eIF2 α inducido por JUNV inhibe la formación de SGs cuando las células infectadas son tratadas con un inductor de estrés oxidativo. Este impedimento sería mediado fundamentalmente por la expresión de los antígenos virales N y GPC y

tendría por finalidad mantener activo al factor eIF2 como así también asegurar el acceso a los factores de inicio de la traducción, que de otra manera podrían quedar secuestrados en los SGs. Esta modulación de la respuesta a la estrés celular no fue observada en los cultivos persistentemente infectados con JUNV, indicando que la ausencia de expresión de G1 y probablemente los bajos niveles de la proteína N en su forma completa serían responsables de que estos cultivos persistentemente infectados no logren bloquear la respuesta celular al estrés.

Por otro lado, se demostró el requerimiento de los factores de inicio de la traducción del complejo eIF: eIF4A y eIF4G, mediante ensayos de silenciamiento y el empleo de inhibidores específicos, indicando una estrategia de traducción alternativa en la cual la participación de eIF4E, integrante canónico de dicho complejo, no sería requerida. Probablemente la participación de una proteína viral en reemplazo del factor de unión al cap eIF4E, favorecería la traducción de los mARNs de JUNV, sin inducir un bloqueo en la síntesis de las proteínas celulares. La interacción de N con los factores eIF4A y eIF4GI, evaluada mediante ensayos de inmunoprecipitación y microscopía confocal, sugiere que esta proteína viral estaría formando parte de los complejos de traducción de los mARNs virales.

En función de los resultados expuestos se plantea un modelo de reprogramación traduccional para JUNV en el cual el factor de unión al cap, eIF4E, no sería mayoritariamente requerido para la traducción de los antígenos virales. La actividad de este factor sería reemplazada por la proteína N que mediante su interacción con los factores eIF4A y eIF4GI constituiría los complejos de traducción del virus. Sin embargo, no puede descartarse la participación de eIF4E en la traducción inicial de los mARNs de N, hasta que los niveles de esta proteína puedan competir efectivamente con dicho factor.

Palabras claves: virus Junín, nucleoproteína, traducción, eIF4E, eIF4A, eIF4G, eIF2, gránulos de estrés.

“Junin virus translational reprogramming strategy: study of the main regulation pathways during initiation of translation”

Translation efficiency of viral proteins is a key factor in defining both cytopathogenicity and virulence of viruses, which are obligate intracellular parasites and entirely dependent on the cellular translational machinery to synthesize their proteins. This dependence has led them to develop different strategies of translational reprogramming to ensure effective competition of viral mRNAs with cellular mRNAs. In this doctoral thesis the translational reprogramming strategy used by Junin virus (JUNV) to achieve the translation of its mRNAs, was analyzed. The study was focused primarily on the process of translation initiation, to evaluate the involvement of eIF complex (eIF4E, eIF4A and eIF4GI) and the eIF2 factor and the modulation of main regulatory mechanisms.

Results suggest that JUNV might be able to translate viral proteins even in the absence of the cap-binding factor, eIF4E, although its mRNAs have cap structures in their 5' ends. This is supported by the fact that inhibitors of PI3K/Akt/mTOR pathway, the main regulatory pathway of cap-dependent translation were effective only during virus entry but not on JUNV protein translation. Treatment of infected cells with rapamycin, an mTOR complex/raptor inhibitor and the expression of a dominant negative protein 4E-BP, eIF4E regulatory protein, had no effect on JUNV replication, reinforcing the idea that the eIF4E factor would not be required for JUNV replication. Furthermore, inhibition of PI3K/Akt pathway in a JUNV persistently infected culture did not affect the synthesis of viral antigens.

On the other hand, a blockage on the eIF2 α phosphorylation exerted by JUNV was observed. Phosphorylation of this factor is one of the main mechanisms of the antiviral cellular response, by which cell induces a global translation blockade to prevent viral replication. The consequence of this phosphorylation is the sequestering of the initiation translation factors in cytoplasmic structures named stress granules (SGs). The results showed that blockage in the phosphorylation of eIF2 α induced by JUNV inhibits the formation of SGs when infected cells are treated with an oxidative stress inductor. This blockage would be mediated primarily by the expression of viral antigens N and GPC and would aim to keep eIF2 factor active to ensure virus access to initiation translation factors which might otherwise be sequestered into SGs. This modulation on the cellular stress response was not observed in cultures persistently infected with JUNV, indicating that the absence of expression of G1 and probably low levels of the complete form of N protein would be responsible for these persistently infected cultures inability to block the cellular stress response.

Requirement of initiation translation complex eIF: eIF4A and eIF4G has been assessed by ARN interfering assays and the use of specific inhibitors. Results indicate an alternative translation strategy in which the involvement of eIF4E, a canon member of this complex would not be required. Probably, the involvement of a viral protein to replace the cap binding factor eIF4E, would favor the translation of JUNV mRNAs without inducing a blockage in cellular proteins synthesis. N interaction with eIF4A and eIF4GI factors was assessed by immunoprecipitation assays and confocal microscopy suggesting that this viral protein would be part of the translation complex of viral mRNAs.

Based on the above results a model for JUNV translational reprogramming is presented. In this model, the cap-binding factor, eIF4E, would be replaced by N protein through its interaction with eIF4A and eIF4GI factors constituting the translation complex for viral proteins. However, it cannot be ruled out the involvement of eIF4E at the initial translation step of N mRNA, until the level of this protein can be high enough to compete effectively with this factor.

Keywords: Junin virus, nucleoprotein, translation, eIF4E, eIF4A, eIF4G, eIF2, stress granules.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi familia, por creer en mí y estar siempre presente. Por ser los pilares que me sostienen a través de la distancia. A Peter, por su paciencia y apoyo incondicional, por estar siempre a mi lado y sobre todo por ser el pilar que me sostiene en esta ciudad. Porque no creo poder escribir en un párrafo todo lo que representan estas personas en mi vida.

Le agradezco eternamente al Dr. Luis Scolaro por darme un lugar en el laboratorio de Virología. Por haberme formado científicamente con paciencia y generosidad. Por dejarme intentar, por alegrarse con mis victorias y sostenerme en los fracasos. Por hacerme sentir muy valorada científicamente y sobre todo por el respaldo incondicional desde mi tesis de licenciatura. Por el compromiso absoluto que asume frente a la formación de sus becarios. Le quiero agradecer a *Luis Albert* por todos los momentos compartidos, por ser una excelente persona, por su incondicional generosidad, por los tres llantos acumulativos anuales. Por sentir que siempre conté con tu apoyo.

Le agradezco a la Dra. Viviana Castilla, Pipi, por ser una excelente persona, madre y científica. Por ser el complemento perfecto de Luis Albert. Por escucharme y aconsejarme con mucho cariño. Por compartir sinceramente la alegría de mis logros y la tristeza de mis derrotas. Por las tardes de enseñanza compartida en la nueva incursión del mundo adulto. Por la alegría que le pones a la vida Pipi.

A Eliana Acosta, Eliané, por todos los buenos momentos de trabajo compartidos. Por la complicidad. Por ser una excelente científica, compañera y amiga. Por creer que un inocente juego de cartas puede pasar de ser de lo más divertido del mundo a lo más aburrido en sólo una milésima de fracción de segundo, por sorprendernos con eso. Por estar siempre, en mis mejores y peores momentos.

A Pablo Fernández Bell Fano y Carlos Bueno, por todos los momentos vividos. Por hacer mucho más fácil mi adaptación a esta enorme ciudad. Por su compañerismo y amistad.

A la Dra. Nélide Candurra, Nelaida, por haberme aceptado con cariño en su laboratorio. Por sus consejos científicos y por su interés sincero. A la Dra. Mónica Wachsman, Moñeque, por darle alegría al día a día del laboratorio. A la Dra. Elsa Damonte, por aguantar mis gritos, risas y llantos, sin levantar un muro de contención, aún...A la Dra. Josefina Carlucci, por todas las aventuras vividas. Al Dr. Carlos Pujol, por su buen humor y paciencia.

A la Dra. Paula Ellenberg, la Dra. Cybele García, Carolina y Claudia. A todos los integrantes del laboratorio de Virología, mi hogar sustituto.

A mis amigas del alma Flora, Gabi, Ana y Valen, por su eterna amistad y por el reencuentro mendocino de todos los años. A mi gran amiga Leticia Cabral, por todo lo compartido y por lo que aún resta por compartir. A mi amiga incondicional Cyntia Amorosi, porque la vida se encarga de reencontrarnos. A mis grandes amigos Sebastián López, Belén Jerez, Cecilia Pandolfo y Constanza Rezzano, porque cada encuentro es como si nunca nos hubiéramos separado. A Romi, Ali y Eva, por todos los buenos momentos compartidos y por su gran amistad.

Agradezco a la Dra. Graciela Boccaccio y al Dr. Luis Carrasco por su inestimable colaboración en la realización de parte de esta tesis doctoral.

La lógica puede llevarte de A a B...La imaginación puede llevarte a cualquier lado...

Albert Einstein

INTRODUCCION	4
1. Los Arenavirus	4
1.1 <i>Propiedades estructurales de los arenavirus</i>	6
1.2 <i>Genoma viral</i>	6
1.3 <i>Las proteínas virales</i>	9
1.3.1 Glicoproteínas virales	9
1.3.2 La nucleoproteína viral	9
1.3.3 La polimerasa viral	10
1.3.4 La proteína Z	11
1.4 <i>El ciclo de multiplicación de los arenavirus</i>	11
1.5 <i>Virus Junín: infección in vitro</i>	14
2. Interacciones virus-hospedador: Regulación del mecanismo de traducción	16
2.1 <i>Mecanismos de traducción proteica y sus principales puntos de regulación</i>	17
2.1.1 Inicio de la traducción	18
2.1.1.1. Inicio de la traducción cap-dependiente	18
2.1.1.2. Inicio de la traducción cap-independiente: traducción mediada por IRES	21
2.1.2 Reprogramación traduccional: virus vs. Célula	22
2.1.3 Principales puntos de regulación del inicio de la traducción	23
2.1.3.1 Control del inicio de la traducción cap-dependiente: regulación del factor eIF4E	23
2.1.3.1.a Disponibilidad de eIF4E: Fosforilación de 4E-BP1	24
2.1.3.1.b Afinidad de eIF4E por el cap: fosforilación en Ser209	24
2.1.3.2 Control del inicio global de la traducción: regulación de la fosforilación de eIF2	25
2.1.3.3 Otros mecanismos de regulación viral del inicio de la traducción: degradación de eIF4G y PABP	25
2.1.3.4 Estrategias virales de traducción: estructura de los mARNs virales	26
2.2 <i>Vía de señalización PI3K/Akt: participación en la replicación viral</i>	27
2.2.1 PI3K/Akt/mTOR: su participación en la traducción cap-dependiente	28
2.2.2 Otras implicancias de la activación de PI3K/Akt en la infección viral	30
2.3 <i>Control traduccional a través de eIF2α: respuesta al estrés celular</i>	31
2.3.1 Quinasas de eIF2 α : sensores de estrés celular	32
2.3.2 Gránulos de estrés: su relación con la inhibición del inicio de la traducción	33
2.3.2.1 SGs y la infección viral	34
2.3.3 Cuerpos de procesamiento: similitudes y diferencias con los SGs	35

OBJETIVOS	37
MATERIALES y MÉTODOS	38
1. Líneas celulares	38
2. Virus	38
2.a Inactivación de virus con luz ultravioleta	38
3. Drogas	39
4. Establecimiento de cultivos persistentemente infectados con JUNV	40
5. Ensayo de viabilidad celular (técnica del MTT)	40
6. Cuantificación de virus	41
6.a Ensayo de infectividad viral	41
6.b Ensayo de adsorción/penetración	41
6.c Ensayo de internalización por plaqueo directo	41
7. Internalización de transferrina	42
8. Ensayo de Western blot (WB)	42
9. Técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI)	44
9.a Determinación de antígenos virales	44
9.b Determinación de marcadores celulares	44
9.c Determinación de marcadores de citoesqueleto	46
10. Ensayo de inmunoprecipitación	46
11. Transfección de células con lipofectamina	47
11.a Transfección con ADN plasmídico	47
11.b Transfección con siARNs	48
12. Ensayo de incorporación de marca radiactiva	48
13. Electroporación de células con la proteasa 2A de poliovirus	48
RESULTADOS	50
<i>CAPÍTULO I: Regulación de la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR en el ciclo de multiplicación de JUNV</i>	50
<i>1.1 Efecto de la inhibición de PI3K en la infección aguda con JUNV</i>	50
1.1.1 Efecto del tratamiento con cafeína	51
1.1.2 Efecto del tratamiento con Ly294002	54
1.1.3 Activación de PI3K/Akt durante la infección aguda de JUNV	58
<i>1.2 Participación de mTOR/raptor en la traducción de Los mARN virales</i>	63

1.2.1 Efecto de la inhibición de mTOR/raptor mediante Rapamicina	63
1.2.2 Análisis de la expresión de dominantes negativos de Akt y 4E-BP en la replicación de JUNV	65
1.3 Participación de PI3K/Akt/mTOR/raptor en la infección persistente de JUNV	68
1.4 Conclusiones parciales capítulo I	75
CAPÍTULO II: Regulación del factor eIF2α en el ciclo de multiplicación de JUNV: respuesta al estrés celular	76
2.1 Estudio de la respuesta al estrés celular en la infección aguda de JUNV	76
2.1.1 Análisis de la formación de gránulos de estrés y fosforilación de eIF2 α	76
2.1.2 Estudio de la respuesta a distintos estímulos de estrés en células infectadas con JUNV	78
2.1.2.a Estrés oxidativo	78
2.1.2.b Estrés de retículo endoplasmático	83
2.1.2.c Estrés inducido por hippuristanol	85
2.1.3 Proteínas virales implicadas en la respuesta a estrés celular	86
2.2 Estudio de la respuesta al estrés celular en la infección persistente de JUNV	89
2.3 Conclusiones parciales Capítulo I	94
CAPÍTULO III: participación del complejo de inicio de la traducción eIF4F en la síntesis de las proteínas de JUNV	95
3.1 Participación del factor eIF4G	95
3.2 Participación del factor eIF4A	105
3.3 Análisis de p97/NAT1/DAP5 durante la infección con JUNV	108
3.4 Conclusiones parciales Capítulo III	113
DISCUSION	114
BIBLIOGRAFIA	127

μCi: micro Curie
2Apro: proteasa 2A de poliovirus
4E-BP: proteína de unión al factor eIF4E
5'UTR: región 5' no traducida
Å: armstrong
Aac: aminoácido
ADN: ácido desoxirribonucleico
AKT=PKB: serina/treonina proteína quinasa B
ARN: ácido ribonucleico
ARNdc: ARN de doble cadena
mARN: ARN mensajero
ARNr: ARN ribosomal
ARNt: ARN de transferencia
ATP: Adenosina tri-fosfato
BMV: virus mosaico de la cebada
BSA: albúmina sérica bovina
Cap=7GpppN: 7 metil guanosina
C-terminal: carboxilo terminal
DABCO: 1,4-diazabicyclo octano
DENV: Virus del Dengue
DMEM: medio mínimo esencial modificado por Dulbecco
DTT: ditionitroretol
EBV: Virus de Epstein Barr
ECL: enhanced chemiluminescence
EE: endosomas tempranos (*early endosomes*)
eIF2: factor 2 de inicio de la traducción
eIF4A: factor 4A de inicio de la traducción eucariota
eIF4E: factor 4E de inicio de la traducción eucariota
eIF4F: factores de inicio de la traducción del complejo 4F
eIF4G: factor 4G de inicio de la traducción eucariota
eIFs: factores de inicio de la traducción eucariota
EMCV: virus de la encefalomiocarditis murina
ER: endosomas de reciclaje (*recycling endosomes*)
EV: virus Ébola
GCN2: Proteína quinasa regulada por deficiencia de aminoácidos
GPC: precursor glicoproteico
h/hs: hora/horas
HCMV: citomegalovirus humano
Hedls: subunidad mayor potenciadora de la degradación de cap humana
HIV: virus de la inmunodeficiencia humana
HPV: Virus de papiloma humano
HRI: proteína quinasa de eIF2α regulada por el grupo Hemo
HSV: virus herpes simplex
IFI: inmunofluorescencia indirecta
IFN: interferón
IGR: región intergénica
IRES: sitio de entrada interna del ribosoma
JUNV: virus Junín
kDa: kilo Dalton
L: ARN polimerasa viral ARN dependiente

mA: mili Amper
MEM: medio mínimo esencial
Met-tARNi: Metionil-ARN de transferencia iniciador
min: minutos
MOI: multiplicidad de infección
mRNP: Complejo formado por mARN y ribonucleoproteínas
mTOR: *mammalian target of rapamycin*
MTT: (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio
nm: nanómetro
NP=N: nucleoproteína viral
nt: nucleótido
N-terminal: amino terminal
p.i.: post infección
PABP: Proteína de unión a Poli-A
PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida
PBs: cuerpos de Procesamiento (*Processing bodies*)
PBS: solución salina de fosfatos
PBS-T: solución salina de fosfatos con Tween
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PERK: proteína quinasa de eIF2 α del retículo endoplasmático pancreático
PFA: paraformaldehído
PI3K: fosfatidilinositol 3 -quinasa
PKR: quinasa regulada por ARN doble cadena
PMSF: fenil-metil-sulfonil-fluoruro
Poli-A: poli adenilado
PVDF: fluoruro de polivinilideno
r.p.m: revoluciones por minuto
RE: retículo endoplasmático
RIPA: ensayo de radioinmuno precipitación
RT-PCR: Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real
SARS: síndrome respiratorio agudo severo
SB: solución de bloqueo
seg: segundo
segmento L: segmento *Large*
segmento S: segmento *Small*
Ser: serina
SFB: suero fetal bovino
SFV: virus de Semliki forest
SGs: gránulos de estrés
siARN: ARN pequeño de interferencia
T°: temperatura
TBS: solución salina de Tris
TBS-T: solución salina de Tris con Tween
Thr: treonina
TIA-1: antígeno 1 interno de células T
TIAR: proteína relacionada con TIA-1
TRITC: iso-tiocianato tetrametil rodamina
U: unidades
ufp: unidades formadoras de placas
UV: ultravioleta

V: volt

VSV: virus de la Estomatitis Vesicular

WB: western blot

WNV: Virus West Nile

Zn: zinc

1. LOS ARENAVIRUS

La familia *Arenaviridae* incluye 22 especies virales caracterizadas hasta el presente (Salvato y col., 2005). Recientemente han sido aislados nueve nuevos arenavirus cuya clasificación taxonómica aún no ha sido realizada (Charrel y Lamballerie, 2010). Los arenavirus infectan roedores, con la aparente excepción del virus Tacaribe (TCRV), el cual sólo ha podido ser aislado a partir del murciélago *Artibeus sp.*. El virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV), prototipo de la familia, es el único de distribución mundial mientras que los demás arenavirus tienen distribución geográfica restringida al área de localización del roedor que actúa como hospedador natural de cada especie (Tabla 1).

Tabla 1. Lista de especies de arenavirus y arenavirus recientemente descubiertos, aún no clasificados, con sus respectivas características (Charrel y de Lamballerie, 2010).

Virus	Acrónimo	Linaje	Distribución	Hospedador
Allpahuayo	ALLV	NM-A	Perú	<i>Oecomys bicolor</i> , <i>Oecomys paricola</i>
Amapari	AMAV	NM-B	Brasil	<i>Oryzomys goeldi</i> , <i>Neacomys guianae</i>
Bear Canyon	BCNV	NM-Rec	EEUU	<i>Peromyscus californicus</i> , <i>Neotoma macrotis</i>
Catarina		NM-Rec	EEUU	<i>Neotoma micropus</i>
Chapare		NM-B	Bolivia	Desconocido
Cupixi	CPXV	NM-B	Brasil	<i>Oryzomys capito</i>
Dandenong		VM	Australia	Desconocido
Flexal	FLEV	NM-A	Brasil	<i>Oryzomys spp.</i>
Guanarito	GTOV	NM-B	Venezuela	<i>Zygodontomys brevicauda</i> , <i>Sigmodon alstoni</i>
Ippy	IPPYV	VM	República central de África	<i>Arvicanthus spp</i>
Junin	JUNV	NM-B	Argentina	<i>Callomys musculinus</i>
Kodoko		VM	Guinea	<i>Mus Nannomys minutoides</i>
Lassa	LASV	VM	África occidental	<i>Mastomys natalensis</i>
Latino	LATV	NM-C	Bolivia	<i>Callomys callosus</i>
*LCM	LCMV	VM	mundial	<i>Mus musculus</i> , <i>M. domesticus</i>
Machupo	MACV	NM-B	Bolivia	<i>Callomys callosus</i>
Mobala	MOBV	VM	República central de África	<i>Praomys spp.</i>
Mopeia	MOPV	VM	Mozambique, Zimbabue	<i>Mastomys natalensis</i>
Morogoro		VM	Tanzania	<i>Mastomys sp.</i>
Oliveros	OLVV	NM-C	Argentina	<i>Bolomys spp.</i>
Pampa		NM-C	Argentina	<i>Bolomys spp.</i>
Parana	PARV	NM-A	Paraguay	<i>Oryzomys buccinatus</i>
Pichinde	PICV	NM-A	Colombia	<i>Oryzomys albigularis</i>
Pinhal		NM-C	Brasil	<i>Calomys tener</i>
Piritital	PIRV	NM-A	Venezuela	<i>Sigmodon alstoni</i>
Sabia	SABV	NM-B	Brasil	Desconocido
Skinner Tank		NM-Rec	EEUU	<i>Neotoma mexicana</i>
Tonto Creek		NM-Rec		<i>Neotoma spp.</i>
Tacaribe	TCRV	NM-B	Trinidad	<i>Artibeus bat</i>
Tamiami	TAMV	NM-Rec	EEUU	<i>Sigmodon hispidus</i>
Whitewater Arroyo	WWAV	NM-Rec	EEUU	<i>Neotoma spp.</i>

*LCMV = virus de la Coriomeningitis Linfocitaria
 NM = Nuevo mundo (clados A, B, C o Recombinante)
 VM = Viejo Mundo

Los humanos son hospedadores accidentales de los arenavirus y su infección ocurre a través del contacto del hombre con las excretas y secreciones de roedores infectados. Es por este motivo que la dinámica poblacional del reservorio sea probablemente, uno de los parámetros más

importantes y determinantes de la epidemiología de la infección en humanos. Los cuadros clínicos más graves son los ocasionados por la infección con los virus LASV, JUNV, MACV, GTOV y SABV los cuales provocan fiebres hemorrágicas en el oeste de África, Argentina, Bolivia, Venezuela y Brasil, respectivamente (Peters, 1996; Charrel y de Lamballerie, 2003).

La familia *Arenaviridae* se divide en dos grupos principales: linajes del Viejo mundo (serocomplejo Lassa-LCMV) que comprende siete virus: LCM, LASV, MOPV, MOBV, IPPYV, Morogoro y Kodoko, y los linajes del Nuevo mundo (serocomplejo Tacaribe) constituidos por virus sudamericanos que comprenden al clado A formado por los virus: PIRV, PICV, FLEV, PARV y ALLV; clado B formado por los virus: SABV, JUNV, MACV, GTOV, AMAV, TCRV, CPXV y Chapare; y clado C formado por los virus sudamericanos: OLVV y LATV (Figura 1). El origen de tres arenavirus norteamericanos WWAV, TAMV y BCNV estaría dado por un evento de recombinación entre virus de los linajes A y B, perteneciendo el extremo 5' no codificante del segmento S al linaje B, mientras que el extremo 3', la región intergénica y el gen de N corresponderían al linaje A (Charrel y Lamballerie, 2003). El descubrimiento reciente de nuevos arenavirus norteamericanos, Skinner Tank, Catarina, Tonto Creek y Big Brushy Tank, confirmó el origen recombinante este segmento (Figura 1) (Cajimat y col., 2007, 2008; Milazzo y col., 2008).

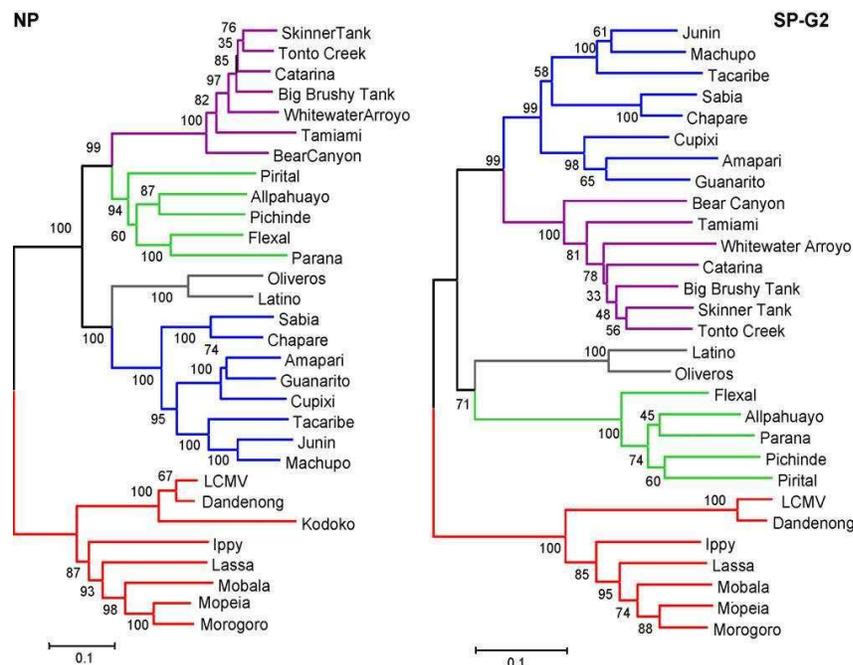


Figura 1. Relaciones filogenéticas de la familia *Arenaviridae*. En rojo, arenavirus del viejo mundo; en verde, arenavirus del nuevo mundo clado A; en azul, arenavirus del nuevo mundo clado B; en gris, arenavirus del nuevo mundo clado C; en violeta, arenavirus del nuevo mundo recombinantes. Panel izquierdo, filograma basado en la secuencia aminoacídica de la nucleoproteína viral (NP = N). Panel derecho, filograma basado en la secuencia aminoacídica del péptido señal y la glicoproteína 2. Los árboles fueron construidos con algoritmos de neighbor-joining y bootstrapping (200 pseudoreplicados) mediante el software MEGA 2 (Charrel y de Lamballerie, 2010).

1.1 PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE LOS ARENAVIRUS

Las partículas de los arenavirus presentan una envoltura lipídica, a partir de la cual se proyectan espículas glicoproteicas. Su forma es esférica o pleomórfica con un diámetro promedio de 120 nm. Mediante estudios de microscopía electrónica se observó la presencia de ribosomas (20 -25 nm) dentro de las mismas, lo que les confiere un aspecto “arenoso”, hecho del cual deriva el nombre de la familia (Figura 2a) (Buchmeier, 2002; Meyer y col., 2002; Rowe y col., 1970; Compans, 1993). El virión presenta un complejo multimérico anclado en la envoltura formado por las glicoproteínas G1 y G2 procesadas a partir del precursor glicoproteico, GPC; un “factor de brotación” o proteína de matriz Z y la proteína N, asociada al ácido nucleico viral. Sumado a estos componentes, se encuentra la ARN polimerasa ARN dependiente denominada L que junto con N y el ARN viral forman las dos nucleocápsides (Figura 2 b) (Neuman y col., 2005).

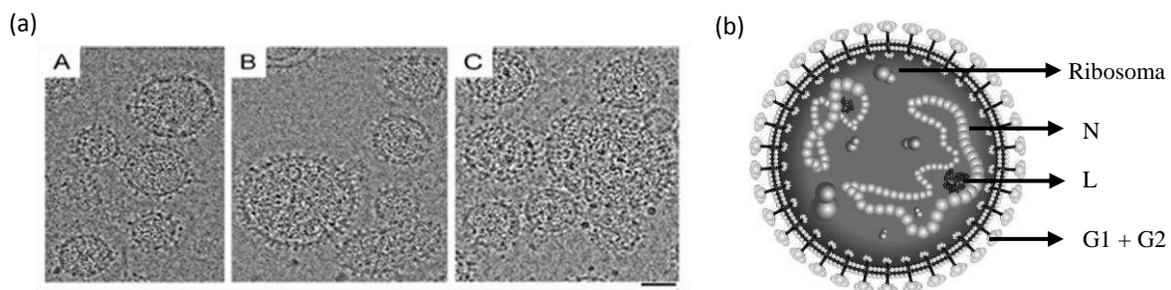


Figura 2. (a) Crio-electro micrografías de partículas virales. PICV (A), TACV (B) y LCMV (C) purificadas (Neuman y col., 2005). Barra=500 A. (b) Representación esquemática de la organización de las proteínas estructurales de los arenavirus y su ubicación en la partícula viral (Neuman y col., 2005).

1.2 GENOMA VIRAL

Los viriones contienen un genoma de ARN bi-segmentado de polaridad negativa, el cual está dispuesto como un complejo ribonucleoproteico en conformaciones circulares conocidas como nucleocápsides. Los segmentos genómicos de los arenavirus fueron designados de acuerdo a su tamaño L (large) y S (small) (Figura 3), de aproximadamente 7,2 y 3,5 kb, respectivamente. La relación entre el segmento S y L encontrada en las partículas virales no es equimolecular, ya que el segmento S se encuentra en mayor proporción que el segmento L (Romanowski y Bishop, 1983; Southern y col., 1987). El segmento S codifica para los componentes mayoritarios del virión: N y GPC. El segmento L codifica para las proteínas L y Z.

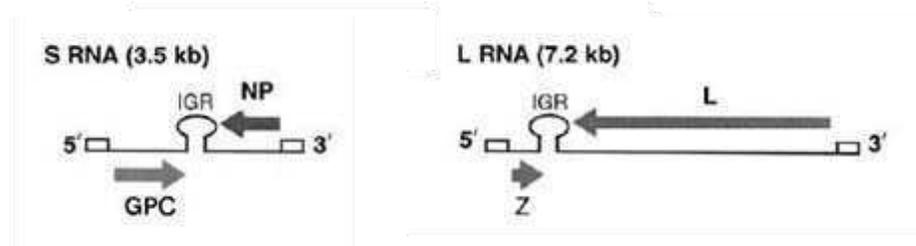


Figura 3. Organización genómica de los arenavirus (de la Torre, 2005). Los dos segmentos genómicos de los arenavirus L (large) y S (small). IGR región intergénica, NP = N = nucleoproteína, GPC precursor glicoproteico, Z, proteína de matriz y L, ARN polimerasa.

Cada segmento de ARN genómico posee una estrategia de codificación ambi-sentido la cual dirige la síntesis de dos polipéptidos en orientaciones opuestas, cuyos genes se encuentran separados por una región intergénica (IGR). Las regiones codificantes de N y L son transcritas a un ARNm complementario al ARN genómico, mientras que las regiones codificantes de GPC y Z son transcritas a ARNm de sentido genómico (Figura 4). Es decir, una región de los segmentos S y L tiene sentido negativo, mientras que otra región no solapada con la anterior tiene polaridad pseudo-positiva, ya que todavía no existen evidencias que los ARN S y L puedan ser directamente traducidos para dar origen a las proteínas GPC y Z, respectivamente (de la Torre, 2005).

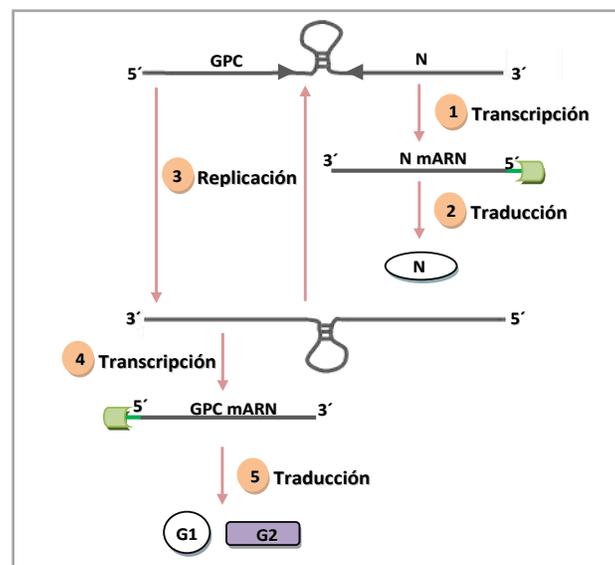


Figura 4. Estrategia de codificación ambisentido de arenavirus. N, nucleoproteína viral; GPC, precursor glicoproteico; G1, glicoproteína 1; G2 glicoproteína 2.

Los ARNm subgenómicos, que no estarían poliadenilados en su extremo 3', poseen en su extremo 5' secuencias cortas adicionales (1 a 5 nt) terminadas en estructuras cap (Banerjee y col., 1976; Kolakofsky y Garcin, 1993; Meyer y Southern, 1993). Esa característica sugiere que los

arenavirus podrían iniciar la síntesis de los ARNm mediante un mecanismo de “secuestro del Cap” (*cap-snatching*), como el descrito para los virus Influenza (Bouloy y col., 1978) y bunyavirus (Bishop y col., 1983; Patterson y Kolakofky, 1984; Kolakofky y Hacker, 1991). Se postula que dicho mecanismo podría ser mediado por la polimerasa viral, dada su capacidad de unir y escindir ARN (Morin y col., 2010).

Asimismo, se ha encontrado dentro de la partícula viral el ARNm de la proteína Z, especulándose que el mismo podría participar en el inicio de la infección de los arenavirus. Actualmente, no es posible determinar si el ARNm de Z se deba considerar como un componente esencial de la partícula viral o simplemente asumir su presencia como consecuencia de un proceso de encapsidación impreciso. Sin embargo, dada la equivalencia molecular alta de esta especie de ARN dentro del virión, es tentador especular acerca de una función específica de este componente durante el inicio de la infección (Salvato y col., 1992; Salvato y Shimomaye, 1989).

La región intergénica (IGR), posee la capacidad de formar un plegamiento estable en forma de horquilla (simple o doble dependiendo del arenavirus), debido a la presencia de secuencias complementarias las cuales se encuentran conservadas a través de la evolución de esta familia, sugiriendo un significado funcional importante, particularmente en la terminación transcripcional o, como también fue planteado en la encapsidación del genoma viral (Auperin y col., 1984, Lopez y Franze-Fernandez, 2007, Pinschewer y col., 2005).

Los arenavirus poseen una secuencia nucleotídica conservada en los extremos 3' de los segmentos genómicos L y S (17 de los primeros 19 nucleótidos son idénticos entre los ARN S y L), mientras que en los extremos 5' de ambos segmentos genómicos se encuentra la secuencia inversa y complementaria de la misma. Se ha sugerido que estas secuencias terminales conservadas podrían representar el sitio de unión de L. Asimismo, se postula la formación de estructuras de duplex intra o inter segmentos con circularización del genoma como consecuencia de la complementariedad de las secuencias terminales, predicción que se encuentra sustentada por datos de microscopía electrónica (Meyer y col., 2002; Young y Howard, 1983). Las secuencias promotoras de la expresión génica y la replicación del genoma residen en los extremos 5' y 3' de los segmentos genómicos. Mediante el uso del sistema de minigenoma para LASV se determinó que el promotor funcionaría como un duplex (genoma circularizado). Mientras las primeras posiciones (1-12) funcionarían de manera “secuencia específica” con el complejo de replicación, las posiciones 13 -19 sólo serían importantes para la complementariedad entre el promotor 5' y 3' lo cual sería relevante para la funcionalidad de la región promotora debido a la posibilidad de formación del duplex mencionado (Hass y col., 2006).

1.3 LAS PROTEÍNAS VIRALES

1.3.1 Glicoproteínas virales

Las glicoproteínas de los arenavirus se sintetizan como precursores glicoproteicos de aproximadamente 70 kDa, los cuales son procesados post-traduccionalmente en dos pasos secuenciales. El complejo glicoproteico maduro de JUNV, consiste en 3 subunidades asociadas de manera no covalente, obtenidos por clivaje de GPC: un péptido señal (SSP) de 58 aminoácidos, la glicoproteína G1 responsable de la interacción con el receptor celular y la proteína de transmembrana G2 con actividad fusogénica. Los dominios de G2 ricos en residuos hidrofóbicos (H) y polares (P) en los extremos amino y carboxilo terminal serían los responsables de mediar el evento de fusión célula-célula dependiente de pH (Gallaher y col., 2001; York y col., 2005). El procesamiento de GPC ocurre tardíamente en la vía secretora entre la red media y el trans Golgi, requiere de glicosilación previa y de la integridad del dominio citoplasmático de G2 (Kunz y col., 2003; Burns y Buchmeier, 1993). La proteasa responsable del primer evento de procesamiento aún no ha sido identificada, mientras que el segundo evento de procesamiento es mediado por una proteasa subtilasa celular (subtilisin kexin isozyme- 1/site-1-protease) SKI-1/S1P, enzima que se encuentra involucrada en el metabolismo del colesterol (Beyer y col., 2003; Lenz y col., 2001). Se ha demostrado que este procesamiento no es requerido para la expresión de las glicoproteínas en la membrana celular pero es esencial para la incorporación de las mismas a los viriones y para la producción de partículas virales infectivas (Kunz y col., 2003). Ambos eventos de procesamiento, como así también, la presencia del SSP, son necesarios para la fusión de la envoltura viral con membrana endosomal mediada por G2 (York y col., 2004).

1.3.2 La nucleoproteína viral

La proteína N, cuyo peso molecular varía entre 60 y 68 KDa dependiendo del arenavirus considerado, es la proteína viral más abundante, tanto en células infectadas como en los viriones, representando hasta un 70% de las proteínas totales del virión (Veza y col., 1977; 1978). Alineamientos de secuencias aminoacídicas de N de diferentes arenavirus han revelado un grado alto de conservación, tanto de secuencias como de motivos estructurales. Se considera que N posee los determinantes antigénicos del grupo (Buchmeier y col., 1977; Buchmeier y Oldstone, 1978). Los residuos de arginina y lisina son abundantes, apareciendo en clusters de dos o tres aminoácidos, presentando el extremo carboxilo-terminal un segmento conservado de 4 o 5 residuos básicos que podrían funcionar como un dominio de unión al ARN. Mediante el análisis bioinformático de la

secuencias aminoacídicas de N de diferentes arenavirus y mediante ensayos de unión a metales, se evidenció la presencia de un dominio de unión a Zn^{++} , ubicado también en el extremo carboxilo-terminal, el cual estaría involucrado en la unión de N al ARN viral (Parisi y col., 1996, Tortorici y col., 2001a).

La proteína N es el elemento estructural principal de las nucleocápsides virales, en las que se encuentra asociada a los ARNs genómicos y antígenómicos de cadena completa. Las nucleocápsides son estructuras biológicamente activas, que sirven como templado para la transcripción y replicación del genoma viral por parte de la polimerasa L. De esta manera las proteínas N y L son suficientes para dirigir la transcripción y replicación del genoma viral y el ciclo completo de replicación de ARN análogos a los ARN virales (Lee y col., 2000; López y col., 2001; Hass y col., 2006). Además se ha propuesto para N un rol como antiterminadora de la transcripción de los ARNm virales durante la infección por arenavirus (Tortorici y col., 2001a). Durante esos procesos es posible que la interacción entre N y L, demostrada en ensayos de co-inmunoprecipitación (Jácamo y col., 2003), tenga un rol regulatorio.

Otra de las funciones descritas para la proteína N de un grupo representativo de arenavirus, con la excepción de TCRV, es la de bloquear la translocación nuclear del factor IRF-3, lo que resulta en una inhibición importante de la producción de interferón de tipo I. Esta función de la proteína N podría contribuir a la falla de la respuesta inmune innata en el control de la replicación de los arenavirus patógenos (Martínez-Sobrido y col., 2006; 2007). Por otra parte se ha demostrado que las proteínas N y Z de LASV interactúan in vivo (Eichler y col., 2004). En concordancia con esos datos, la observación de viriones en estudios de criomicroscopía ubicaron a la proteína N como una capa de densidad interna, separada de la membrana lipídica por la proteína Z (Neuman y col., 2005). Estos datos sugieren que la interacción entre Z y N podría desempeñar un papel importante en el reclutamiento de las nucleocápsides en la membrana plasmática durante la maduración de las partículas virales.

1.3.3 La polimerasa viral

La proteína L (180-250 kDa) de los arenavirus es una ARN polimerasa ARN dependiente, cuya función es esencial en el evento de replicación/transcripción viral. Alineamientos de secuencias mostraron la presencia de 6 dominios conservados con virus de ARN de polaridad negativa y dos regiones conservadas sólo entre las polimerasas de arenavirus y bunyavirus. La proteína L, junto con N, es un componente de las nucleocápsides (Buchmeier, 2002; Sanchez y de la Torre, 2005). Recientemente fue reportada la caracterización funcional y estructura cristalográfica de una región de 196 aminoácidos correspondientes al dominio N-terminal de L de LCMV (dominio LN1). Dicho

dominio es capaz de unirse y escindir ARN, y por lo tanto se plantea que sería el responsable del mecanismo de robado del cap propuesto para los arenavirus (Morin y col., 2010).

1.3.4 La proteína Z

La proteína Z (11 kDa) es la proteína más pequeña codificada por el genoma de los arenavirus. Esta proteína presenta en su secuencia un motivo RING-finger, con capacidad de unión a Zn. La coordinación de Zn⁺⁺ entre los residuos de cisteína e histidina favorece la formación de multímeros de Z (Djavani y col., 1997).

Se ha reportado la interacción de Z con diversas proteínas celulares, tales como la proteína de leucemia promielocítica (PML), las proteínas ribosomales P y el factor de inicio de la traducción eucariota eIF4E (Borden y col., 1998). La interacción de Z con eIF4E en cultivos celulares reprimiría la síntesis de proteínas celulares específicas, tales como la ciclina D1, a nivel post-transcripcional. Esta represión podría también estar mediada por el secuestro de componentes ribosomales, tales como las proteínas de la subunidad ribosomal mayor P, cuya interacción con Z ha sido observada en el núcleo de células infectadas con LCMV (Campbell y col., 2000). Por otro lado, se ha sugerido que la proteína Z es un componente estructural de las nucleocápsides (Buchmeier, 2002), y que además, ejercería un rol fundamental en la brotación de partículas virales a partir de células infectadas (Perez y col., 2003). La función de Z respecto a la regulación de la transcripción y replicación es aún discutida ya que existen trabajos que señalan a Z como inhibitoria de la transcripción y replicación del ARN de LCMV y de TCRV (Cornu y de la Torre, 2001, Lopez y col., 2001), mientras que otros la señalan como necesaria para la síntesis tanto del ARNm como ARN genómico (Garcin y col., 1993). Se ha demostrado que el efecto inhibitorio de Z en la replicación y transcripción es dependiente de la integridad del dominio RING (Cornu y de la Torre, 2002). Las proteínas Z de los diferentes arenavirus poseen en su extremo carboxilo-terminal motivos conservados de prolinas (PPxY y P(T/S)AP), similares a los observados en proteínas de matriz de otros virus. Estos motivos se denominan motivos tardíos e intervienen en la interacción con diferentes proteínas celulares involucradas en el proceso de brotación viral.

1.4 EL CICLO DE MULTIPLICACIÓN DE LOS ARENAVIRUS

El ciclo de multiplicación de los arenavirus, cuya duración oscila entre 12-24 horas, ocurre exclusivamente en el citoplasma de las células infectadas y la progenie viral es liberada por brotación a partir de la membrana plasmática (Coto y col., 1970,; Meyer y col., 2002) (Figura 5).

Adsorción: Los arenavirus presentan un amplio tropismo celular. Consistente con estas propiedades se ha identificado al α -dístroglicano (DG) como receptor de los arenavirus LCMV, LASV y OLVV (Meyer y col., 2002). Sin embargo aunque los virus del viejo mundo utilizan al α -DG como receptor, sólo los virus pertenecientes al clado C del nuevo mundo (Figura 1) utilizan dicho receptor para la entrada a células de embrión de ratón. Recientemente, se ha descrito como receptor celular para los virus del nuevo mundo pertenecientes a los clados A y B, entre los cuales se incluye los altamente patogénicos JUNV, MACV, GTOV y SABV al receptor de transferrina 1 (Radoshitzky y col., 2007).

Penetración y desnudamiento: La entrada de los arenavirus a la célula ocurre por un evento de endocitosis mediada por receptor. Se ha documentado para LCMV que la entrada ocurre a través de grandes vesículas desnudas (Borrow y Oldstone, 1994), que entran a la vía endosomal y son acidificadas al moverse dentro de la célula, mientras que para JUNV la entrada a la célula ocurre por endocitosis dependiente de clatrina (Martínez y col., 2007). El pH intravesicular decrece desde 6.2 en los endosomas tempranos hasta aproximadamente 5 al tiempo de alcanzar los lisosomas, compartimentos finales de la vía. La fusión entre la envoltura viral y la membrana de la vesícula es disparada al descender el pH, siendo 5.3 el pH óptimo para LCMV y JUNV (Castilla y col., 1994; Di Simone y Buchmeier, 1995). Cuando el interior de la vesícula alcanza este pH, el complejo glicoproteico sufre un cambio conformacional irreversible en el cual G1 se disocia del complejo. Esta disociación deja expuesto al péptido de fusión contenido en G2 el cual sufre cambios conformacionales en su estructura y de esta manera provocaría la fusión de la envoltura del virus y la membrana endosomal liberando así el material genético del virus en el citoplasma celular (Castilla y col., 1994, Di Simone y col., 1994, York y col., 2005).

Replicación y síntesis de macromoléculas: Una vez liberadas las nucleocápsides en el citoplasma, la estrategia de codificación ambisentido provee e impone un mecanismo de regulación temporal de la expresión génica de los arenavirus durante el curso de su ciclo de multiplicación. Experimentalmente se ha demostrado que el núcleo es importante para el ciclo de multiplicación, posiblemente la membrana nuclear sería requerida como soporte para la transcripción y replicación del ARN viral. Dado que se ha descrito la presencia de estructuras 5' cap en los mRNA de los arenavirus (Banerjee y col., 1976) se especula que la necesidad del núcleo también podría deberse a la adquisición de cap mediante un mecanismo de "robado de Cap" del hospedador (Meyer y col., 2002).

La síntesis del ARNm de N puede ocurrir en las células infectadas que han sido tratadas con inhibidores de la síntesis proteica, pero la progresión del ciclo de multiplicación mas allá de esta etapa queda bloqueado. Esto llevó a la especulación que N podría estar involucrada en la regulación de la

terminación de la transcripción en la región intergénica. En estadios tempranos de la infección cuando los niveles intracelulares de N son bajos, la progresión de la polimerasa sería arrestada en la región intergénica, y de esta manera sólo los mARN de N (segmento S) y mARN L (segmento L) serían sintetizados. A medida que los niveles de N se acumulan en el citoplasma de la célula infectada, N se uniría a la región intergénica de algunas moléculas de molde y permitiría la progresión de la polimerasa hacia el extremo 5' del templado y de esta manera completaría la replicación del ARN antígenómico. Por el contrario el ARNm de GPC no es transcrito hasta que la replicación del ARN ya ha comenzado. Esta separación temporal de la expresión de N y GPC ha sido convalidada mediante estudios de cinética de expresión de estos antígenos virales. Asimismo, basados en la estrategia de codificación ambisentido, para las proteínas codificadas por el segmento L se podría esperar que la polimerasa L apareciera en el citoplasma tempranamente respecto de síntesis de Z. Por el contrario si el ARNm de Z se encuentra en el virion, Z se sintetizaría antes que L en el curso del ciclo de multiplicación viral en la célula infectada (Meyer y col., 2002). Según un primer modelo, es muy probable que el contenido intracelular y la distribución de N sean críticos para la regulación de niveles relativos de transcripción y replicación en las células infectadas con arenavirus (Tortorici y col., 2001a). Un modelo alternativo propone la existencia de dos complejos diferentes conteniendo la polimerasa, los cuales estarían comprometidos a la transcripción o a la replicación desde el inicio de dichos procesos, los cuales no competirían entre sí. La polimerasa estaría comprometida a uno de los mismos cuando se produce la iniciación en el extremo 3', ya sea utilizando un primer con cap para el proceso de la transcripción o empleando un mecanismo de "prime-and-realign" para la replicación del genoma viral (Pinschewer y col., 2003).

Se ha reportado que Z ejercería su función inhibitoria mediante su interacción con la proteína L posiblemente provocando un cambio conformacional en su estructura, lo cual alteraría su capacidad de iniciar la replicación del ARN viral (Jacamo y col., 2003). Altos niveles de Z a tiempos tardíos de la infección podrían ser requeridos para la maduración y brotación viral (Cornu y de la Torre, 2002). Asimismo, se ha sugerido que Z podría interactuar con las estructuras secundarias presentes en la IGR, reclutando al genoma y a los distintos componentes proteicos durante el ensamblado de las partículas virales (Pinschewer y col., 2005).

Ensamblaje: El ARN sintetizado de largo completo y de sentido genómico es utilizado para la formación de la progenie viral. Cabe destacar que solo los ARN genómico y antígenómico se encuentran formando cápsides unidos fuertemente a N (Pinschewer y col., 2003).

Brotación: Los arenavirus brotan desde la membrana plasmática, lo que involucra una asociación entre N y la membrana del hospedador enriquecida en glicoproteínas virales. Las proteínas con dominios tardíos tienen un rol esencial en los últimos pasos de la brotación viral. Las proteínas

celulares TSG101 y Nedd4, las cuales forman parte del sistema del direccionamiento vacuolar de proteínas (VPS vacuolar protein sorting), interaccionan con los dominios tardíos P(T/S)AP y PPxY, respectivamente, presentes en las proteínas Z de los diferentes arenavirus. Dicha interacción recluta a estas proteínas al sitio del ensamblado de los componentes virales, lo cual es necesario para la brotación de la progenie viral (Perez y col., 2003). La brotación de las partículas virales desde la membrana plasmática involucraría una compleja interacción entre las proteínas virales y proteínas de la maquinaria celular VPS, incluyendo TSG101, VPS4A y VPS4B (Urata y col., 2006).

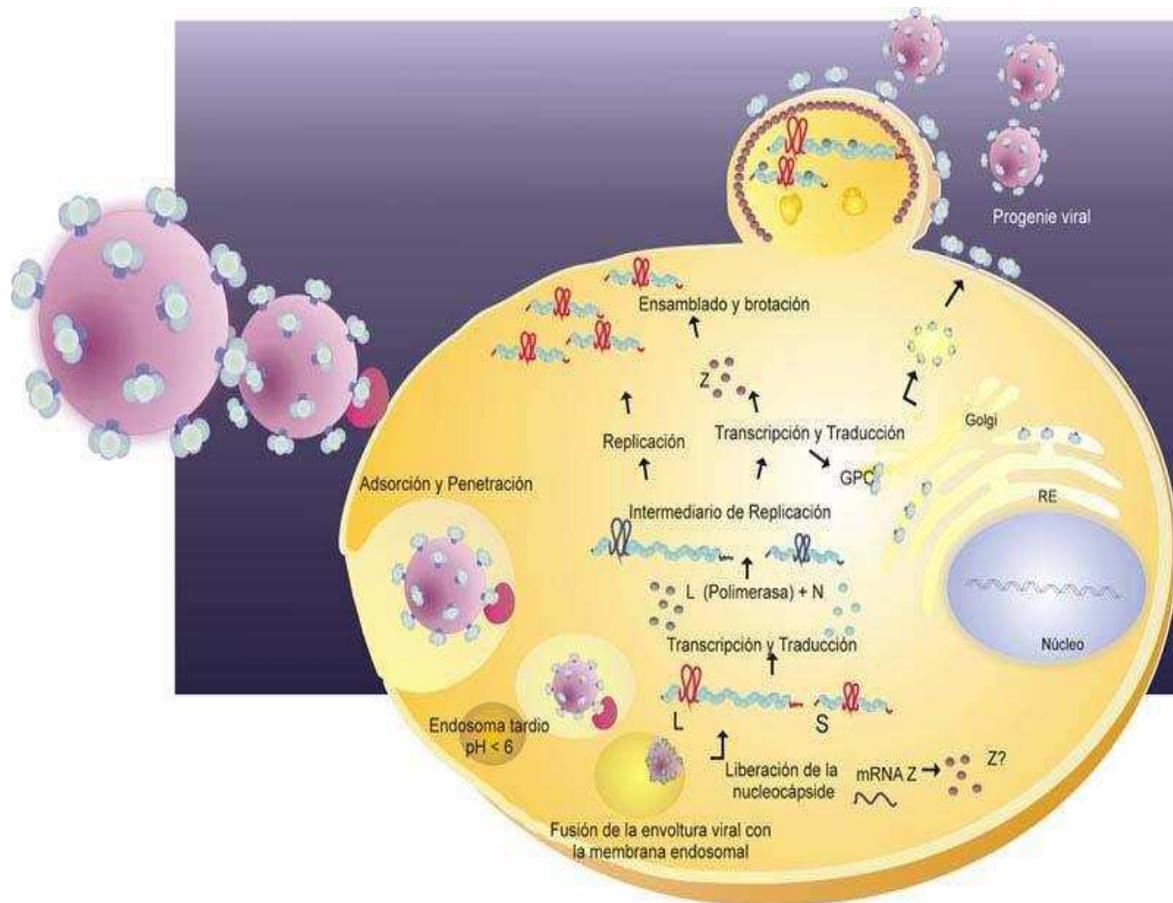


Figura 5. Ciclo de multiplicación de los arenavirus.

1.5. VIRUS JUNÍN: INFECCIÓN *IN VITRO*

JUNV es capaz de crecer *in vitro* en una amplia variedad de sustratos celulares sin producir efecto citopático aparente, con la excepción de células Vero, HeLa y MRC5 (Weissenbacher y Damonte, 1983, Weber y col., 1985). Este efecto ocurre durante los primeros estadios de la infección, definiendo lo que se conoce como etapa aguda de la misma, en donde los niveles de multiplicación viral son máximos. A partir de 10 días post-infección las células sobrevivientes a la acción viral

comienzan a repoblar el cultivo estableciéndose un equilibrio entre el virus y la célula, que da origen a lo que se conoce como etapa persistente. De manera similar a lo observado para LCMV, la transición desde la infección aguda a la persistente está caracterizada por una reducción en la liberación de progenie viral infecciosa y por una reducción de la expresión G1 en la superficie de la célula infectada. Sin embargo los cultivos poseen capacidad fusogénica demostrándose la presencia de la glicoproteína G2. Asimismo, en algunos casos se observó un patrón de expresión diferencial de la nucleoproteína viral en el citoplasma de las células persistentemente infectadas con JUNV (Carballal y col., 1980, Ellenberg y col., 2002).

Estos cultivos, además de ser morfológicamente indistinguibles de las células no infectadas, se caracterizan por ser resistentes a la sobreinfección con virus homólogo y antigénicamente relacionado (Damonte y Coto, 1979; Damonte y col., 1978; Weber y col., 1985). En un cultivo de células Vero persistentemente infectado con JUNV no virogénico se comprobó que JUNV sobreinfectante fue capaz de adsorberse y penetrar pero no de sintetizar la cadena complementaria del genoma viral, paso intermediario necesario para la replicación del genoma del virus. Asimismo, la resistencia a la sobreinfección observada en estos cultivos fue atribuida a un factor asociado a células, dado que esta resistencia fue conferida a células susceptibles cuando las mismas fueron co-cultivadas junto con células persistentemente infectadas, mientras que sobrenadantes de células persistentemente infectadas no mostraron esta capacidad. Más aun, la resistencia a la sobreinfección con virus homólogo, que mostraron dichos cultivos, fue correlacionada a la expresión de N en dichas células (Ellenberg y col., 2004).

En la mayoría de los trabajos realizados, en los que se estudiaron cultivos virogénicos, se describe la existencia de un patrón cíclico y niveles reducidos de liberación de virus infeccioso, con períodos de ausencia de liberación de progenie viral y producción en algunos casos de partículas defectivas interferentes (D.I.) (Candurra y Damonte, 1985; Help y col., 1976; Ellenberg y col., 2007). Cultivos de células BHK-21 persistentemente infectadas con JUNV mostraron una resistencia parcial, no mediada por interferón, ni partículas D.I. a la sobreinfección con virus homólogo o antigénicamente relacionado a JUNV. En estos cultivos se comprobó que una alteración a nivel de la brotación viral determinado por la sobreexpresión de la proteína celular TSG-101, sería responsable, en parte, de la resistencia a la sobreinfección característica de estos cultivos (Ellenberg y col., 2007).

2. INTERACCIONES VIRUS-HOSPEDADOR: REGULACIÓN DEL MECANISMO DE TRADUCCIÓN

Los virus son parásitos intracelulares obligados y como tales han desarrollado distintas estrategias como marco en su relación con el hospedador a fin de asegurar su supervivencia en la naturaleza. El destino de una infección está determinado por la capacidad del agente de infectar y replicar dentro del hospedador y por la habilidad del hospedador de responder eficientemente ante la infección a través de su sistema inmune (Thomsen y col., 2000). En un individuo inmunocompetente el control primario de una infección aguda es llevado a cabo por la respuesta inmune innata y adaptativa, lo cual representa para el patógeno una compleja barrera a superar. Sin embargo, además de evadir al sistema inmune, el virus debe sortear un nivel de control secundario que se interrelaciona con dicho sistema: el control a nivel celular. La dependencia completa de los virus por los factores de la célula huésped, hace que el control a nivel celular sea imprescindible en la regulación de la infección viral (Ghazal y col., 2000).

La replicación exitosa de un virus requiere del establecimiento de un entorno favorable que responda a sus necesidades de síntesis de macromoléculas. Generalmente durante este proceso se generan alteraciones sustanciales en la fisiología celular que activan respuestas de estrés alertando a la célula acerca de problemas metabólicos y de síntesis. La inducción de esta respuesta a estrés tiene como fin la activación mecanismos de reparación o, en caso de que esta reparación no sea posible, inducir finalmente la muerte celular por apoptosis. El resultado de la activación de esta respuesta tienen muchos efectos que pueden ser beneficiosos o perjudiciales en la biología del virus (Buchkovich y col., 2008). Una de las mayores respuestas al estrés celular la constituye el bloqueo temporario de la traducción de proteínas mediante el cual la célula frena, empleando diferentes mecanismos, la traducción de mARNs que codifican genes de “mantenimiento” (*housekeeping*) priorizando la síntesis de proteínas chaperonas y enzimas necesarias para hacer frente a la situación de estrés. La inducción de la fosforilación de la subunidad α del factor de inicio de la traducción eIF2 (eIF2 α), fenómeno estrechamente relacionado con la respuesta antiviral, constituye uno de principales mecanismos de inhibición global de la síntesis proteica (Gale y col., 2000). La consecuencia morfológica de esta inhibición es la rápida formación de agregados granulares citoplasmáticos, conocidos como gránulos de estrés (SGs), que actúan como sitios de almacenamiento transitorio de los mARNs (Anderson y Kedersha., 2002; 2006). La inhibición de la traducción cap-dependiente mediante el bloqueo de la vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-quinasa/Proteína quinasa B/mTOR (PI3K/Akt/mTOR), constituye otro de los mecanismos de respuesta celular tendientes a reprimir la síntesis proteica (Buchkovich y col., 2008).

La inhibición de la traducción tiene por finalidad permitir que la célula se recupere del estrés al que fue sometida, sin embargo, en muchos casos resulta perjudicial en el ciclo de replicación de los virus para los cuales el mantenimiento de la síntesis de proteínas es crucial (Buchkovich y col., 2008).

2.1 MECANISMOS DE TRADUCCIÓN PROTEICA Y SUS PRINCIPALES PUNTOS DE REGULACIÓN

En las células eucariotas existen dos mecanismos principales de traducción de proteínas definidos en función de la presencia o ausencia de una estructura 7-metil guanosina (⁷GpppN) (cap), en el extremo 5' de los mARNs: mecanismo de traducción cap-dependiente o mecanismo de traducción cap-independiente, respectivamente.

La mayoría de los mARNs celulares se traducen mediante un mecanismo cap-dependiente en el cual el reconocimiento del cap, por factores específicos, es un requisito imprescindible para la unión del mismo al complejo ribosomal de preiniciación 43S. El cap además de otorgarle estabilidad al mARN y ser fundamental en el mecanismo de exportación nuclear, le otorga a la célula la ventaja de regular finamente la expresión génica estimulando o reprimiendo la traducción de mARNs específicos, usualmente a través de fosforilaciones reversibles de los factores de traducción (Merrick y Hershey, 1996).

Sin embargo ciertos mARNs pueden ser traducidos mediante un mecanismo cap-independiente. El ejemplo más estudiado de este tipo de traducción es la traducción mediada por IRES (sitios de entrada interna al ribosoma), la cual fue descubierta en 1988 durante estudios de la replicación de poliovirus y del virus de la encefalomiocarditis murina (EMCV) (Jang y col., 1988; Pelletier y Sonenberg, 1988). La presencia de estructuras IRES en el extremo 5' de los mARNs, media la unión de los mismos al complejo de preiniciación 43S, prescindiendo del cap. Este mecanismo de traducción es empleado por algunos virus, como una estrategia para favorecer la traducción de sus mARNs frente al shut-off de la traducción proteica cap-dependiente desencadenado por la infección. Sin embargo la traducción mediada por IRES no está restringida a los agentes virales, muchos mARNs celulares también usan IRES para incrementar la traducción de determinadas proteínas en condiciones tales como la mitosis, pro-apoptosis o respuesta al estrés, donde el bloqueo global impuesto a la mayoría de los mARNs con cap, es evadido mediante la presencia de estas estructuras.

2.1.1 Inicio de la traducción

La síntesis de proteínas es un proceso complejo sujeto a una importante regulación fisiológica, que puede ser dividido en tres etapas fundamentales: inicio, elongación y terminación siendo la primera etapa el mayor blanco regulatorio del control traduccional.

El inicio de la traducción involucra la interacción entre los factores de inicio eucariotas (*eukaryotic initiation factors*, eIFs), los ácidos ribonucleicos mARNs, rARNs y tARNs y las subunidades ribosomales 40S y 60S. Sin embargo estas interacciones difieren en función de la presencia o no del cap en el extremo 5' de los mARNs, por lo cual a continuación se presentan los principales eventos que ocurren en cada caso.

2.1.1.1 Inicio de la traducción cap-dependiente

El inicio de la traducción de los mARNs con cap puede ser dividido en tres etapas principales: Formación del complejo ternario eIF2-GTP-Met-tARNi, formación del complejo de unión al cap eIF4F y búsqueda del codón de inicio (Figura 6).

- **Formación del complejo ternario eIF2-GTP-Met-tARNi:**

La unión del mARN a la subunidad ribosomal 40S requiere una serie de eventos que comienzan con la formación de un complejo ternario constituido por el factor de inicio de la traducción eIF2, una molécula de GTP y un tARN iniciador (eIF2-GTP-Met-tARNi) (Trachsel H, 1996). Este complejo ternario es posteriormente reclutado a la subunidad ribosomal 40S la cual a su vez está asociada a los factores de inicio de la traducción eIF3 y eIF1A, formando de esta manera el complejo de pre-iniciación 43S. El factor eIF3 facilita la unión del complejo de pre-iniciación al mARN a través del reclutamiento del complejo de unión al cap, eIF4F, que se encuentra unido a la estructura 5' cap de los mARNs (Merrick y Hershey, 1996; Pain, 1996).

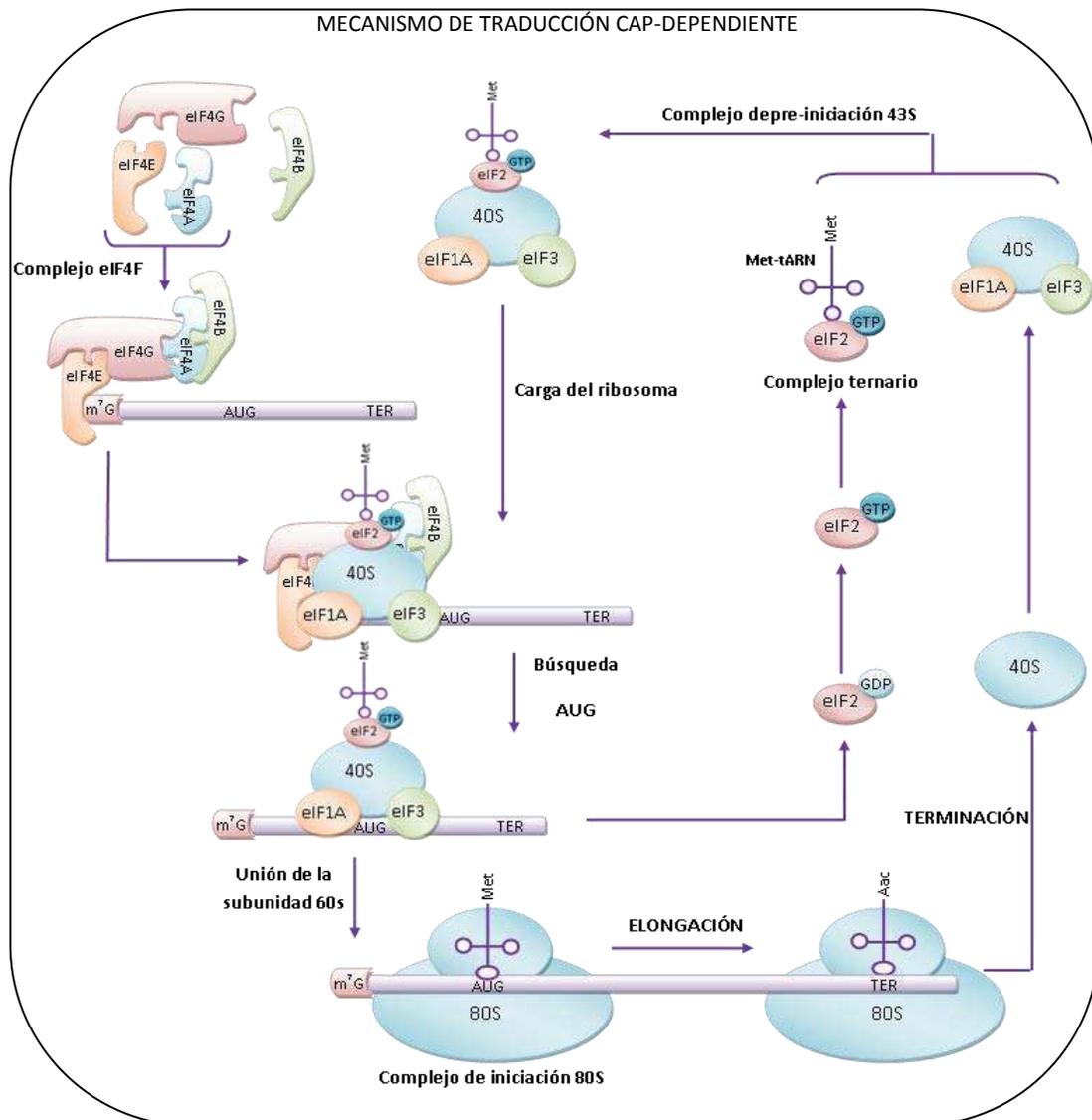


Figura 6. Esquema simplificado del mecanismo de traducción cap-dependiente de mARNs eucariotas. 40S y 80S representan a la subunidad ribosomal menor y al ribosoma de elongación, respectivamente. AUG, codón de inicio de la traducción. TER, codón de terminación de la traducción. Aac, aminoácido. En el esquema no se representa el extremo 3' del mARN. Adaptado de Gale y col., 2000.

- **Formación del complejo de unión al cap (eIF4F):**

eIF4F es un complejo multiproteico cuyo núcleo principal se encuentra constituido por la proteína de unión al cap, eIF4E, una proteína de andamiaje, eIF4G y la ARN helicasa ATP-dependiente, eIF4A. El ensamblaje del complejo eIF4F alrededor del mRNA es dependiente de eIF4E el cual reconoce y se une a la estructura 5' cap de los mismos. Este paso es obligatorio para el comienzo de la traducción cap-dependiente. eIF4A participa en el inicio de la traducción desensamblando la estructura secundaria de la región 5' no traducida (5' UTR) de los mARNs facilitando de esta forma la búsqueda del codón de inicio por parte de la subunidad ribosomal 40S. El factor eIF4A por si mismo

posee relativamente poca actividad ATPasa y helicasa, sin embargo estas actividades son estimuladas por el factor eIF4G y por los factores eIF4B y eIF4H (Rogers y col., 2002). El factor eIF4G actúa como una proteína de andamiaje que coordina el ensamblaje del complejo de inicio de la traducción, mediando la unión del mRNA a la maquinaria de traducción (Prevot y col., 2003). En humanos existen dos isoformas de eIF4G denominadas eIF4GI y eIF4GII, los cuales muestran una moderada homología de secuencias (46% de identidad) (Figura 7a) pero poseen actividades bioquímicas globales muy similares (Gallie y Browning, 2001; Tarun y col., 1997). eIF4GI, es considerado el prototipo de la familia y actúa como la piedra angular de la formación del complejo eIF4F, ya que presenta dos sitios de unión para eIF4A y un sitio de unión para eIF4E. eIF4GI presenta además un sitio de unión a eIF3, cuya interacción es crítica para mediar la unión del cap-mRNA al complejo de pre-iniciación 43S (Figura 7a). Finalmente eIF4GI también media la interacción de la estructura 5' cap con el extremo poli-adenilado (poli-A) de los mRNAs, mediante la interacción con la proteína de unión a 3' poli-A, PABP. El extremo 3' poli-A de la mayoría de los transcritos se encuentra rodeado por múltiples copias de la proteína PABP, la cual constituye una proteína ubicua esencial para el inicio de la traducción y el *turn-over* de los mRNAs. La interacción de PABP con eIF4G causa la circularización del mRNA formando un puente entre los extremos 5' y 3' denominado modelo del círculo cerrado (Figura 7b). Esta circularización aumentaría la eficiencia de traducción contribuyendo a la estabilización del mRNA y del complejo 5' cap y favoreciendo el reclutamiento eficiente y reciclaje de las subunidades ribosomales (Gale y col., 2000).

Además de estos homólogos funcionales, la familia eIF4G también comprende una proteína que solo presenta homología con una parte del extremo carboxilo terminal de eIF4GI (31% de identidad). Esta proteína denominada p97/NAT1/DAP5 fue aislada por tres grupos independientes, y es una proteína ubicua, abundantemente expresada en tejidos normales y líneas celulares (Imataka y col., 1997; Levy-Strumpf y col., 1997; Yamanaka y col., 1997). Esta proteína se caracteriza por la ausencia de los dominios de unión a PABP y eIF4E (presentes en el extremo amino terminal de eIF4GI), y la presencia de los dominios de unión a los factores eIF4A y eIF3 (Figura 7a). Los primeros reportes acerca de la función de esta proteína, indicaron que la sobreexpresión de la misma en cultivos de células inducía la inhibición tanto de la traducción cap-dependiente como de la traducción mediada por IRES, sugiriendo que su función sería la regulación negativa de la traducción (Imataka y col., 1997; Yamanaka y col., 1997). Reportes posteriores sugirieron que dicha proteína constituye un factor de traducción activado por caspasas, que media la traducción cap-independiente de diversos IRES celulares entre los que se encuentran los mRNAs de Apaf-1, c-myc, HIAP2, XIAP e incluso de su propio mensajero (Nevins y col., 2003; Warnakulasuriyarachchi y col., 2004; Henis-Korenblit y col., 2000, 2002). Sin embargo otros estudios mostraron que, contrariamente a lo esperado, p97 actuaría como

un activador traduccional en células estresadas, que no requeriría el clivaje mediado por caspasas para su activación (Nousch y col., 2007). Sobre la base de estos resultados descriptos, hasta el momento la función de p97/NAT1/DAP5 es controversial y permanece en estudio.

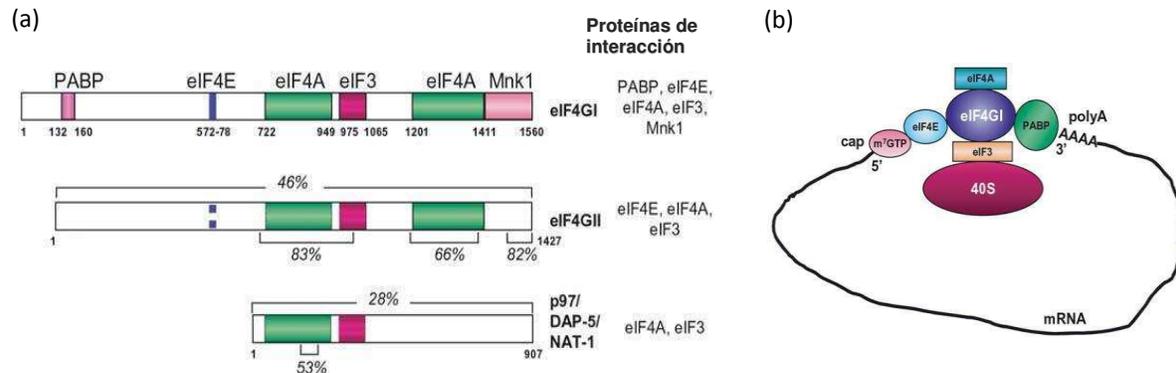


Figura 7. (a) Familia de factores eIF4G y sus proteínas de interacción. Representación esquemática de eIF4GI, eIF4GII y p97. Los dominios de interacción de eIF4GI con eIF4A, eIF3, Mnk-1, PABP y eIF4E, son indicados mediante la posición de aminoácidos de cada dominio. La homología entre eIF4GII y p97 es indicada como porcentaje de identidad de aminoácidos respecto de eIF4GI. (Prévot y col., 2003). (b) Modelo del complejo de traducción del círculo cerrado de mARNs. El complejo de inicio de la traducción eIF4F unido a la estructura 5' cap del mARN interactúa con el extremo 3' mediante la unión con proteína PABP. Esta interacción es mediada por el factor eIF4G que a través de sus dominios de unión a eIF4E y PABP, promueve la circularización del mARN (Prévot y col., 2003).

- **Búsqueda y selección del AUG:**

Luego de la asociación con el mARN, el complejo de pre-iniciación 43S comienza la búsqueda del extremo 5' del mARN y continúa recorriéndolo hasta que el Met-tARNi interactúa con el codón de inicio AUG. Una vez que el Met-tARNi se asocia con el codón de inicio, se produce la hidrólisis de la molécula de GTP del complejo ternario. Este proceso promueve la liberación de los factores de inicio de la traducción y la posterior unión de la subunidad ribosomal 60S, formando el complejo de iniciación 80S. Este último complejo media posteriormente la fase de elongación de la traducción (Jackson, 1996; Merrick y Hershey, 1996).

2.1.1.2 Inicio de la traducción cap-independiente: traducción mediada por IRES

El mecanismo de traducción dependiente de IRES se caracteriza principalmente por la unión directa del ribosoma al codón de inicio del mARN (o a una posición cercana), prescindiendo del paso de formación del complejo eIF4F y la posterior búsqueda de dicho codón de inicio desde la región 5' cap. El mecanismo molecular preciso mediante el cual la maquinaria de traducción celular reconoce al IRES es poco conocido. Sin embargo se sugiere que factores de traducción canónicos, como así también proteínas celulares específicas, que normalmente no están involucradas en el inicio de la traducción, denominadas factores transactivadores de IRES (ITAFs), serían fundamentales en este

proceso de reconocimiento (Niepmann 2009; Fitzgerald y Semler, 2009; Stoneley y Willis, 2004; Belsham y Sonenberg, 2000; Lewis y Holcik, 2008). La lista de ITAFs conocidos está creciendo continuamente, siendo los más extensamente estudiados el autoantígeno humano La (La), la proteína de unión a polipirimidinas (PTB) y las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares A1 (hnRNPA1), entre otras.

Dado que no hay similitudes significativas, ya sean estructurales o mecánicas, entre los IRES correspondientes a distintos mARNs (Filbin y Kieft, 2009; Balvay, 2009; Semler y Waterman, 2008), la combinación de factores de traducción e ITAFs necesaria para iniciar la traducción de un IRES es muy variable. El IRES del virus de la hepatitis C, por ejemplo, se une directamente a la subunidad ribosomal 40S prescindiendo de los factores de inicio eIF1A, eIF4A, eIF4B y eIF4E, mientras que el IRES de picornavirus, requiere la participación de eIF4G para su unión al ribosoma. Por otro lado, estudios funcionales in vitro revelaron que la eficiencia de la actividad traduccional de algunos IRES requiere de una combinación específica de varios ITAFs: PTB e ITAF45 para el IRES del virus aftosa (Andreev y col., 2007); PTB, La, hnRNPA1, Unr y la proteína-2 de unión a poli (rC) (PCBP2) para el IRES de rinovirus (Hunt y Jackson, 1999; Fitzgerald y Semler, 2009), entre algunos ejemplos.

2.1.2 Reprogramación traduccional: virus vs. célula

La dependencia obligada de los virus por la maquinaria de la célula huésped, justifica el hecho de que estos agentes hayan desarrollado un amplio rango de estrategias de reprogramación traduccional con un único fin: sintetizar las proteínas virales y completar su ciclo de replicación. Sin embargo dada la naturaleza de la relación virus-hospedador, la célula a su vez ha desarrollado estrategias tendientes a impedir el éxito replicativo de dichos agentes. Esta evolución conjunta lleva a que la reprogramación traduccional ejercida por los virus incluya frecuentemente mecanismos de modificación de la maquinaria de traducción en respuesta a los bloqueos ejercidos por la célula. De esta manera los virus son capaces de afectar todos los niveles del proceso de traducción incluyendo el inicio, la elongación, la terminación y las vías de señalización de control de la traducción celular (Gale y col., 2000).

El proceso de inicio de la traducción constituye el principal punto de competencia por el control de la síntesis proteica entre el virus y su célula hospedadora. Los dos blancos más importantes de control celular se encuentran a nivel de la formación del complejo de unión al cap, eIF4F, y del complejo ternario eIF2-GTP-Met-tARN, ambos procesos regulados fundamentalmente mediante eventos de fosforilación/desfosforilación. Sin embargo, la regulación viral es más amplia e incluye estrategias que van desde la modificación de estos mecanismos de fosforilación hasta la alteración de

la disponibilidad de los factores de traducción mediante la degradación o el secuestro de los mismos (Figura 8).

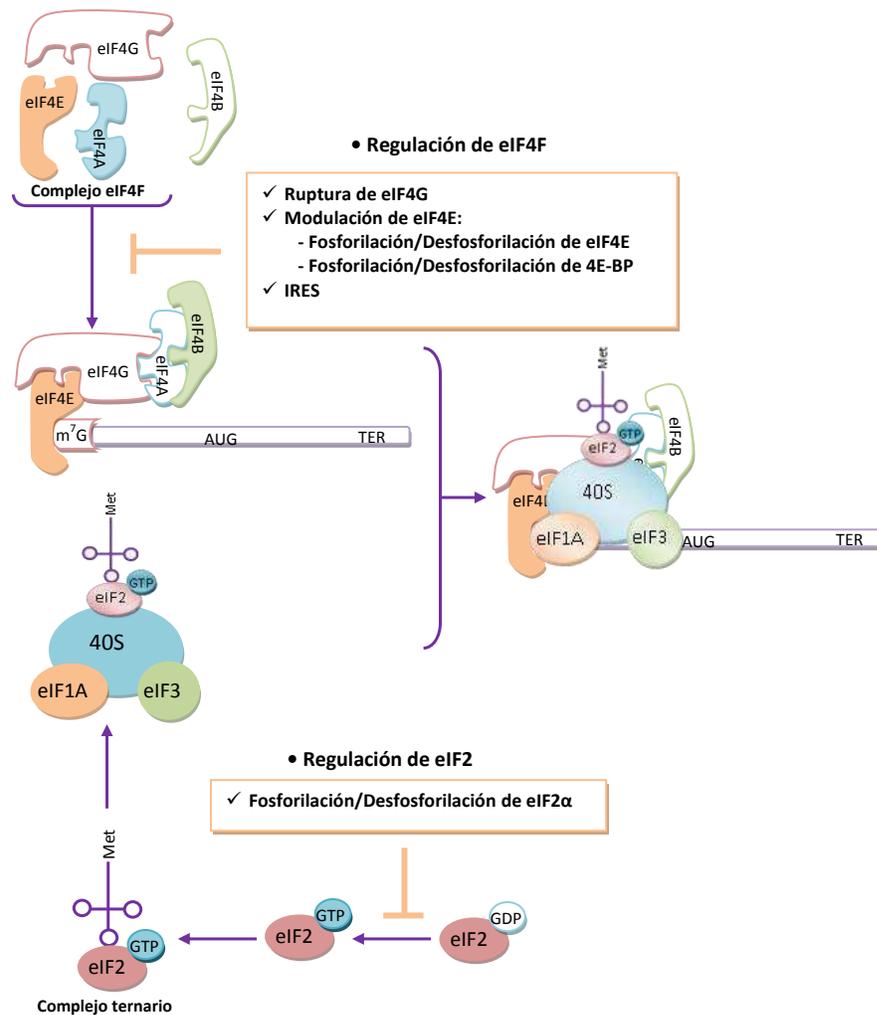


Figura 8. Esquema simplificado de los principales sitios de regulación viral del inicio de la traducción: formación de eIF4F y regulación del factor eIF2. Los cuadros indican los principales mecanismos empleados por los virus para llevar a cabo la regulación específica de cada etapa.

2.1.3 Principales puntos de regulación del inicio de la traducción

2.1.3.1 Control del inicio de la traducción cap-dependiente: regulación del factor eIF4E

El factor eIF4E constituye el mayor punto de regulación de la traducción cap-dependiente y es considerado el componente limitante de este mecanismo de traducción. La expresión de este factor es incrementada a nivel transcripcional en respuesta a factores de crecimiento o a la presencia de suero en el medio de cultivo de las células (Meric y Hunt, 2002). Su control durante el inicio de la traducción incluye dos estrategias principales: la regulación de su disponibilidad (mediante proteínas de unión a eIF4E [4E-BPs]) y la modificación de su afinidad por el cap (mediante fosforilación).

2.1.3.1.a Disponibilidad de eIF4E: Fosforilación de 4E-BP1

La unión del factor eIF4E a la estructura 5'cap constituye el principal mecanismo de regulación de la traducción cap-dependiente. Esta unión es mayormente regulada por la familia de proteínas 4E-BPs (cuyo miembro más estudiado es 4E-BP1) que secuestran al factor, mediante la formación de complejos eIF4E/4E-BPs, resultando en la inhibición de la traducción cap-dependiente (Pause y col., 1994; Patel y Sen, 1998). La formación de estos complejos está sujeta a regulación mediante fosforilación (Gingras y col., 2001), de modo que en su forma hipofosforilada 4E-BP1 inhibe la traducción, mientras que en su forma hiperfosforilada, mediada por la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, libera al factor eIF4E permitiendo su unión con eIF4G con la consecuente formación del complejo eIF4F activo (Haghighat y col., 1995; Mader y col., 1995; Marcotrigiano y col., 1999).

Naturalmente, la acumulación de eIF4E en su forma hipofosforilada, que conlleva al bloqueo en la formación del complejo eIF4F, es una estrategia empleada por virus que utilizan mecanismos de traducción cap-independientes. Este es el caso de picornavirus, tales como EMCV y poliovirus, los cuales contienen elementos IRES capaces de reclutar a los ribosomas en ausencia de una estructura cap (Hellen y Sarnow, 2001). Sin embargo esta estrategia también ha sido reportada en la infección con el virus de la estomatitis vesicular (VSV), a pesar de la presencia de estructuras cap en los mARNs virales (Connor y Lyles, 2002).

La estrategia opuesta es empleada por aquellos virus cuyos mARNs poseen estructuras cap, tales como adenovirus y herpesvirus, los cuales promueven la fosforilación de 4E-BP1, mediante la activación de PI3K/Akt/mTOR (Feigenblum y Schneider, 1996; Gingras y Sonenberg, 1997; Walsh y Mohr, 2004; Kudchodkar y col., 2004; Walsh y col., 2005). Sin embargo en la infección con herpesvirus la fosforilación de 4E-BP1 es sensible al inhibidor rapamicina (Walsh y Mohr, 2004), mientras que en células infectadas con HCMV, la fosforilación de 4E-BP1 es parcialmente sensible a rapamicina sugiriendo la existencia de un mecanismo adicional (Kudchodkar y col., 2004; Walsh y col., 2005).

2.1.3.1.b Afinidad de eIF4E por el cap: fosforilación en Ser209

Se ha reportado que la fosforilación de eIF4E en la Ser209 mediada por la kinasa asociada a eIF4G, denominada mnk-1 o mnk-2, incrementaría su afinidad por la estructura 5'cap (Fukunaga y Hunter, 1997; Waskiewicz y col., 1997; Pyronnet y col., 1999; Scheper y col., 2001, 2002). Sin embargo, a pesar de que el rol regulatorio de esta fosforilación es poco conocido y se propone que no sería limitante para el inicio de la traducción celular (Scheper y Proud, 2002), en muchas infecciones virales se plantea que la fosforilación de eIF4E en Ser209 tendría un rol clave en la inhibición de la síntesis de las proteínas celulares.

En células eucariotas, alteraciones en la fosforilación de eIF4E en Ser209 han sido observadas durante la infección con diversos virus. Durante la infección con VSV (Connor y Lyles, 2002), adenovirus (Huang y Schneider, 1991) o el virus influenza (Feigenblum y Schneider, 1993), por ejemplo, se observa una acumulación de la forma no fosforilada de eIF4E que se correlaciona con la inhibición de la síntesis de proteínas. La estrategia opuesta es observada durante la infección con el virus herpes simplex-1 (HSV-1) o citomegalovirus humanos (HCMV), los cuales inducen la acumulación de eIF4E fosforilado mediante la activación de la vía de señalización de p38, en el caso de HSV-1 o p38 y ERK en el caso de HCMV (Walsh y Mohr, 2004; Walsh y col., 2005). Sin embargo a pesar que tanto HSV-1 como HCMV inducen la fosforilación de eIF4E, HSV-1 induce una potente inhibición en la traducción de los mARNs celulares, que no está relacionada con la fosforilación de este factor, sino que sería el resultado de múltiples eventos, entre los cuales se destaca la reducción en la transcripción mediada por la ARN pol II (Roizman y Knipe, 2001).

2.1.3.2 Control del inicio global de la traducción: regulación de la fosforilación de eIF2

A diferencia de eIF4E, cuya regulación constituye el principal mecanismo de control del inicio de la traducción dependiente del cap, y es claramente explotada por los virus, la regulación de eIF2 constituye el principal mecanismo de regulación global de la síntesis proteica y es un componente crítico de la respuesta antiviral de la célula.

La capacidad de las células de responder a diversas formas de estrés que van desde la ausencia de nutrientes hasta la infección, involucra en parte su capacidad de regular la actividad de eIF2. La fosforilación de eIF2 α , mediada por proteínas kinasas específicas (Clemens MJ, 1994; Merrick y Hershey, 1996), impide la formación del complejo ternario eIF2-GTP-Met-tARNi inhibiendo de esta forma la síntesis global de proteínas (Katze, 1995; Mathews, 1993; 1996; Merrick y Jershey, 1996). Las diversas alteraciones que se producen durante las infecciones virales, tales como la acumulación de grandes cantidades de ARN doble cadena (ARNdc) o la extensa síntesis de proteínas virales, desencadena la activación de quinasas específicas (Pery y Mathews, 2000) que inducen la fosforilación de eIF2 α , con la finalidad de impedir la síntesis de proteínas virales y celulares. Sin embargo numerosos virus han desarrollado estrategias para contrarrestar esta respuesta celular.

2.1.3.3 Otros mecanismos de regulación viral del inicio de la traducción: degradación de eIF4G y PABP

La modificación de la disponibilidad de los factores de traducción mediante la degradación de los mismos, es otra de las estrategias ampliamente usadas durante la infección viral. Un ejemplo de

ello lo constituye el shut-off inducido durante la infección con picornavirus, el cual es extremadamente intenso y resulta en la completa interrupción de la traducción de los mARNs celulares a favor de la traducción IRES-dependiente de los mARNs virales. La característica principal de este shut-off involucra la interrupción del complejo eIF4F mediante el clivaje de eIF4G por la acción de la proteasa viral 2A tanto en la infección con EMCV y poliovirus, o por la proteasa L en la infección con el virus aftosa (Hentze, 1997; Keiper y col., 1999; Morley y col., 1997). A su vez, la ruptura de eIF4G por las proteasa viral 2A genera dos productos de clivaje: un producto amino terminal y otro carboxilo terminal. Llamativamente, la traducción cap-independiente de algunos picornavirus es estimulada por el producto de clivaje carboxilo terminal, el cual contiene los sitios de interacción con los factores de traducción eIF3 y eIF4A (Morley y col., 1997; Ohlmann y col., 1996) (Figura 9).

El clivaje de PABP también ha sido reportado en la infección de poliovirus, esta degradación tiene como finalidad por un lado, alterar la estabilidad de los mARNs y por otro reducir la eficiencia de la traducción cap-dependiente (Gale y col., 2000). En este caso el clivaje proteolítico de PABP es inducido mediante las proteasas virales 2A y 3C (Joachims y col., 1999; Kerekatte y col., 1999).

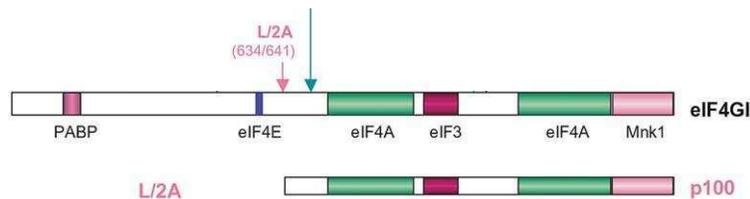


Figura 9. Mapa de la degradación de eIF4G1 mediada por las proteasas de picornavirus 2A y L. Abajo se indica el fragmento de clivaje C-terminal generado durante la proteólisis con estas proteasas (p100), con sus dominios de unión (Prévoit y col., 2003).

2.1.3.4 Estrategias virales de traducción: estructura de los mARNs virales

Como se puede observar, la manipulación viral a nivel de la fosforilación del factor eIF2 α , es un mecanismo global, cuya alteración afecta por igual la síntesis de proteínas celulares y virales. Aquellos virus que impiden la fosforilación de este factor, impuesta generalmente por la respuesta antiviral de la célula, eliminan la posibilidad de favorecer la traducción específica de sus mARNs, ya que la traducción de cualquier mARNs viral o celular se verá favorecida en esta situación.

Sin embargo los virus son capaces de contrarrestar esta “ventaja celular”, aprovechando la complejidad del inicio de la traducción. La extrema versatilidad de los mARNs virales en cuanto a su estructura, hace que la mayor parte de las estrategias desarrolladas por los virus tengan como blanco la formación del complejo eIF4F. De esta manera en función de las características de sus mARNs los

agentes virales emplean una o varias estrategias dirigidas hacia el impedimento del inicio de la traducción celular a favor de la traducción específica de sus mARNs. Estas estrategias incluyen la presencia o ausencia de la estructura cap y poliA en los mARNs virales, la modificación de factores celulares como así también el uso de proteínas virales en reemplazo de los mismos. El siguiente cuadro ejemplifica distintas estrategias en función de la estructura de los mARNs virales (cuadro 1).

mARNs	eIF4F			PABP	Estrategia	Ejemplos
	eIF4E	eIF4G	eIF4A			
5' Cap ----- poliA 3'	x	√	√	√	NS1 → Reemplaza a eIF4E	Orthomixovirus
5' Cap----- 3'	√	√	√	x	NSP3 → Reemplaza a PABP	reovirus
	x	x	x	x	N → Reemplaza a eIF4E, eIF4A y eIF4G	bunyavirus
5' Cap--IRES----- 3'	√ / x	√	√	x	Traduce de forma cap dependiente o independiente	flavivirus
5' IRES ----- poliA 3'	x	√*	√	√	2Aproteasa → Cliva a eIF4GI (* usa la porción carboxilo terminal)	picornavirus
5' IRES----- 3'	x	x	x	x	Emplean a eIF3 como factor de inicio	Hepacivirus y pestivirus
5'----- poliA 3'	√	x	x	√	VPg → Reemplaza al cap	calcivirus

Cuadro 1. Estrategias empleadas en la traducción de los mARNs virales en función de la estructura de los mismos. Cap= estructura m⁷G. poli-A= extremo 3' poliadenilado. IRES= sitio de entada interno al ribosoma. √, indica la participación del factor. X, indica el no requerimiento del factor. NS1, NSP3, N, 2A proteasa y Vpg, proteínas virales específicas.

2.2 VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT: PARTICIPACIÓN EN LA REPLICACIÓN VIRAL

Como se mencionó anteriormente, la regulación de la fosforilación de 4E-BP cumple un rol clave en el mecanismo de control de la traducción cap-dependiente, siendo esta regulación mediada principalmente por la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR. Virtualmente todos los virus tanto ARN como ADN, deben regular esta cascada de señalización ya sea activando o inactivando algún paso de la misma (Buchkovich y col., 2008).

PI3K es una familia de enzimas celulares heterodiméricas que consisten en una subunidad regulatoria (p85) y una subunidad catalítica (p110). PI3K es activada por la unión del dominio de homología a Src (SH) de la subunidad p85 de receptores con actividad tirosina quinasa autofosforilables, de tirosinas quinasas que no forman parte de receptores o bien por algunas proteínas virales citoplasmáticas (Skolnik y col., 1991; Hiles y col., 1992; Carpenter y col., 1993; Stoyanov y col., 1995; Street y col., 2004). Luego de la activación, la subunidad p110 de PI3K fosforila al sustrato lipídico fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) produciendo fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). Esta molécula actúa como un segundo mensajero lipídico que se une a Akt y a la proteína

quinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos, PDK1, reclutándolas a la membrana plasmática (Figura 10). Akt es un miembro de la familia de quinasas AGC, y como tal, es fosforilada en dos residuos claves localizados en el sitio catalítico (dominio de activación) y en el motivo hidrofóbico carboxilo terminal. La fosforilación del dominio de activación (Thr308) es mediada por la quinasa PDK1, mientras que se propone al complejo mTOR/rictor como responsable de la fosforilación del dominio hidrofóbico (Ser473). Al igual que para muchos otros miembros de esta familia de quinasas, se propone que ambas fosforilaciones serían interdependientes.

Luego de su activación Akt fosforila numerosas proteínas de señalización, las cuales regulan funciones elementales celulares, convirtiéndola en un importante blanco de regulación viral.

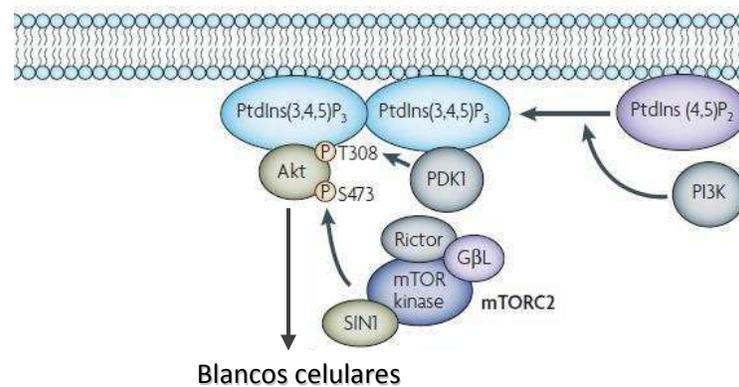


Figura 10. Activación de Akt mediada por PI3K. La activación de PI3K induce la fosforilación de PIP2 promoviendo la formación de PIP3 en la membrana plasmática. Tanto Akt como PDK1 son reclutadas a la membrana mediante la unión de PIP3. Este reclutamiento posiciona a PDK1 de manera que pueda fosforilar a Akt en Thr308. La fosforilación de Akt en Ser473 es mediada por el complejo mTORC2.

2.2.1 PI3K/Akt/mTOR: su participación en la traducción cap-dependiente

Los factores de crecimiento, mitógenos y hormonas activan la vía de señalización de PI3K/Akt. Un efecto importante de la inducción de esta vía, es la activación de la quinasa mTOR en el complejo 1 (mTORC1 o mTOR/raptor) cuya actividad es crucial en el mecanismo de traducción cap-dependiente, como fue expuesto anteriormente.

La señalización entre Akt y mTORC1 involucra al complejo de la esclerosis tuberosa (TSC) constituido por las proteínas TSC1, TSC2 y Rheb-GTP, un miembro de la familia Ras. TSC estimula la actividad GTPasa intrínseca de Rheb, convirtiendo a Rheb-GTP en Rheb-GDP, el cual es incapaz de activar a la quinasa mTOR. TSC es inactivado por la fosforilación de Akt, lo cual permite que los niveles de Rheb-GTP se mantengan elevados desplazando de esta manera al inhibidor de mTORC1, FKBP38 (Figura 11).

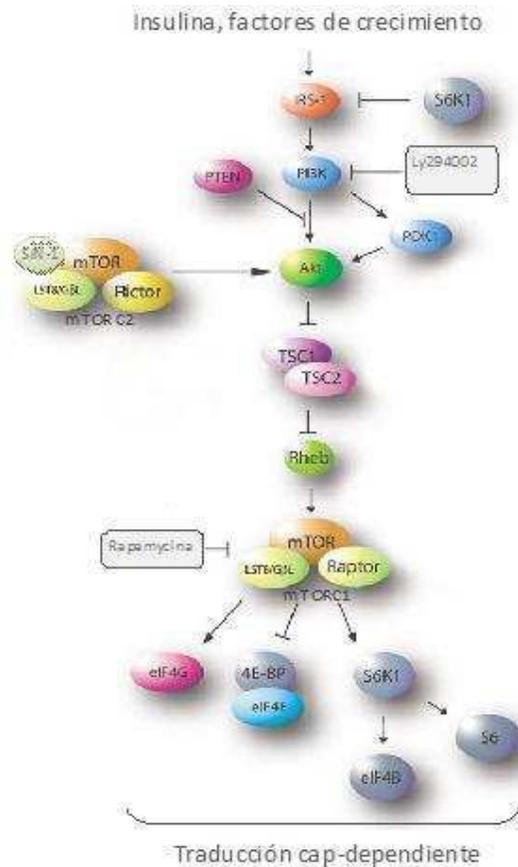


Figura 11. Vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR. La señalización mediada por mTOR regula el inicio de la traducción integrando diferentes señales. Insulina, hormonas y factores de crecimiento activan la cascada de señalización de PI3K/Akt. Akt es activada por PDK1 y por el complejo mTORC2. Akt fosforila a TSC2, desestabilizando al complejo TSC1/2, promoviendo por lo tanto la activación de mTOR mediada por Rheb. El complejo mTORC1 media la fosforilación de 4E-BP1, S6K1 y eIF4G. Una vez activada S6K1, fosforila a la proteína ribosomal S6 y al factor de traducción eIF4B. Wortmanina y Ly294002: inhibidores farmacológicos de PI3K. Rapamicina: inhibidor farmacológico de mTORC1 (Mamane y col., 2006).

La quinasa mTOR se encuentra formando dos complejos con funciones diferentes: el complejo mTORC1 formado por raptor (proteína reguladora asociada de TOR) y GβL (también denominada mLST8), y el complejo mTORC2 constituido por rictor (componente de mTOR insensible a la rapamicina), GβL y SIN1 (Figura 11). En condiciones normales los dos complejos difieren en su sensibilidad a la droga rapamicina: mTORC1 es sensible mientras que mTORC2 es insensible a la misma.

La función del complejo mTORC2 (también denominado complejo mTOR/rictor) está poco caracterizada, pero se sugiere que participaría en la organización del citoesqueleto de actina. Hasta el momento el único sustrato conocido para este complejo es la Ser 473 de Akt (Sarvasov y col., 2006). El rol de esta fosforilación en la actividad de Akt es controversial aunque se propone que sería requerido para el reconocimiento y la fosforilación de Akt por PDK1 en la Thr308. Dado que la fosforilación de Akt en Ser473 se correlaciona con la activación completa de la misma (Alessi y col.,

1996), es de esperarse que los virus que activan a esta quinasa, sean capaces de activar a mTORC2, sin embargo el control de la actividad de este complejo no está caracterizada hasta el momento.

A diferencia de mTORC2, la función del complejo mTORC1 ha sido extensamente estudiada en la regulación de la traducción cap-dependiente. Cuando mTORC1 está activo, promueve la fosforilación y la activación de S6K y la fosforilación de 4E-BPs. La fosforilación de S6K promueve la traducción de proteínas ribosomales e induce la fosforilación del co-factor eIF4B, cuya actividad es fundamental para el complejo eIF4F. La fosforilación de 4E-BP es el mayor punto de control de la traducción cap-dependiente y regula la función del complejo de unión al cap eIF4F. mTORC1 regula la unión de 4E-BP a eIF4E, de modo que en condiciones favorables de crecimiento, la activación de mTORC1 induce la hiperfosforilación de 4E-BP, impidiendo su unión a eIF4E, promoviendo por tanto, la interacción de este último factor con eIF4G para formar el complejo eIF4F activo. Por el contrario, en condiciones desfavorables de crecimiento, por ejemplo durante estrés o frente al tratamiento con rapamicina, mTORC1 está inactivo, 4E-BP se desfosforila uniéndose eficientemente a eIF4E, impidiendo la formación del complejo eIF4F e inhibiendo la traducción.

El control viral de la actividad de mTORC1 y la fosforilación de 4E-BP depende de las necesidades específicas del virus. Como se mencionó anteriormente, los virus que deben mantener la traducción cap-dependiente, por ejemplo los virus con genoma de ADN y algunos virus de ARN, inducen mecanismos que mantienen activa la vía de PI3K/AKT/mTOR o bien emplean otras estrategias que aseguran el mantenimiento del complejo eIF4F activo. Mientras que aquellos virus que poseen IRES en sus mARNs, emplean estrategias tendientes a disminuir la traducción cap-dependiente. Para estos virus la inhibición de mTORC1 o la alteración del complejo eIF4F, resulta una ventaja en su mecanismo de replicación (Buchkovich y col., 2008).

2.2.2 Otras consecuencias de la activación de PI3K/Akt en la infección viral

Un elevado número de proteínas pro-apoptóticas han sido identificadas como blanco de la fosforilación de Akt, incluyendo al miembro de la familia bcl2, BAD, a la caspasa-9 y a la quinasa-3 beta glicógeno sintasa (GSK-3b) (Cooray, 2004). De esta manera la modulación positiva de la vía de señalización de PI3K/Akt ha sido reportada como un mecanismo importante de inhibición de la apoptosis desencadenada en respuesta a la infección viral, influyendo directamente sobre la supervivencia a largo plazo y la transformación celular en cultivos infectados. Muchos virus incluyendo el virus de Epstein Barr (EBV) y el virus de papiloma humano (HPV) tienen la capacidad de establecer infecciones crónicas o latentes. En estos virus se ha reportado que la síntesis de proteínas virales específicas estimula la supervivencia celular mediada por la vía de PI3K/Akt, bloqueando por lo

tanto la apoptosis de las células infectadas. Esta activación contribuiría tanto a la supervivencia viral como a la transformación oncogénica (Cooray y col., 2004). La activación de la vía de PI3K/Akt también ha sido reportada como un evento crucial para el establecimiento de la infección persistente *in vitro* del coronavirus SARS. El bloqueo de estas vía junto con la vía de las JUNK quinasas durante las primeras etapas de la infección impide el establecimiento de la persistencia de este agente en cultivos celulares, mientras que una vez establecida la misma, el mantenimiento de la persistencia no sería afectada significativamente por el bloqueo de estas vías (Mizutani y col., 2005).

La regulación del tráfico vesicular mediada por PI3K también ha sido extensamente estudiada (Siddhanta y col., 1998; Hawkins y col., 2006). PI3K influye sobre una variedad de eventos intracelulares relacionados al tráfico vesicular que incluyen la formación y el movimiento de vesículas, como así también la fusión de membranas. Muchos virus emplean este mecanismo para mejorar su eficiencia de multiplicación, por ejemplo, el virus no envuelto adenovirus, favorece su entrada a los endosomas mediante la unión a su receptor en una manera PI3K dependiente. Por otro lado, el filovirus ébola (EBV) induce la activación de PI3K durante su proceso de entrada, siendo esta activación crítica para el ingreso a la célula hospedadora (Saeed y col., 2008).

2.3 CONTROL TRADUCCIONAL A TRAVÉS DE EIF2 α : RESPUESTA AL ESTRÉS CELULAR

Como se mencionó anteriormente la actividad del factor de inicio de la traducción eIF2 constituye otro de los puntos de control claves en la síntesis de proteínas en células eucariotas (Dever, 2002). eIF2 es un oligómero compuesto por tres subunidades (α , β y γ) que interactúan con una molécula de GTP y con el iniciador Met-tARNi, para constituir el complejo ternario de inicio de la traducción. Este complejo se asocia con la subunidad ribosomal menor para constituir el complejo de pre-iniciación 43S que luego de la unión con el eIF4F-mARN, forma el complejo 48S. La unión de la subunidad ribosomal mayor 60S se produce luego del reconocimiento del codón de inicio AUG con la consecuente liberación de eIF2 producida por la hidrólisis de GTP (Kozac, 1980; Merrick y Hershey, 1996; Pain, 1996; Gingras y col., 1999). El complejo eIF2-GDP es continuamente reciclado en un proceso catalizado por eIF2B (Yang y Hinnebush, 1996; Kimball y col., 1998; Kimball, 1999). Diversas señales de estrés inducen la inactivación transitoria de eIF2, mediante la fosforilación de la subunidad α en la Ser51, llevada a cabo por quinasas específicas. eIF2-GDP fosforilado se une de manera irreversible a eIF2B, impidiendo la regeneración del complejo eIF2-GTP activo, lo cual resulta en la inhibición general de la síntesis proteica (Sudhakar y col., 2000).

2.3.1 Quinasas de eIF2 α : sensores de estrés celular

La respuesta integrada al estrés comprende una serie de cambios en el metabolismo celular tendientes a permitirle a la célula reparar el daño generado durante el estrés, asegurando así su supervivencia en condiciones adversas. Condiciones nocivas tales como, temperatura excesiva, oxidación, radiación ultravioleta (UV) e incluso infecciones virales, inducen un bloqueo en la síntesis de proteínas mediante una respuesta estereotípica tendiente a conservar la energía anabólica a fin de reparar el daño molecular generado por el estrés (Anderson y Kedersha, 2008). En células eucariotas existen cuatro quinasas de eIF2 α que colectivamente monitorean diferentes tipos de estrés celular y regulan el inicio de la traducción mediante la fosforilación de eIF2 α , éstas incluyen: la quinasa regulada por la deficiencia de hemo (HRI), la quinasa regulada por el estrés de retículo endoplasmático (PERK), la quinasa regulada por la deficiencia de aminoácidos (GCN2) y la quinasa regulada por ARN doble cadena (ARNdc) (PKR) (Figura 12).

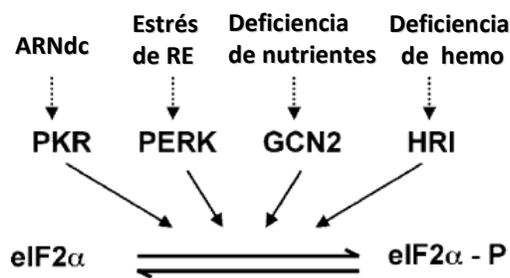


Figura 12. Activación de quinasas de eIF2 α por diferentes estímulos. Las cuatro quinasas de eIF2 α conocidas hasta el momento se caracterizan por presentar un dominio quinasa unido a un dominio de unión al ligando, que permanecen catalíticamente inactivas hasta que interactúan con sus respectivos ligandos activadores. La acumulación de ARNdc activa a PKR, mientras que niveles reducidos del grupo hemo activan a HRI, la privación de nutrientes o la radiación UV inducen a GCN2 y la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE activan a PERK (Mohr, 2005).

PERK está involucrada en la respuesta a estrés inducida por la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático (Harding y col., 2000a; Harding y col., 2000b). GCN2 es la quinasa encargada de monitorear el nivel de aminoácidos en la célula, activándose frente a bajos niveles de los mismos (Wek y col., 1995). HRI regula la síntesis balanceada de las cadenas de globina y del grupo hemo, durante la maduración de los eritrocitos (McEwen y col., 2005). Finalmente PKR es una quinasa dependiente de ARNdc, activada principalmente durante algunas infecciones virales (Clemens y Elia, 1997; Srivastava y col., 1998). PKR está implicada en la defensa antiviral de la célula, ya que se une y es activada por ARN doble cadena, una molécula que usualmente es generada durante la replicación y transcripción de los virus con genoma de ARN. La actividad de PKR se encuentra estrechamente relacionada con el efecto antiviral del interferón (IFN): la expresión de PKR es inducida por IFN tipo I (Stark y col., 1998; Yang y col., 1995; Balachandran y col., 2000; Stojdl y col.,

2000). La importancia de PKR en la defensa antiviral también está apoyada por el hecho que la mayoría de los virus animales han desarrollado estrategias tendientes a inhibir la activación de esta quinasa en células infectadas (Kaufman, 1999).

2.3.2 Gránulos de estrés: su relación con la inhibición del inicio de la traducción

El arresto traduccional repentino inducido por la fosforilación de eIF2 α cuando las células son sometidas a distintos tipos de estrés conduce a un rápido desensamblaje de los polisomas. Este evento causa que muchas proteínas involucradas en el procesamiento normal de los mARNs asuman funciones de “emergencia”, activando un proceso molecular en el cual los mARNs de los polisomas desensamblados son almacenados y clasificados para definir su destino final. La consecuencia morfológica de este proceso molecular es la formación de gránulos citoplasmáticos de composición ribonucleoproteica denominados gránulos de estrés (SGs, del inglés: stress granules) (Figura 13) (Anderson y Kedersha, 2002; 2006). El requerimiento de fosfo-eIF2 α puede ser reemplazado usando drogas que también inhiben el inicio de la traducción por otros mecanismos, por ej. la inhibición de eIF4A mediante la droga hippuristanol induce la formación de SGs (Bordeleau y col., 2005; Mazroui y col., 2006).

Los principales componentes de los SGs consisten en complejos de iniciación detenidos, aún unidos a sus mARNs. Dentro de esta clase se incluye el complejo eIF4F (eIF4E, eIF4A, eIF4G), eIF4B, la subunidad ribosomal menor y PABP-1 (Anderson y Kedersha, 2002; Kedersha y col., 2002), constituyendo los marcadores universales de los mismos. Una segunda clase de componentes incluye proteínas de unión al ARN, relacionadas con funciones de silenciamiento traduccional y estabilización de los mARNs, los cuales son fidedignos marcadores, pero no son universales a todos los SGs. Dentro de estos se encuentran TIA-1 (antígeno 1 interno de las células T), TIAR (proteína relacionada con TIA-1) (Kedersha y col., 1999) y la helicasa RCK (también llamada p54) (Wilczynska, 2005). Una tercera clase de componentes incluye proteínas de unión al ARN que regulan el metabolismo del ARN más que su traducción o degradación, entre las cuales se incluyen, FAST (Kedersha y col., 2005) y G3BP (Tourriere y col., 2003).

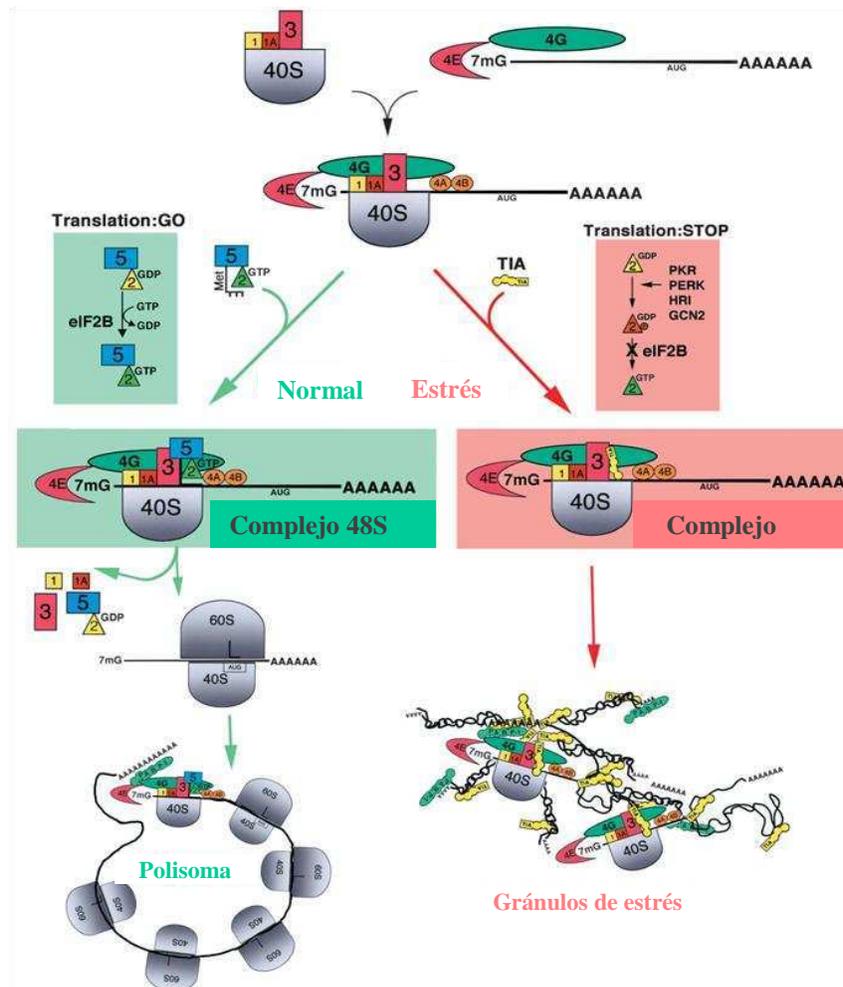


Figura 13. Inicio traduccional en presencia o ausencia de estrés. En ausencia de estrés, eIF2B promueve la formación del complejo ternario mediante el intercambio de GDP por GTP. Cuando el complejo ternario está disponible, el complejo canónico de pre-inicio 48S se une al extremo 5' de los transcritos con cap, con la consecuente búsqueda del codón de inicio, seguida de la liberación de los factores y la unión de la subunidad ribosomal 60. Ribosomas adicionales se unen al transcrito constituyendo un polisoma. (Panel verde) En células estresadas la fosforilación de eIF2 α mediada por las quinasas específicas, convierte a eIF2 en un análogo competitivo de eIF2B, reduciendo la formación del complejo ternario. En estas condiciones TIA-1 es incluida en un complejo de pre-inicio no canónico 48S* deficiente de eIF2, que es traduccionalmente inactivo. La auto-agregación de TIA-1 promueve posteriormente la acumulación de estos complejos en discretos foci citoplasmáticos, denominados gránulos de estrés (Panel rosa) (Anderson y Kedersha, 2002).

2.3.2.1 SGs y la infección viral

La manipulación del ensamblaje de los SGs, como parte de la reprogramación de la maquinaria traduccional, ha sido documentada en numerosas infecciones virales. Durante la infección con los flavivirus West Nile (WNV) y dengue (DENV), se ha reportado la inhibición del ensamblaje de los SGs mediante el secuestro de TIAR hacia los sitios de replicación viral (Li y col., 2002, Emará y Brinton, 2007). Contrariamente, la infección con poliovirus promueve el ensamblaje transitorio de SGs, seguido de un rápido desensamblaje inducido por el clivaje de G3BP mediante la proteasa viral 3C (White y col., 2007). El ensamblaje/desensamblaje de SGs también ha sido

reportado en la infección con SFV. En fibroblastos de embrión de ratón (MEFs) mutados para TIA-1, se observó una disminución en la formación de SGs inducidos en las etapas tempranas de la infección con SFV, acompañado por la ausencia del shut-off en la traducción de las proteínas celulares frecuentemente observado en infecciones con este virus (McInerney y col., 2005). Por otro lado, la infección de MEFs mutados para TIA-1, mostró un aumento de la replicación viral en un rango de diferentes virus incluyendo VSV (virus ARN de cadena negativa), Sindbis (virus ARN de cadena positiva) y HSV (virus de ADN) (Li y col., 2002). Dado que los SGs requieren un pool de mARNs no traducidos para su ensamblaje, aquellos virus que induzcan la degradación de los mARNs de la célula huésped, podrían inhibir el ensamblaje de estos gránulos, debido a una reducción en la cantidad de los mARNs citoplasmáticos (Beckman y Parker, 2008).

Los resultados mencionados sugieren que los SGs y/o sus componentes, pueden funcionar primariamente en la modulación de las infecciones virales. Una posibilidad es que la formación de los SGs forme parte de la respuesta de la célula para restringir la traducción mediante el secuestro de factores de traducción limitantes, reduciendo por tanto la replicación viral. Alternativamente, los componentes de los SGs tales como TIA-1 y G3BP podrían limitar las infecciones virales, simplemente reprimiendo la función de transcriptos celulares o virales específicos, fundamentales para la replicación de estos agentes (Beckman y Parker, 2008).

2.3.3 Cuerpos de procesamiento: similitudes y diferencias con los SGs

Los SGs están cercanamente relacionados con una segunda clase de gránulos de ARN conocidos como cuerpos de procesamiento (PBs, del inglés: processing bodies) (Parker y Sheth, 2007; Eulalio y col., 2007). En condiciones normales los PBs actúan como sitios de regulación y degradación de mARNs. La remoción de la estructura cap llevada a cabo por las enzimas de deccapping DCP1/DCP2 generan mARNs susceptibles a la degradación 5'-3' por la exonucleasa XRN1. Estas proteínas junto con otros péptidos celulares se encuentran localizadas en foci citoplasmáticos discretos constituyendo los PBs.

Tanto los SGs como los PBs son simultáneamente ensamblados en células sometidas a estrés (Wilczynska, 2005; Kedersha y col., 2005), ambos requieren la presencia de mARNs no traducidos derivados de polisomas desensamblados y ambos contienen un sub-conjunto de proteínas compartidas tales como FAST, XRN1, eIF4E y TTP. Sin embargo estas estructuras citoplasmáticas de silenciamiento presentan importantes diferencias, entre sí: i) sólo los PBs se observan constitutivamente en células no estresadas en crecimiento activo; ii) el ensamblaje de SGs, pero no de PBs, usualmente requiere la fosforilación de eIF2 α ; iii) los SGs están definidos por la presencia de factores de inicio de la traducción que forman el complejo no canónico de iniciación 48S (por ej. eIF3,

eIF4A, eIF4G, PABP-1 y la subunidad ribosomal menor), mientras que los PBs están definidos por componentes de la maquinaria de degradación de los mARNs tales como DCP1a, DCP2, Hedls (human enhancer of deccapping), entre otros (Kerdersha y col., 2005).

Por otro los PBs están transitoria e intermitentemente en contacto con los SGs, posibilitando la transferencia de mRNPs específicas (Figura 14) (Kerdersha y col., 2005).

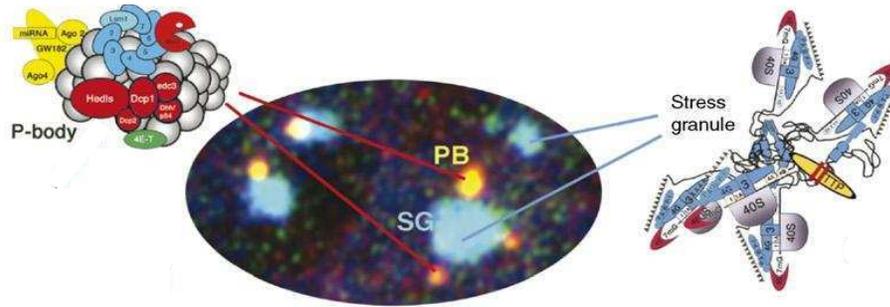


Figura 14. Interacción dinámica entre los granulos de estrés y los cuerpos de procesamiento. En azul SGs, en amarillo PBs, marcados mediante la proteína TTP.

Numerosos estudios indican que los PBs y/o sus componentes podrían influenciar el ciclo de multiplicación de diversos virus. Uno de los modelos propuestos sugiere que los P-bodies, podrían actuar como sitios de almacenamiento de transcritos virales tradicionalmente reprimidos favoreciendo el empaquetamiento eficiente de los mismos o bien la formación de complejos de replicación virales. De esta manera, la capacidad de los PBs de concentrar a los mARNs en una simple localización subcelular, podría ser particularmente importante en la coordinación del empaquetamiento de virus multi-segmentados de ARN, tales como el virus mosaico de la cebada (*Brome mosaic virus*) (BMV). Para este virus se sugiere que la acumulación de los ARNs genómicos junto con los factores virales de replicación en PBs favorecería la formación de complejos de replicación y su asociación con membranas celulares, en las cuales se produce el ensamblaje de estos complejos (Beckman y Parker, 2007). Por otro lado, se ha reportado la presencia de la nucleoproteína de hantavirus en PBs. Para este virus se demostró que la localización de esta proteína viral en PBs sería fundamental para el mecanismo de robo de cap. En este modelo la nucleoproteína viral promovería la protección y el secuestro las estructuras cap que son generadas durante la degradación de los mARNs celulares, empleándolas posteriormente para promover la síntesis de los mARNs virales (Mir y col., 2008).

El objetivo general del presente trabajo de tesis doctoral se centró en el estudio de la estrategia de traducción de proteínas empleada por el virus Junín (JUNV) durante la infección aguda y persistente *in vitro*.

Con este propósito se investigó el mecanismo de reprogramación traduccional utilizado por JUNV para favorecer la traducción de sus proteínas. El análisis se enfocó en el inicio de la traducción evaluándose los dos puntos principales de control de este proceso: la modulación de la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR, principal reguladora del mecanismo de traducción cap-dependiente y la manipulación de la respuesta al estrés celular mediada por eIF2 α , principal reguladora del mecanismo global de traducción.

El estudio de la cascada de señalización de PI3K/Akt/mTOR durante la infección con JUNV tuvo como objetivo específico el análisis de la regulación del factor de unión al cap, eIF4E, en la traducción de los mARNs virales. Por otro lado, la caracterización de la respuesta al estrés celular incluyó el análisis de la modulación de la fosforilación de eIF2 α y su relación con el bloqueo traduccional y con la formación de gránulos de estrés (SGs). Asimismo, asociado a este último objetivo se evaluó la relevancia en la traducción de las proteínas virales de los factores celulares de inicio de la traducción que son secuestrados en los SGs durante la respuesta al estrés celular. La integración de estos procesos permitió evaluar el requerimiento de los factores de inicio de la traducción eIF4G y eIF4A, generando un panorama más amplio acerca de la participación del complejo eIF4F.

Los resultados obtenidos constituyen un aporte importante a la caracterización de las estrategias empleadas por JUNV para lograr una replicación eficiente y demuestran una modulación precisa del mecanismo de traducción celular por parte de este agente.

1. Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares BHK-21 (riñón de hámster neonato, ATCC, CRL8544), la línea celular continua Vero (riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*, ATCC CCL 81) y la línea celular A549 (carcinoma de hígado humano, ATCC CCL 185). La línea celular BHK-21 fue crecida en medio de cultivo DMEM (medio mínimo esencial modificado por Dulbecco, Gibco) con 50 µg/ml de gentamicina suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado (56°C durante 30 minutos) y buffer HEPES 20 µM. Las líneas celulares A549 y Vero fueron crecidas en medio de cultivo MEM (medio mínimo esencial, Gibco) con 5% y 10% de SFB inactivado, respectivamente, suplementado con gentamicina y buffer HEPES. Las células fueron repicadas cada siete días mediante tripsinización con 0,05% tripsina pancreática (Invitrogen). El mantenimiento se realizó en DMEM o MEM, según la línea celular empleada, suplementado con 1,5% SFB (v/v) y antibiótico. Los cultivos se crecieron y mantuvieron a 37°C en estufa con 4% de CO₂.

2. Virus

Se utilizó la cepa XJCI3 de virus Junín (JUNV), atenuada para cobayo, derivada de la cepa prototipo XJ (de Guerrero et al., 1969, Rugiero et al., 1969). También se emplearon los virus: herpes simplex tipo 1 (HSV-1) cepa F; virus de la estomatitis vesicular (VSV), cepa Indiana y poliovirus tipo III cepa Sabín, como controles no relacionados.

El stock de trabajo de JUNV se preparó infectando células Vero con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 ufp/cél, utilizando como fuente de virus el sobrenadante del cultivo cosechado al 3er y 4to día post infección (p.i.). Los stocks tuvieron títulos que fluctuaron entre de 10⁶ y 10⁷ ufp/ml. Los stocks de trabajo de HSV-1, VSV y poliovirus se prepararon en células Vero infectadas a una MOI de 0,1 ufp/cél.. El sobrenadante del cultivo se cosechó a las 24 hs p.i.. Fueron empleados los stocks que tuvieron títulos de 10⁷ -10⁸ ufp/ml.

Todos los stocks se clarificaron por centrifugación durante 15 min a 10000 x g, luego de lo cual el sobrenadante fue alicuotado y guardado a -70°C hasta su utilización.

2.a Inactivación de virus con luz ultravioleta (UV)

La inactivación de JUNV fue realizada mediante la exposición de una dilución 1/10 de JUNV en PBS a luz ultravioleta de 30W durante 3 min a una distancia de 10 cm. La inactivación completa del virus fue corroborada por ensayos de rendimiento viral e de IFI, en los cuales se detectó una ausencia de producción de progenie viral, como así también la ausencia completa de expresión de antígenos virales

3. Drogas

Los compuestos empleados en este trabajo se detallan en la siguiente tabla, indicándose el rango de concentraciones empleadas y su blanco celular:

Tabla II. Principales compuestos usados con sus blancos celulares de acción

Compuesto (rango de concentración usado)	Blanco celular	Marca
Ly294002 (1-50 μM)	Inhibidor específico de PI3K	GE
Cafeína (1-10 mM)	*Inhibidor PI3K	Sigma
Rapamicina (1-1000 nM)	Inhibidor específico mTOR/raptor (mTORC1)	Sigma
Thapsigargina (0,5-5 μM)	- Inhibidor de la bomba Ca^{+2} -Activador de la quinasa de retículo endoplasmático (PERK). Inductor de stress de RE	GE
Hippuristanol (0,5-5 μM)	Inhibidor de la actividad helicasa de eIF4A.	Dr. Pelletier
Arsenito de sodio (100-500 μM)	Activador de la quinasa regulada por el grupo hemo (HRI). Inductor de estrés oxidativo.	Sigma
Dithiotreitol (DTT) (0,5-2 mM)	Activador de la quinasa de retículo endoplasmático (PERK). Inductor de stress de RE.	Invitrogen
Insulina humana (100-300 μM)	Activador de PI3K.	Pharma
Transferrina (20 μg/ml)	Activador de PI3K.	Invitrogen
Clorpromazina (40 μM)	Inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina	Sigma
Cicloheximida (250 μM)	Inhibidor de la traducción: estabilizador de polisomas	Sigma
Puromicina (250 μM)	Inhibidor de la traducción: desestabilizador de polisomas	Sigma

Los tratamientos con los inhibidores farmacológicos de las vías de señalización Ly294002, rapamicina y cafeína fueron realizados en células mantenidas durante 24 hs en medio sin suero (medio de ayuno). Los compuestos fueron agregados según se indica en cada ensayo, en medio de ayuno a 37°C en estufa de CO₂.

Los tratamientos con los activadores de las vías de señalización Insulina y transferrina fueron realizados en células mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno. Los compuestos fueron agregados según se indica en cada ensayo, en medio de ayuno a 37°C en estufa de CO₂.

Los tratamientos con los inductores de estrés thapsigargina, DTT, arsenito e hippuristanol fueron realizados durante 1 h a 37°C (o el tiempo específico indicado en el experimento) en medio

MEM 1,5/ SFB. Luego del tratamiento las células fueron procesadas para inmunofluorescencia indirecta (IFI) o western blot (WB).

Los tratamientos con clorpromazina fueron realizados en células mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno. El compuesto fue agregado 2 hs antes de la estimulación con insulina o de la infección con JUNV en medio de ayuno y fue mantenido durante todo el ensayo.

Los tratamientos con los inhibidores de la traducción cicloheximida y puromicina fueron realizados durante 6 hs en MEM 1,5/ SFB.

4. Establecimiento de cultivos persistentemente infectados con JUNV

La línea de células Vero persistentemente infectada con JUNV (denominada V3) fue obtenida por infección de células Vero con la cepa XJCI3 de JUNV a una MOI de 1 ufp/cél.. Después de la infección las células fueron mantenidas en MEM 1,5/ hasta el final de la fase aguda de infección (alrededor de los 25-30 días p.i.). El cultivo fue caracterizado de acuerdo a la expresión de las proteínas virales N y G1, capacidad fusogénica (G2), producción de virus infeccioso y resistencia a la sobreinfección. Los cultivos persistentes iniciados en presencia de Ly294002 fueron realizados en el mismo ensayo de obtención de la línea V3, el compuesto fue agregado a una concentración 10 µM en MEM 0,5/ de SFB y mantenido durante 7 días, realizando un cambio del medio cada tres días. Transcurrido el tratamiento el compuesto fue retirado y reemplazado por MEM 1,5/. Los tratamientos fueron realizados durante el primer mes, y caracterizados cada 7 días durante este primer mes y luego a los 60 y 120 días p.i..

Los estudios efectuados en estas células se realizaron entre los días 7 y 400 p.i..

El crecimiento y mantenimiento de la línea V3, y de las líneas persistentes obtenidas en presencia de Ly294002, fue similar al mencionado en el ítem 1 para células Vero.

5. Ensayo de viabilidad celular (técnica del MTT)

Para evaluar el crecimiento de los cultivos celulares, se utilizó el ensayo colorimétrico o técnica del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio). Este compuesto es procesado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa formando cristales de formazán (producto coloreado), siendo la cantidad de los mismos proporcional al número de células metabólicamente activas presentes en el cultivo. Las monocapas de células correspondientes a los ensayos respectivos fueron crecidas en microplacas de 96 cavidades. Luego del tratamiento adecuado, se agregaron 10 µl de una solución de MTT (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, USA) en cada cavidad y se incubó a 37°C durante 2 h. Transcurrido este período, se descartaron los sobrenadantes y los cristales de formazán fueron disueltos en 200 µl de etanol por cavidad. Se determinó la densidad

óptica, utilizando un lector de ELISA a una longitud de onda de muestra de 492 nm y una longitud de onda de referencia de 690 nm.

6. Cuantificación de virus

6.a Ensayo de infectividad viral

La cuantificación de la infectividad viral se llevó a cabo mediante la técnica de unidades formadoras de placas (ufp). Para ello, se infectaron monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades con 0.1 ml de diluciones seriadas decimales del virus, dejando adsorber el inóculo por 1 h a 37°C. Al cabo de ese tiempo, se descartó dicho inóculo y las células se cubrieron con medio de cultivo semisólido formado por una mezcla en partes iguales de metilcelulosa 1,4/ y MEM 2x (doble concentrado). Luego de 7 días de incubación a 37°C, para JUNV y de 48 hs para HSV-1, VSV y poliovirus, las células se fijaron con formol 10/ durante 1 h y se tiñeron con cristal violeta 1/ en etanol 10/ .

El título fue calculado como:

$$\text{Título (ufp/ml)} = \frac{\text{Promedio del N° de placas}}{\text{Volumen del inóculo x dilución}}$$

6.b. Ensayo de adsorción/penetración

Monocapas de células Vero mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno fueron pre-tratadas con 10 µM de Ly294002 durante 45 min y posteriormente infectadas JUNV a una MOI de 10 ufp/cél. en ausencia o presencia de droga. El inóculo se dejó adsorber por distintos tiempos a 37°C, al cabo de los cuales el inóculo fue removido y las monocapas fueron tratadas con buffer citrato para remover el virus adsorbido no penetrado. Finalmente, luego de 2 lavados con PBS, se agregó 200 µl de del este buffer y las células se rompieron por 3 ciclos de congelado/descongelado. Los restos celulares se separaron por centrifugación (10 min a 3000 x g) cuantificándose virus infeccioso en el sobrenadante por la técnica de UFP.

6.c Ensayo de internalización por plaqueo directo

Células Vero mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno fueron pre-tratadas o no con 10 µM de Ly294002 durante 45 min y posteriormente infectadas a 4°C con 200 ufp de JUNV en presencia o ausencia de compuesto. Luego de 1 h de adsorción las células fueron incubadas por períodos variables de tiempo a 37 ° C con medio de ayuno (en presencia o ausencia de compuesto). Al tiempo

indicado el medio fue retirado, las monocapas fueron lavadas 2 veces con PBS frío y 1 vez con buffer citrato para remover el virus adsorbido no penetrado. Finalmente las células se cubrieron con medio de cultivo semisólido y las placas fueron reveladas luego de 7 días de incubación a 37°C.

7. Internalización de transferrina

Los ensayos de incorporación de transferrina fueron realizados empleando transferrina humana conjugada a TRITC (Invitrogen). Células Vero y V3 mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno fueron pre-tratadas o no con 10 µM de Ly294002 durante 45 min y posteriormente incubadas por distintos tiempos a 37°C con transferrina-TRITC (20 µg/ml) en presencia o ausencia del inhibidor. Terminada la incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS se fijaron con metanol por 10 min a -20°C. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con PBS y se montaron en glicerina tamponada conteniendo 2,5% de DABCO.

8. Ensayo de Western blot (WB)

Células crecidas en microplacas de 24 cavidades fueron lavadas con PBS y lisadas con buffer de siembra para PAGE (Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, SDS 5%, glicerol 10%, β-Me-OH 2% / , azul de bromofenol 0,005% /) a los tiempos indicados en cada ensayo. Las proteínas celulares se resolvieron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida 10% (PAGE-SDS) (Tris-ClH 0,2M pH 8,8 con SDS 0,1% / , utilizando como agentes catalizadores el TEMED y persulfato de amonio). La electroforesis se realizó a 110 V en buffer de corrida (Tris-ClH 0,025M pH 8,3, glicina 0,192M y SDS 0,1% /). La transferencia de proteínas fue realizada a una membrana de PVDF (Hybond P, Amersham Pharmacia), utilizando un sistema de electrotransferencia en seco (LKB Electrophoretic transfer 2117 250 Bromma) durante 1 h 30 min a 0,8 mA/cm² de membrana, previamente activada con metanol y equilibrada con buffer de transferencia (buffer de corrida sin SDS, metanol 20% /). Para detectar la proteína eIF4GI (aprox. 200 KDa) se realizó una transferencia líquida durante 12 hs a 4°C.

Luego de la transferencia las membranas fueron bloqueadas y procesadas según el protocolo correspondiente A, B o C (cuadro II). La lista de proteínas determinadas con cada protocolo se detalla a continuación:

Protocolo A:

- Monoclonal ratón anti-**N**: 1/600 (NA05AG12) (Sanchez y col., 1989).

Protocolo B:

- Policlonal conejo anti-**p-Akt (Ser473)**: 1/1000 (Cell Signalling).
- Policlonal conejo anti-**Akt total**: 1/1000 (Cell Signalling).

- Monoclonal ratón anti-**Actina**: 1/1000 (Cell Signalling).
- Policlonal conejo anti-**eIF4G1**: 1/1000 (Aldabe y col., 1995)
- Policlonal conejo anti-**eIF2 α total**: 1/1000 (Santa Cruz, Biotechnology).
- Monoclonal ratón anti-**eIF4A**: 1/500 (Lab. Dr. H. Trachsel, Institute for Biochemistry and Molecular Biology, University of Berne, Holanda).
- Monoclonal ratón anti-**proteína ribosomal eucariota P**: 1/10 (Lab. Dr J. P. García-Ballesta, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Madrid, España).
- Policlonal conejo anti-**p97**: 1/1000 (Lab. Dr. T. Preiss, Molecular Genetics Program, Victor Chang Cardiac Research Institute, Sydney, Australia).

Protocolo C:

- Policlonal conejo anti-**p-eIF2 α** (Ser 211) 1/1000 (Cell Signalling)
- Monoclonal ratón anti-**GPC**: 1/600 (GB03-BE08) (Sanchez y col., 1989)

Cuadro II. Protocolos empleados para WB

Protocolo	A	B	C
Solución Bloqueo (SB)	• Leche descremada 5/ en PBS	• BSA 4/ en TBS 0.1 / Tween (TBS-T)	• Leche descremada 5/ en TBS-T
Tiempo de incubación	• Overnight a 4°C	• 1 h a 37°C	• Overnight a 4°C
Lavados (3 lavados 5 min c/u)	PBS	TBS-T	TBS-T
1° anticuerpo	• Dilución en PBS	• Dilución SB	• Dilución en BSA 4/ en TBS-T
Tiempo de incubación	• 1 h a 37°C	• Overnigth a 4°C	• 1 h a 37°C
Lavados (3 lavados 5 min c/u)	PBS 0,1/ Tween (PBS-T)	TBS-T	TBS-T
2° anticuerpo	• Dilución en SB • Burro anti-ratón 1/5000 (Sigma)	• Dilución en SB • Burro anti-conejo 1/1000 (Amersham) o goat anti-ratón 1/5000 (Sigma)	• Dilución en SB • Burro anti-conejo 1/1000 (Promega)
Tiempo de incubación	• 1 h a 37°C	• 1 h a 37°C	• 1 h a 37°C

Luego de la incubación con el respectivo anticuerpo 2° se realizaron 3 lavados con agitación de 5 min c/u con PBS-T o TBS-T según protocolo. Finalmente, el revelado se llevó a cabo mediante la técnica de quimioluminiscencia, utilizando los reactivos ECLTM (Enhanced chemiluminescence) (Amersham-Pharmacia, USA), por impresión en película radiográfica (Kodak).

En los casos correspondientes la cuantificación de bandas fue realizada mediante el empleo del software *Scion Image*, y expresada en unidades arbitrarias como el cociente de la medición de la banda de interés con su respectivo control de carga.

9. Técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

9.a. Determinación de antígenos virales

Para la determinación N y GPC las células fueron crecidas sobre cubreobjetos, infectadas con JUNV y luego del correspondiente tratamiento, se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con metanol a -20° C, durante 10 min. Luego del período de fijación, se retiró el metanol y se dejó secar al aire.

El ensayo de IFI se realizó según el protocolo indicado en el cuadro III.

Cuadro III. Protocolo de IFI para la determinación de antígenos virales

Protocolo	Marcadores virales
Bloqueo	NO
1° Anticuerpo	<ul style="list-style-type: none"> • Diluciones en PBS • Ratón anti-N: 1/300 (SA05AG12) • Ratón anti-GPC: 1/300 (GB03BE08)
Tiempo de incubación	<ul style="list-style-type: none"> • 1 h a 37°C
Lavados (3 lavados 5 min c/u con agitación)	PBS
2° anticuerpo	<ul style="list-style-type: none"> • Diluciones en PBS • Cabra anti-ratón FIT-C: 1/100 (Sigma)
Tiempo de incubación:	<ul style="list-style-type: none"> • 1 h a 37°C
Lavados (3 lavados 5 min c/u con agitación)	PBS
Montaje	glicerina tamponada y DABCO 2.5/ (Sigma, Aldrich)

La expresión de antígenos virales fue cuantificada utilizando el programa Image Pro-plus, a partir de 20-30 campos escogidos al azar (aumento 400x) con similar número de células. El / de expresión fue calculado como la media de tres o más ensayos independientes donde el error corresponde al SD.

9.b. Determinación de marcadores celulares

Para la determinación marcadores de SGs (TIA-1, eIF4E, PABP-1), PBs (Hedls, Rck/p54) y factores de traducción las células fueron crecidas sobre cubreobjetos y luego del correspondiente tratamiento, se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4 / en PBS a 37°C

durante 15 min Previos 3 lavados con PBS en agitación durante 5 min, las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0,2% en PBS durante 10 min a 37°C.

El ensayo de IFI se realizó según el protocolo indicado en el cuadro IV.

Cuadro IV: Protocolo de IFI para la determinación de marcadores de SGs y PBs

Protocolo	Marcadores de SGs y PBs- Ensayo de doble marca
Bloqueo	<ul style="list-style-type: none"> • BSA 3% en TBS 0,3% Tritón (SB)
Tiempo de incubación	<ul style="list-style-type: none"> • 1h a 37°C
1° Anticuerpo	<ul style="list-style-type: none"> • Diluciones en SB: • Cabra anti- TIA-1: 1/300 (Santa Cruz Biotechnology) • Ratón anti- PABP-1:1/300 (Santa Cruz Biotechnology) • Conejo anti- Hedls: 1/600 (Sigma Aldrich) • Conejo anti-eIF4E: 1/50 • Conejo anti-eIF4GI: 1/100 • Ratón anti-eIF4A: 1/50 • Ratón anti-proteína ribosomal P: 1/10 • Conejo anti-p97: 1/50 • Conejo anti-Rck/p54: 1/300 (Bioscience)
Tiempo de incubación	<ul style="list-style-type: none"> • 1 h a 37°C
Lavados (3 lavados 5 min c/u con agitación)	TBS 0,1% Tween (TBS-T)
2° anticuerpo	<ul style="list-style-type: none"> • Diluciones en SB <p><u>Marca simple:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Burro anti-cabra Cy3: 1/200 (Invitrogen) (TIA-1) • Burro anti-ratón Alexa 448: 1/300 (Invitrogen) (N, GPC, ribosomas) • Burro anti-conejo Alexa 555: 1/300 (Invitrogen)(eIF4GI y p97) • Cabra anti-conejo TRIT-C: 1/100 (Sigma) (Hedls) <p><u>Marca doble:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Burro anti-cabra Cy3 (TIA-1) + Burro anti-ratón Alexa 448 (antígenos virales N) • Burro anti-conejo Alexa 555 (p97, eIF4GI) + burro anti-ratón Alexa 488 (antígenos virales N o GPC) • Burro anti-conejo Alexa 555 (p97, eIF4GI) + burro anti-ratón Alexa 488 (ribosoma)
Tiempo de incubación:	<ul style="list-style-type: none"> • 1 h a 37°C
Lavados (3 lavados 5 min c/u con agitación)	TBS-T
Montaje	Mobiol

En el caso de las muestras procesadas para microscopía confocal los núcleos fueron marcados con To-Pro 3 (Invitrogen) agregado junto con los anticuerpos secundarios en una dilución 1/500.

La cuantificación de los SGs fue realizada en forma manual tomando como tamaño de muestra entre 150-300 células elegidas al azar, se consideraron como células positivas las que

presentaron un número de SGs > 2. Los resultados son expresados como / de células con SGs a partir del total de células contadas. En los experimentos de marca doble se cuantificó el / de células con SGs positivas y negativas para la expresión de N.

La co-localización entre dos antígenos fue expresada mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Los valores de este coeficiente varían entre -1 y 1, donde valores comprendidos entre 0.5-1 indican co-localización y valores comprendidos entre -1 y 0.5 indican ausencia de co-localización (Zinchuk V y Zinchuk O, 2008). Este coeficiente fue calculado mediante el programa MacBiophotonics Image J.

9.c Determinación de marcadores de citoesqueleto

Para la determinación de proteínas de citoesqueleto las células fueron crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades y procesadas al tiempo indicado según el experimento. Los cultivos fueron lavados 3 veces con PBS para su posterior fijado con paraformaldehído 4/ en PBS por 10 min a Tº ambiente, seguido de 3 lavados con PBS y posterior incubación de 10 min con NH₄Cl a Tº ambiente. Finalmente, las células se permeabilizaron con Triton X-100 1/ por 10 min a Tº ambiente seguido por 3 lavados con PBS.

El ensayo de IFI se realizó según el protocolo mencionado en el cuadro V.

Cuadro V. Protocolo para la determinación de marcadores de citoesqueleto

protocolo	Actina
1º Anticuerpo	NO
Tiempo de incubación	
Lavados (3 lavados 5 min c/u con agitación)	NO
2º anticuerpo	<ul style="list-style-type: none"> Solución de Phalloidina-FITC: 1/20 (Sigma)
Tiempo de incubación:	<ul style="list-style-type: none"> 1 h a 37°C
Lavados (3 lavados 5 min c/u con agitación)	PBS
Montaje	(Sigma, Aldrich)

10. Ensayo de inmunoprecipitación

Monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 6 cavidades fueron no infectadas o infectadas con JUNV (moi de 1 ufp/cél.). Finalizada la hora de adsorción se incubó con MEM 1,5/ SFB. A los 48 h p.i. las células se lavaron con PBS y se lisaron con 75 µl buffer RIPA (NaCl 0,15M, SDS

0,1% , Triton X-100 1%, PMSF 0,1mM, Aprotinina 10 µg/ml, deoxicolato de Na 1%, Tris-HCl 0,01M pH 7,4). Las muestras fueron sometidas a ciclos de congelado/descongelado y sonicadas. Posteriormente, las mismas se centrifugaron a 10000 r.p.m. por 10 min. Al sobrenadante obtenido luego de la centrifugación se adicionó 1/100 del anticuerpo anti-N, anti-eIF4E o anti-eIF4G, incubándose esta solución durante 30 min a 37°C y luego 90 min a 4°C. Como medio de arrastre de los complejos inmunes se agregó 100 µl de proteína A-sefarosa (100 mg/ml) (GE Technology) y se incubó durante otros 30 min a 37°C, seguido de 90 min a 4°C. Luego de esta incubación las muestras fueron centrifugadas a 10000 r.p.m., el sobrenadante correspondiente fue guardado como fracción no inmunoprecipitada (resuspendida en buffer PAGE) y el inmunoprecipitado (complejo proteína A-inmunoglobulina-proteínas) fue sometido a tres ciclos de lavado con buffer RIPA. Finalmente el pellet se resuspendió en buffer de siembra PAGE, se hirvió a 100 °C por 2 min conservándose el sobrenadante. Las muestras fueron resueltas en SDS-PAGE y procesadas para WB según la proteína a revelar.

11. Transfección de células con lipofectamina

11.a Transfección con ADN plasmídico

Células Vero fueron crecidas en microplacas de 24 cavidades hasta 60% de confluencia. Para cada muestra se prepararon mezclas separadas de 1 µg de ADN plasmídico en 50µl de OptiMEM (Gibco) sin suero y 2,5µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen) en 50µl del mismo medio. Luego de 20 minutos, se combinaron las soluciones de lipofectamina y ADN, y se incubaron por 40 min adicionales a T^o ambiente para permitir la formación de complejos. Posteriormente, se agregaron los 100 µl de la mezcla a cada una de las cavidades de la microplaca, incubándose los cultivos en estufa de CO₂ durante 5 h. Finalmente, transcurrido dicho tiempo se reemplazó el medio con la mezcla de transfección por OptiMEM 5% SFB. A las 24 h post-transfección las células fueron infectadas con JUNV o no infectadas, e incubadas durante 24 o 48 hs p.i. según experimento a realizar.

Plásmidos empleados:

- pcDNA3.1-N, pcDNA3.1-GPC, pcDNA3.1-Z-eGFP (Artuso y col., 2009).
- pCEFL-Akt wt (salvaje) y pCEFL Akt Mut (mutado en su dominio de kinasa) (Murga y col., 1998).
- eIF4A wt y eIF4A mutado (provistos por el Dr. A. Panganiban, Universidad de Nuevo México)
- pcDNA3-HA-4E-BP1 wt (salvaje) y pcDNA3-HA-4E-BP1 4A (mutada en su sitio de fosforilación por mTOR) (Burgui, I y col., 2007).

11.b. Transfección con siARNs

Células Vero fueron crecidas en microplacas de 24 cavidades hasta 60% de confluencia fueron transfectadas con una mezcla de 25 ng del respectivo siRNA y 0,5µl de lipofectamina 2000 en 100 µl finales de OptiMEM (Gibco) sin suero. A las 4 h post-transfección las células fueron disgregadas con tripsina y sembradas en proporción 1:2 en placa de 24 cavidades en medio MEM 5% SFB. A las 12 h. post-siembra las células fueron transfectadas nuevamente con una mezcla del respectivo siRNA en las condiciones mencionadas anteriormente. A las 24 h post-2^{da} reacción de transfección, las células fueron infectadas con JUN o no infectadas, e incubadas durante 24 o 48 hs p.i. según experimento a realizar.

Las secuencia blanco de los siARNs empleados fueron: siARN dirigido contra eIF4G1: 5'-GAGCGAAGCTGCTGCAGAA-3' (Welnowska y col., 2009), siARN dirigido contra p97: 5'-AGTCGTTCTAATGAATAA (Welnowska y col., 2009); siARN control: corresponde a una secuencia al azar que no interfiere con proteínas celulares (Gene Link, siControl non silencing un labeled).

12. Ensayo de incorporación de marca radiactiva.

Células Vero crecidas en placas de 24 cavidades provenientes de cada ensayo particular, fueron incubadas con DMEM deficiente en metionina y cisteína durante 1 h a 37°C. Posteriormente las células fueron incubadas con DMEM suplementado con 25 µCi/ml marca radioactiva (metionina y cisteína marcadas con ³⁵S [Expre35S35S, NEN, USA]) durante 1 h a 37°C. Transcurrido este tiempo las células fueron lavadas con PBS, resuspendidas en buffer de siembra PAGE y hervidas durante 4 min. Las muestras fueron resueltas en geles de gradiente 4-12 Bis-Tris (NuPage® [Invitrogen]), una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron con una solución de Coomassie Blue R250 al 0,25% en metanol: H₂O: acético glacial (50:50:10). Posteriormente, los geles se decoloraron y fueron incubados con una solución de Acético: Etanol: H₂O (10:10:30) durante 15 min y fijados con Salicilato 1M durante 45 min. Finalmente, los geles se secaron y se expusieron sobre una película Agfa Curix RPI durante distintos tiempos.

Alternativamente las células fueron marcadas radiactivamente según se describe en el párrafo anterior y posteriormente inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti-N. Finalmente las muestras inmunoprecipitadas fueron resueltas en SDS PAGE.

13. Electroporación de células con la proteasa 2A de poliovirus

Células Vero crecidas en placas de 10 cm² fueron infectadas con JUNV a una moi de 5 ufp/cél. o no infectadas. A las 48 h p.i. las células provenientes de cada placa fueron disgregadas con tripsina,

lavadas 2 veces con PBS estéril y resuspendidas en 800 µl de dicho buffer. Para la reacción de electroporación 200 µl de resuspendido de células fueron electroporados con 1 o 10 µg del mRNA de la proteasa de poliovirus, previa transcripción in vitro con la polimerasa T7 a partir de plásmido que contiene el gen 2A de poliovirus tras el IRES del EMCV (pTM1-2A) (Aldabe, R., 1995). El pulso de electroporación fue realizado durante 7 mseg a un voltaje de 1.5 Kv y una capacitancia de 25 µF. Posteriormente las células provenientes de cada reacción de electroporación fueron sembradas en una cavidad de placa de 24 pocillos con MEM 10/ SFB y a las 2 h post-electroporación fueron marcadas metabólicamente con ³⁵S, según se describe en el ítem 12.

1. REGULACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE PI3K/AKT/mTOR EN EL CICLO DE MULTIPLICACIÓN DE JUNV

La vía de PI3K/Akt constituye una de las principales rutas moduladoras de la traducción cap-dependiente (Mamane y col., 2006) y en función de que los mARNs de JUNV poseen en el extremo 5' una estructura m7Gppp-cap (Banerjee y col., 1976), esta vía podría estar implicada en la traducción de las proteínas virales. Finalmente, el hecho de que la infección *in vitro* con arnavirus no suprime la síntesis de proteínas celulares (Candurra y col., 1990), la cual es mayoritariamente cap-dependiente, sugiere el mantenimiento de esta vía activa durante la infección. En base a lo expuesto, la modulación de la vía de PI3K/Akt podría tener múltiples funciones en el ciclo de replicación del JUNV, que irían desde generar un entorno favorable para su replicación, regulando su potencial citopático y favoreciendo la traducción de sus mARNs, hasta mediar el inicio de la persistencia, mediante el cual el virus asegura su subsistencia en la naturaleza.

Sobre la base de los antecedentes mencionados, en este primer capítulo se estudió la modulación de la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR durante el ciclo de multiplicación de JUNV *in vitro*.

1.1 EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE PI3K EN LA INFECCIÓN AGUDA CON JUNV

El bloqueo de la quinasa PI3K, una de las principales reguladoras de la actividad de Akt, reprime la activación completa de esta última. Akt se caracteriza por poseer 2 sitios de fosforilación claves e interdependientes: Thr308 (ubicado en el dominio catalítico) y Ser473 (ubicado en el dominio hidrofóbico). La fosforilación en el dominio catalítico es mediada por la quinasa PDK-1, mientras que la fosforilación en Ser473 es mediada por el complejo reorganizador del citoesqueleto de actina, TORC2 (mTOR/riCTOR). El hecho de que la inhibición de PI3K afecte la fosforilación en Ser473 de Akt indica que el complejo TORC2 sería regulado directa o indirectamente por esta quinasa, sin embargo, hasta el momento el mecanismo de regulación de este complejo aún no ha sido esclarecido.

La Figura 15 representa un esquema simplificado de la vía de PI3K/Akt, con sus principales efectores y los blancos de acción de los inhibidores ensayados (vía completa en Introducción, Figura 11).

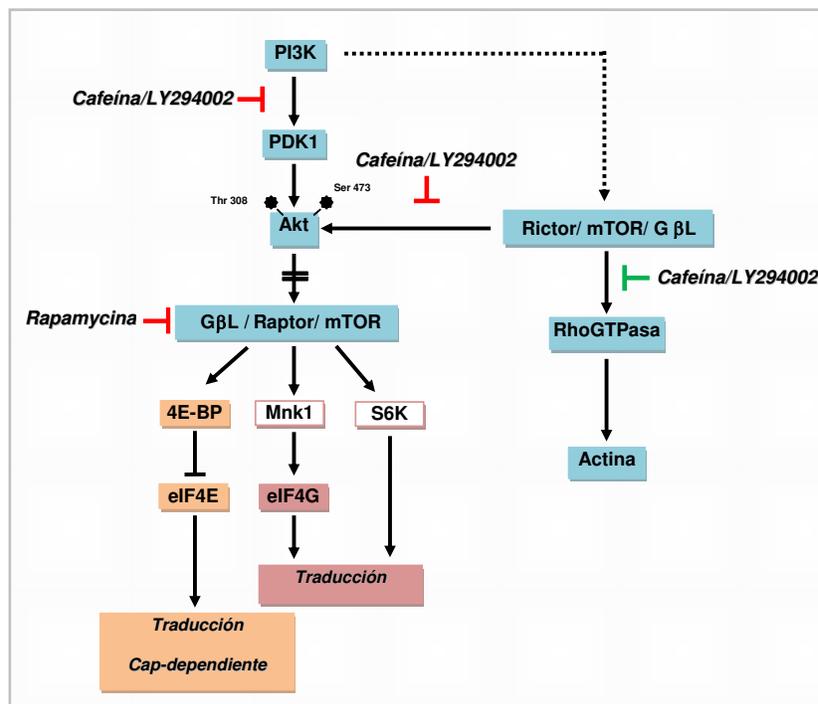


Figura 15. Esquema representativo de la vía de señalización PI3K/mTOR /Raptor. En color rojo se muestran los blancos de inhibición específicos de los compuestos ensayados, en color verde se muestran otros posibles blancos de acción. Líneas llenas representan rutas caracterizadas, las líneas punteadas representan posibles rutas. → (activación); —| (inhibición).

1.1.1 Efecto del tratamiento con cafeína

La cafeína ha sido caracterizada como una droga inhibitoria de la actividad lípido quinasa de PI3K, cuya acción afecta la fosforilación de Akt en Ser473 y Thr308 (Foukas y col., 2002). Estudios previos de nuestro laboratorio reportaron que el tratamiento con esta droga reduce la producción de virus en células infectadas con JUNV en forma dosis-dependiente, observándose una inhibición en la síntesis de antígenos virales como así también en la producción de virus infectivo (Candurra y Damonte, 1999). Con el objetivo de establecer una posible relación entre el efecto inhibitorio de la cafeína en la replicación del virus y su acción sobre la vía de PI3K/Akt, se profundizaron los estudios acerca la acción de esta droga en la multiplicación de JUNV.

En función de que la vía de PI3K/Akt es activada por factores de crecimiento presentes en el suero bovino, los ensayos de esta vía fueron realizados en medio de cultivo sin suero (medio de ayuno) a fin de evitar la interferencia de los mismos. De esta manera se evaluó en primer lugar el efecto de la cafeína sobre la viabilidad celular en condiciones de ayuno. Células Vero fueron tratadas con concentraciones de cafeína en el rango de 2-10 mM durante 24 hs y posteriormente evaluadas mediante un ensayo de viabilidad celular por MTT. Como se observa en la Figura 16, en el rango de concentraciones ensayadas sólo se detectó una reducción moderada de la viabilidad, observándose

una disminución aproximada del 30% a la concentración 10 mM. A estas mismas concentraciones el tratamiento con cafeína indujo una reducción dosis-dependiente en la producción de virus infeccioso, observándose valores de rendimiento de $65 \pm 7\%$, $20 \pm 5\%$ y $5 \pm 3\%$ en los tratamientos de 2, 6 y 10 mM, respectivamente, en comparación con el rendimiento obtenido en las células no tratadas (0mM) (Figura 16).

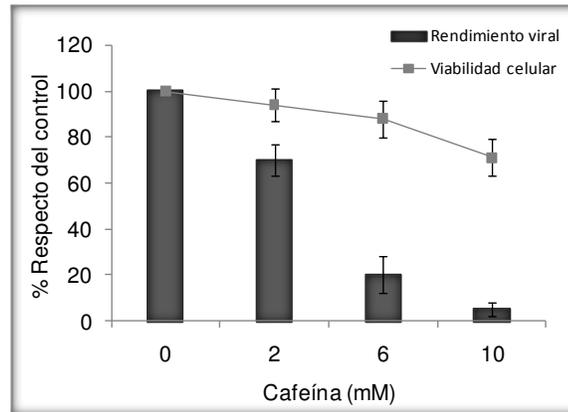


Figura 16. Efecto de cafeína en la viabilidad celular y en la replicación de JUNV. Células Vero mantenidas en ayuno durante 24 hs fueron infectadas con JUNV a una MOI de 0,1 ufp/cel. (Ensayo de rendimiento viral) o no infectadas (Ensayo de viabilidad celular) y tratadas con distintas concentraciones de cafeína durante 24 hs. Transcurrido este tiempo se realizó la cuantificación de infectividad viral en los sobrenadantes mediante un ensayo de ufp y la viabilidad celular fue evaluada mediante un ensayo de MTT.

A su vez, la expresión de N evaluada mediante IFI también fue reducida frente al tratamiento con cafeína, observándose valores de inhibición del $76 \pm 9\%$ y $91 \pm 5\%$, para las concentraciones 6 y 10 mM, respectivamente (Figura 17a, paneles O y P). Los valores obtenidos fueron comparables a los reportados por Candurra y Damonte (1999), aunque la inhibición en ausencia de estimulación por suero, fue superior. Probablemente la presencia de suero en el medio de cultivo, active a la vía de PI3/Akt, contrarrestando el efecto inhibitorio ejercido por la cafeína. Esto explicaría la menor toxicidad de la droga en presencia de suero, como así también los valores levemente inferiores en la inhibición del virus.

En base a que la integridad del citoesqueleto de actina es necesaria para la replicación de JUNV (Candurra y col., 1999), una posible causa de la reducción observada en la replicación del virus, podría ser que el tratamiento con cafeína altere la red de actina como consecuencia de la inhibición del complejo mTOR/rictor (TORC2). De esta manera se evaluó la integridad del citoesqueleto en células Vero infectadas o no infectadas con JUNV y tratadas con distintas concentraciones de cafeína durante 24 hs. Como se observa en la Figura 17a, el tratamiento con cafeína 10mM indujo alteraciones en las fibras de actina caracterizadas por una desorganización en la integridad de las mismas y la aparición de un patrón de “cuentas de rosario” tanto en las células no infectadas (Figura

17a, panel D y Figura 17b) como en las células infectadas con JUNV (Figura 17a, panel L). Sin embargo estas alteraciones no fueron observadas frente a los tratamientos de menor concentración (Figura 17a, paneles A-C y I-K). Estos resultados indican que el efecto en la replicación de JUNV observado frente al tratamiento con 10 mM de cafeína podría ser una consecuencia de la alteración del citoesqueleto celular. En cambio, los tratamientos a concentraciones inferiores, en los cuales no se detectaron estas alteraciones pero aún así se redujo la replicación del virus, sugieren que probablemente otro efecto de la droga sea el responsable de la inhibición observada.

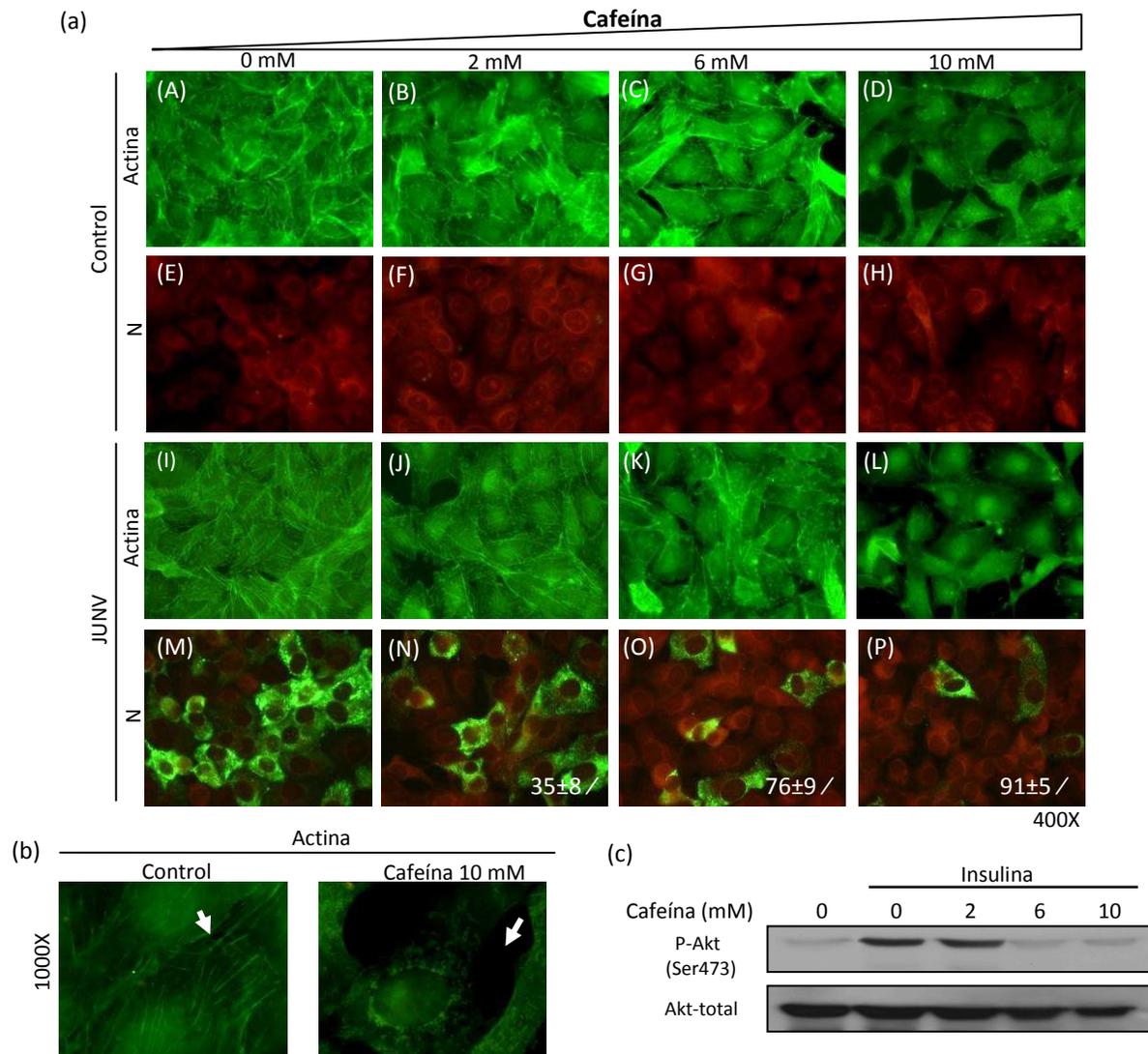


Figura 17. Efecto de cafeína sobre el citoesqueleto de actina y la fosforilación de Akt. (a) Células Vero mantenidas 24 hs en medio de ayuno, fueron no infectadas (control) o infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cel. y tratadas con distintas concentraciones de cafeína. A las 24 hs p.i. la actina celular y N fueron ensayadas mediante IF. Los números en los paneles indican el % de inhibición de expresión de N, respecto del control sin tratar. El error corresponde al SD de tres experimentos independientes. (b) Filamentos de actina correspondientes a células Vero no tratadas (control) o tratadas con cafeína 10mM. (c) Células Vero mantenidas en medio de ayuno durante 24 hs fueron pre-tratadas con distintas concentraciones de cafeína durante 1 h y estimuladas posteriormente con 240 μ M de insulina en presencia de la droga. A los 30 min post-estimulación las células fueron lisadas y la fosforilación de Akt (Ser473) fue evaluada mediante WB.

Finalmente, a fin de comprobar el efecto de la cafeína sobre PI3K, se evaluó la activación de Akt (Ser473) inducida por insulina en células Vero tratadas con las concentraciones de cafeína evaluadas en los ensayos anteriores. Como se observa en la Figura 17c, el tratamiento con la droga redujo considerablemente la activación de Akt, observándose un bloqueo en su fosforilación prácticamente total a partir de la concentración 6 mM.

En base a estos resultados se podría inferir que el efecto que la cafeína ejerce sobre la activación de la vía de PI3K/Akt podría ser la causa de la inhibición en la replicación de JUNV, sin embargo dada la amplia variedad de efectos pleiotrópicos reportados para esta droga, no es posible asegurar que la inhibición observada se deba específicamente a la acción sobre esta quinasa.

1.1.2 Efecto del tratamiento con Ly294002

En base a la inespecificidad de la droga cafeína para determinar la participación de PI3K en la replicación de JUNV, se decidió evaluar el efecto del compuesto Ly294002, un inhibidor específico de esta quinasa. Esta droga es un derivado morfolínico de la quercetina que actúa como un potente inhibidor reversible de PI3K (Vlahos y col., 1994). En primer lugar se determinó la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT, en el cual células Vero fueron tratadas con distintas concentraciones Ly294002 durante 12 y 24 hs. Como se observa en la Figura 18a, las concentraciones ensayadas no mostraron efectos considerables en la viabilidad celular. El tratamiento con 10 μ M de Ly294002 fue elegido para continuar los ensayos, ya que a esta concentración los valores de viabilidad se mantuvieron cercanos o incluso superiores al 90%, observándose un bloqueo prácticamente total en la fosforilación de Akt (Figura 18b), sin detectarse alteraciones en el citoesqueleto de actina (Figura 18c).

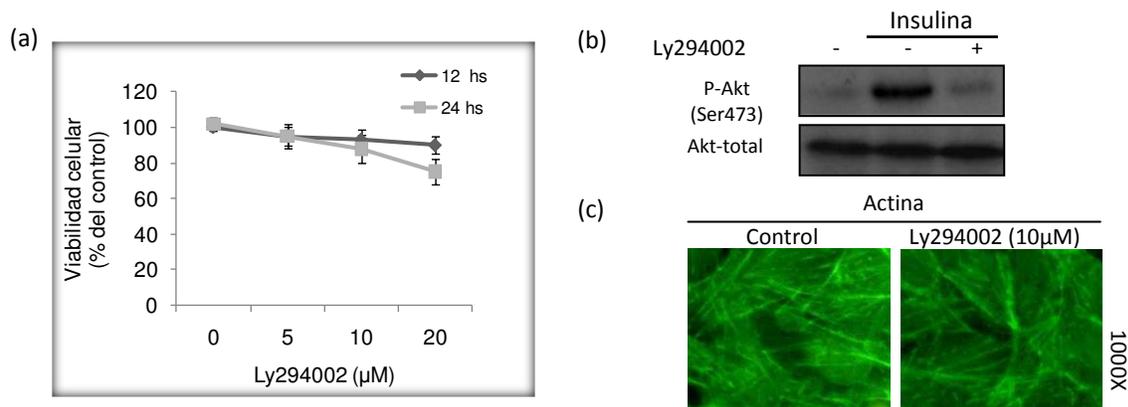


Figura 18. Efecto de Ly294002 sobre la viabilidad de células Vero (a) Células Vero mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno, fueron tratadas con distintas concentraciones de Ly294002 (rango de 5-20 μ M) y evaluadas a las 12 o 24 hs mediante un ensayo de viabilidad celular por MTT. (b) Células Vero mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno fueron tratadas con insulina 240 μ M en presencia (+) o ausencia (-) de 10 μ M de Ly294002 y evaluadas a los 30 min post-contacto para determinar la presencia de P-Akt (Ser473) mediante WB. (c) Células Vero mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno fueron no tratadas (control) o tratadas con 10 μ M de Ly294002 y procesadas para IF a las 24 hs post-tratamiento para evaluar la integridad de las fibras de actina.

Para determinar el efecto del compuesto sobre la multiplicación de JUNV, células Vero fueron infectadas y tratadas con 10 μ M de Ly294002 durante 12 y 24 hs. La producción de virus infeccioso fue cuantificada mediante un ensayo de formación de placas, determinándose una reducción del $60\pm 8\%$ y del $83\pm 7\%$, a las 12 y 24 hs p.i., respectivamente. Estos resultados se correspondieron con el efecto observado en la producción de N, para la cual se determinaron valores de inhibición de entre 60-70% a las 12 hs p.i. y cercanos al 85% a las 24 hs p.i., tanto en la expresión (Figura 19a) como en la síntesis (Figura 19b) de la proteína viral.

El aumento de la MOI en estos experimentos no modificó las conclusiones de los mismos, ya que como muestra la Figura 19c, el tratamiento con Ly294002 durante 12 hs manifestó una reducción marcada en la expresión de N, demostrando que aún a una elevada MOI se observa el efecto antiviral del compuesto.

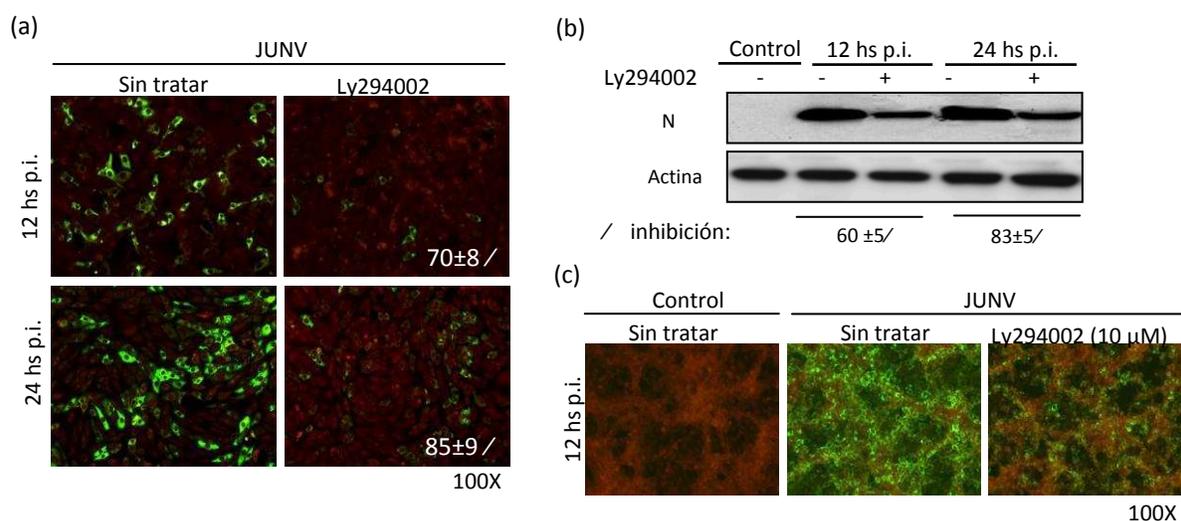


Figura 19. Efecto de Ly294002 sobre la replicación de JUNV. Células Vero mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno, fueron no infectadas o infectadas con JUNV (MOI=1 ufp/cél.) en presencia o ausencia de 10 μ M de Ly294002 y tratadas con la droga durante 12 o 24 hs p.i.. (a) Expresión de N evaluada mediante IFI. Los números indican el % de inhibición de la expresión de N respecto del control sin tratar correspondiente a cada tiempo p.i.. (b) Síntesis de N evaluada mediante WB. (c) Células Vero mantenidas en medio de ayuno durante 24 hs fueron no infectadas (control) o infectadas con JUNV a una MOI de 10 ufp/cél. en presencia o ausencia de 10 μ M de Ly294002 y tratadas durante 12 hs con el inhibidor. Transcurrido este tiempo las células fueron fijadas y procesadas para IFI a fin de evaluar la expresión de N.

Teniendo en cuenta que JUNV es capaz de multiplicar en distintos sustratos celulares se analizó la participación de la vía de PI3K en células humanas (A549), en las que el virus produce un efecto citopático similar al observado en células Vero y en células de hámster (BHK-21) en donde multiplica exhibiendo una capacidad citolítica muy reducida. En primer lugar se realizaron curvas de viabilidad celular a fin de determinar las concentraciones de ensayo de Ly294002 para cada línea,

seleccionándose los tratamientos con 10 μ M, para A549 y 20 μ M, para BHK-21, concentraciones a las cuales la viabilidad celular se mantuvo por encima del 90% en ambos casos.

Posteriormente se evaluó el efecto del compuesto en la multiplicación del virus, observándose una reducción en la síntesis y expresión de N en ambas líneas celulares (Figura 20). Estos valores se correlacionaron con una disminución del 77 \pm 7% y 89 \pm 9% en el rendimiento viral determinado a las 24 hs p.i. en células BHK-21 y A549, respectivamente.

Estos resultados refuerzan la importancia de la vía de señalización de PI3K en la replicación de JUNV, ya que la inhibición de la misma en cultivos celulares de distinto origen, muestra una marcada reducción en la replicación del virus.

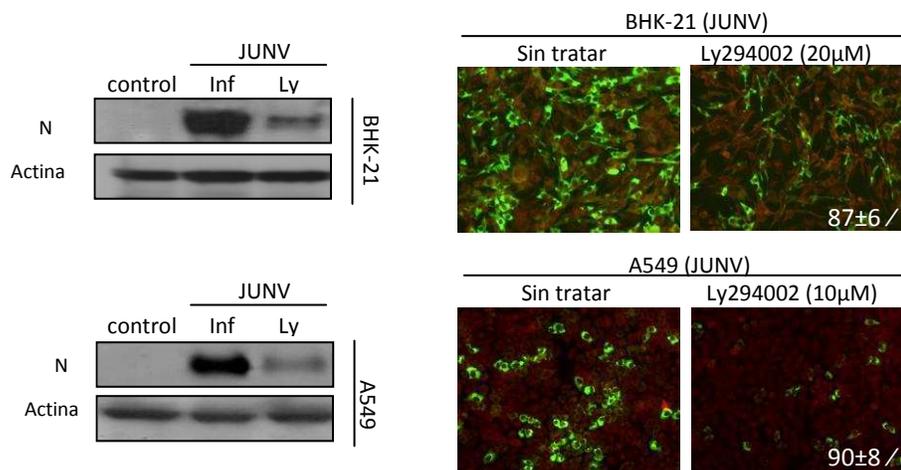


Figura 20. Efecto de Ly294002 sobre la replicación de JUNV en células BHK-21 y A549. Células BHK-21 y A549 mantenidas en medio de ayuno durante 24 hs, fueron no infectadas (control) o infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. en presencia o ausencia de Ly294002 y tratadas durante 24 hs con la droga, tiempo al cual la síntesis de N fue evaluada mediante IFI y WB, respectivamente. Los números indican el % de inhibición de la expresión de N respecto del control sin tratar donde el error corresponde al SD de tres experimentos realizados en forma independiente. Inf=células infectadas. Ly=Ly294002. Fotos en aumento 100X.

Finalmente para obtener información acerca de la participación de PI3K/Akt a lo largo de la infección con JUNV, se estudió la producción de virus en función del tiempo de agregado de Ly294002 durante el ciclo de multiplicación viral. La Figura 21a muestra que el tratamiento con este inhibidor produjo efectos inhibitorios cuando fue agregado junto con el virus (0-18) o luego de 1 h p.i. (1-18), sin embargo cuando la droga fue agregada a partir de las 3 hs p.i. no produjo efectos marcados en la expresión de N, estos resultados fueron observados tanto en células Vero como en células A549. La cuantificación de virus infectivo se correlacionó con los resultados obtenidos por IFI, confirmando el efecto inhibitorio del compuesto sólo cuando éste es agregado a tiempos tempranos de infección (Figura 21b y 21c). Como control se evaluó la replicación de VSV en células Vero tratadas con

Ly294002 a distintos tiempos p.i., observándose que el agregado del compuesto no modificó la replicación de VSV en ninguno de los tiempos ensayados (Figura 21d).

Estos resultados indicarían que JUNV requiere de la actividad de la quinasa PI3K para su replicación efectiva, ya que el bloqueo de la misma con los inhibidores cafeína o Ly294002 redujo significativamente la multiplicación del agente viral. Este requerimiento sería independiente de la línea celular empleada, debido a que el tratamiento con Ly294002, disminuyó la multiplicación de JUNV en cultivos celulares de distinto origen. Finalmente el hecho de que el tratamiento con Ly294002 sólo haya mostrado efectos inhibitorios cuando es agregado durante las etapas tempranas de infección, sugiere la participación de PI3K en eventos tempranos de la multiplicación del virus.

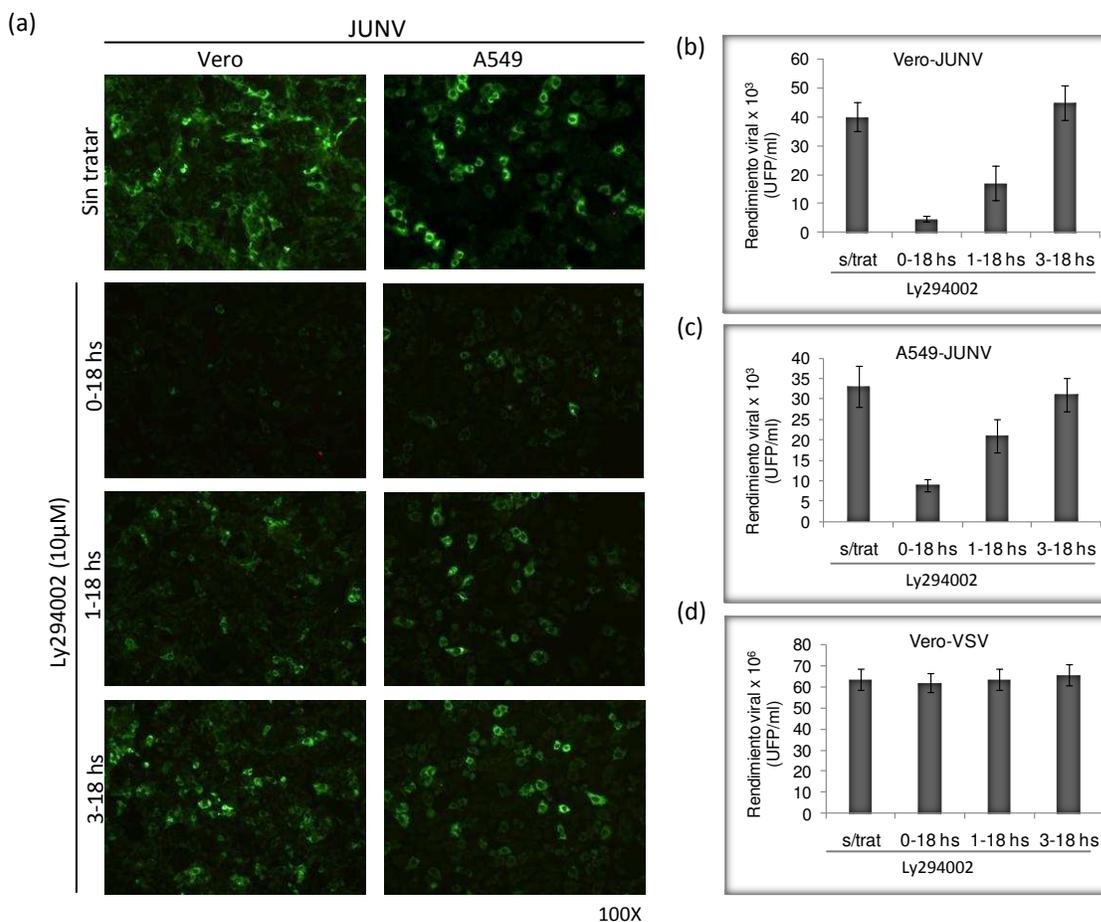


Figura 21. Efecto del tratamiento con LY294002 a diferentes tiempos p.i.. Células Vero y A549 fueron mantenidas en medio de ayuno durante 24 hs e infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. El tratamiento con 10 μ M de Ly294002 fue realizado entre las 0-18, 1-18 y 3-18 hs p.i.. (a) Ensayo de IFI de N. (b y c) Cuantificación de virus infeccioso mediante ensayo de ufp. (d) Células Vero mantenidas en medio de ayuno durante 24 hs fueron infectadas con VSV (MOI=0,001 ufp/cél.) y tratadas como se mencionó en el ítem anterior. A las 18 hs p.i. los sobrenadantes fueron cosechados y cuantificados por ensayos de ufp.

1.1.3 Activación de PI3K/Akt durante la infección aguda de JUNV

La activación temprana de Akt mediada por PI3K ha sido reportada en numerosas infecciones virales, en las cuales mecanismos tempranos de interacción virus-célula mostraron ser responsables de la inducción de esta vía de señalización. Con el objetivo de confirmar la activación temprana de PI3K durante la infección con JUNV, se evaluó la fosforilación de Akt (Ser473) en células Vero y BHK-21. En este experimento se analizó además el estado basal de fosforilación de Akt en células Vero no infectadas en los todos tiempos ensayados, a fin de eliminar la posibilidad de una activación inespecífica inducida durante la manipulación experimental de los cultivos. Como puede observarse en la Figura 22a, el control sin infectar presentó una leve activación de Akt en los primeros tiempos, sin embargo estos niveles fueron significativamente inferiores a los observados frente a la infección viral (Figura 22b). El análisis de la fosforilación de Akt en células Vero infectadas con JUNV mostró una activación bifásica con un primer pico de fosforilación entre los 15-30 min p.i. y un segundo pico menos pronunciado a los 120 min p.i. (Figura 22b). El tratamiento con Ly294002 bloqueó completamente la fosforilación de Akt, corroborando que la activación observada es mediada por la quinasa PI3K (Figura 22c). Finalmente la infección en células BHK-21 presentó un patrón de fosforilación bifásico similar al observado en células Vero, indicando un mecanismo común de activación en ambas líneas celulares desencadenado por la entrada del virus a la célula (Figura 22d).

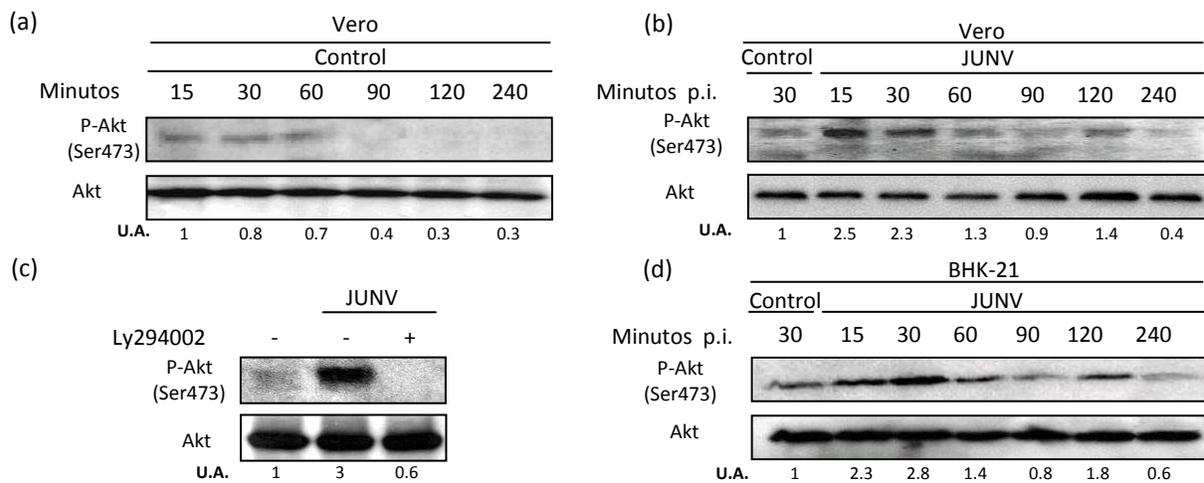


Figura 22. Cinética de activación de Akt durante la infección con JUNV. Células Vero o BHK-21 mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno fueron no infectadas (Control) o infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél (JUNV). A distintos tiempos p.i. las células fueron procesadas para determinar la presencia de P-Akt (Ser473) mediante WB. (a) Cinética de activación de Akt en células Vero no infectadas. (b) Cinética de activación de Akt en células Vero infectadas con JUNV. (c) Determinación de P-Akt a los 30 min post-contacto en células Vero infectadas con JUNV y tratadas con 10 μ M de Ly294002. (d) Cinética de activación de Akt en células BHK-21 infectadas con JUNV. El tiempo cero corresponde al momento de agregado del inóculo viral. En las muestras evaluadas a tiempos posteriores a los 60 min post-contacto, el virus fue retirado luego de 1 hora de adsorción y las células fueron cubiertas con medio de ayuno. Las membranas fueron reprobadas a fin de determinar el nivel de Akt total en cada calle. La activación de Akt en Ser473 es expresada en unidades arbitrarias (U.A.) calculadas como el coeficiente entre P-Akt /Akt-total, respecto del control sin infectar de cada ensayo o respecto del primer tiempo en el ensayo de células no infectadas.

Sobre la base de estos resultados se llevó a cabo un ensayo similar en el cual se inactivó al virus con luz ultravioleta (UV) y se evaluó la cinética de activación de Akt, en estas condiciones el virus es incapaz de replicar, pero conserva la capacidad unirse a su receptor y por tanto entrar en la célula blanco. Como puede observarse en la Figura 23a el virus inactivado con luz UV fue capaz de activar la vía de señalización de PI3K, provocando un patrón de fosforilación de Akt análogo al obtenido con el virus sin inactivar (Figura 22b). Estos resultados comprueban que la modulación de PI3K/Akt no sería mediada por la replicación viral, dada la incapacidad del virus inactivado para llevar a cabo este proceso, sugiriendo al mecanismo de adsorción-penetración viral como responsable de la activación de la vía.

Para profundizar los estudios acerca de la modulación de PI3K/Akt y su posible relación con el mecanismo de entrada de JUNV, se analizó en primer lugar, el comportamiento del receptor de transferrina (Tfr), el cual media el transporte de Tfr al interior celular a través de un mecanismo de endocitosis dependiente de clatrina y ha sido reportado como el principal receptor celular empleado por el virus para entrar en la célula blanco (Radoshitzky y col., 2007). Como se observa en la Figura 23b, la unión de la Tfr a su receptor indujo una activación bifásica de Akt similar a la inducida por el virus, sugiriendo que la actividad de dicho receptor sería responsable de la modulación de la vía de PI3K/Akt.

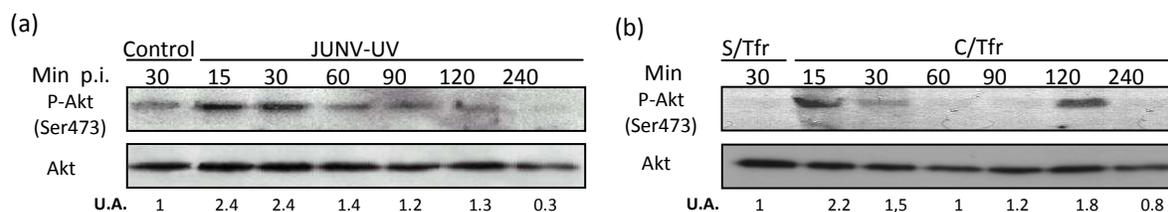


Figura 23. Activación de Akt por la entrada de JUNV-UV y Tfr. (a) Células Vero mantenidas en medio de ayuno durante 24 hs fueron no infectadas (control) o infectadas con JUNV (MOI de 1 ufp/cél.) previamente inactivado mediante la exposición a luz UV (JUNV-UV). A distintos tiempos p.i., se determinó la presencia de P-Akt (Ser473) mediante WB. (b) Células Vero mantenidas en medio de ayuno durante 24 hs fueron no tratadas (S/Tfr) o tratadas con 20 µg/ml de Tfr (C/Tfr) y procesadas a distintos tiempos post-contacto, a fin de determinar la presencia de P-Akt (Ser473) por WB. Las membranas fueron reprobadas a fin de determinar el nivel de Akt total en cada calle. La activación de Akt en Ser473 es expresada en unidades arbitrarias (U.A.) calculadas como el coeficiente entre P-Akt/Akt-total, respecto del control sin infectar o sin tratar, respectivamente.

Posteriormente se evaluó si la unión de JUNV al receptor es suficiente para activar la vía de señalización o si se requiere un paso posterior del mecanismo de entrada del virus. Esto fue comprobado mediante el empleo de clorpromazina, un inhibidor del mecanismo de entrada dependiente de clatrina. Como muestra la Figura 24, la infección de JUNV en presencia de clorpromazina fue incapaz de activar a PI3K, observándose un bloqueo prácticamente total en la

fosforilación de Akt. A su vez, la activación de Akt inducida por insulina (ligando que no emplea el mecanismo de entrada mediado por clatrina) no fue alterada por el agregado de la droga, demostrando que el bloqueo de la fosforilación de Akt observado con el virus en presencia de clorpromazina, no se debería a un efecto inespecífico de la droga sobre la cascada de señalización.

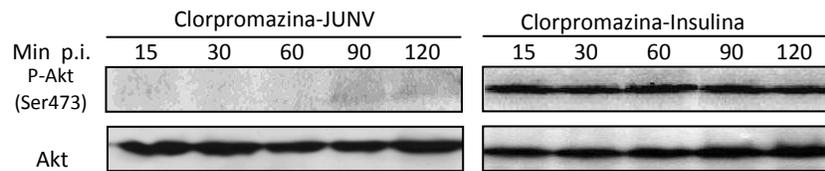


Figura 24. Activación de Akt por la entrada de JUNV dependiente de clatrina. Células Vero mantenidas en medio de ayuno durante 24 hs fueron pre-tratadas con 40 μ M de clorpromazina durante 2 hs y posteriormente infectadas con JUNV (MOI 1ufp/cél.) o estimuladas con 240 μ M de insulina. A distintos tiempos post-contacto o p.i., las células fueron procesadas para WB a fin de determinar la presencia de P-Akt (Ser473). Las membranas fueron re-probadas a fin de determinar el nivel de Akt total en cada calle.

La participación de PI3K ha sido reportada en el camino endocítico del receptor de Tfr, en el cual su activación favorecería el reciclaje del mismo. El receptor de Tfr es reciclado a la membrana plasmática mediante dos mecanismos: uno rápido, en el cual el receptor es reciclado directamente desde los endosomas tempranos (EE) hacia la membrana plasmática, y uno lento que requiere el pasaje previo por endosomas de reciclaje (ER). El primero de estos mecanismos requiere la participación de PI3K, mientras que el segundo, no es bloqueado por inhibidores de esta quinasa y es dependiente de dineína. La participación de PI3K también ha sido reportada como necesaria para la fusión de los EE, donde la activación de EEA1 (responsable de la fusión de EE) es co-regulada por Rab5 y PI3K (Simonsen y col., 1998). Sin embargo el efecto de los inhibidores de PI3K sobre este último mecanismo es controversial, y si bien se acepta que el tratamiento con estos inhibidores genera EE de mayor tamaño, algunos estudios sugieren que estos EE serían incapaces de fusionar, mientras que otros sostienen que conservan gran parte de su capacidad de fusión (Bright y col., 2001).

Sobre la base de estos antecedentes se evaluó la participación de PI3K/Akt en el mecanismo de entrada de JUNV en cuanto a su participación en el reciclado del receptor de Tfr. En primer lugar se determinó el efecto de la inhibición de PI3K sobre el mecanismo de endocitosis de Tfr. Con este fin células Vero fueron pre-tratadas con 10 μ M de Ly294002 y estimuladas con Tfr conjugada con TRITC (Tfr-TRIC) en presencia del inhibidor. Como se observa en la Figura 25a, el tratamiento con Ly294002 indujo una disminución de Tfr endocitada, detectándose un patrón granular más marcado respecto del control sin tratar. De acuerdo a lo mencionado anteriormente, la disminución de Tfr endocitada se debería al efecto del Ly294002 en el reciclaje rápido del receptor, el cual una vez endocitado no puede ser transportado a la membrana reduciéndose de esta manera la cantidad de receptores

disponibles. Por otro lado, la presencia de estructuras granulares de mayor tamaño en el citoplasma de las células tratadas constituirían EEs cuyo aumento de tamaño sería una consecuencia de la inhibición de PI3K.

Con el objetivo de comprobar si el bloqueo de PI3K reduce la entrada del virus a la célula, tal como fue observado para Tfr, se realizó un ensayo de internalización en el cual células Vero fueron pre-tratadas con 10 μM de Ly294002 e infectadas con 200 ufp totales de JUNV en presencia del inhibidor. A distintos tiempos p.i. el virus internalizado fue cuantificado mediante plaqueo directo. Como se observa en la Figura 25b, contrariamente a lo observado para Tfr, el tratamiento con Ly294002 no afectó la cantidad de virus internalizado. Una posible explicación en la discrepancia de estos resultados podría ser que en los ensayos de Tfr se emplea un exceso de ligando, mientras que en los experimentos de plaqueo directo el virus usualmente se emplea en defecto a modo de obtener aproximadamente entre 100-150 ufp totales. En estas condiciones la entrada de Tfr estaría siendo afectada por reciclaje del receptor, no siendo este el caso para JUNV en el que una partícula infectaría 1 de cada 1000 células, por lo cual el reciclado del receptor podría ser prescindible.

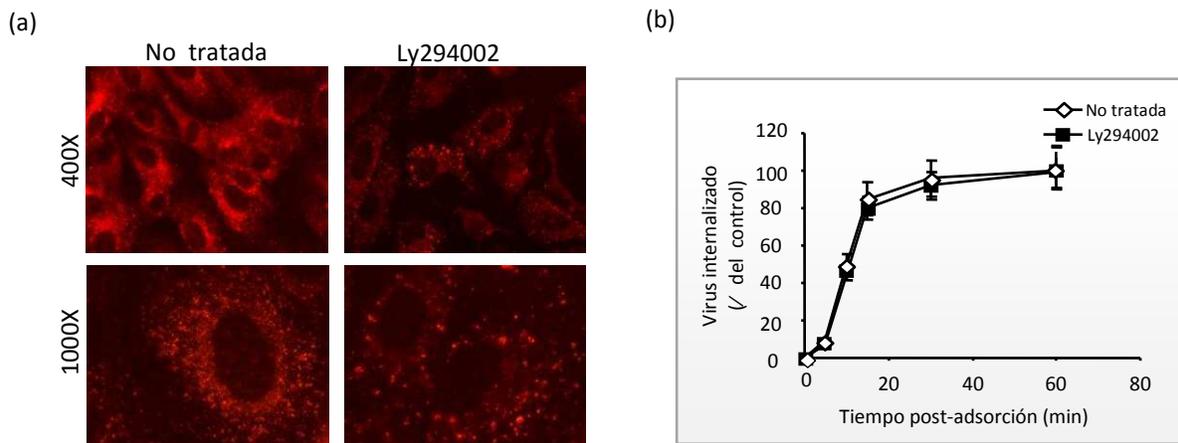


Figura 25. Participación de PI3K/Akt en la endocitosis de Tfr y JUNV. (a) Células Vero mantenidas en medio de ayuno durante 24 hs fueron no pre-tratadas (No tratada) o pre-tratadas con 10 μM de Ly294002 durante 45 min y posteriormente incubadas con Tfr conjugada con TRITC (Tfr-TRITC) en presencia del inhibidor. A los 45 min las células fueron fijadas y los preparados fueron observados mediante microscopía. (b) Células Vero mantenidas en medio de ayuno durante 24 hs fueron no pre-tratadas (No tratadas) o pre-tratadas con 10 μM de Ly294002 durante 45 min y posteriormente infectadas a 4°C con 200 ufp de JUNV en presencia del inhibidor. Luego de 1 hora de adsorción las células fueron incubadas con la droga a 37°C y el virus internalizado fue cuantificado a diferentes tiempos p.i. mediante un ensayo de plaqueo directo.

En función de que la cantidad de virus no es un parámetro modificable en los ensayos de internalización por plaqueo directo, se decidió realizar un ensayo de adsorción y penetración. En este ensayo las células fueron infectadas con JUNV a una MOI elevada (en presencia o ausencia de droga) y el virus intracelular infectivo fue cuantificado a diferentes tiempos p.i.. Como se observa en la Figura

26a, a los 15 min p.i. la cantidad de virus infectivo fue similar en presencia o ausencia de inhibidor, sin embargo a partir de los 30 min p.i. el tratamiento con Ly294002 redujo considerablemente la cantidad de virus endocitado en comparación con el control sin tratar. Teniendo en cuenta que el receptor de Tfr es reciclado a la membrana plasmática a partir de los 15 min luego de su endocitosis (Simonsen y col., 1998), la disminución en la cantidad de virus internalizado a partir de los 30 min p.i., podría ser una consecuencia del bloqueo del reciclaje del receptor de Tfr inducido por la droga. Por otro lado, mediante este ensayo fue posible evaluar el mecanismo de desnudamiento del virus. Como puede observarse en el control sin tratar, a partir de los 30 min p.i. la cantidad de virus infectivo comenzó a disminuir debido a la fusión de los endosomas, con la consecuente acidificación de las vesículas de transporte y desnudamiento de las partículas endocitadas. En el tratamiento con Ly294002 el virus infectivo también comenzó a disminuir a partir de los 30 min p.i., indicando que la presencia del inhibidor no alteró el desnudamiento del virus (las curvas en presencia y ausencia de inhibidor presentaron formas similares).

Finalmente a fin de comprobar la importancia del reciclaje del receptor de Tfr en la infección con JUNV, se evaluó el efecto de la depleción del mismo previo a la infección viral. Con este fin células Vero fueron pre-tratadas durante 1 h con Tfr, Ly294002 o Tfr+Ly294002 e infectadas con 150 ufp de JUNV. El virus internalizado fue cuantificado mediante un ensayo de plaqueo directo. Como puede observarse en la Figura 26b, el pre-tratamiento de Tfr+Ly294002 disminuyó la cantidad de placas de JUNV, comprobando que el agregado del inhibidor redujo el reciclaje de los receptores internalizados disminuyendo por tanto la cantidad de receptores disponibles para el virus. Contrariamente, la incubación con Tfr o el tratamiento con Ly294002, no mostró ningún efecto en la entrada del virus, dado que en el primer caso el reciclado del receptor no fue alterado, mientras que en el segundo no se alteró la endocitosis del receptor dada la ausencia de ligando.

Estos resultados comprueban que la reducción en la replicación de JUNV observada frente al tratamiento con inhibidores de PI3K, se debería mayoritariamente a la disminución en el reciclado del receptor empleado por el virus para entrar a la célula huésped, y no así a un bloqueo en la fusión de los endosomas.

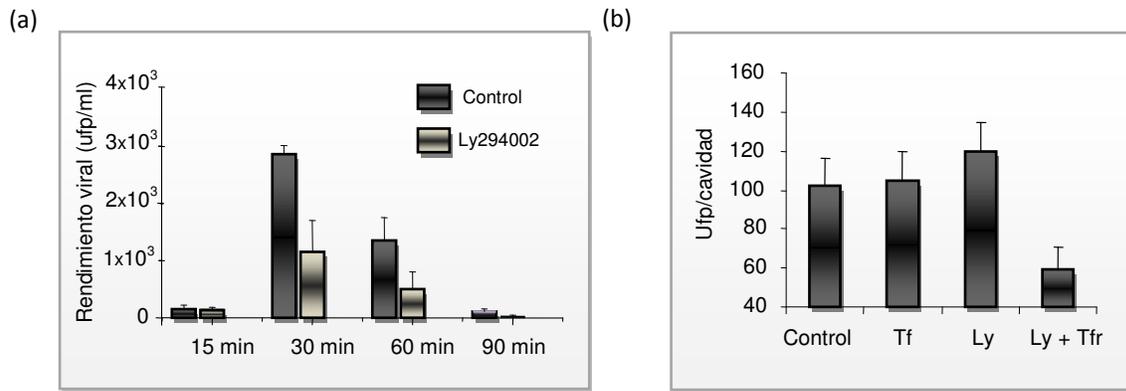


Figura 26. Participación de la activación de Akt en el reciclado del receptor de JUNV. (a) Células Vero mantenidas en medio de ayuno durante 24 hs fueron pre-tratadas con 10 μ M de Ly294002 durante 45 min e infectadas con JUNV a una MOI de 10 ufp/cél. en ausencia o presencia del compuesto a 37°C. A diferentes tiempos p.i. el virus intracelular internalizado fue cuantificado mediante ensayo de ufp, previos ciclos de congelado y descongelado. (b) Células Vero mantenidas en medio de ayuno durante 24 hs fueron pre-tratadas con 20 μ g/ml de Tfr, 10 μ M de Ly294002 o ambos reactivos a la vez durante 1h y posteriormente infectadas con 150 ufp de JUNV. El virus internalizado fue cuantificado mediante plaqueo directo.

1.2 PARTICIPACIÓN DE mTOR/RAPTOR EN LA TRADUCCIÓN DE LOS mARN VIRALES

1.2.1 Efecto de la inhibición de mTOR/raptor mediante Rapamicina

Una de las principales funciones de la vía de PI3K/Akt es la regulación de la traducción cap-dependiente, mediante la liberación del factor de unión al cap, eIF4E. La activación de Akt, promueve la fosforilación del complejo mTOR/raptor, que a su vez activa a distintos efectores relacionados con la traducción, entre estos 4E-BP, S6K y eIF4G. La regulación a través de 4E-BP constituye el mecanismo principal de control de la traducción cap-dependiente. En su estado fosforilado 4E-BP pierde su afinidad por eIF4E, quedando este último libre para su interacción con el factor eIF4G iniciando de esta manera el proceso de traducción.

Si bien los resultados obtenidos hasta el momento indican que la activación de la vía favorecería la entrada de JUNV a la célula huésped, esta activación temprana podría ser suficiente para desencadenar las señales necesarias para favorecer la traducción de las proteínas virales.

En función de estos antecedentes, y dada la presencia de estructuras cap en los mARNs del virus, se evaluó la participación del complejo mTOR/raptor en la replicación de JUNV, utilizando el compuesto rapamicina, un inhibidor específico de dicho complejo. En primer lugar se determinó la toxicidad de la droga mediante un ensayo de viabilidad celular, observándose que en el rango de concentraciones evaluadas, los niveles de viabilidad se mantuvieron elevados aún después de 48 hs de tratamiento (Figura 27a). Posteriormente, se evaluó el efecto del inhibidor en células Vero infectadas con JUNV. Como se observa en la Figura 27b, el tratamiento con rapamicina no alteró

considerablemente la producción de partículas virales, correlacionándose estos resultados con el efecto en la síntesis de N, la cual tampoco fue afectada por el inhibidor (Figura 27c).

Los resultados obtenidos, sugieren que a pesar de que JUNV activa la vía de PI3K/Akt, la participación del complejo mTOR/raptor, no sería imprescindible para el virus.

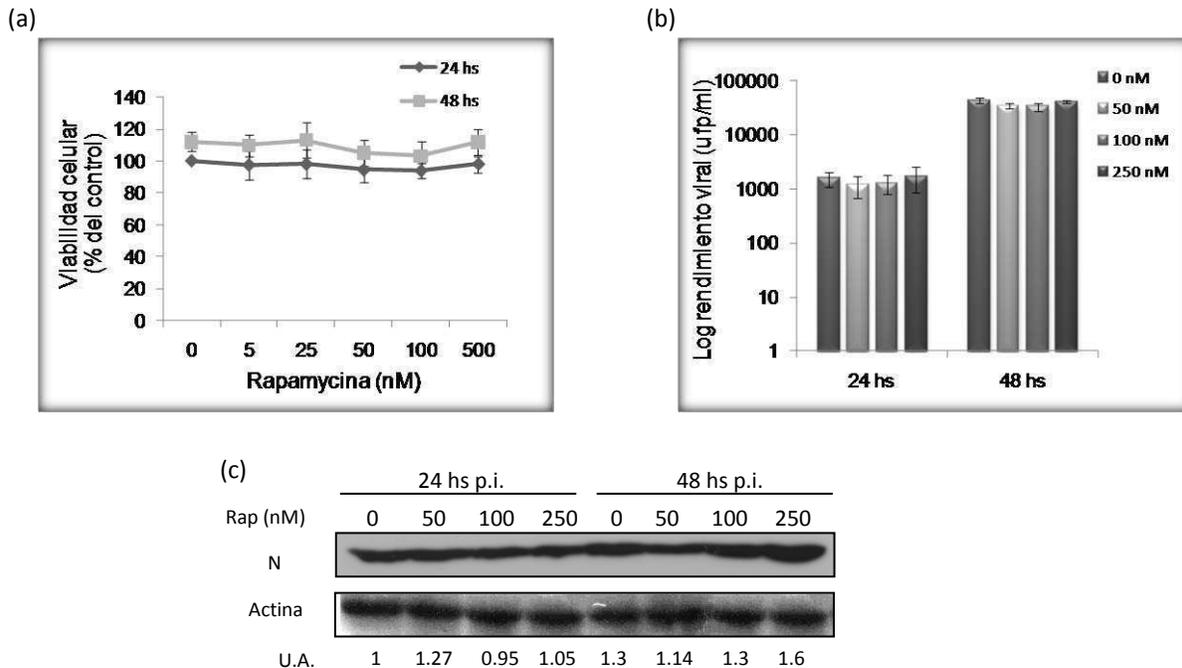


Figura 27. Efecto de la rapamicina en la replicación de JUNV. (a) Células Vero mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno, fueron tratadas con distintas concentraciones de rapamicina (rango de 5-500 nM) y procesadas a las 24 y 48 hs para determinar la viabilidad celular mediante ensayo de MTT. (b) Células Vero mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno fueron infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. y tratadas con distintas concentraciones de rapamicina. A las 24 y 48 hs p.i. los sobrenadantes fueron titulados por ensayos de ufp y las células fueron procesadas para WB a fin de evaluar la síntesis de N (c). La síntesis de N es expresada en unidades arbitrarias (U.A.) calculadas como el coeficiente entre N y actina.

Para un tener un cuadro más completo acerca de la participación de PI3K y mTOR/raptor, se comparó el efecto de Ly294002 y rapamicina en la replicación de JUNV, extendiendo el análisis sobre HSV-1 y VSV, virus que emplean mecanismos de traducción cap-dependiente y cap-independiente, respectivamente. De esta manera, células Vero fueron infectadas con JUNV, HSV-1 y VSV y tratadas con 10 μ M de Ly294002 o 100nM de rapamicina durante 24 hs. Como se muestra en la Figura 28a, la síntesis de antígenos virales de VSV no fue afectada por ninguno de los tratamientos empleados, observándose inclusive un pequeño incremento en la síntesis de los mismos, indicando que el bloqueo de la vía le otorgaría un beneficio replicativo a este virus. Por otro lado HSV-1 mostró una reducción importante en la síntesis de antígenos frente al tratamiento con Ly294002, sin embargo, el tratamiento con rapamicina, no tuvo efecto en la síntesis de los mismos. En el caso de JUNV, el tratamiento con Ly294002 redujo el porcentaje de las células (+) para N, mientras que el tratamiento

con rapamicina no mostró efectos considerables, confirmando los resultados obtenidos previamente. Como se muestra la Figura 28b, el efecto de los tratamientos en la síntesis de las proteínas virales se correspondió, en todos los casos, con el efecto en la producción de virus infeccioso.

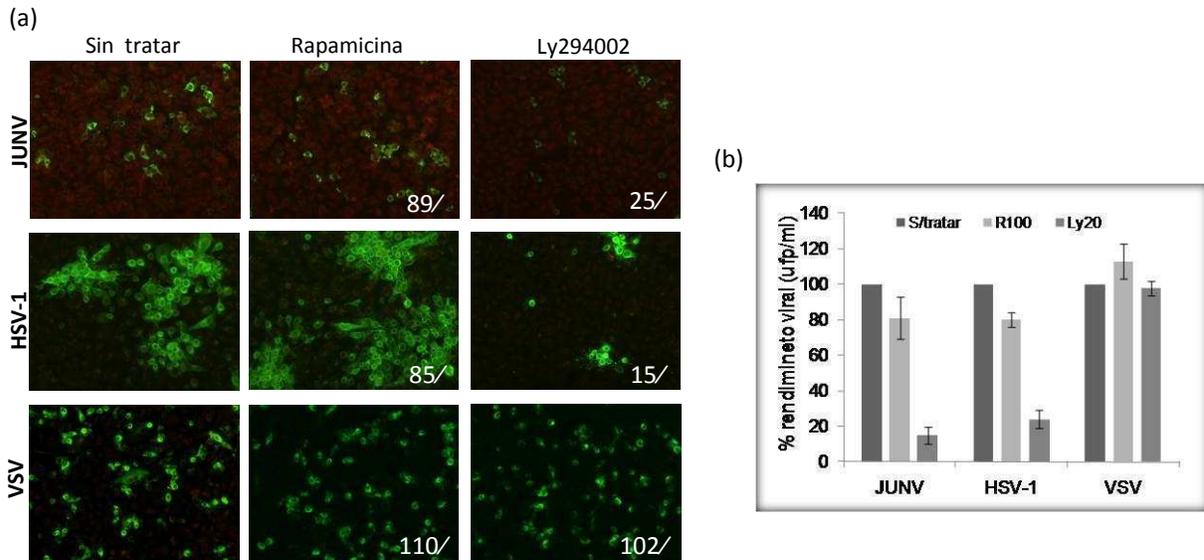


Figura 28. Efecto de distintos inhibidores de la vía PI3K/Akt/mTOR en la infección de JUNV, HSV-1 y VSV. (a) Células Vero mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno, fueron infectadas con JUNV (MOI de 1 ufp/cél.), HSV-1 (MOI de 0,01 ufp/cél.) o VSV (MOI de 0,001 ufp/cél.) durante 1h en presencia de inhibidores. Transcurrida la hora de adsorción las células fueron tratadas con 10 μ M de Ly294002 (Ly) o 100 nM de rapamicina (R) durante 24 hs. Luego del tratamiento las células fueron evaluadas por IFI a fin de determinar la expresión de N en el caso de JUNV o la expresión de los antígenos de superficie para HSV-1 y VSV. Los números en los paneles indican el porcentaje de células (+) para la expresión de los antígenos virales. Fotos en aumento 100X. (b). Los sobrenadantes obtenidos fueron cuantificados mediante ensayo de ufp.

1.2.2 Análisis de la expresión de dominantes negativos de Akt y 4E-BP en la replicación de JUNV

Los resultados presentados indicarían que en la estrategia traduccional de JUNV la participación del complejo mTOR/raptor no sería crucial. Sin embargo, el hecho de que la rapamicina no haya mostrado efectos considerables en la traducción cap-dependiente de las proteínas de HSV-1, cuestiona el uso de este inhibidor como única herramienta para definir dicha estrategia. Por esta razón, a fin de lograr una caracterización más detallada acerca de la participación de estos efectores, se evaluó el efecto de la sobre-expresión de dominantes negativos de Akt y 4E-BP, obtenidos mediante la alteración de sus respectivos sitios de fosforilación (Murga et al., 1998; Burgui, y col., 2007). De esta manera la proteína dominante negativa para Akt es incapaz de fosforilarse, y por lo tanto de activar a sus efectores, mientras que el dominante negativo de 4E-BP mantiene secuestrado al factor eIF4E, bloqueando específicamente al factor de unión al cap (Figura 29, esquema). Como se muestra en la Figura 29 panel superior, las células que expresan el dominante negativo de Akt (Akt-

mut) mostraron una significativa reducción en el número de células positivas para N en comparación con aquellas que expresan la proteína salvaje (Akt-wt) (20 / vs. 62 / , $p < 0,005$). Estos datos coinciden con los resultados obtenidos previamente, confirmando la participación de Akt en la replicación del virus. Sin embargo, la expresión del dominante negativo de 4E-BP (4EBP-mut) no tuvo efectos significativos en la expresión de N en comparación con la proteína salvaje (4EBP-wt) (70 / vs. 60 / , $p < 0,005$) (Figura 29, panel inferior).

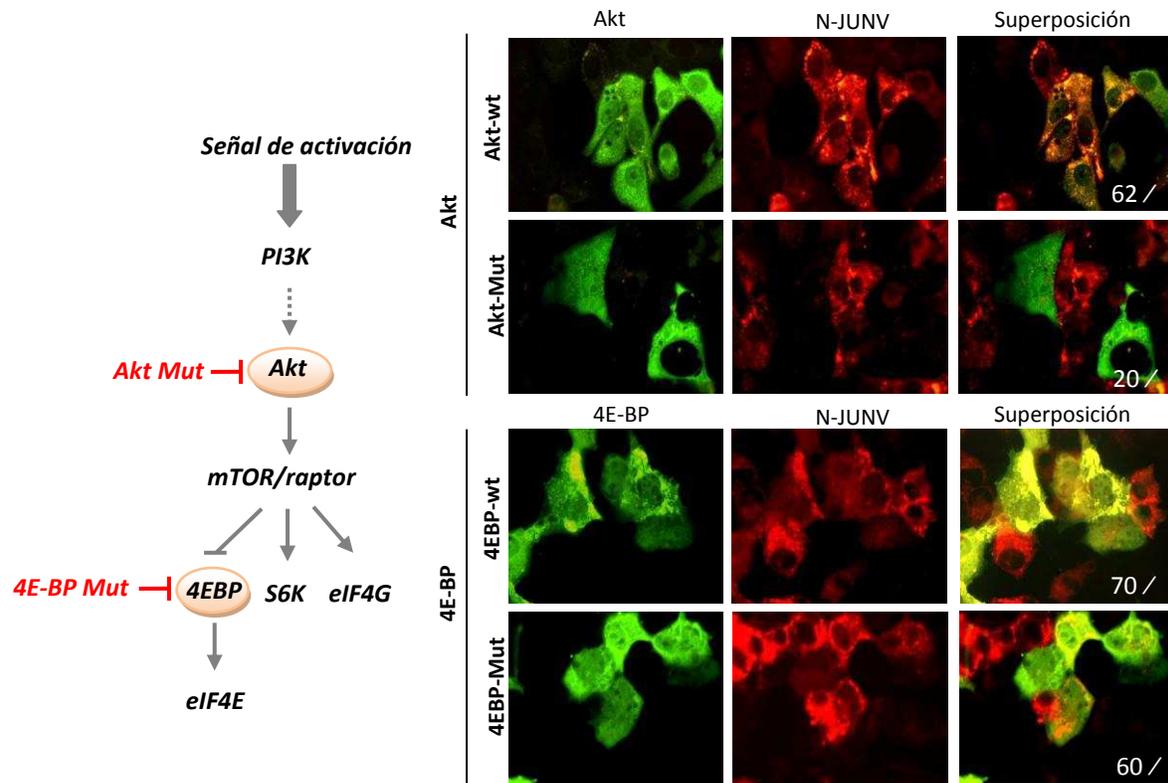


Figura 29. Efecto de la expresión de proteínas dominantes negativas de Akt y 4E-BP en la replicación de JUNV. Células Vero fueron transfectadas con plásmidos de expresión de proteínas dominantes negativas de Akt (Akt-Mut) o 4E-BP (4EBP-Mut) o de sus respectivas proteínas salvajes Akt-wt o 4EBP-wt. A las 24 hs post-transfección las células fueron infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél.. A las 24 hs p.i. las células fueron fijadas y procesadas para IFI a fin de evaluar la expresión de N y 4E-BP o Akt, mediante el uso de anticuerpos específicos. Fotos en aumento 400X. Los números indican el / de células transfectadas que expresan N calculado a partir de 150 células contadas en tres experimentos independientes.

Resultados similares fueron obtenidos cuando se cuantificó la producción de virus en los cultivos transfectados, observándose una reducción en la replicación de JUNV sólo en los cultivos transfectados con el dominante negativo de Akt (Figura 30a). Como control se evaluó el efecto de la expresión de estos mutantes en la replicación de VSV y HSV-1. Como muestra la Figura 30b la replicación de VSV no fue afectada por la expresión de ninguno de los dominantes negativos. Contrariamente la replicación de HSV-1 fue afectada por la expresión de ambas proteínas mutantes,

corroborando la necesidad de mantener esta vía activa por parte del virus para asegurar la eficiencia de su replicación (Figura 30c).

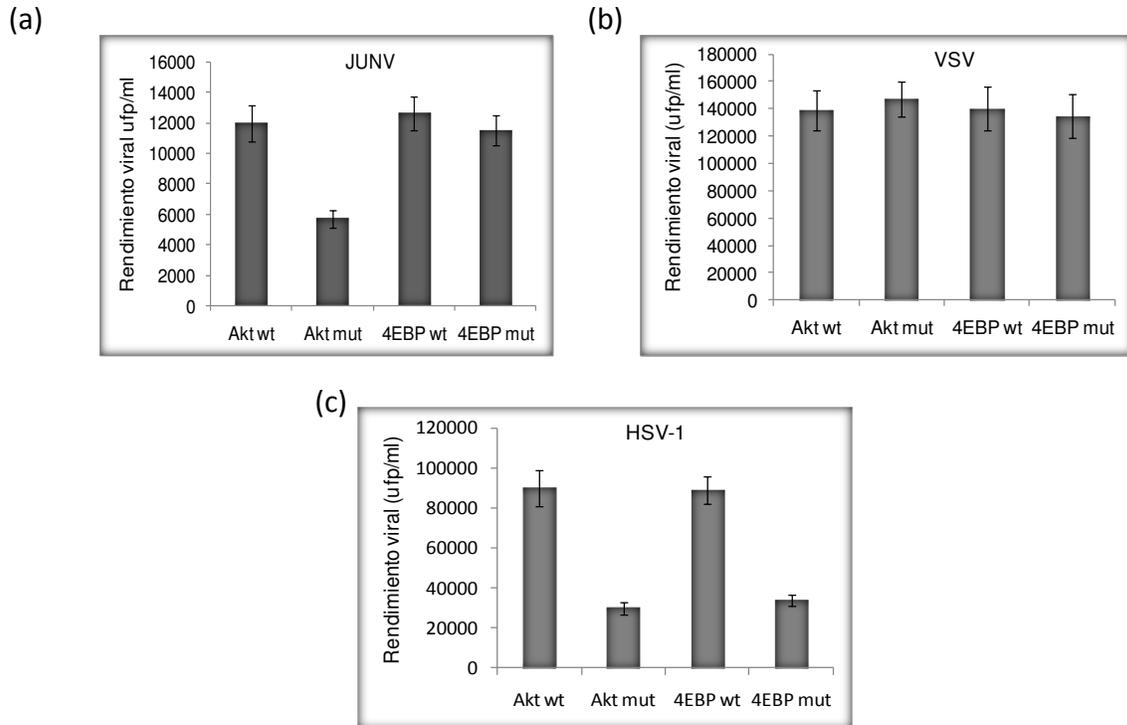


Figura 30. Producción de virus en células que expresan las proteínas dominantes negativas de Akt y 4E-BP. Células Vero fueron transfectadas con plásmidos de expresión de proteínas dominantes negativas de Akt (Akt-Mut) o 4E-BP (4EBP-Mut), o de sus respectivas proteínas salvajes Akt-wt o 4EBP-wt. A las 24 hs post-transfección las células fueron infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. (a), VSV a una MOI de 0,001 ufp/cél. (b) o HSV-1 a una MOI de 0,01 ufp/cél. (c). A las 24 hs p.i. los sobrenadantes fueron titulados mediante ensayos de ufp.

Estos resultados indican que si bien JUNV activa la vía de PI3K/Akt durante su ciclo de multiplicación y a pesar de la presencia de estructuras cap en el extremo 5' de sus mARNs, el bloqueo del factor eIF4E, uno de los principales factores traduccionales activados por dicha vía, no tiene efectos considerables en la replicación del agente viral, sugiriendo una posible estrategia de traducción independiente de este factor.

1.3 PARTICIPACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT/mTOR/RAPTOR EN LA INFECCIÓN PERSISTENTE DE JUNV

La activación de la vía de supervivencia de PI3K/Akt ha sido reportada como necesaria para el establecimiento de la infección persistente in vitro del coronavirus SARS (Mizutani y col., 2005). La activación de esta cascada de señalización permitiría que una población minoritaria de células sobreviva y logre establecer la persistencia. Sin embargo el bloqueo de la misma, una vez que la infección persistente ya se ha establecido, no tiene ningún efecto en los cultivos infectados, indicando que la activación de PI3K/Akt es necesaria para el establecimiento pero no para el mantenimiento de la infección persistente de SARS.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, y dado que JUNV induce infecciones persistentes in vitro, se evaluó la participación de PI3K/Akt en la persistencia de JUNV. En primer lugar se analizó si la activación de esta vía de señalización es necesaria para el establecimiento de la infección persistente. Con este fin células Vero fueron infectadas con JUNV y tratadas por un período de 7 días a diferentes tiempos p.i. con 10 μ M de Ly294002. Los tratamientos fueron realizados durante la primera (0-7 días p.i.), segunda (7-14 días p.i.), tercera (14-21 días p.i.) y cuarta semana (21-28 días p.i.) usándose como control un cultivo iniciado de la misma manera pero en ausencia de droga (Figura 31, esquema). El cultivo iniciado en ausencia de Ly294002, mostró características similares a las reportadas previamente para esta línea celular (Ellenberg y col., 2002), observándose ciclos de efecto citopático hasta los 85 días p.i.. A partir de los 100 días p.i. el cultivo dejó de producir virus infectivo, mostró moderada expresión de N y ausencia de expresión de G1, conservando su capacidad de formar sincicios a bajo pH. Este cultivo fue denominado V3 y se usó como cultivo control de persistencia.

Los cultivos tratados fueron evaluados cada 7 días durante el primer mes según la producción de virus infectivo y la síntesis de N.

Como se observa en la Figura 31, el cultivo tratado durante la primera semana (0-7 días p.i.) mostró una importante disminución en la síntesis de N, llegándose a niveles prácticamente nulos de expresión a los 21 días p.i.. Sin embargo, a los 28 días p.i. el cultivo presentó valores de expresión de N similares al control sin tratar. El cultivo tratado durante la segunda semana p.i. (7-14 días p.i.) presentó un comportamiento similar, observándose una disminución progresiva en la expresión de N, cuando el inhibidor fue retirado, llegándose a niveles prácticamente indetectables a los 28 días p.i.. En el cultivo tratado durante la tercera semana p.i. (14-21), también se detectó una disminución en la expresión de N, sin embargo, a los 7 días post-tratamiento los niveles de expresión de dicha proteína fueron comparables con los del control, observándose una recuperación más rápida del cultivo en la expresión del antígeno viral. A diferencia de estos cultivos, las células tratadas durante la cuarta semana de inicio de la infección no mostraron un efecto considerable en la expresión de N en

comparación con control. Este último resultado indicaría que el agregado de Ly294002 en estadios avanzados de la infección no tendría efectos en la replicación de JUNV. En trabajos de persistencia de LCMV se considera al cultivo como persistente a partir de los 20 días p.i., por lo cual se podría inferir que el bloqueo de PI3K una vez iniciada la persistencia no tendría efectos en el mantenimiento de dicha etapa.

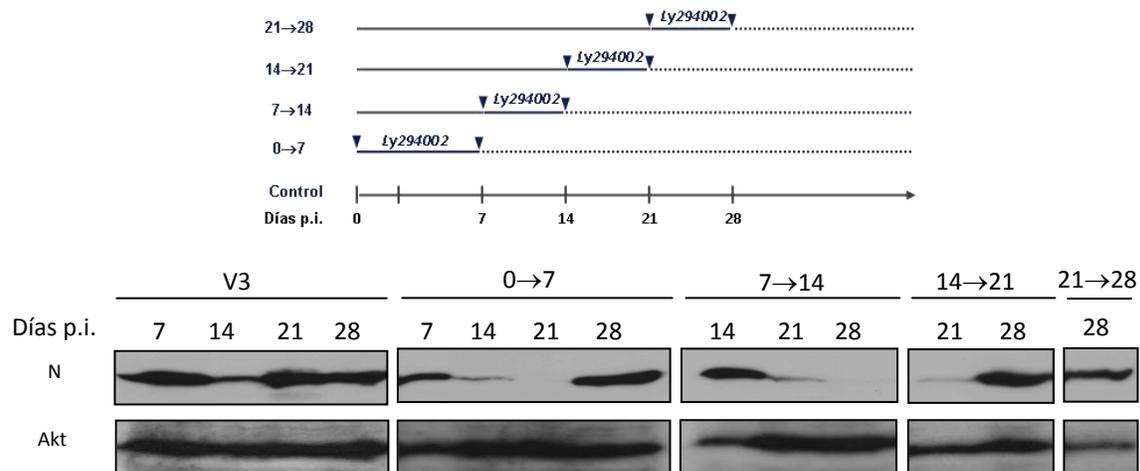


Figura 31. Efecto del inhibidor de PI3K, LY294002 en el inicio de la persistencia de JUNV. Células Vero mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno fueron infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. y no tratadas (control) o tratadas con 10 μ M de Ly294002 a distintos tiempos p.i. durante el lapso de 7 días. Transcurrido el período de tratamiento la droga fue retirada y los cultivos fueron mantenidos en medio 1,5/ de SFB. Cada 7 días duplicados de cada muestra fueron procesados para WB a fin de evaluar la expresión de N.

En vista de estos resultados podría considerarse que el bloqueo de PI3K/Akt mediante Ly294002, no tiene efecto en el inicio de la persistencia de JUNV, a excepción del tratamiento realizado durante la segunda semana, en el cual no se detectó expresión de N en el último tiempo evaluado. Este análisis se completó continuando con el estudio de los cultivos hasta los 120 días p.i.. Como se observa en la Figura 32, panel izquierdo, todos los cultivos expresaron N y G1 a los 70 días p.i., siendo los niveles de expresión de N similares en todos los tratamientos respecto del control, tanto por IFI como por WB. Resultados similares fueron observados a los 120 días p.i., a partir de este tiempo todos los cultivos se caracterizaron por la ausencia de producción de virus infeccioso y de expresión de G1, mientras que todos mostraron similares niveles de expresión de N (Figura 32, panel derecho). Respecto de la producción de virus infeccioso, el tratamiento de 21-28 días p.i., mostró un comportamiento muy similar al cultivo control, mientras que en el resto de los cultivos el tratamiento con Ly294002 si bien produjo una importante reducción en el rendimiento viral durante los primeros tiempos, a partir de los 28 días p.i. todos los cultivos mostraron una recuperación en la producción de

virus. A los 120 días p.i. no se detectó la producción de partículas en ninguno de los tratamientos, comportándose de esta manera en forma similar al control (datos no mostrados).

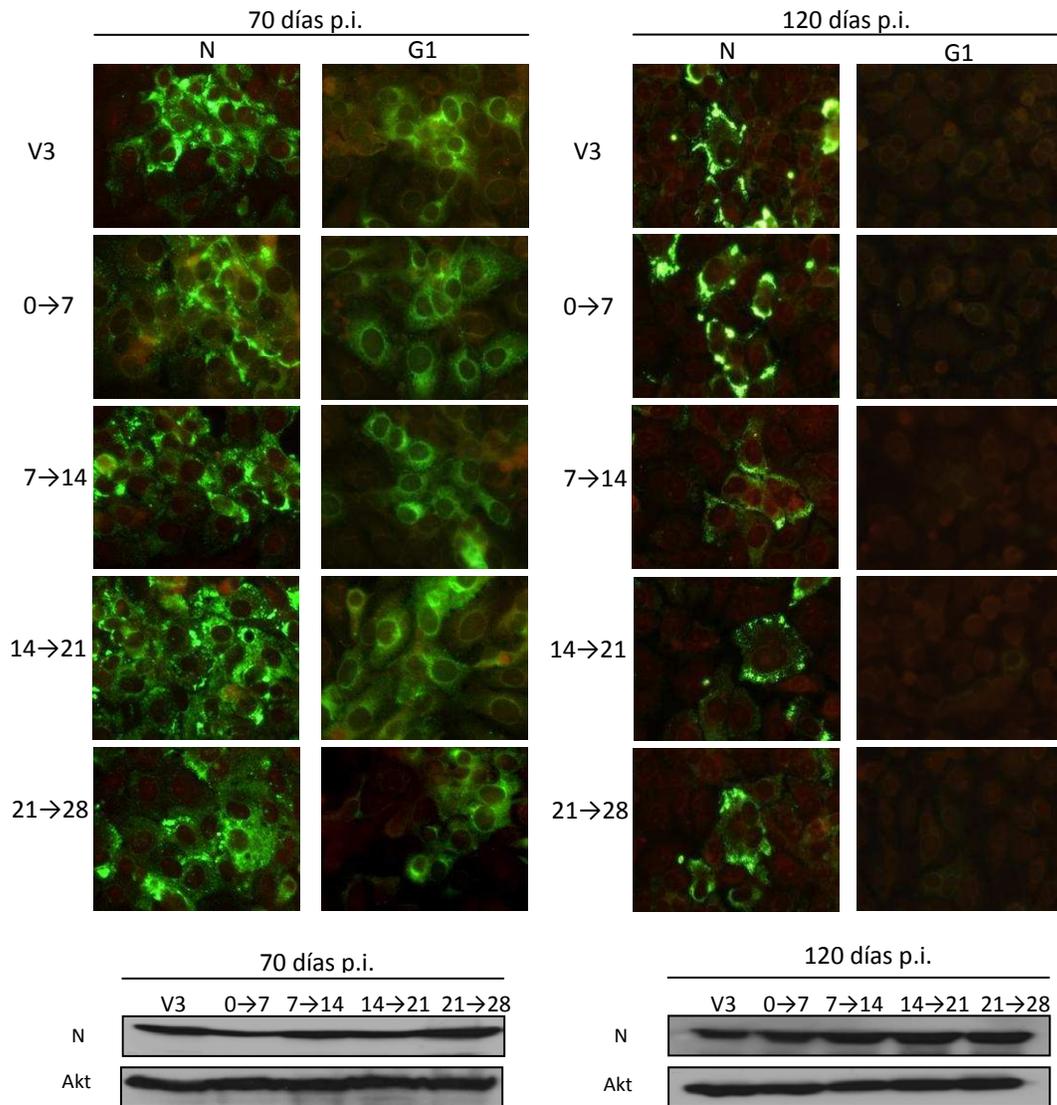


Figura 32. Progresión de los cultivos persistentemente infectados iniciados en presencia de LY294002. Los cultivos persistentemente infectados iniciados mediante el tratamiento a distintos días p.i. con $10 \mu\text{M}$ de Ly294002 mencionados en la figura anterior fueron evaluados a los 70 y 120 días p.i. según su capacidad de expresión de N o G1 (IFI). Fotos en aumento 400X. La síntesis de N fue evaluada mediante un ensayo de WB evaluándose como control de carga Akt.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que la activación de la vía de PI3K/Akt no sería un requisito indispensable para el inicio de la persistencia de JUNV. Si bien la inhibición de dicha vía durante las primeras semanas de infección mostró alteraciones en la multiplicación del virus, todos los cultivos alcanzaron un estadio de persistencia similar al obtenido en ausencia de la droga. Como se observa en el tratamiento realizado entre los días 21-28 p.i., cuanto

más avanzada fue la infección menos efecto causó el bloqueo de PI3K en la replicación de JUNV. Estos resultados coinciden con trabajos realizados con el virus SARS en los cuales se reporta que el tratamiento con inhibidores de PI3K una vez avanzada la infección, no tiene efecto en la persistencia de este agente viral (Mizutani y col., 2005).

A fin de evaluar si los cultivos una vez iniciada la persistencia se comportaban en forma similar a los cultivos infectados de manera aguda se decidió comparar el efecto de la inhibición de PI3K sobre los mismos. Con este fin se utilizó el cultivo persistentemente infectado obtenido en el ensayo anterior (V3) a los 130 días p.i., ya que en este tiempo el cultivo no producía virus infeccioso, eliminando de esta manera el efecto del Ly294002 en la entrada del virus. De acuerdo con los resultados ya presentados la inhibición de PI3K redujo la expresión de N en los cultivos infectados en forma aguda (Figura 33a, panel izquierdo). Por el contrario, el tratamiento con Ly294002 del cultivo persistentemente infectado no disminuyó la expresión de N, ni aún a la concentración de 30 μM (Figura 33a, panel derecho).

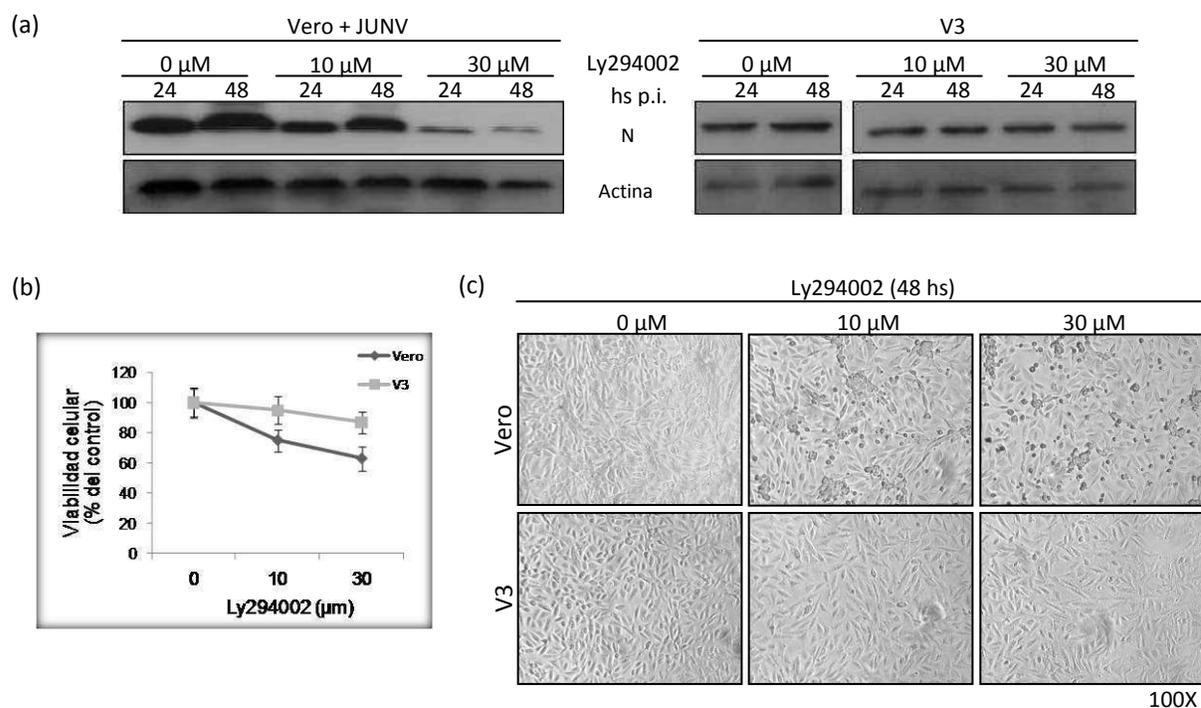


Figura 33. Efecto del tratamiento con Ly294002 sobre cultivos persistentemente infectados con JUNV. (a) Células Vero infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél., o células V3 de 130 días p.i., previamente mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno, fueron tratadas con 10 o 30 μM de Ly294002 durante 24 o 48 hs y posteriormente evaluadas mediante WB a fin de determinar la síntesis de N. (b) Células Vero o células V3 de 130 días p.i., mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno, fueron tratadas con 10 o 30 μM de Ly294002 durante 48 hs y evaluadas mediante un ensayo de viabilidad de MTT. (c) Alternativamente en un ensayo similar al descrito en el ítem anterior las células fueron fijadas y observadas mediante microscopía, para evaluar el efecto citopático de los cultivos.

Por otro lado, como se observa en la Figura 33b, el inhibidor mostró un efecto citotóxico marcado en los cultivos de células Vero, reduciendo un 40% la viabilidad del cultivo tratado con una concentración de 30 μ M de Ly294002. Estos resultados coinciden con la aparición de efecto citopático en los cultivos en función de la concentración de Ly294002 (Figura 33c). En el cultivo V3, sin embargo, la viabilidad se mantuvo elevada a la concentración de 30 μ M (90% viabilidad) y no se observó efecto citopático durante ninguno de los tratamientos (Figura 33b y 33c).

Estos resultados indican que la inhibición de PI3K en un cultivo persistentemente infectado con JUNV (V3) no afecta la síntesis de N. Por otro lado, el hecho que estas células no produzcan partículas virales elimina el efecto de la inhibición que podría ocurrir a nivel de la entrada del virus, con lo cual podría inferirse que la síntesis de antígenos virales no requiere la activación de esta vía, ya que el tratamiento con Ly294002 no redujo la síntesis de antígenos virales. Sin embargo dado que estos cultivos se caracterizan por expresar elevadas cantidades de N, la ausencia de inhibición observada en la síntesis de esta proteína, también podría deberse a un lento *turnover* de la misma. Finalmente otra posibilidad podría ser que la vía en estos cultivos persistentes no sea funcional, o bien que sea insensible al tratamiento con Ly294002. Por este motivo se analizó la funcionalidad de la vía, evaluando la activación de la misma inducida por JUNV e insulina. Células Vero y V3, fueron infectadas con JUNV o tratadas con insulina en presencia o ausencia de 10 μ M de Ly294002. A los 15 min post-contacto las células fueron procesadas para WB a fin de evaluar la activación de Akt mediante la aparición de su forma fosforilada. Como se observa en la Figura 34a, la activación basal de Akt fue similar en los cultivos de células Vero en comparación con las células V3 (calles 1 y 6). Por otro lado el agregado de insulina mostró una activación marcada de Akt tanto en células Vero como V3 (calles 2 y 7) siendo ambas activaciones susceptibles al tratamiento con LY294002 (calles 3 y 8). Resultados similares fueron observados frente a la infección con JUNV, donde se detectó la activación de Akt tanto en el cultivo V3 como en las células Vero (calles 4 y 9) siendo nuevamente ambas activaciones bloqueadas por el tratamiento con el inhibidor de PI3K (calles 5 y 10). Estos resultados muestran que en el cultivo persistente V3, la vía de señalización de PI3K/Akt presentaría un comportamiento similar al cultivo sin infectar. De hecho, la sobreinfección de las células V3 con JUNV mostró una cinética de activación de Akt similar a la observada durante la infección aguda, con un pico de activación a los 15 min p.i. y un segundo pico de activación entre los 90-120 min p.i. (Figura 34b).

Cuando se evaluó la entrada de Tfr, se observó que la misma fue incorporada al cultivo persistentemente infectado, mostrando un patrón perinuclear difuso, el cual fue modificado por el tratamiento con Ly294002, observándose la aparición de estructuras vesiculares citoplasmáticas (Figura 34c).

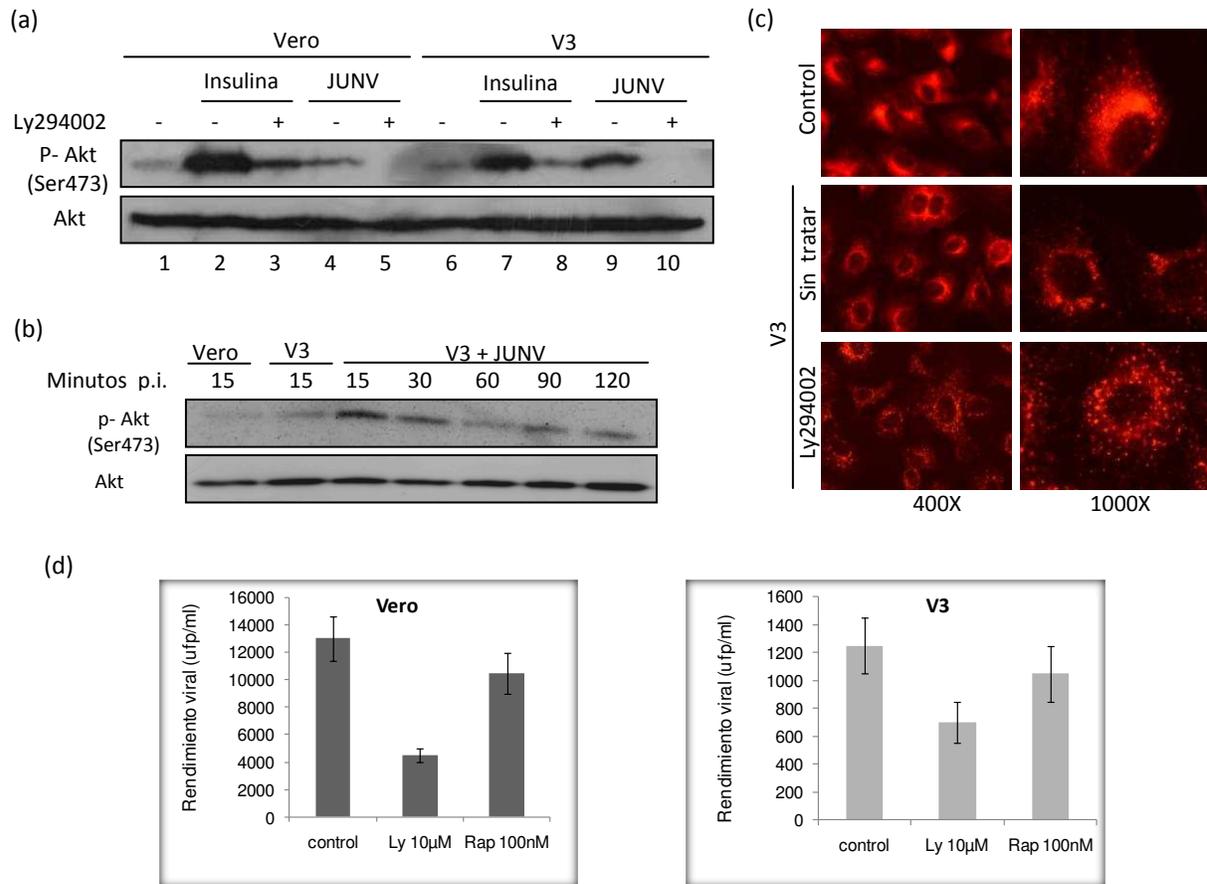


Figura 34. Análisis de la funcionalidad de la vía PI3K/Akt/mTOR en el cultivo persistentemente infectado (V3). (a) Células Vero o células V3 (130-150 días p.i.), mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno, fueron infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. o estimuladas con 240 µM de insulina en presencia (+) o ausencia (-) de 10 µM de Ly294002 durante 15 min. Transcurrido este tiempo las células fueron procesadas para WB a fin de analizar la presencia de Akt fosforilada (Ser473). (b) Células V3 (130-150 días p.i.) mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno, fueron infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. A distintos tiempos p.i. las células fueron procesadas para WB a fin de evaluar la presencia de P-Akt (Ser473). Como control se utilizaron células V3 y vero sin infectar. (c) Células Vero o células V3 (de 130-150 días p.i.), mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno, fueron incubadas con 20 µg/ml de transferrina conjugada con FITC (Tfr-FITC) en presencia a ausencia de 10 µM de Ly294002. A los 45 min las células fueron fijadas y observadas por microscopía de fluorescencia. (d) Células Vero o células V3 (130-150 días p.i.), mantenidas durante 24 hs en medio de ayuno, fueron infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. en presencia de 10 µM de Ly294002 o 100 nM de rapamicina. Los cultivos fueron tratados durante 24 hs, tiempo al cual los sobrenadantes fueron titulados mediante ensayo de ufp. Ly = Ly294002; Rap = rapamicina

Finalmente se determinó si la sobreinfección con JUNV en las células V3, era igualmente afectada por el bloqueo de la vía PI3K/Akt/mTOR en comparación con una infección aguda. Como se observa en la Figura 34d los cultivos V3 mostraron una resistencia a la sobreinfección con virus homólogo, característica de estos cultivos, observándose una reducción de aproximadamente 1 log en comparación con el cultivo infectado de manera aguda. El tratamiento con Ly294002 mostró una reducción del rendimiento viral en ambos cultivos, observándose una disminución levemente inferior

en los cultivos persistentes, mientras que el tratamiento con rapamicina no mostró tener efectos considerables en ninguno de los cultivos evaluados.

En su conjunto estos resultados indican que la resistencia al tratamiento con inhibidores de PI3K/Akt/mTOR/raptor observada en el cultivo persistente V3 no se debería a una alteración de la vía, ya que la misma se encuentra funcional en dicho cultivo. De esta manera el cultivo V3 fue capaz de activar la vía frente al tratamiento con insulina, como así también frente a la sobre-infección con JUNV, observándose en este último caso un patrón de activación similar al observado en cultivos no persistentes. Por otro lado ambas activaciones, así como la incorporación de Tfr, fueron bloqueadas por el agregado de Ly294002, indicando que el inhibidor es funcional en dicho cultivo.

1.4 CONCLUSIONES PARCIALES CAPÍTULO I

- La infección con JUNV activa la vía de PI3K/Akt para favorecer su mecanismo de entrada a la célula blanco.
- La regulación de la traducción cap-dependiente mediada por la activación del complejo mTOR/raptor (efector de Akt) no sería crucial en la traducción de los mARNs virales, ya que el secuestro de eIF4E, mediante la expresión de un dominante negativo de 4E-BP, o la inhibición del mismo mediante rapamicina, no tiene efectos marcados sobre la replicación de JUNV, sugiriendo un mecanismo de traducción alternativo al uso de este factor.
- La activación de la vía de señalización de PI3K/Akt no cumple un rol clave en la transición de la infección aguda a la infección persistente ni en el mantenimiento de la misma. Por otro lado, pesar de que estos cultivos muestran funcional a la vía de PI3K/Akt/mTOR, el tratamiento con inhibidores de la misma no altera la síntesis de antígenos virales.

2. REGULACIÓN DE eIF2 EN EL CICLO DE MULTIPLICACIÓN DE JUNV: RESPUESTA AL ESTRÉS CELULAR

La regulación del factor eIF2 constituye otro de los puntos de control del inicio de la traducción evaluado en este trabajo. La importancia de este factor reside principalmente en su capacidad de regular la unión del Met-tARNi a la subunidad ribosomal 40S. La fosforilación de eIF2 en la subunidad α constituye una de las principales respuestas celulares activadas frente al estrés cuya consecuencia es el bloqueo temporal del inicio de la traducción. Las infecciones virales son detectadas como una señal de estrés dados los múltiples cambios fisiológicos inducidos durante la infección. Esta respuesta, en muchos casos, interfiere con la replicación viral, resultando perjudicial para la multiplicación de estos agentes. La mayoría de los virus requieren de la participación del factor eIF2 para su replicación, por lo cual han desarrollado numerosas estrategias a fin de evitar la respuesta celular tendiente al bloqueo de este factor. Sin embargo, existen excepciones tales como el virus de la parálisis del grillo, el cual dirige la incorporación del primer aminoácido alanina en lugar de metionina en el sitio ribosomal A, prescindiendo de la actividad de eIF2 (Wilson y col., 2000).

El escaso shut-off observado durante la infección in vitro con JUNV, así como la modulación del efecto citopático, sugieren la existencia de un mecanismo de regulación de la respuesta celular frente a la infección de este virus. En base a esta hipótesis se analizó entonces la modulación viral de la respuesta de estrés celular evaluando la fosforilación de eIF2 α y su relación con la formación de gránulos de estrés.

2.1 ESTUDIO DE LA RESPUESTA AL ESTRÉS CELULAR EN LA INFECCIÓN AGUDA DE JUNV

2.1.1 Análisis de la formación de gránulos de estrés y fosforilación de eIF2 α

A fin de analizar la modulación de la respuesta celular de estrés frente a la infección con JUNV, se evaluó en primer lugar, si la infección con este virus induce la formación de gránulos de estrés (SGs). Dicho análisis fue realizado mediante el empleo de los marcadores TIA-1 y PABP-1. Como se observa en la Figura 35a, panel derecho, no se detectó la presencia de gránulos de estrés tanto en los cultivos no infectados (control) como en los cultivos infectados con JUNV. A su vez, la ausencia de SGs en estos últimos, no se debió a una baja o ineficiente infección, ya que como se observa en la Figura 35a, panel izquierdo, a las 24 hs p.i. los cultivos mostraron una expresión de 15 ± 6 / 26 ± 7 / de G1 y N, respectivamente, mientras que a las 48 hs p.i. el 69 ± 7 / del cultivo expresa N, y el 55 ± 7 / expresa G1.

Por otro lado puede observarse que la infección con JUNV no modificó la localización subcelular de los marcadores de estrés TIA-1 y PABP-1, dicho de otra manera, la localización celular de estos marcadores fue similar en células no infectadas e infectadas con JUNV, eliminando la posibilidad de que la re-localización de los mismos fuera la causa de la ausencia de SGs observados durante la infección (Figura 35a, panel derecho).

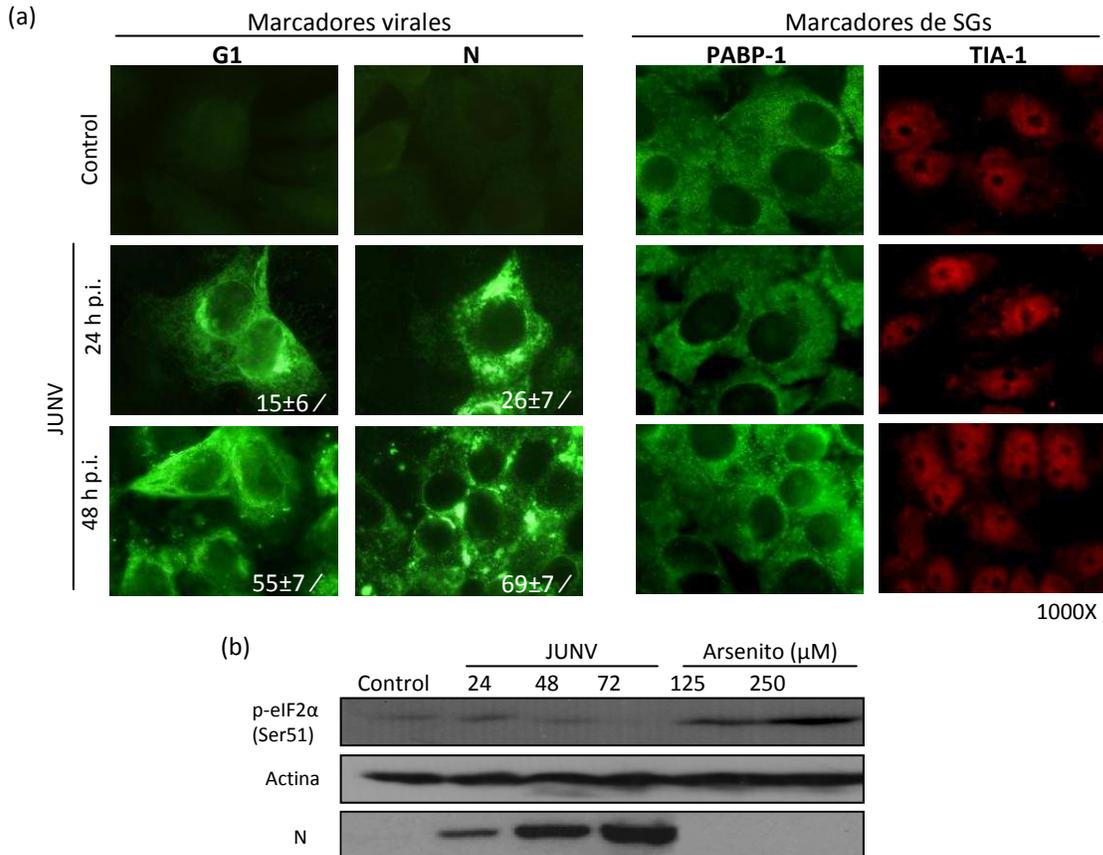


Figura 35. Respuesta de estrés celular frente a la infección con JUNV. (a) Células Vero fueron no infectadas (control) o infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. y a las 24 y 48 hs p.i. las células fueron fijadas y procesadas para IFI. Panel izquierdo: Patrón de expresión de los antígenos virales G1 y N. Los números indican el / de células positivas para cada caso, obtenidos a partir de 200 células contadas en tres ensayos independientes. El error corresponde al SD de la media. Panel derecho: patrón de expresión de de los antígenos celulares marcadores de estrés, TIA-1 y PABP-1 (b) Células Vero fueron infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. y procesadas a las 24, 48 y 72 hs p.i. para WB a fin de evaluar la presencia de P-eIF2α (Ser51). Como control de fosforilación se emplearon células Vero tratadas con arsenito de sodio 125 y 250 μM durante 1h.

Dado que la formación de gránulos de estrés es un fenómeno estrechamente relacionado con la fosforilación de eIF2α, y en base a que esta fosforilación constituye una de las respuestas celulares antivirales más importantes, se evaluó el estado de fosforilación de este factor a lo largo de la infección con JUNV. Como muestra la Figura 35b, no se detectaron niveles significativos de fosforilación en ninguno de los tiempos evaluados, en comparación con las células no infectadas (control), confirmando los resultados obtenidos por microscopía, en los cuales no se detectó la

presencia de SGs durante la infección con JUNV. Como control de fosforilación se empleó al inductor de estrés oxidativo arsenito de sodio el cual indujo una marcada fosforilación de eIF2 α .

2.1.2 Estudio de la respuesta a distintos estímulos de estrés en células infectadas con JUNV

Los resultados presentados en la sección anterior sugieren dos posibles hipótesis a fin de explicar la ausencia de fosforilación de eIF2 α con el consecuente impedimento en la formación de SGs. En la primera opción podría considerarse que el nivel de replicación de JUNV no fuera lo suficientemente elevado como para inducir una respuesta de estrés; en este caso el cultivo infectado conservaría su capacidad de responder frente a otros estímulos de estrés. La segunda opción podría contemplar el hecho de que JUNV manipule el mecanismo de respuesta celular de estrés, resultando en una alteración de la capacidad de las células infectadas de responder frente a otros estímulos de estrés. En este último caso, a su vez el virus podría estar manipulando un aspecto general de la respuesta o bien un tipo específico de respuesta a estrés. En base a estas posibilidades el siguiente objetivo consistió en evaluar la capacidad de respuesta de los cultivos infectados con JUNV frente a la exposición de distintos agentes inductores de estrés.

2.1.2.a Estrés oxidativo

En primer lugar, se analizó la respuesta al estrés oxidativo en células Vero empleando arsenito de sodio como inductor. Como muestra la Figura 36a, la formación de SGs inducidos por este agente fue dependiente de la concentración utilizada, observándose en el tratamiento con 500 μ M la presencia de SGs en el 90 \pm 8 / de las células. En base a estos resultados se realizó un ensayo similar en células Vero infectadas con JUNV y tratadas con 500 μ M de arsenito de sodio a distintos tiempos p.i.. En la Figura 36b, panel derecho, se observa que con el progreso la infección disminuyó la capacidad del cultivo de formar SGs frente al tratamiento con arsenito, observándose un 25 \pm 4 / y un 37 \pm 6 / de células con SGs a las 48 hs p.i., para el marcador PABP-1 y TIA-1, respectivamente, frente a un 60 \pm 9 / y 90 \pm 8, detectado en las células sin infectar. Por otro lado en la Figura 36b, panel izquierdo, se observa que el tratamiento con arsenito no modificó la expresión de antígenos virales como así tampoco disminuyó el porcentaje de células que expresan N y G1, siendo similares a los observados en ausencia de arsenito.

Estos resultados indican que la infección con JUNV altera el mecanismo de respuesta a estrés oxidativo en células Vero, limitando la capacidad del cultivo infectado de formar SGs frente al tratamiento con arsenito de sodio.

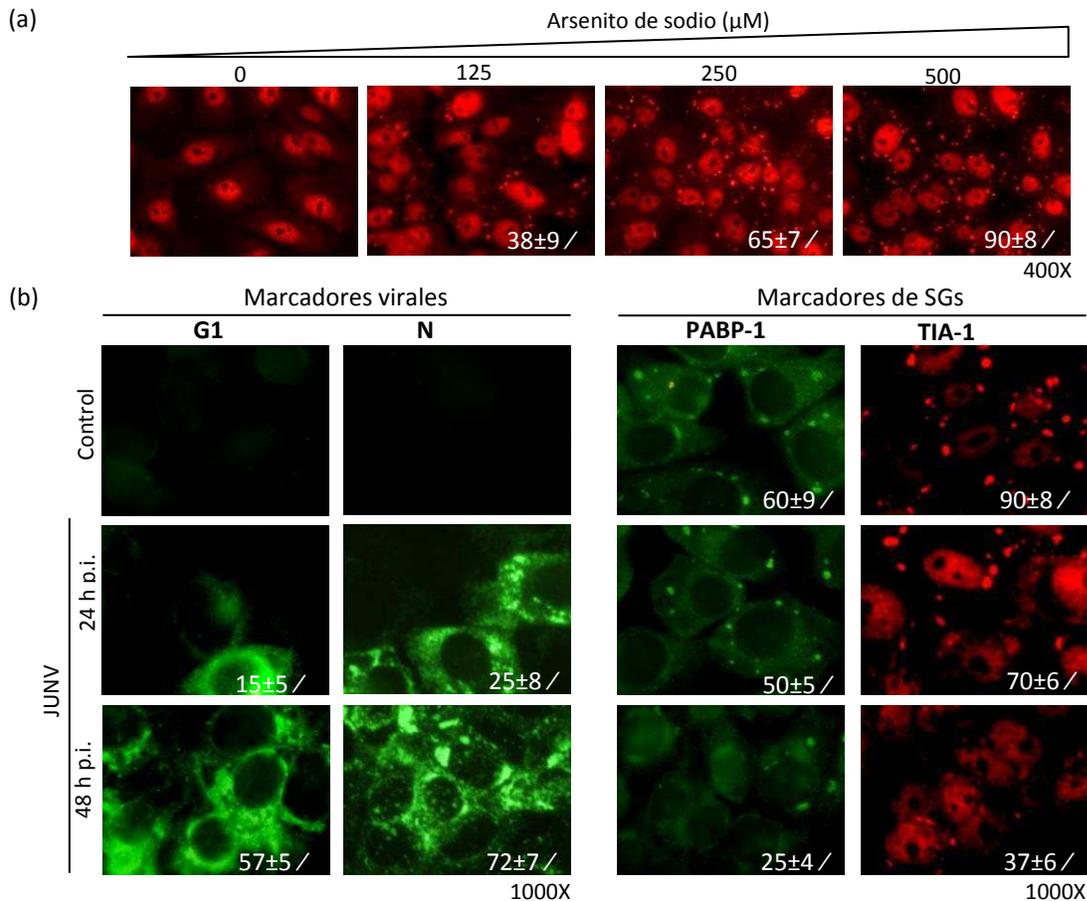


Figura 36. Respuesta al estrés oxidativo en células Vero infectadas con JUNV. (a) Células Vero fueron tratadas con distintas concentraciones de arsenito de sodio durante 1 h. Transcurrido este tiempo las células fueron fijadas y procesadas para IFI a fin de evaluar la formación de SGs empleando el marcador TIA-1. Los números indican el / de células con SGs obtenido a partir de 150 células contadas en cada preparado. (b) Células Vero fueron no infectadas (control) o infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. y tratadas a las 24 y 48 hs p.i. con 500 μM de arsenito de sodio durante 1 h. Panel izquierdo: patrón de expresión de los antígenos virales G1 y N. Panel derecho: patrón de expresión de los marcadores de SGs, PABP-1 y TIA-1. Los números indican el / de células positivas para los antígenos virales G1 o N (panel izquierdo) o el / de células con SGs marcados con PABP-1 o TIA-1 (panel derecho). Los porcentajes fueron obtenidos a partir de un total de 150 células contadas en cada ensayo y corresponden a la media de tres experimentos independientes donde el error corresponde al SD de la media.

Dada la estrecha relación observada entre los PBs y los SGs también se analizó el patrón de expresión del factor eIF4E, un marcador compartido entre ambos tipos de gránulos. De esta manera en condiciones normales, eIF4E se encuentra formando parte de PBs mientras que cuando las células son sometidas a un estímulo de estrés se observa tanto en PBs como en SGs. Como marcador específico de PBs se analizó la proteína Hedls, marcador que sólo se encuentra formando parte de estas estructuras. Como se observa en la Figura 37a, eIF4E se encontró formando parte de PBs tanto en células no infectadas como en células infectadas con JUNV, observándose un patrón similar de expresión de dicho marcador. Sin embargo, cuando las células fueron sometidas a estrés oxidativo se observó la formación de SGs positivos para eIF4E en un 60±8 / de células no infectadas, mientras que

en las células infectadas con JUNV el porcentaje de células con SGs se redujo al $15\pm 5\%$ a las 48 hs p.i., confirmando los resultados obtenidos con los marcadores TIA-1 y PABP-1. Por su parte, el análisis del marcador Hedls mostró un patrón de expresión similar en ausencia de estrés en células infectadas o no infectadas, de acuerdo a lo observado para eIF4E. Sin embargo cuando los cultivos fueron tratados con arsenito de sodio se detectó un aumento en el tamaño y un leve aumento en el número de PBs en ambos cultivos, indicando que la infección con JUNV no modificaría la dinámica de estos cuerpos de silenciamiento durante su multiplicación (Figura 37b). Estos resultados muestran que si bien PBs y SGs son estructuras relacionadas, que incluso tienen marcadores en común, la manipulación de JUNV sería exclusiva sobre los SGs, mientras que los PBs no serían afectados durante la infección.

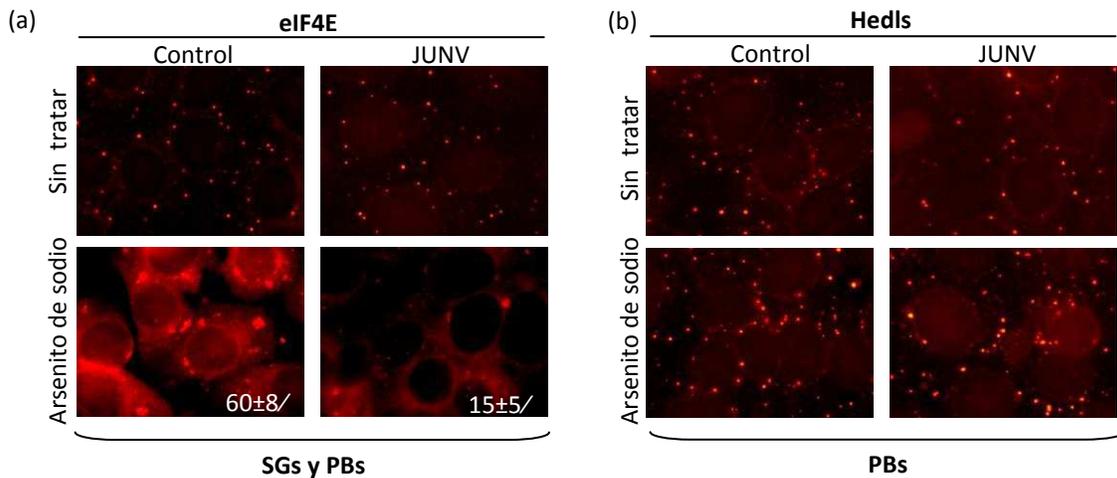


Figura 37. PBs en la replicación de JUNV. Células Vero no infectadas (control) o infectadas con JUNV a una MOI de 1ufp/cél. fueron tratadas o no tratadas a las 48 hs p.i. durante 1 h con arsenito de sodio $500\ \mu\text{M}$. Luego del tratamiento las células fueron procesadas para IFI a fin de determinar la expresión de eIF4E (a) y Hedls (b). Los números indican el $\%$ de células con SGs obtenido a partir de 150 células contadas en tres ensayos independientes donde el error corresponde al SD de la media. Fotos en aumento 1000X.

Con la finalidad de evaluar si la expresión de los antígenos virales estaba relacionada con el impedimento en la formación de SGs, se analizó simultáneamente la expresión de N y TIA-1 en células infectadas con JUNV. En este ensayo N fue elegida como marcador dado que constituye el antígeno viral expresado en forma más temprana y en mayor abundancia. En la Figura 38a, panel izquierdo, se observa la ausencia de SGs tanto en células positivas como negativas para la expresión de N, confirmando los resultados obtenidos previamente, donde no se detectó respuesta a estrés frente a la infección. Sin embargo cuando el cultivo infectado fue tratado con arsenito de sodio se observó una reducción en la formación de SGs particularmente en las células positivas para N [N (+)] donde sólo el $15\pm 5\%$ de las mismas fueron capaces de inducir SGs. Contrariamente, en el mismo preparado, el $92\pm 10\%$ de las células negativas para la expresión de N presentaron SGs siendo este último valor comparable con el observado en el cultivo no infectado tratado con arsenito, donde el $97\pm 5\%$ de las

células presentaron estas estructuras (Figura 38a, panel derecho). Estos resultados señalan como mecanismo clave de inhibición de la formación de SGs a la expresión de antígenos virales, ya que en el preparado infectado, las células que no expresaron N o bien expresaron bajos niveles de dicha proteína, presentaron una expresión de SGs comparable a la del cultivo sin infectar.

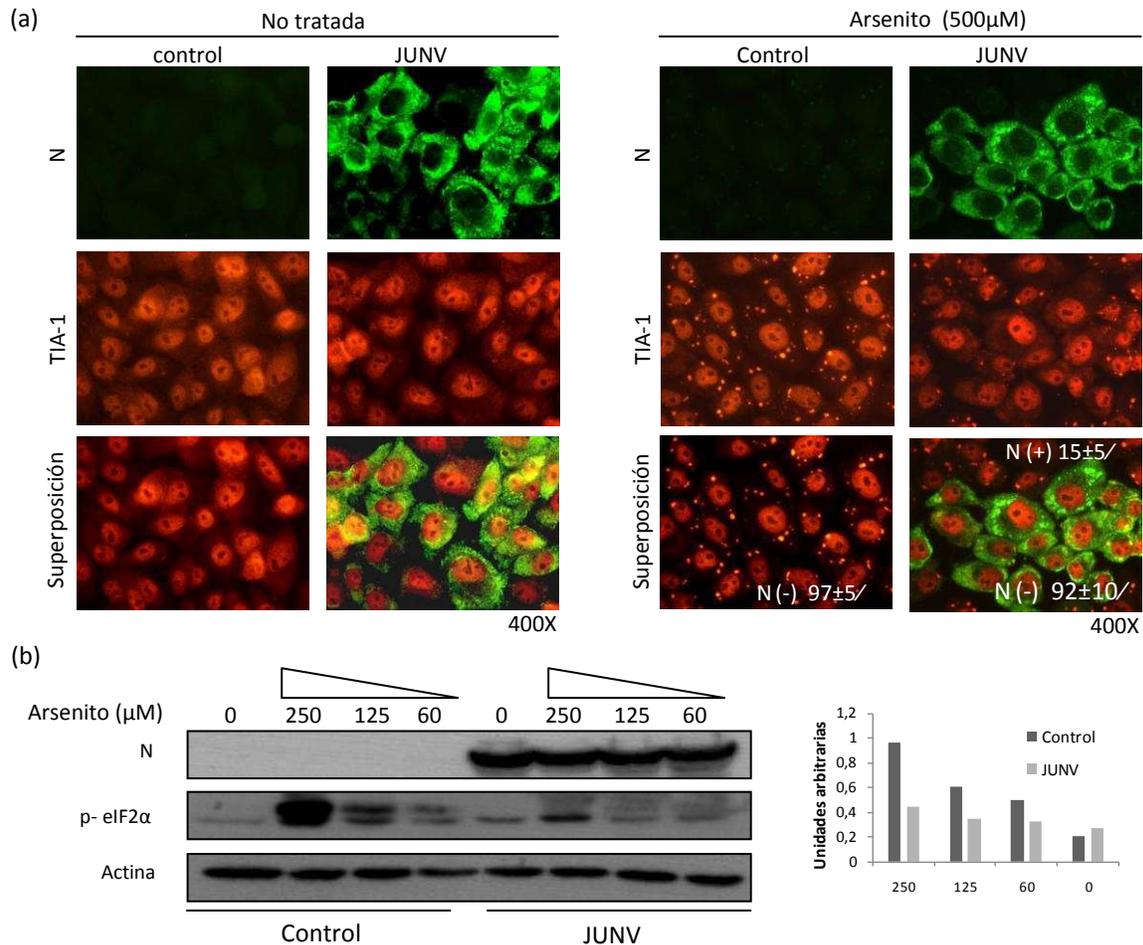


Figura 38. Formación de SGs y fosforilación de eIF2α en células infectadas con JUNV y tratadas con arsenito de sodio. (a) Células Vero no infectadas (control) o infectadas con JUNV (MOI de 1 ufp/cél.) fueron tratadas o no tratadas a las 24 hs p.i. con 500 µM de arsenito de sodio durante 1h y procesadas para IFI a fin de evaluar la expresión de N y la formación de SGs positivos para TIA-1. IFI doble de N y TIA-1 en células no tratadas (panel izquierdo) y en células tratadas (panel derecho). Los números en los paneles indican la media del / de células N (-) o N (+) con SGs obtenida a partir de 3 experimentos independientes donde el error corresponde al SD respectivo. El / fue obtenido a partir de 350 células totales contadas en cada experimento. (b) Células Vero no infectadas (control) o infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. fueron no tratadas (0) tratadas a las 48 hs p.i. con distintas concentraciones de arsenito de sodio durante 1 h. Transcurrido el tratamiento las células fueron procesadas para WB a fin de evaluar la fosforilación de eIF2α (Ser51). El grafico de la derecha corresponde a la cuantificación de p-eIF2α, expresada como unidades arbitrarias calculadas como el coeficiente entre p-eIF2α y actina respecto del control sin tratar no infectado

Posteriormente para determinar si este impedimento en la formación de SGs se relacionaba con una alteración de eIF2α, se evaluó la fosforilación de dicho factor en células Vero infectadas con JUNV y tratadas con distintas concentraciones de arsenito de sodio. Los resultados obtenidos

comprobaron que la infección con el virus provocó una marcada inhibición en la fosforilación de eIF2 α en comparación con el cultivo sin infectar, frente al tratamiento con este inductor (Figura 38b). En su conjunto estos resultados indican que las células infectadas con JUNV, particularmente aquellas que expresan N, muestran una resistencia al estrés oxidativo que sería mediada fundamentalmente a través de la inhibición de la fosforilación de eIF2 α .

Finalmente con el propósito de analizar las consecuencias de la respuesta a estrés oxidativo en la multiplicación de JUNV, se evaluó en primer lugar, el efecto del pre-tratamiento de las células con arsenito de sodio previo a la infección. Como se observa en la Figura 39a el pre-tratamiento con este inductor redujo la multiplicación de JUNV, corroborando que la activación de esta vía de estrés resulta perjudicial en la replicación viral. Por otro lado, el tratamiento con arsenito de sodio redujo considerablemente la incorporación de marca radiactiva en la síntesis de la proteína N, indicando que la activación de esta vía tendría consecuencias directas en la traducción viral (Figura 39b).

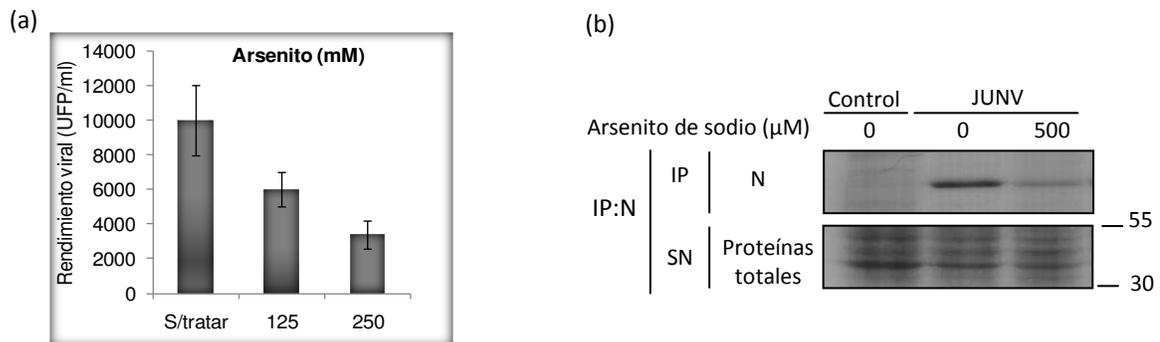


Figura 39. Efecto del tratamiento con arsenito de sodio en la multiplicación de JUNV. (a) Células Vero fueron pre-tratadas durante 1 h con distintas concentraciones de arsenito de sodio y posteriormente infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél.. A las 24 hs p.i. los sobrenadantes fueron cosechados y titulados mediante ensayo de ufp. (b) Células Vero fueron infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. y a las 48 hs p.i. fueron ayunadas durante 1 h con DMEM deficiente en metionina y cisteína en presencia de arsenito de sodio 500 μ M e incubadas posteriormente durante 2 h con DMEM suplementado con metionina y cisteína marcadas con 35 S en presencia de la droga. Posteriormente las muestras fueron inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti-N, resueltas en un gel Bis-Tris y finalmente reveladas por autorradiografía.

Estos resultados sugieren que uno de los objetivos principales de la modulación de la respuesta al estrés oxidativo ejercida por JUNV sería impedir que dicha respuesta afecte su eficiencia de replicación mediante la alteración de la síntesis de las proteínas virales.

2.1.2.b Estrés de retículo endoplasmático

Para investigar si esta alteración en la respuesta al estrés era específica del tipo de inductor utilizado se evaluó la respuesta a estrés frente al tratamiento con ditioneitol (DTT) y thapsigargina, drogas que desencadenan una respuesta a estrés de retículo endoplasmático (RE). En primer lugar se determinó la formación de SGs inducida por estos inhibidores en un cultivo no infectado, observándose que en ambos casos la inducción de estas estructuras fue dependiente de la concentración determinándose un 65 ± 11 / y 95 ± 4 / de células con SGs a las máximas concentraciones ensayadas para thapsigargina y DTT, respectivamente (Figura 40).

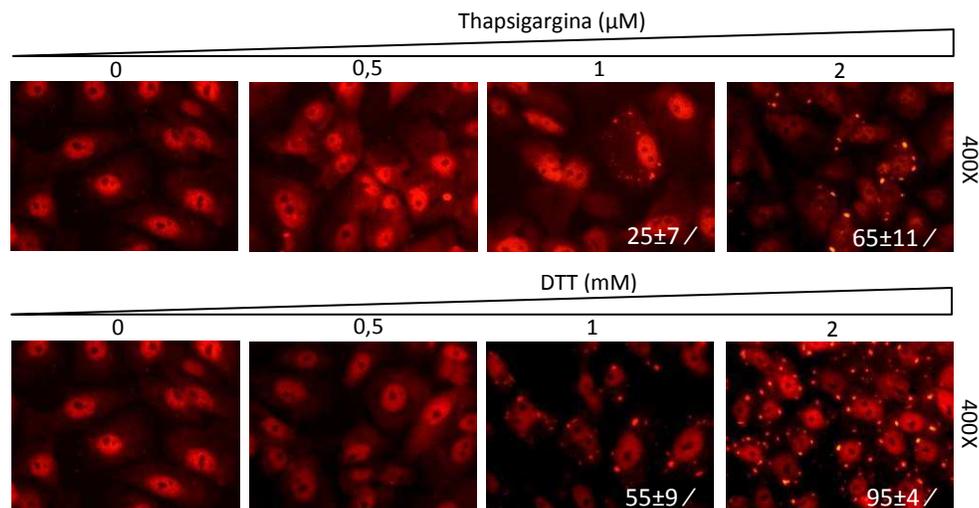


Figura 40. Formación de SGs como respuesta a estrés de retículo endoplasmático (RE). Células Vero fueron tratadas con distintas concentraciones de los inductores de estrés de RE thapsigargina (μM) o DTT (mM) durante 1 h. Transcurrido este tiempo las células fueron fijadas y procesadas para IFI a fin de evaluar la formación de SGs empleando a la proteína TIA-1 como marcador. Los números indican el % de células con SGs obtenido a partir de 150 células contadas en 3 ensayos independientes donde el error corresponde al SD de la media.

Posteriormente se evaluó la respuesta a estrés de RE en células Vero infectadas con JUNV. Como se observa en la Figura 41a, panel izquierdo, las células positivas para la expresión de N, mostraron una reducción moderada en la formación de SGs, determinándose que un 39 ± 7 / de las mismas presentaron SGs frente a un 65 ± 6 / observado en las células sin infectar tratadas con thapsigargina. Resultados similares fueron observados frente al tratamiento con DTT donde, a pesar de que este inductor produjo un 93 ± 6 / de células con SGs en los cultivos no infectados, en las células que expresaban N este porcentaje se redujo a 55 ± 8 / (Figura 41a, panel derecho). Sin embargo, cuando se determinó el estado de fosforilación de eIF2 α frente al tratamiento con estos inductores, se observó que la infección con JUNV no impidió la fosforilación de este factor, observándose un nivel de fosforilación similar al del cultivo sin infectar (Figura 41b). Estos resultados indicarían que la

infección con JUNV altera parcialmente la respuesta a estrés de RE. Es así que si bien la expresión de antígenos virales redujo moderadamente la capacidad de las células de formar SGs, esta inhibición no se relacionó con la alteración en los niveles de fosforilación de eIF2 α .

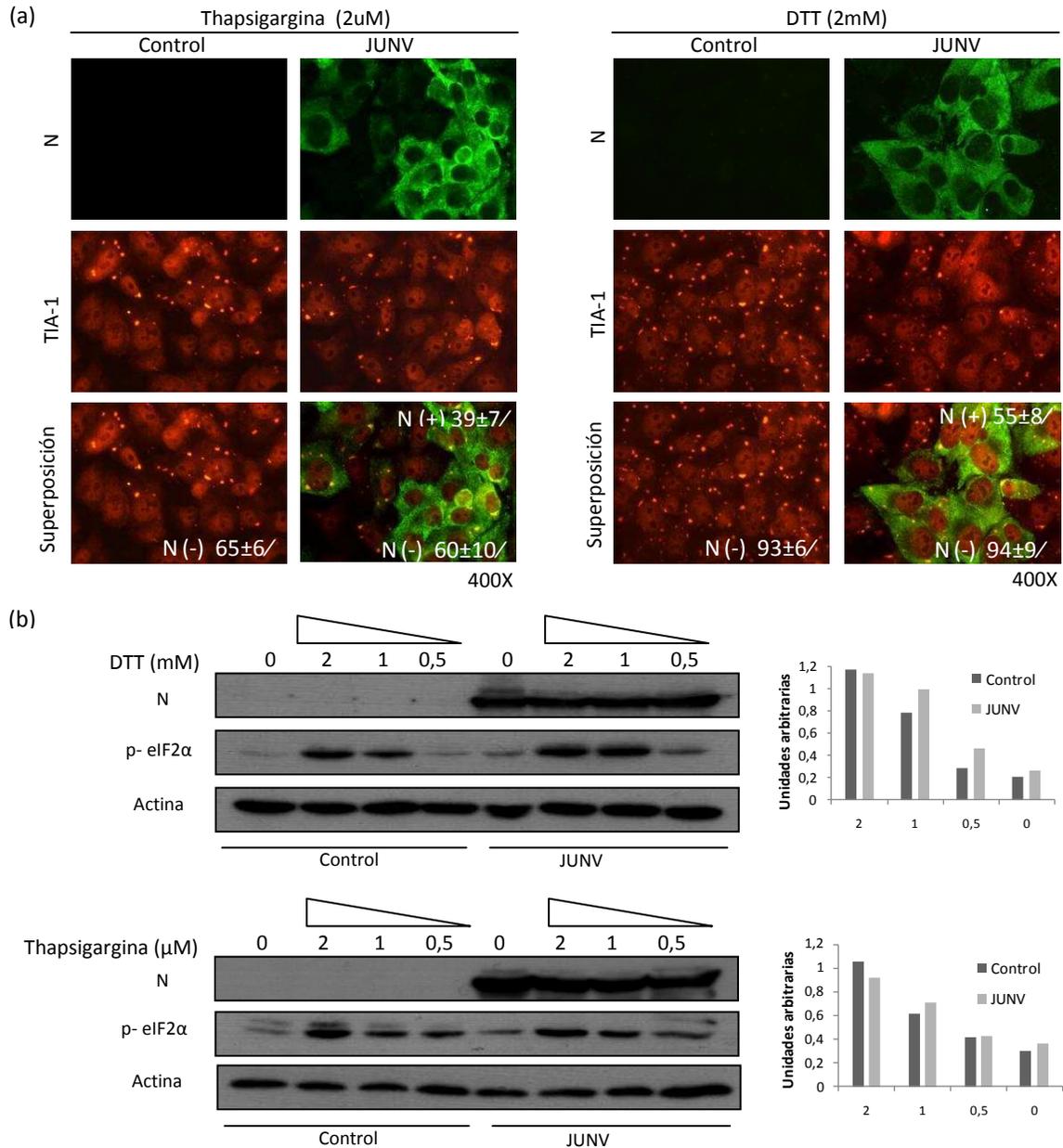


Figura 41. Formación de SGs en células infectadas con JUNV tratadas con inductores de estrés de RE. (a) Células Vero no infectadas (control) o infectadas con JUNV (MOI de 1 ufp/cél.) fueron tratadas o no tratadas a las 24 hs p.i. con thapsigargina 2 μ M o DTT 2mM durante 1h y procesadas para IFI a fin de evaluar la expresión de N y la formación de SGs positivos para TIA-1. IFI doble de N y TIA-1 en células tratadas con thapsigargina (panel izquierdo) y en células tratadas con DTT (panel derecho). Los números en los paneles indican la media del / de células N (-) o N (+) con SGs obtenida a partir de 3 experimentos independientes donde el error corresponde al SD respectivo. El / fue obtenido a partir de 350 células totales contadas en cada experimento. (b) Células Vero fueron no infectadas (control) o infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. y no tratadas (0) o tratadas con distintas concentraciones de DTT (panel superior) o thapsigargina (panel inferior) durante 1 h. Transcurrido el tratamiento las células fueron procesadas para WB a fin de evaluar la fosforilación de eIF2 α (Ser51). Los gráficos de la derecha corresponden a la cuantificación de p-eIF2 α , expresada como unidades arbitrarias calculadas como el coeficiente entre P-eIF2 α y actina respecto del control sin tratar no infectado.

Sin embargo, a pesar de esta moderada inhibición en la formación de SGs frente a estrés de RE, cuando las células fueron pre-tratadas con thapsigargina previamente a la infección, se observó una considerable reducción en la multiplicación de JUNV (Figura 42a). En este sentido, la síntesis de N evaluada mediante un ensayo de marca radiactiva en células tratadas con este inductor, mostró una marcada inhibición (Figura 42b). Estos resultados indicarían que si bien la modulación de la respuesta de estrés celular ejercido por JUNV apunta mayoritariamente al estrés oxidativo más que al estrés de RE, la activación de la respuesta a estrés, independientemente de la vía implicada, tiene consecuencias deletéreas en la replicación de JUNV limitando la síntesis de las proteínas virales.

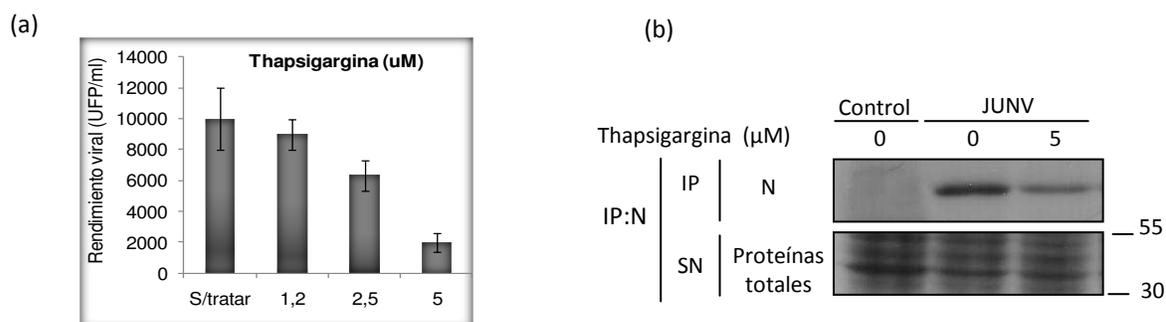


Figura 42. Efecto del tratamiento con arsenito de sodio en la multiplicación de JUNV. (a) Células Vero fueron pre-tratadas durante 1 h con distintas concentraciones de thapsigargina y posteriormente infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél.. A las 24 hs p.i. los sobrenadantes fueron cosechados y titulados mediante ensayo de ufp. (b) Células Vero fueron infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. y a las 48 hs p.i. fueron ayunadas durante 1 h con DMEM deficiente en metionina y cisteína en presencia de thapsigargina 5 µM e incubadas posteriormente durante 2 h con DMEM suplementado con metionina y cisteína marcadas con ^{35}S en presencia de la droga. Posteriormente las muestras fueron inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti-N, resueltas en un gel Bis-Tris y finalmente reveladas por autorradiografía.

2.1.2.c Estrés inducido por hippuristanol

Como se mencionó en la Introducción el requerimiento de la fosforilación de eIF2 α para la formación de SGs puede ser reemplazado mediante el uso de drogas que inhiben el inicio de la traducción por otro mecanismo, tal es el caso del compuesto hippuristanol, el cual induce la formación de SGs mediante la inhibición del factor de traducción eIF4A (Mazroui y col., 2006). De esta manera este compuesto permite evaluar la capacidad del cultivo de formar SGs independientemente de la fosforilación de eIF2 α . A fin de estudiar la capacidad de JUNV de interferir con la acción del hippuristanol, células Vero infectadas o no infectadas con el virus fueron tratadas con hippuristanol y evaluadas según su capacidad de inducir la formación de SGs. Como se observa en la Figura 43a, el tratamiento con hippuristanol 2 µM indujo la formación de SGs en prácticamente la totalidad del cultivo no infectado, siendo esta respuesta dependiente de la concentración. En las células infectadas con JUNV, el tratamiento con hippuristanol mostró resultados similares, donde el

porcentaje de células con SGs fue de 95 ± 6 / y 96 ± 5 / para células positivas y negativas para la expresión de N, respectivamente (Figura 43b), indicando que la formación de SGs asociada al bloqueo del inicio de la traducción por hippuristanol, no lograría ser superada por JUNV.

Finalmente, el pre-tratamiento de los cultivos con hippuristanol mostró una considerable reducción en la replicación de JUNV (Figura 43c). En base a que la formación de SGs inducida por este inhibidor no es mediada por la fosforilación de eIF2 α , el secuestro de los factores de inicio de la traducción en estas estructuras podría ser la causa de la reducción en la replicación del virus.

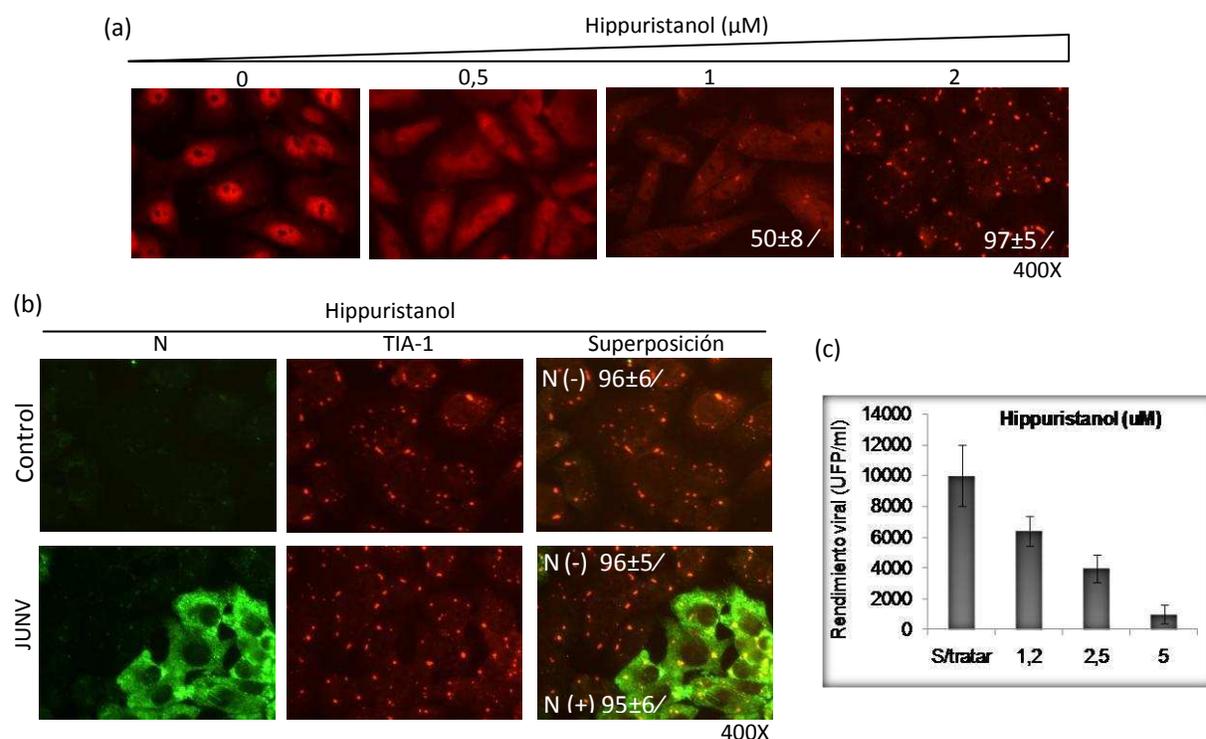


Figura 43. Formación de SGs en células infectadas con JUNV y tratadas con hippuristanol. (a) Células Vero fueron tratadas con distintas concentraciones de hippuristanol (μM) durante 1 h. Transcurrido este tiempo las células fueron fijadas y procesadas para IFI a fin de evaluar la inducción de SGs empleando al marcador TIA-1. (b) Células Vero no infectadas (control) o infectadas con JUNV (MOI de 1 ufp/cél.) fueron tratadas a las 24 hs p.i. con $2 \mu\text{M}$ de hippuristanol durante 1h y procesadas para IFI a fin de evaluar la expresión de N y la formación de SGs positivos para TIA-1. IFI doble de N y TIA-1 en células no infectadas (panel superior) y en células infectadas (panel inferior). Los números en los paneles indican el / de células N (-) o N (+) con SGs obtenida a partir de 3 experimentos independientes donde el error corresponde al SD respectivo. El / fue obtenido a partir de 350 células totales contadas en cada experimento (c) Células Vero fueron pre-tratadas durante 1 h con distintas concentraciones de hippuristanol y posteriormente infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél.. A las 24 hs p.i. los sobrenadantes fueron cosechados y titulados mediante ensayo de ufp.

2.1.3 Proteínas virales implicadas en la respuesta a estrés celular

Los resultados obtenidos en los experimentos de doble marcación donde se evaluó la presencia de SGs en células infectadas que expresaban antígenos virales, sugieren que la expresión de N sería condición necesaria para la modulación de la respuesta al estrés celular. Sin embargo no es posible descartar que otros antígenos virales también hayan participado en dicho efecto. Con la

finalidad de esclarecer las proteínas virales implicadas en dicha modulación, se evaluó la formación de SGs frente al tratamiento con arsenito de sodio en células transfectadas con plásmidos de expresión de N, GPC o Z. Como control de expresión de proteína no relacionada se empleó un plásmido de expresión de eGFP. La Figura 44, muestra que tanto la expresión de N como de GPC produjeron una considerable reducción en la formación de SGs, observándose que sólo un $3,7 \pm 2$ / y un $3,6 \pm 2$ / de células que expresaron dichas proteínas, respectivamente, fueron capaces de formar SGs en su citoplasma. La expresión de Z, sin embargo, no mostró diferencias considerables respecto de la expresión de la proteína control eGFP, observándose que un 29 ± 9 / de las células que expresaban Z fueron capaces de formar SGs en comparación con un 40 ± 10 / en células que expresaban eGFP. En ningún caso se detectó la presencia de SGs en ausencia de arsenito de sodio. Los resultados obtenidos indican que la expresión de N y GPC estaría relacionada con el impedimento en la formación de SGs observado durante el estrés oxidativo. Probablemente esta expresión sea, al menos en parte, responsable de la evasión de la respuesta al estrés oxidativo durante la infección con JUNV.

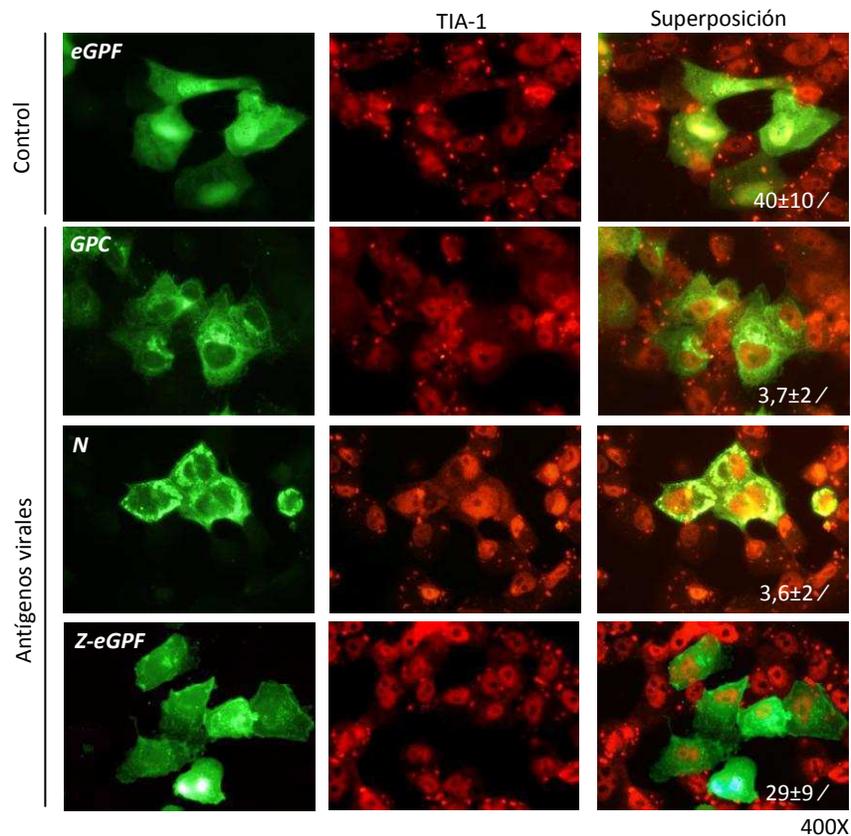


Figura 44. Formación de SGs en células transfectadas que expresan N, GPC o Z. Células Vero fueron transfectadas con plásmidos que expresan las proteínas virales N, GPC o Z fusionada a eGFP (Z-eGFP) y con un plásmido de expresión de eGFP como proteína no relacionada. A las 48 hs post-transfección las células fueron tratadas con arsenito de sodio $500 \mu\text{M}$ durante 1 h y posteriormente procesadas para IFI a fin de determinar la presencia de SGs, mediante el marcador TIA-1, en las células transfectadas. Los números indican el porcentaje de células transfectadas positivas para SGs, obtenido a partir del conteo de 150 células. Cada porcentaje fue calculado como la media de tres experimentos independientes donde el error corresponde al SD.

Como se mostró anteriormente, la resistencia al estrés oxidativo en las células infectadas con JUNV se correlacionó con un bloqueo de la fosforilación de eIF2 α . A fin de confirmar que la inhibición en la formación de SGs observado mediante la expresión de N y GPC es mediada por la alteración de este factor, se evaluó la fosforilación del mismo en células transfectadas con los plásmidos de expresión utilizados en el ensayo anterior. Como muestra la Figura 45, todas las células transfectadas no tratadas con arsenito, presentaron un nivel basal de expresión de P-eIF2 α , caracterizado por un patrón difuso citoplasmático y un escaso número de células con pequeñas estructuras granulares.

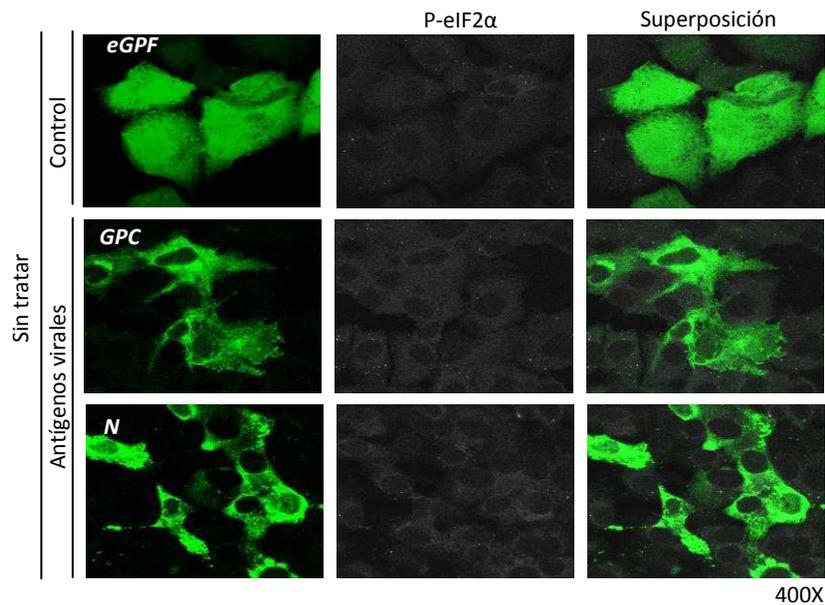


Figura 45. Fosforilación de eIF2 α en células que expresan los antígenos de JUNV. Células Vero fueron transfectadas con plásmidos que expresan N o GPC y con un plásmido de expresión de eGFP como proteína no relacionada (control). A las 48 hs post-transfección las células fueron procesadas para IFI a fin de determinar la fosforilación de eIF2 α (Ser51).

Cuando se analizó la fosforilación de eIF2 α en las células transfectadas tratadas con arsenito, se observó que en el 65 \pm 9% de las células que expresaron eGFP se detectó p-eIF2 α , mientras que en las células que expresaron GPC o N el porcentaje de células con p-eIF2 α se redujo a un 15 \pm 5% y 10 \pm 4%, respectivamente (Figura 46). La expresión de P-eIF2 α es detectada como un aumento en la señal fluorescente junto con la aparición de un patrón granular citoplasmático.

Estos resultados confirman que la expresión de N o GPC sería suficiente para inhibir la formación de SGs inducida por arsenito a través de la reducción del nivel de fosforilación de eIF2 α .

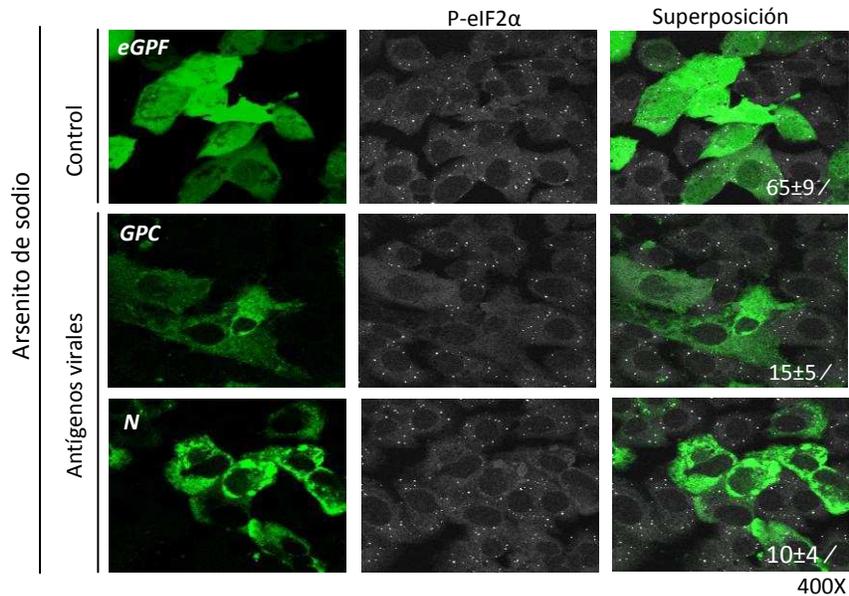


Figura 46. Fosforilación de eIF2α en células que expresan los antígenos de JUNV frente al tratamiento con arsenito de sodio. Células Vero fueron transfectadas con plásmidos que expresan las proteínas virales N o GPC y con un plásmido de expresión de eGFP (control) como proteína no relacionada. A las 48 hs post-transfección las células fueron tratadas con arsenito de sodio 500 μM durante 1 h y posteriormente procesadas para IFI a fin de determinar la fosforilación de eIF2α, en las células transfectadas. Los números indican el porcentaje de células transfectadas que expresan P-eIF2α, obtenido a partir del conteo de 150 células. Cada porcentaje fue calculado como la media de tres experimentos independientes donde el error corresponde al SD.

2.2 ESTUDIO DE LA RESPUESTA AL ESTRÉS CELULAR EN LA INFECCIÓN PERSISTENTE DE JUNV

En función de la modulación evidente de la respuesta celular de estrés ejercida por JUNV durante la infección aguda, se decidió investigar si dicha modulación es llevada a cabo además durante la etapa persistente de infección. Es importante señalar que los cultivos de células Vero persistentemente infectados con JUNV presentan diferencias importantes frente a un cultivo infectado en forma aguda ya que son cultivos no virogénicos, caracterizados por la ausencia de expresión de G1 y síntesis continua de N. En estos ensayos se empleó el cultivo persistentemente infectado V3 mencionado en el capítulo I (ítem 1.3) entre los pasajes 21-30 (150-200 días p.i.).

En primer lugar se evaluó la formación de SGs en el cultivo V3 frente al tratamiento con distintos inductores de estrés. Como se observa en la Figura 47, a diferencia de lo observado durante la infección aguda, todos los tratamientos indujeron un elevado porcentaje de células con SGs, independientemente del nivel de expresión de N. De hecho, el tratamiento con thapsigargina 2μM indujo inclusive un mayor número de células con SGs, en comparación con células Vero sin infectar. Por otro lado, en la mayoría de los casos se detectó un aumento en el número de SGs en las células V3 respecto de las células Vero.

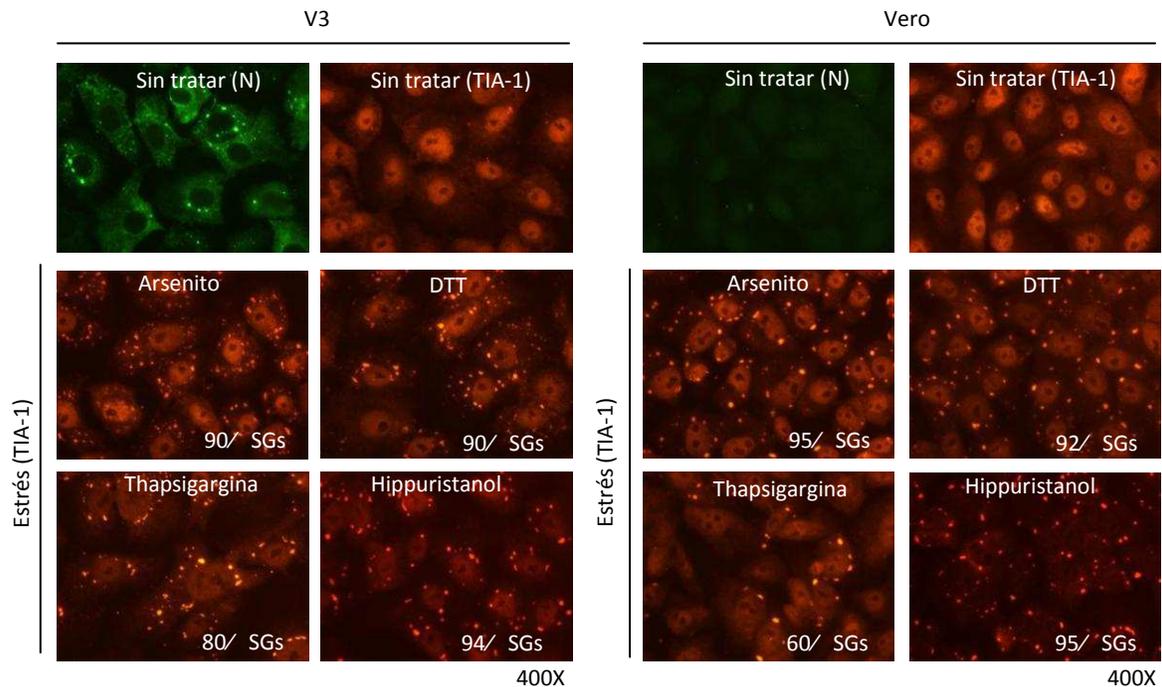


Figura 47. Formación de SGs en células Vero persistentemente infectadas con JUNV. Células Vero o V3 (150-200 días p.i.) fueron tratadas durante 1 h con 500 μ M de arsenito de sodio, 2mM de DTT, 2 μ M de thapsigargina o 2 μ M de hippuristanol y posteriormente procesadas para IFI a fin de analizar la expresión de N (panel superior izquierdo en ambos bloques) y la presencia de SGs mediante el marcador TIA-1 (resto de los paneles). Los números indican el porcentaje de células con SGs cuantificadas a partir de 200 células contadas.

En los cultivos persistentemente infectados con JUNV la proteína N presenta un patrón de expresión diferencial respecto de lo que se observa en la infección aguda. De esta manera, en los cultivos persistentes la síntesis de N presenta un patrón heterogéneo de expresión observándose células con un patrón citoplasmático característico de aspecto puntillado fino y células con una distribución de N granular. En base a esta observación y en función del comportamiento diferencial de los cultivos persistentes frente al estrés, se analizó si la distribución granular de N se relacionaba con las estructuras de silenciamiento: SGs o PBs. De esta manera se realizó un ensayo de microscopia confocal en células V3 en el cual se analizó simultáneamente la presencia de las estructuras granulares de N, SGs y PBs. En este ensayo se empleó el marcador Rck/p54 el cual constituye un componente compartido de SGs y PBs. Como se muestra en la Figura 48, en ausencia de estrés inducido por arsenito, Rck/p54 se encontró mayoritariamente en PBs no detectándose co-localización con los gránulos de N. Por otro lado se observó que la distribución de los PBs fue similar tanto en las células que mostraron una distribución homogénea de N como en las que mostraron una distribución granular. Cuando el cultivo fue sometido a estrés oxidativo, Rck/p54 se observó simultáneamente en PBs y SGs, detectándose una marcada co-localización con TIA-1 que, en estas condiciones, es reclutada a SGs, mientras que no se observó co-localización con las estructuras granulares de N. Por

otro lado puede observarse que la inducción de SGs fue independiente del patrón de expresión de N que presentaba la célula, corroborando los resultados obtenidos en el ensayo anterior.

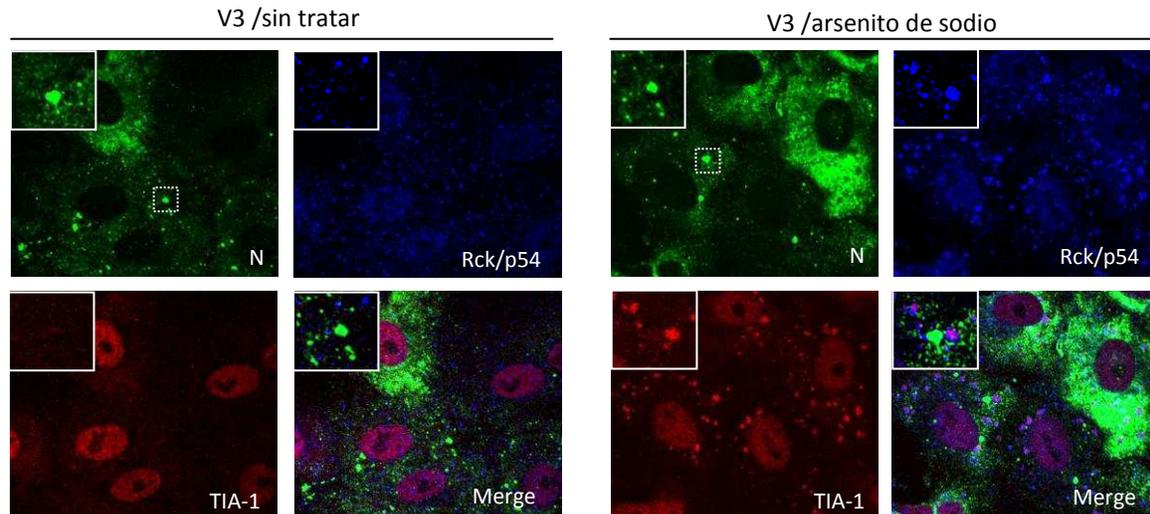


Figura 48. Microscopía confocal de los gránulos de N y su relación con marcadores de SGs y PBs en células V3. Células V3 (150-200 días p.i.) fueron no tratadas o tratadas durante 1 h con 500 μ M de arsenito de sodio y procesadas para IFI. Nucleoproteína (verde); Rck/p54 (azul); TIA-1 (rojo). El recuadro ubicado en la esquina superior de cada foto corresponde a un aumento de un gránulo de N (recuadro punteado). Merge= superposición

Con la finalidad de profundizar la dinámica de estas estructuras granulares de N, se evaluó el efecto de los inhibidores de la traducción: cicloheximida y puromicina, los cuales se caracterizan por afectar a los polisomas de maneras opuestas, mientras que la cicloheximida los estabiliza, la puromicina los desestabiliza. Dado que tanto los SGs como los PBs están en equilibrio dinámico con los polisomas, el tratamiento con estos inhibidores tiene consecuencias directas sobre estas estructuras: el tratamiento con cicloheximida impide la formación de SGs y desensambla a los PBs, mientras que el tratamiento con puromicina usualmente incrementa el número y tamaño de ambas estructuras. Con la finalidad de evaluar el comportamiento de SGs y PBs en la infección persistente, como así también la dinámica de los gránulos de N, se analizó la respuesta a estrés oxidativo en cultivos tratados con los inhibidores de la traducción cicloheximida y puromicina. Como se observa en la Figura 49, de acuerdo a lo reportado, el tratamiento con cicloheximida impidió la formación de SGs mientras que el tratamiento con puromicina mostró un incremento en el tamaño y número de los mismos. Resultados similares fueron observados para PBs, donde el tratamiento con cicloheximida desarmó estas estructuras de silenciamiento, mientras que la puromicina no tuvo efecto sobre las mismas. Sin embargo, cuando se analizó el efecto de estos tratamientos en la expresión de N, se observó que tanto el agregado de puromicina como cicloheximida indujeron un cambio en el patrón de expresión de esta proteína, obteniéndose un patrón homogéneo de distribución (similar al

descrito como puntillado fino) acompañado de una reducción muy marcada en el número de estructuras granulares presentes en el citoplasma. Estos resultados sugieren que los cúmulos de N observados en las células persistentemente infectadas con JUNV constituirían sitios de traducción activa, más que estructuras de silenciamiento. Por otro lado, los SGs y los PBs presentes en estas células mostraron un comportamiento similar al reportado para células no infectadas respecto de los tratamientos con cicloheximida y puromicina, demostrando que en estos cultivos la presencia de JUNV no alteraría la dinámica de estas estructuras.

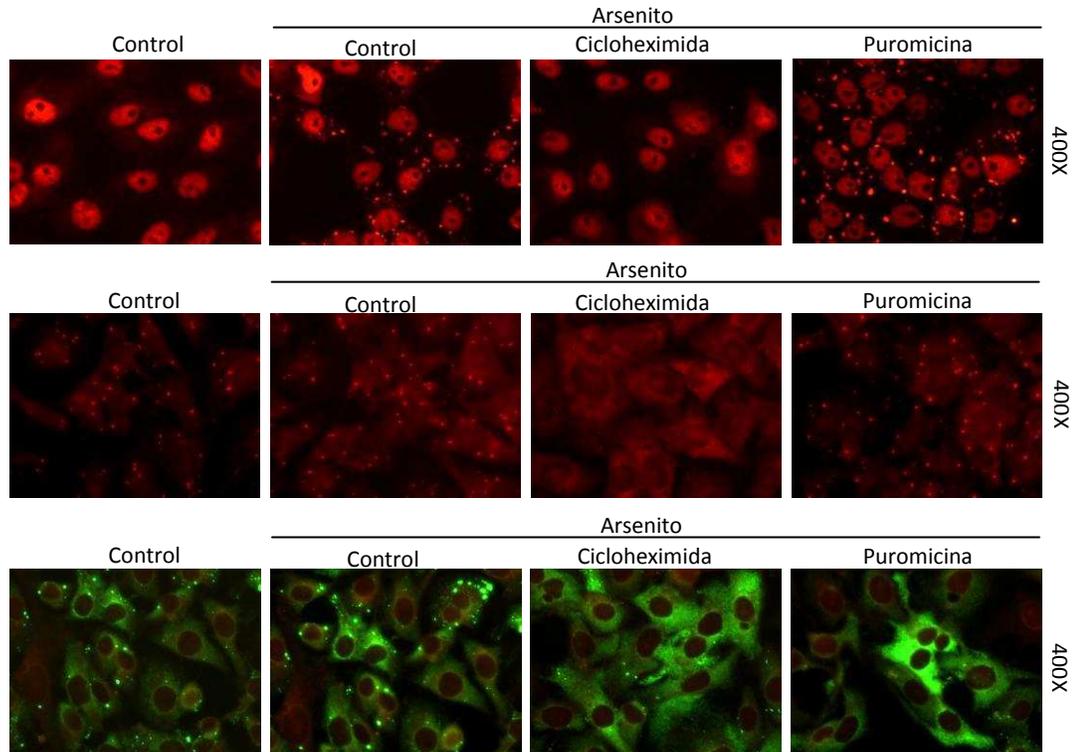


Figura 49. Dinámica de SGs, PBs y gránulos de N frente al tratamiento con inhibidores de la traducción. Células V3 (150-200 días p.i.) fueron no tratadas o tratadas durante 6 h con 250 μ M de puromicina o 250 μ M de cicloheximida. A las 5 h de tratamiento con los inhibidores de la traducción, las células fueron sometidas a estrés oxidativo mediante el agregado de 500 μ M de arsenito de sodio durante 1h. Transcurrido este tiempo las células fueron fijadas y procesadas para IFI. Panel superior, SGs marcados con TIA-1. Panel medio, PBs marcados con Hedls. Panel inferior, N marcada con anticuerpo monoclonal.

Finalmente, en base a la susceptibilidad de las células V3 a la formación de SGs, se evaluó el efecto de la sobreinfección con JUNV en estos cultivos. Es importante señalar que los cultivos persistentes con JUNV se caracterizan por presentar una resistencia a la sobreinfección con virus homólogo caracterizada por una disminución en la producción viral de aproximadamente 1 log respecto de una infección en células Vero (Ellenberg y col., 2004). En estos cultivos se ha reportado que la entrada de JUNV no estaría afectada aunque pasos posteriores tales como la síntesis de antígenos virales presentan una restricción marcada. De esta manera el cultivo persistentemente

infectado V3 fue sobreinfectado con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. o no sobreinfectado y a las 48 hs p.i. fue tratado durante 1 h con distintas concentraciones de arsenito de sodio o DTT. Como se observa en la Figura 50a, la sobreinfección con JUNV no modificó el patrón de fosforilación de eIF2 α inducido por arsenito de sodio, en comparación con el cultivo no sobre-infectado. Efectos similares fueron observados durante el tratamiento con DTT (Fig. 50b). Estos resultados indican que la sobreinfección con JUNV de las células V3 no lograría impedir la fosforilación de eIF2 α en comparación con lo observado en células Vero infectadas en forma aguda a la misma MOI. El hecho de que a esta multiplicidad de infección no se haya observado una significativa producción de antígenos virales del virus sobreinfectante (datos no mostrados), en parte explicaría los resultados obtenidos, fortaleciendo la conclusión de que la expresión de una o varias proteínas virales serían necesarias para impedir la respuesta a estrés oxidativo. A su vez, dado que los cultivos V3 se caracterizan por la ausencia de expresión de G1 pero una elevada expresión de N, los resultados obtenidos sugieren que la función/es que cumple N expresada durante la persistencia diferiría/n de aquella/s propia/s de la expresada durante una infección aguda, ya que durante la persistencia N no controlaría la formación de SGs.

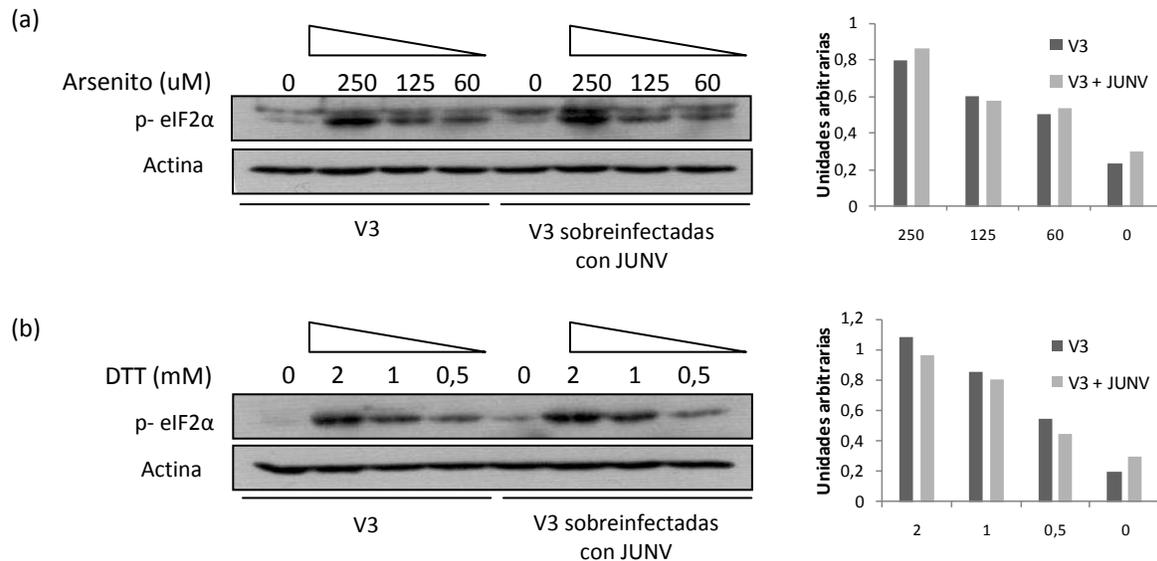


Figura 50. Formación de SGs y fosforilación de eIF2 α en células persistentemente infectadas con JUNV (V3). Células V3 (150-200 días p.i.) fueron sobreinfectadas o no sobreinfectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél., y tratadas a las 48 hs p.i. con distintas concentraciones de arsenito de sodio o DTT durante 1 h. Transcurrido el tratamiento las células fueron procesadas para WB a fin de analizar la presencia de p-eIF2 α (Ser51). Los gráficos corresponden a la cuantificación de p-eIF2 α , expresada como unidades arbitrarias calculadas como el cociente entre p-eIF2 α y actina respecto del control sin tratar no infectado.

2.3 CONCLUSIONES PARCIALES CAPÍTULO II

- La infección aguda con JUNV modula negativamente la capacidad de las células de formar SGs inducido por arsenito de sodio y en menor extensión por thapsigargina y DTT.
- Esta modulación ejercida principalmente frente al estrés oxidativo es regulada mediante la expresión de las proteínas virales N y G e involucra el mantenimiento de eIF2 α en su estado hipofosforilado.
- Los cultivos persistentemente infectados con JUNV son capaces de formar SGs frente a la inducción con distintos agentes del mismo modo que lo hacen células Vero no infectadas.

3. PARTICIPACIÓN DEL COMPLEJO DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN eIF4F EN LA SÍNTESIS DE LAS PROTEÍNAS DE JUNV

El inicio de la traducción es un proceso complejo que involucra la participación de factores canónicos de traducción denominados eIFs entre los cuales se encuentra el factor de unión al cap eIF4E, la proteína helicasa eIF4A y el factor de andamiaje eIF4G. Estos tres factores constituyen elementos claves para el inicio de la traducción cap-dependiente y asimismo son empleados alternativamente en la traducción mediada por IRES (según la característica del IRES).

La presencia de estructuras cap en el extremo 5' de los mARNs de JUNV lleva a pensar en la participación de dicha estructura en el inicio de la traducción de las proteínas virales. Sin embargo, los resultados obtenidos en el capítulo I sugieren que, si bien JUNV activa la principal vía de regulación de la traducción cap-dependiente, esta activación es efectivamente empleada para la entrada del virus a la célula huésped más que para procesos tardíos de replicación. El empleo de un dominante negativo mutante para Akt confirmó la importancia de la vía en la replicación de JUNV, sin embargo el uso de un dominante negativo mutante para 4E-BP (regulador negativo de eIF4E) no tuvo efecto en la síntesis de antígenos virales sugiriendo entonces el empleo de un mecanismo independiente al uso de este factor. Finalmente, el hecho de que la infección con JUNV interfiera con los mecanismos de respuesta de estrés celular, mediante el cual los eIFs quedan secuestrados en SGs, hace suponer la necesidad, por parte del virus, de contar con dichos factores que, de otra manera permanecerían secuestrados en estas estructuras (capítulo II).

Sobre la base de estos resultados, en este capítulo se evaluó la participación de los factores eIF4A y eIF4G en el mecanismo de síntesis de las proteínas de JUNV a fin de completar los estudios acerca de la estrategia de traducción de este agente.

3.1 PARTICIPACIÓN DEL FACTOR eIF4G

Con la finalidad de evaluar la participación del factor eIF4G en primer lugar se analizó si la infección con JUNV altera los niveles de síntesis de dicho factor, tal como se ha reportado durante la infección con HCMV (Walsh y col., 2005). Como se observa en la Figura 51 a partir de las 12 hs p.i. comenzó a detectarse la expresión de N, mientras que la expresión de GPC comenzó a detectarse entre las 24-33 hs p.i.. Los niveles de eIF4G, sin embargo, se mantuvieron constantes durante toda la infección, aún cuando los niveles de N y GPC fueron más elevados (48 hs p.i.). Por otro lado los niveles de eIF4E y eIF2 también permanecieron constantes indicando que JUNV no altera el nivel basal de síntesis de estos factores durante la infección.

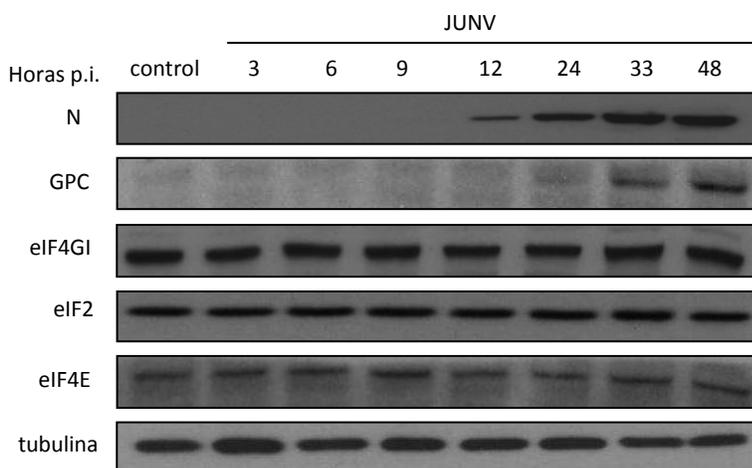


Figura 51. Cinética de infección de JUNV. Células Vero fueron infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. y a distintos tiempos p.i. fueron procesados para WB a fin de evaluar la síntesis de los antígenos virales N y GPC, y de los factores de traducción celular eIF4GI, eIF2y eIF4E. La tubulina fue usada como control de carga. La calle control corresponde a células no infectadas.

En función que eIF4GI es uno de los factores que forman parte de los SGs cuando la célula es sometida a una situación de estrés, se caracterizó el reclutamiento de dicho factor frente al tratamiento con arsenito de sodio en células infectadas con JUNV. Como se observa en la Figura 52a, el tratamiento de células Vero con arsenito promovió el reclutamiento de eIF4GI a SGs, observándose en prácticamente la totalidad del cultivo la presencia de estas estructuras granulares. Cuando se analizó el cultivo infectado con JUNV, Figura 52b, se observó que la infección, en ausencia de tratamiento, no modificó la localización celular de eIF4GI, sin embargo se observó una marcada superposición de los fluoróforos cuando se evaluó la expresión simultánea de eIF4GI y N. Por otro lado, el tratamiento del cultivo infectado con arsenito de sodio mostró una disminución marcada en el número de células con SGs, particularmente en las que expresaban N, corroborando su resistencia a la formación de los mismos frente al estrés oxidativo.

Con la finalidad de profundizar los resultados acerca de la localización sub-celular de N y eIF4GI se realizó un ensayo de microscopía confocal, observándose que en los sitios de expresión de N se detectó la co-localización con el factor eIF4GI, mientras que dicho factor no co-localizó con los sitios de expresión de GPC (coeficiente de Pearson 0.7 [N] vs. 0.29 [GPC]) (Figura 52c). Estos resultados sugieren el requerimiento de eIF4GI durante la replicación del virus y apoyan la hipótesis de que JUNV bloquearía la formación de SGs para evitar que dicho factor quede atrapado en estas estructuras.

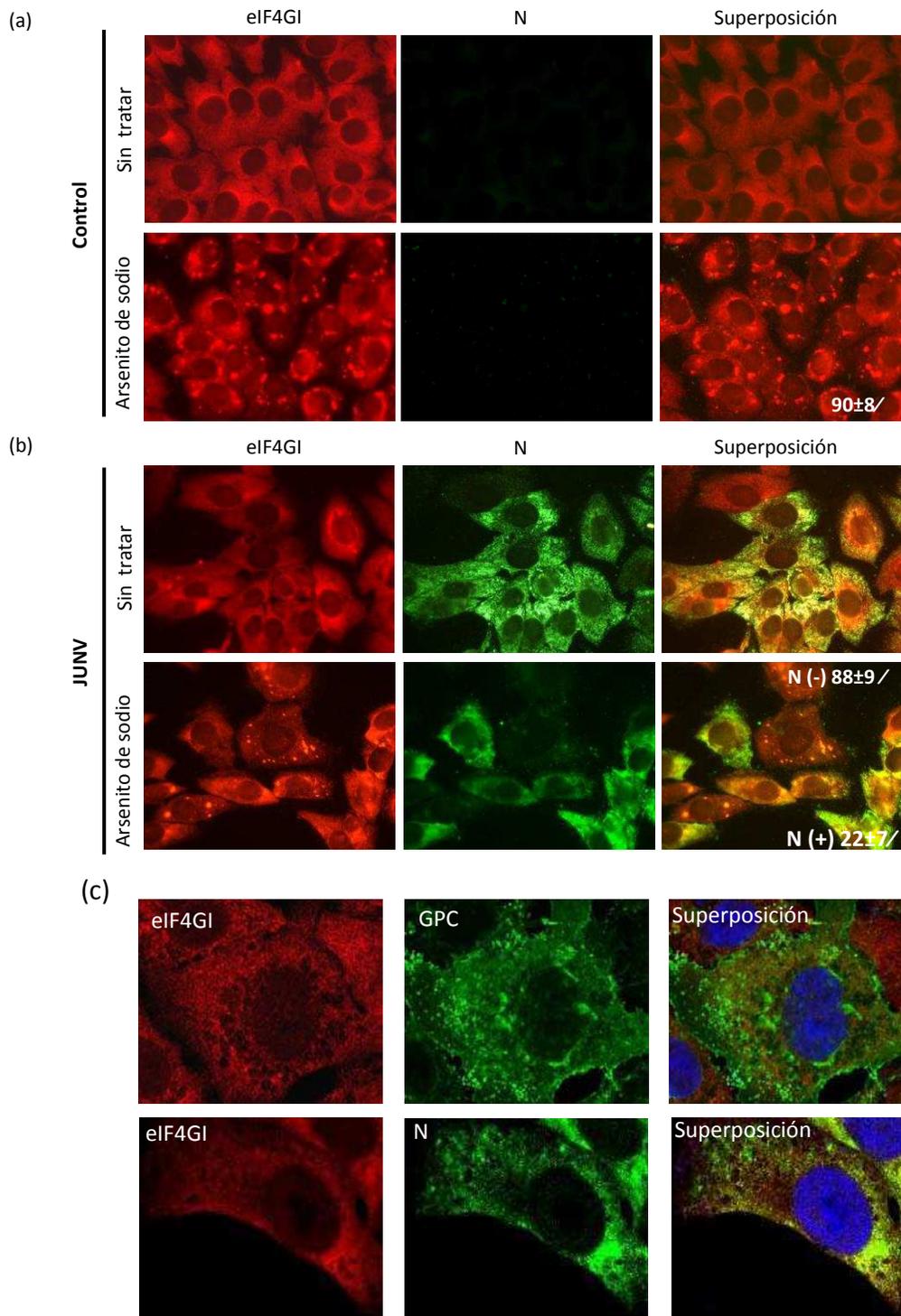


Figura 52. Expresión de eIF4GI en células infectadas con JUNV. Células Vero no infectadas (a) o infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. (b) fueron no tratadas o tratadas a las 48 hs p.i. con arsenito de sodio 500 μ M durante 1h y posteriormente fijadas para IFI. En verde N y en rojo eIF4GI. Aumento 400X. Los números en los paneles indican el / de células N (-) o N (+) con SGs obtenidos a partir de 3 experimentos independientes donde el error corresponde al SD respectivo. El / fue obtenido a partir de 350 células totales contadas en cada experimento. (c) Microscopía confocal de células Vero infectadas con JUNV a una MOI de 2 ufp/cél. y fijadas a las 48 p.i. (aumento 1000X). En verde expresión de N o GPC, en rojo expresión de eIF4GI y en azul núcleos marcados con To-pro3.

Con la finalidad de comprobar la participación de eIF4GI en la replicación de JUNV, se evaluó en primer lugar el efecto del silenciamiento de este factor mediante el empleo de un siARNs específico (siEIF4GI). De esta manera células Vero fueron transfectadas con dicho siARN o con un siARN control, y posteriormente infectadas con JUNV. Como se observa en la Figura 53, la transfección con el siEIF4GI en células Vero produjo una disminución considerable en la expresión de dicho factor, obteniéndose valores cercanos al 70% de inhibición en comparación con el siARN control. A su vez el silenciamiento de dicho factor mostró una reducción significativa en la expresión de N en comparación con el cultivo transfectado con el siControl (29% vs. 62% , con un $p < 0,005$).

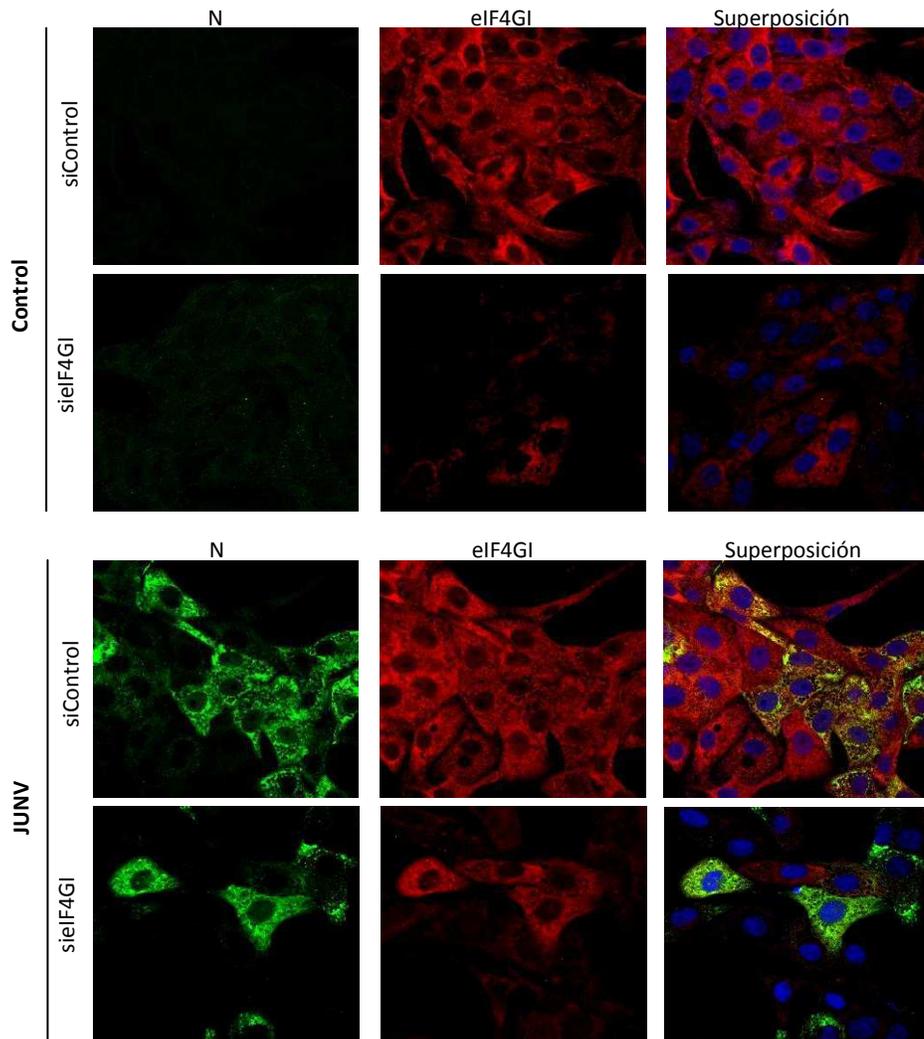


Figura 53. Efecto del silenciamiento de eIF4GI en la multiplicación de JUNV. Células Vero fueron transfectadas 2 veces consecutivas con un siARN dirigido contra eIF4GI o un siARN control y a las 24 hs luego de la segunda transfección las células fueron no infectadas (control) o infectadas con JUNV a una MOI de 2 ufp/cél.. A las 24 hs p.i. las células fueron fijadas y procesadas para IFI a fin de evaluar la expresión de N (verde) y eIF4GI (rojo). Los núcleos fueron teñidos con el marcador To-pro3.

Estos resultados se completaron mediante un ensayo de marca metabólica en células Vero infectadas con JUNV y transfectadas con el siIF4GI. Para ello en primer lugar se determinó la sensibilidad de la técnica para evaluar la síntesis de antígenos virales, dado que este virus no induce shutoff por lo que tanto las proteínas celulares como las virales incorporan marca radiactiva. De esta manera células Vero infectadas con JUNV fueron marcadas metabólicamente con ^{35}S metionina a las 24 y 48 hs p.i.. Como se observa en la Figura 54, en la calle correspondiente a las células infectadas se detectó una banda entre los marcadores de 75 y 50 KDa, la cual presentó mayor intensidad a las 48 hs p.i. y no se detectó en el control sin infectar. De acuerdo al tamaño, esta banda podría corresponder al precursor GPC (PM 70 KDa) o a la nucleoproteína N (PM entre 60-68 KDa).

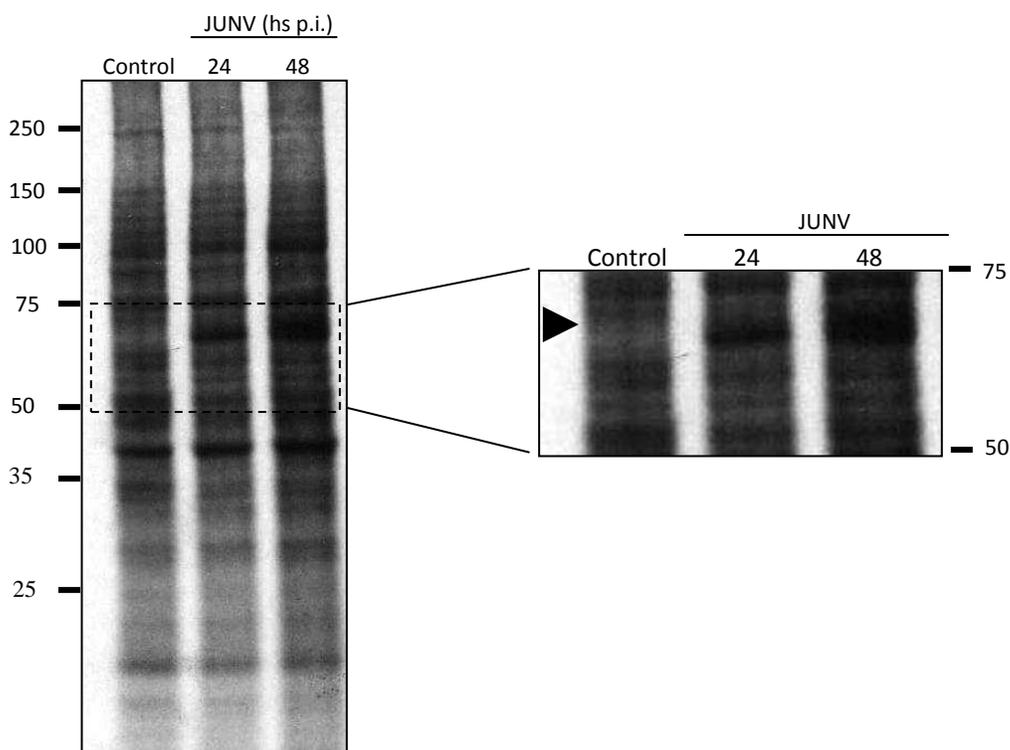


Figura 54. Detección de antígenos virales por marcado metabólico. Células Vero fueron infectadas con JUNV a una MOI de 5 ufp/cél. y a las 24 y 48 hs p.i. las células fueron ayunadas durante 1 h con DMEM deficiente en metionina y cisteína e incubadas posteriormente durante 1 h con DMEM en presencia de metionina y cisteína marcadas con ^{35}S . Las muestras fueron resueltas en geles de Bis-Tris 4-12/ (Nupage) y reveladas por autorradiografía.

En base a estos resultados, se evaluó posteriormente el efecto del silenciamiento de eIF4GI en la incorporación de marca radiactiva durante la infección con JUNV. Como se muestra en la Figura 55a el silenciamiento de eIF4GI produjo una disminución en la incorporación de ^{35}S en la banda correspondiente al antígeno viral, así como también en las proteínas celulares. Por otro lado, el

silenciamiento efectivo de eIF4GI fue corroborado mediante un ensayo de WB, en el cual se observó una inhibición casi total en la síntesis de este factor de traducción.

Un ensayo de WB en células transfectadas con el siEIF4GI y posteriormente infectadas con JUNV, corroboró los resultados obtenidos previamente, observándose una significativa reducción en la síntesis de N tanto a las 24 como a las 48 hs p.i. (Figura 55b). En su conjunto estos resultados sugieren la participación del factor eIF4GI en la síntesis de las proteínas de JUNV.

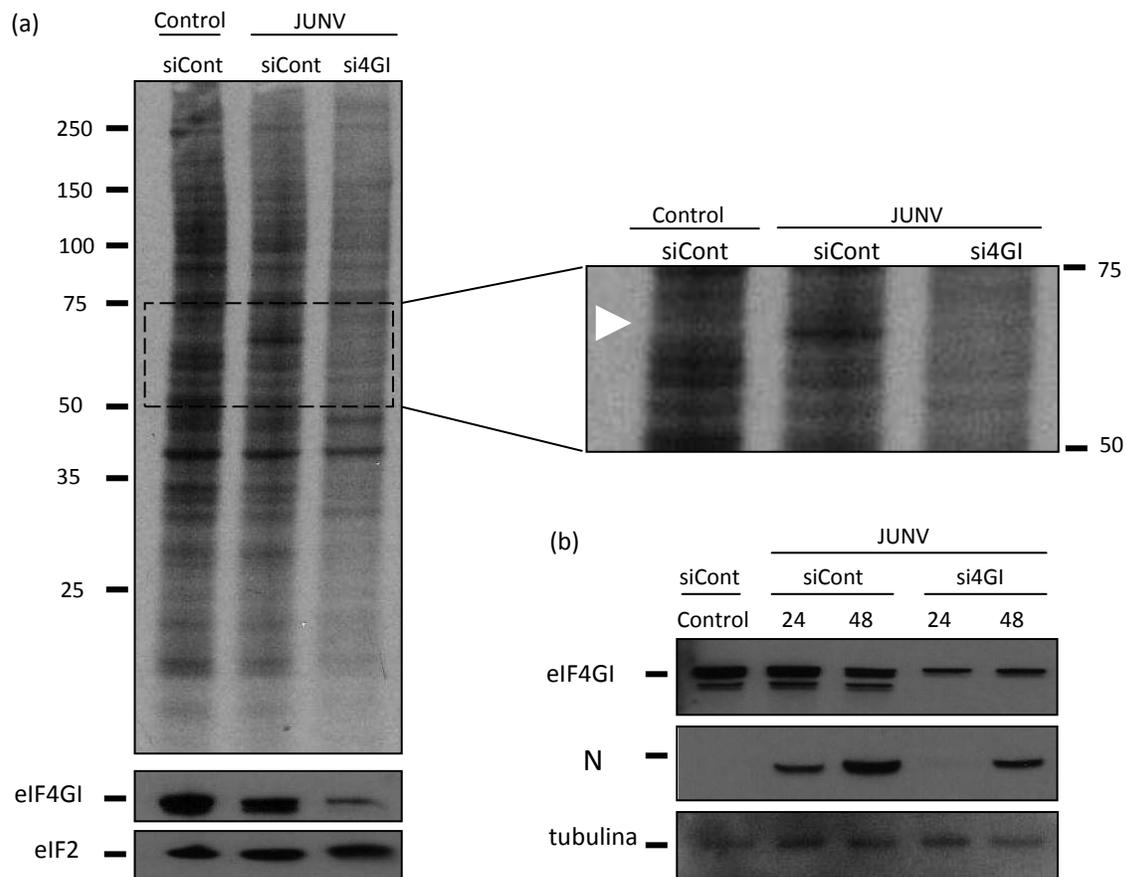


Figura 55. Efecto del silenciamiento de eIF4GI en la multiplicación de JUNV. (a) Células Vero fueron transfectadas 2 veces con un siARN dirigido contra eIF4GI o un siARN control y a las 24 hs luego de la segunda transfección las células fueron infectadas con JUNV a una MOI de 5 ufp/cél.. A las 24 hs p.i. las células fueron ayunadas durante 1 h con DMEM deficiente en metionina y cisteína e incubadas posteriormente durante 1 h con DMEM en presencia de metionina y cisteína marcadas con ^{35}S . Las muestras fueron resueltas en geles de Bis-Tris 4-12/ (Nupage). La síntesis de eIF4GI y eIF2 fue evaluada mediante WB. (b) Células Vero fueron transfectadas 2 veces con un siARN dirigido contra eIF4GI o un siARN control y a las 24 hs luego de la segunda transfección las células fueron infectadas con JUNV a una MOI de 5 ufp/cél.. A las 24 y 48 hs p.i. se evaluó la síntesis de N, eIF4GI y tubulina mediante ensayo de WB.

Con la finalidad de estudiar la participación directa de eIF4GI en la replicación de JUNV se realizó un ensayo de electroporación del mRNA de la proteasa 2A de poliovirus. La expresión de esta proteasa degrada al factor eIF4GI generando dos productos de degradación: un producto amino terminal, el cual contiene el sitio de unión a eIF4E y PABP y otro carboxilo terminal, que contiene los sitios de unión a eIF3 y eIF4A. De esta manera este ensayo combinado con marca radiactiva permite evaluar por un lado el efecto directo de eIF4GI en la síntesis de proteínas, ya que la proteasa es traducida rápidamente luego de la electroporación y su acción se evalúa a tiempos cortos, minimizando los efectos secundarios sobre la traducción de otras proteínas celulares. Por otro lado este ensayo permite determinar si la región carboxilo terminal es suficiente para mantener la traducción (traducción cap-independiente), o si se requiere al factor completo (traducción cap-dependiente). Como se muestra en la Figura 56 la expresión de la proteasa 2A produjo un efecto de shutoff en la síntesis de proteínas celulares, obteniéndose el mayor efecto cuando se electroporaron 10 µg del ARN de la proteasa. A su vez en las células infectadas se observó un bloqueo prácticamente completo en la incorporación de ³⁵S en la banda correspondiente al antígeno viral. La ruptura de eIF4GI fue corroborada mediante un ensayo de WB donde se observó la desaparición de la forma completa de este factor con la correspondiente aparición de uno de los fragmentos de degradación.

Estos resultados comprueban la participación efectiva de eIF4GI en la replicación de JUNV. Llamativamente, el requerimiento del factor completo indicaría un mecanismo de traducción cap-dependiente, sin embargo los resultados obtenidos previamente demostraron que el factor de unión al cap, eIF4E, no sería imprescindible para la replicación del virus. Estos resultados plantean la necesidad de postular la interacción de otro factor, probablemente viral, en el sitio de unión a eIF4E, lo cual explicaría la necesidad de la presencia del factor eIF4GI intacto y la independencia de eIF4E. Teniendo en cuenta los resultados de la microscopía confocal (Fig. 54), muy probablemente la proteína viral N, la cual mostró una importante co-localización con eIF4GI, podría estar cumpliendo esta función formando parte de un complejo de traducción de los mARNs virales.

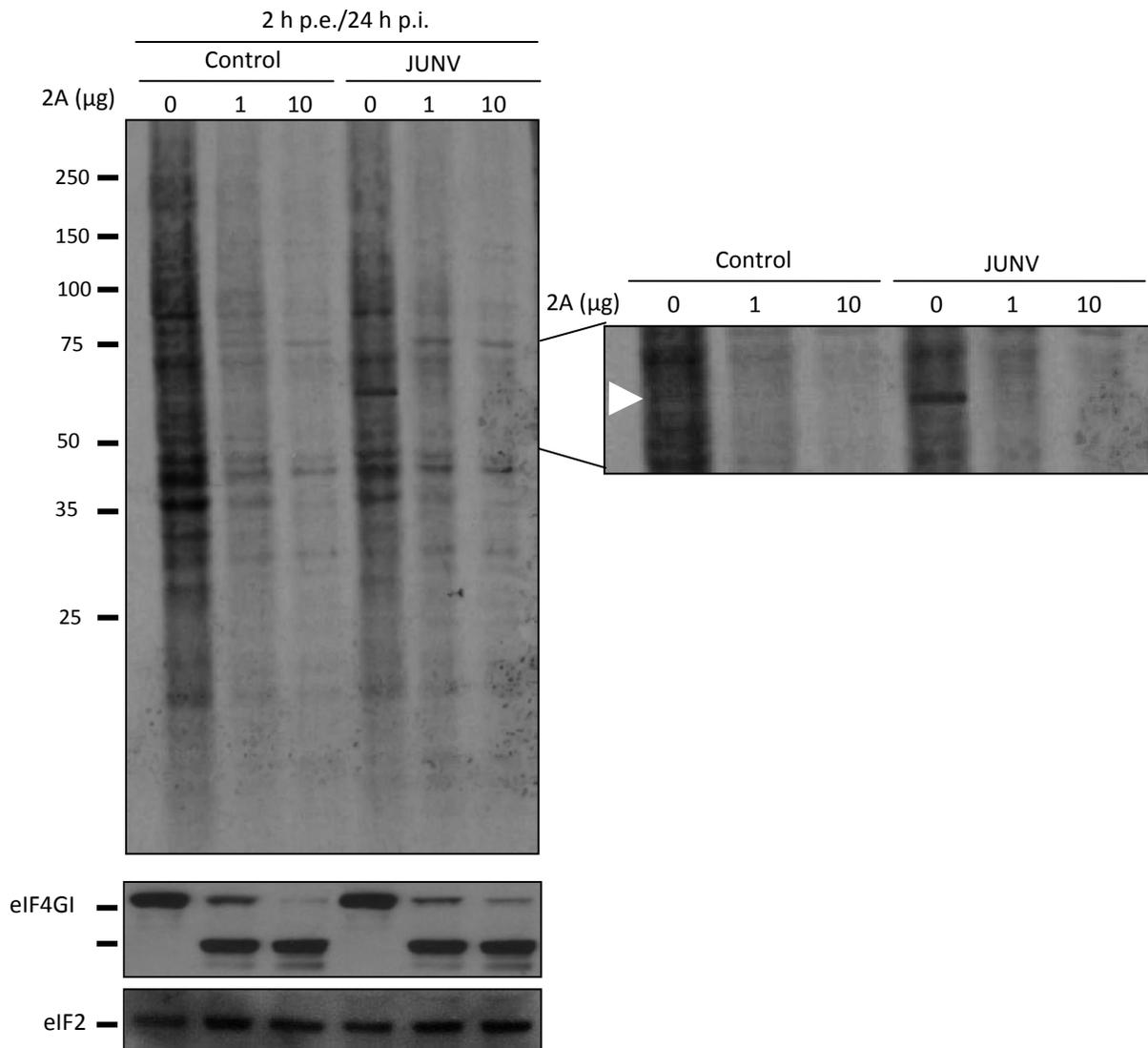


Figura 56. Efecto del clivaje de eIF4GI en la multiplicación de JUNV. Células Vero no infectadas (control) o infectadas con JUNV (JUNV) a una MOI de 5 ufp/cél. fueron electroporadas a las 24 hs p.i. con distintas concentraciones del mRNA de la proteasa 2A de poliovirus, previa transcripción in vitro. A las 2 hs post-electroporación (p.e.) las células fueron ayunadas durante 1 h con DMEM deficiente en metionina y cisteína e incubadas posteriormente durante 1 h con DMEM en presencia de metionina y cisteína marcadas con ³⁵S. Las muestras fueron resueltas en geles de Bis-Tris 4-12/ (Nupage) (panel superior). La síntesis de eIF2 y la degradación de eIF4GI fueron evaluadas mediante un ensayo de WB (panel inferior).

Con el objetivo de comprobar la posible interacción entre N y eIF4GI observada por IFI, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación empleando un anticuerpo dirigido contra dicho factor de traducción en células infectadas con JUNV. Como se observa en la Figura 57a la presencia de N en la fracción inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-eIF4GI indicaría la interacción entre este factor y la nucleoproteína viral. Es importante destacar que si bien con este ensayo se comprueba la presencia de N en los complejos inmunoprecipitados contra eIF4GI, esta presencia no indica la interacción directa entre ambas proteínas. Por otro lado la presencia de N en la fracción no inmunoprecipitada de

la correspondiente muestra indica que sólo una parte de la misma se encontraría en probables complejos de traducción, mientras que la restante no se encontraría en los mismos. Como control de interacción se evaluó la presencia de eIF4E en las muestras inmunoprecipitadas, observándose que tanto en las células no infectadas como en las células infectadas con JUNV, eIF4E se encontró principalmente en la fracción inmunoprecipitada de eIF4GI. Estos resultados comprueban la participación del eIF4GI en el mecanismo de traducción de las proteínas de JUNV e indican una posible asociación, ya sea directa o indirecta, con N.

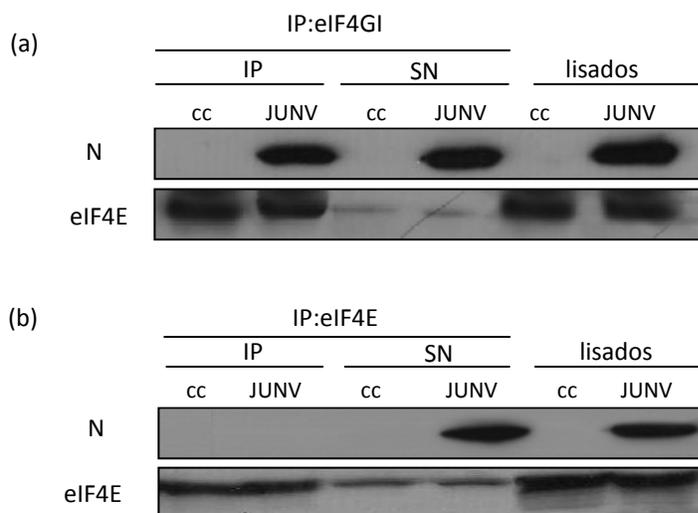


Figura 57. Interacción de los factores eIF4GI y eIF4E con N en células Vero infectadas con JUNV. Células Vero fueron infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél.. A las 48 hs p.i. las células fueron inmunoprecipitadas con un anticuerpo dirigido contra eIF4G (a) o contra eIF4E (b) y reveladas con un anticuerpo anti N o anti eIF4E. IP= fracción inmunoprecipitada. SN= fracción correspondiente al sobrenadante de la respectiva muestra inmunoprecipitada. Lisados= muestras control no inmunoprecipitadas. cc= células no infectadas.

Con la finalidad de comprobar que efectivamente el factor eIF4E no forma parte de un complejo de traducción putativo de los mARNs virales, se realizó un ensayo similar al mencionado anteriormente pero inmunoprecipitando con un anticuerpo dirigido contra el factor de unión al cap, eIF4E. Como se observa en la Figura 57b, no se detectó la presencia de N en la fracción inmunoprecipitada de las células infectadas, detectándose sin embargo, en el sobrenadante de la misma. Por otro lado, los resultados mostrados indican que la ausencia de interacción no se debería a una falla en la inmunoprecipitación ya que la mayoría de eIF4E aparece en la fracción inmunoprecipitada tanto para las células no infectadas como para las infectadas con JUNV.

Con el objetivo de evaluar si los sitios de expresión de N constituyen áreas de traducción activa se analizó la localización de la proteína ribosomal P durante la infección. En primer lugar, se evaluó si la infección con JUNV produce una modificación en la localización celular de dicha proteína.

Como se observa en la Figura 58 la infección con JUNV indujo una acumulación de P en foci citoplasmáticos discretos, ausentes en las células no infectadas.

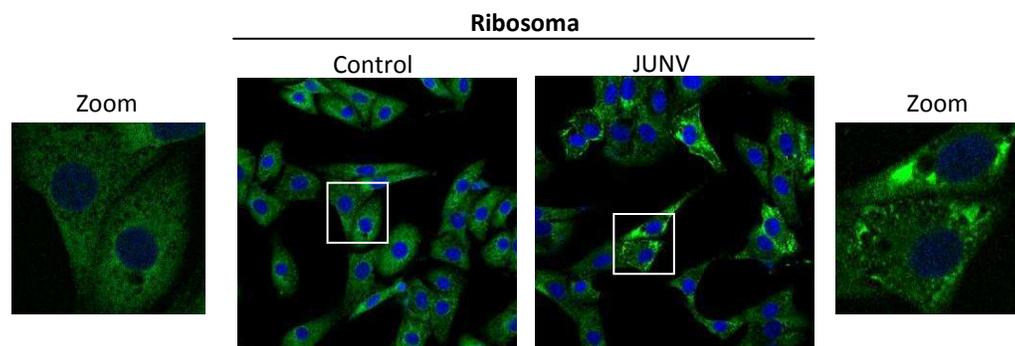


Figura 58. Localización de la proteína ribosomal P durante la infección con JUNV. Células Vero fueron no infectadas (control) o infectadas con JUNV a una MOI de 2 ufp/cél. A las 24 hs p.i. las células fueron procesadas para IFI empleando un anticuerpo monoclonal anti-proteína P y posteriormente analizadas mediante microscopía confocal. Aumento 400X. El zoom corresponde a un aumento de tres veces de la zona delimitada.

Estos resultados sugieren que la relocalización de la proteína P posiblemente se relacione con su presencia en complejos de traducción de proteínas virales. Fue así que se decidió evaluar la relación entre los foci de proteína P observados durante la infección con JUNV y el factor de traducción eIF4GI, ya que este último interactuaría con la proteína N. Como se observa en la Figura 59, si bien la infección con JUNV no indujo una re-localización de eIF4GI, de acuerdo a lo descrito anteriormente, en los foci de la proteína P se observó la co-localización con este factor (Coeficiente de Pearson = 0.65). De acuerdo a estos resultados se podría inferir que la proteína N se encontraría formando parte de complejos de traducción activa en función de la presencia de la proteína P, indirectamente demostrada mediante el análisis de eIF4GI.

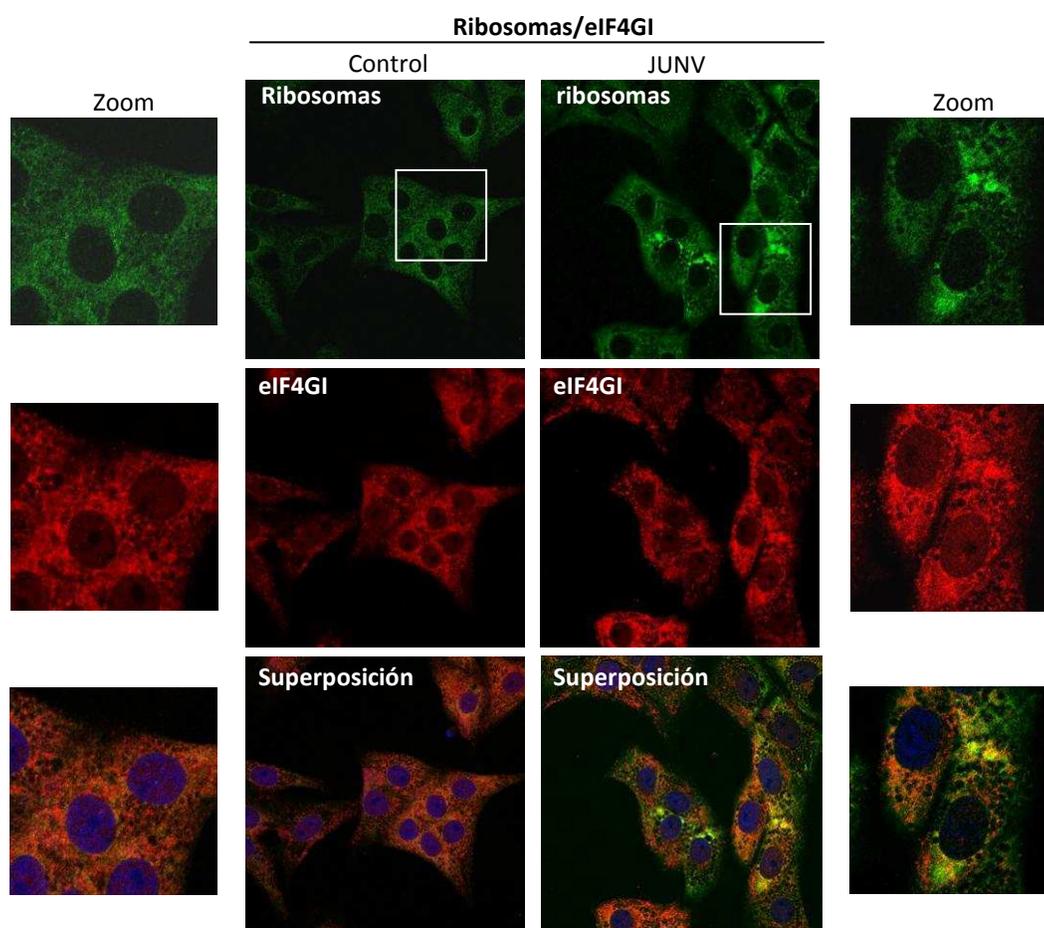


Figura 59. Expresión p97 y eIF4G1 en células infectadas con JUNV. Células Vero fueron no infectadas (control) o infectadas con JUNV (JUNV) a una MOI de 2 ufp/cél. A las 24 hs p.i. las células fueron procesadas para IFI empleando anticuerpos específicos dirigidos contra eIF4G1 y la proteína P. Los preparados fueron analizados mediante microscopía confocal. Aumento 630X. El zoom corresponde a un aumento de 2 veces de la zona delimitada.

3.2 Participación del factor eIF4A

La helicasa eIF4A constituye otro de los factores implicados en el inicio de la traducción que forma parte del complejo eIF4. Su actividad es fundamental en la búsqueda del codón de inicio de la traducción AUG. Con la finalidad de evaluar la participación de dicho factor en la traducción de los mARNs de JUNV, se analizó en primer lugar, la expresión de eIF4A y su reclutamiento a SGs frente al tratamiento con arsenito de sodio. Como se muestra en la Figura 60, el tratamiento con el inductor de estrés promovió el reclutamiento de eIF4A a SGs en prácticamente la totalidad de las células del cultivo ($86 \pm 11 /$). Cuando se analizó la expresión de eIF4A en las células infectadas con JUNV, se observó una modificación en la localización celular de dicho factor. Por otro lado, cuando el cultivo fue sometido al tratamiento con arsenito de sodio, se detectó una reducción importante en el número de células con SGs ($26 \pm 5 /$), respecto de los cultivos sin infectar.

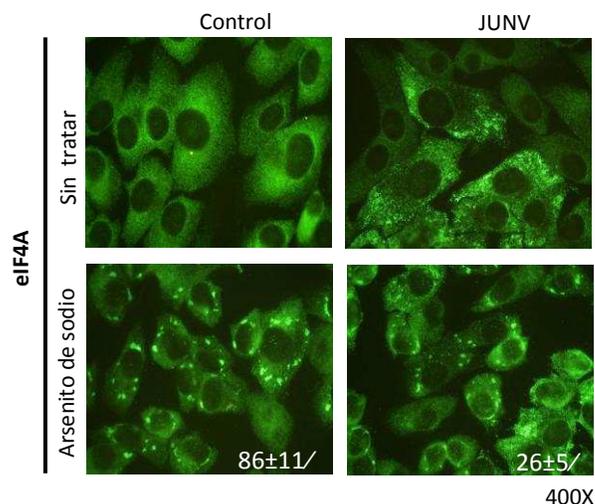


Figura 60. Expresión de eIF4A en células infectadas con JUNV. Células Vero no infectadas (Control) o infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. fueron no tratadas o tratadas a los 48 hs p.i. con arsenito de sodio 500 μ M durante 1h y posteriormente fijadas para IFI a fin de evaluar la expresión de eIF4A mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal. Aumento 400X. Los números en los paneles indican el % de células con SGs obtenidos a partir de tres experimentos independientes donde el error corresponde al SD respectivo. El % fue obtenido a partir de 200 células totales contadas en cada experimento.

Para confirmar la participación de eIF4A en la multiplicación de JUNV, células Vero fueron infectadas con el virus y tratadas con hippuristanol, un inhibidor de la actividad helicasa de dicho factor. Como se observa en la Figura 61a el tratamiento con esta droga redujo la síntesis de N, en forma dependiente de la concentración, observándose una inhibición prácticamente total a la concentración 5 μ M. Estos resultados se correspondieron con una inhibición en la producción de virus infectivo (Figura 61b). Es importante señalar que en todas las concentraciones evaluadas la viabilidad celular se mantuvo superior al 90%.

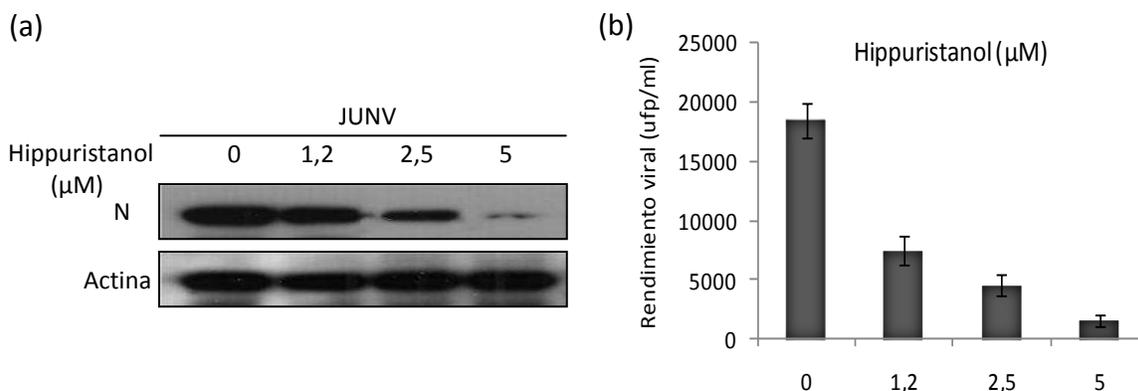


Figura 61. Efecto del tratamiento con hippuristanol en la multiplicación de JUNV. Células Vero fueron infectadas con JUNV a una MOI de 1 ufp/cél. y tratadas con distintas concentraciones de hippuristanol durante 24 hs. Transcurrido el tratamiento las células fueron procesadas para WB con la finalidad de evaluar la síntesis de N (a) y los sobrenadantes fueron titulados mediante un ensayo de ufp (b).

El requerimiento de este factor fue estudiado además mediante el empleo de un dominante negativo mutante para eIF4A, el cual posee alterado su dominio de actividad helicasa. Células Vero fueron transfectadas con el plásmido de expresión de la proteína mutada o de la proteína salvaje y posteriormente infectadas con JUNV. Como controles se emplearon los virus VSV y poliovirus. Como se muestra en la Figura 62 la expresión del dominante negativo de eIF4A redujo la replicación de poliovirus mientras que no mostró efectos en la replicación de VSV. Por otro lado, la expresión del dominante negativo indujo una inhibición moderada en la multiplicación de JUNV, sugiriendo la participación de este factor en la multiplicación de este agente. En estos experimentos la eficiencia de transfección no logró ser superior al 50% lo cual podría explicar la inhibición parcial observada frente a poliovirus, virus para el cual se ha reportado la participación de este factor.

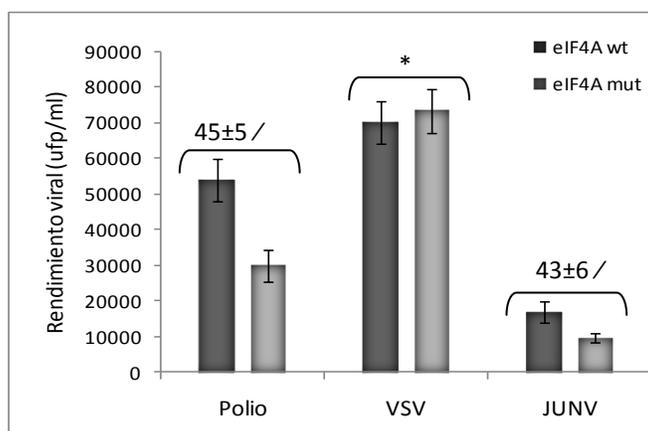


Figura 62. Efecto de la expresión de un dominante negativo de eIF4A en la multiplicación de JUNV. Células Vero fueron transfectadas con un plásmido de expresión de eIF4A mutado en su dominio helicasa (eIF4A-mut) o un plásmido de expresión de la proteína salvaje (eIF4A-wt). A las 24 hs post-transfección las células fueron infectadas con JUNV (MOI de 1 ufp/cél.), poliovirus (MOI 1 ufp/cel.) o VSV (MOI de 0.01 ufp/cél.). A las 24 hs p.i. la producción de virus infeccioso fue evaluada mediante un ensayo de ufp. Los números indican el porcentaje de inhibición de la multiplicación viral en las células transfectadas con el plásmido de expresión de eIF4A mut respecto de las transfectadas con el plásmido salvaje. * no hubo inhibición.

Finalmente, dada la re-localización de eIF4A observada en las células infectadas con JUNV se evaluó la posible interacción entre esta proteína y N mediante un ensayo de inmunoprecipitación. Como se muestra en la Figura 63 la presencia de eIF4A fue detectada en la muestra infectada inmunoprecipitada con N, indicando que dicho factor estaría formando parte de un complejo de traducción con N. A su vez, la presencia de eIF4A en el sobrenadante de la muestra inmunoprecipitada, indica que sólo un aparte de este factor estaría formando parte del complejo de traducción viral, mientras que el resto formaría parte de los complejos de traducción de proteínas celulares.

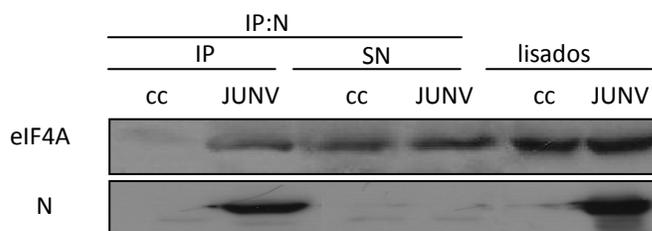


Figura 63. Interacción de N y eIF4A en células Vero infectadas con JUNV. Células Vero fueron infectadas con JUNV (JUNV) a una MOI de 1 ufp/cél. .A las 48 hs p.i. las células fueron inmunoprecipitadas (IP) con un anticuerpo dirigido contra N y reveladas con un anticuerpo dirigido contra eIF4A. Como control las muestras fueron reveladas contra N. IP= fracción inmunoprecipitada. SN= fracción correspondiente al sobrenadante de la respectiva muestra inmunoprecipitada. Lisados= muestras control no inmunoprecipitadas. Cc= células no infectadas.

3.3 Análisis de p97/NAT1/DAP5 durante la infección con JUNV

Como fue mencionado en la introducción, la familia eIF4G comprende al factor principal eIF4GI, a su proteína homóloga eIF4GII y a una proteína relacionada que sólo presenta homología con su extremo amino terminal denominada p97/NAT1/DAP5. Esta última se caracteriza por la ausencia de los sitios de unión para PABP y eIF4E y la presencia de los sitios de unión para eIF3 y eIF4A. La ausencia del sitio de unión para eIF4E sugiere su participación en procesos de traducción cap-independientes y aunque su función aún es controversial se postula que regularía la traducción mediada por IRES de determinados mARNs y que su actividad sería desencadenada mediante su clivaje promovido por la caspasa-3.

Dada la analogía de p97 con la porción amino terminal de eIF4GI, se analizó la participación de dicha proteína en la replicación de JUNV. De esta manera, en primer lugar se evaluó la localización celular de p97 en células infectadas con JUNV. Como se observa en la Figura 64, en células no infectadas p97 presentó una distribución nuclear-citoplasmática homogénea, de acuerdo a lo reportado en bibliografía. Sin embargo cuando se evaluó la distribución de p97 en las células infectadas con JUNV se observó que algunas células del cultivo presentaron una re-localización llamativa de dicha proteína en agregados citoplasmáticos.

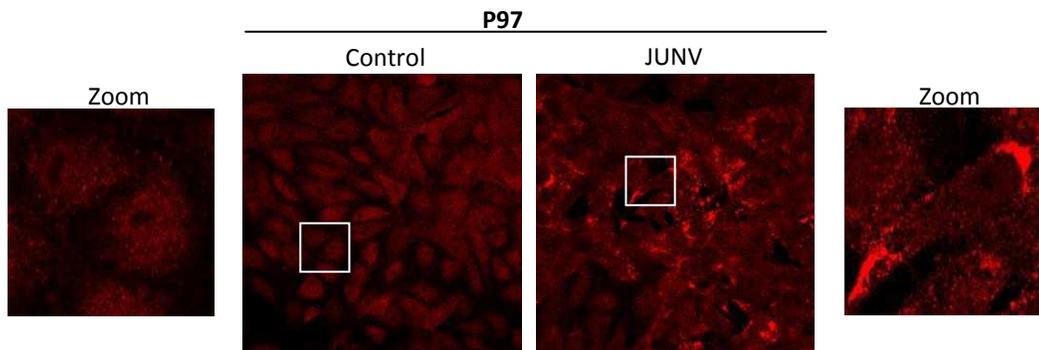


Figura 64. Distribución celular de p97. Células Vero no infectadas (control) o infectadas con JUNV a una MOI de 2 ufp/cél. fueron procesadas a las 24 hs p.i. para IFI empleando un anticuerpo anti-p97 y posteriormente analizadas mediante microscopía confocal. Aumento 400X. El zoom corresponde a un aumento de cinco veces de la zona delimitada.

En base a los resultados obtenidos, se realizó un ensayo de IFI doble con la finalidad de establecer una posible relación entre la expresión de antígenos virales y la re-localización de p97 observada durante la infección. En primer lugar se analizó la distribución de p97 en células infectadas con JUNV positivas para la expresión de N. Los resultados obtenidos corroboraron que la infección con JUNV sería la responsable de la re-localización de p97, ya que esta re-localización se encontró mayormente en las células positivas para la expresión de N (Figura 65). El resultado más llamativo de este ensayo fue la observación de una marcada co-localización entre N y p97 (coeficiente de Pearson=0.8), sugiriendo la interacción entre la nucleoproteína viral y este factor no canónico de traducción. Sin embargo cabe destacar que a pesar de esta co-localización, no todas las células que expresaban N mostraron una marcada relocalización de p97, indicando cierta independencia entre la expresión de N y la posible función traduccional de p97.

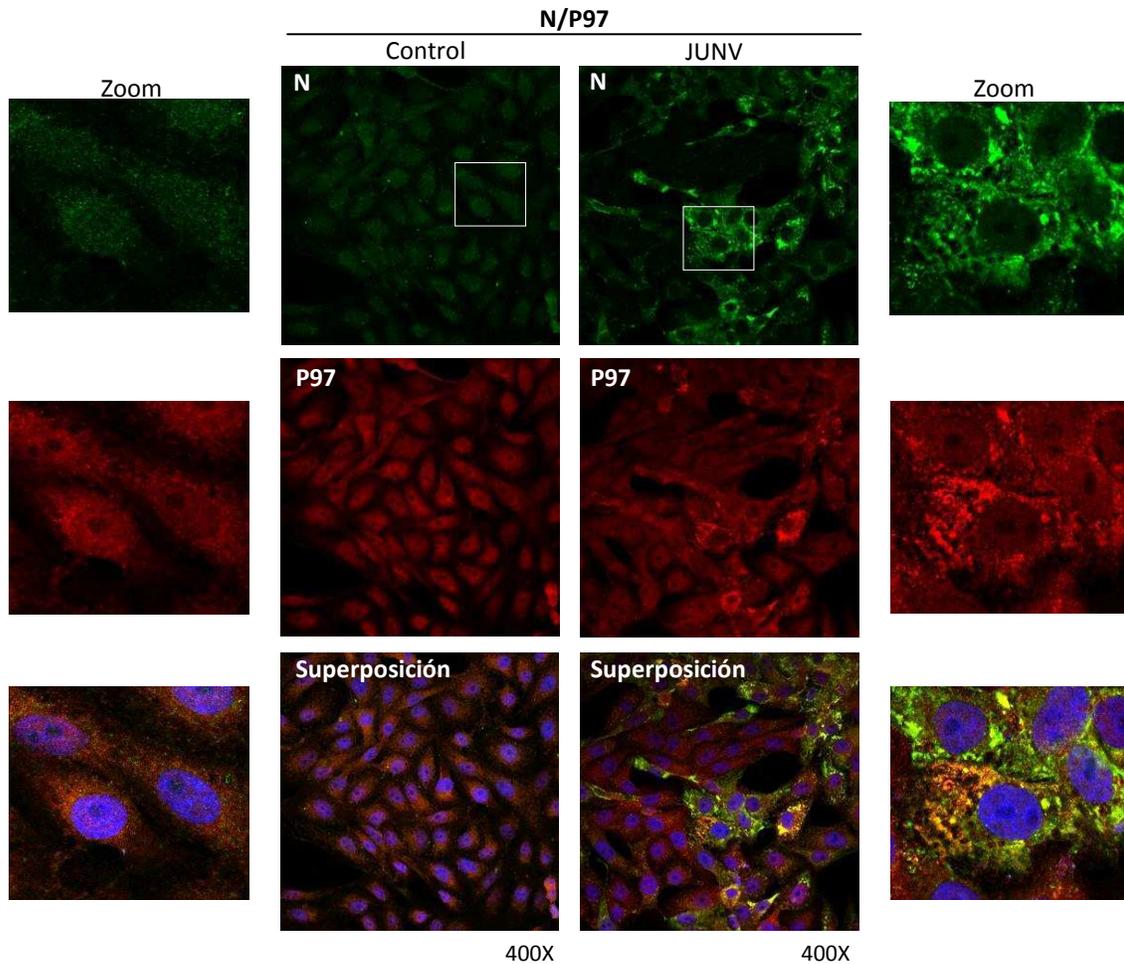


Figura 65. Estudio de la expresión de p97 y N. Células Vero fueron no infectadas (control) o infectadas con JUNV a una MOI de 2 ufp/cél. A las 24 hs p.i. las células fueron procesadas para IFI empleando anticuerpos específicos dirigidos contra p97 y N. Los preparados fueron analizados mediante microscopía confocal. Aumento 400X. El zoom corresponde a un aumento de cuatro veces de la zona delimitada.

En un ensayo similar se evaluó la relación entre la expresión de p97 y GPC. Como muestra la Figura 66, p97 mostró una re-localización citoplásmica principalmente en células positivas para GPC, indicando que la infección con JUNV sería la responsable de esta relocalización tal como fue observado en el ensayo anterior. Sin embargo en este ensayo se observó la ausencia de co-localización entre GPC y p97 indicando que no habría interacción entre estas proteínas (coeficiente de Pearson= 0.29). Por otro lado el hecho de que no todas las células que expresaban dicho antígeno viral hayan mostrado una marcada relocalización de p97, corrobora los resultados observados frente a la expresión de N e indicaría que este evento de relocalización correspondería más a un suceso tardío que a un evento relacionado con la síntesis de antígenos virales.

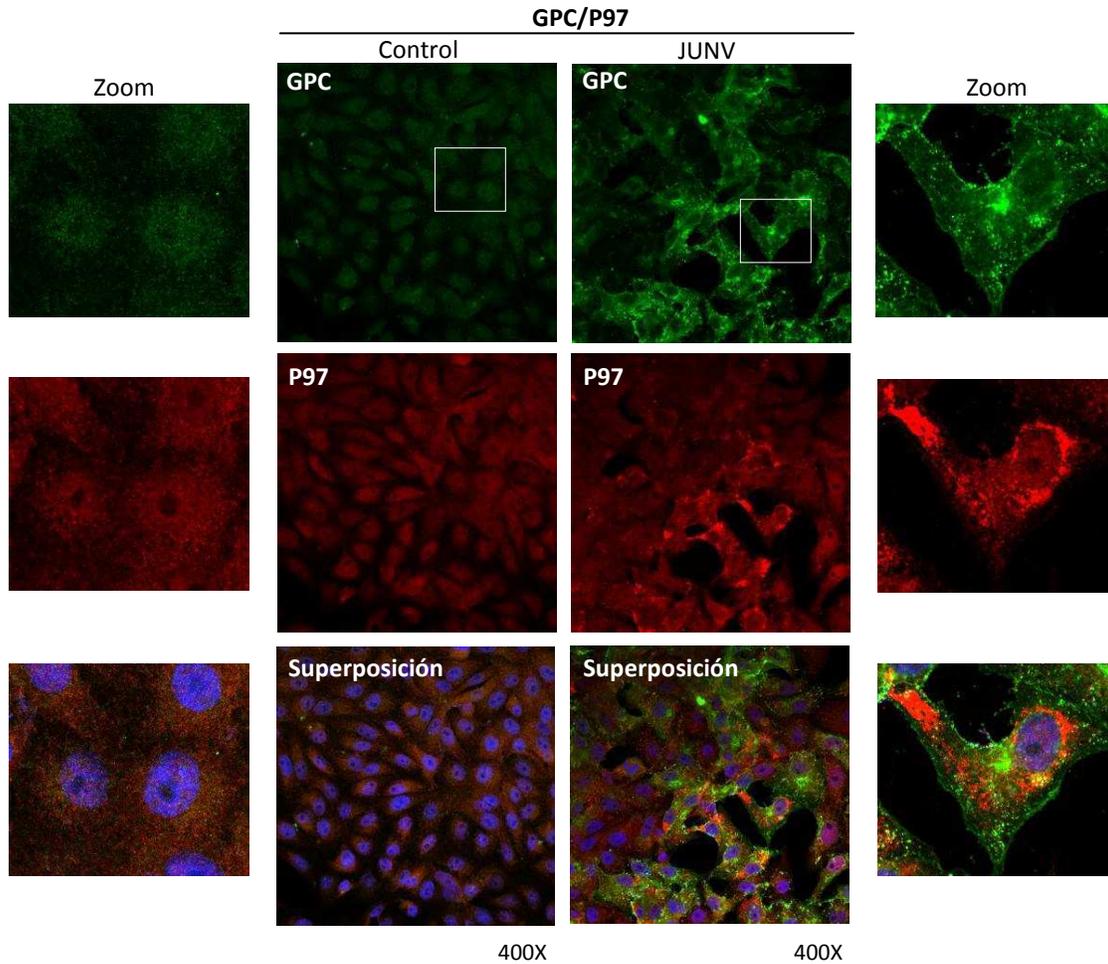


Figura 66. Estudio de expresión de p97 y GPC. Células Vero fueron no infectadas (control) o infectadas con JUNV (JUNV) a una MOI de 2 ufp/cél.. A las 24 hs p.i. las células fueron procesadas para IFI empleando anticuerpos específicos dirigidos contra p97 y GPC. Los preparados fueron analizados mediante microscopía confocal. Aumento 400X. El zoom corresponde a un aumento de cuatro veces de la zona delimitada

Finalmente, se evaluó el efecto del silenciamiento de p97 en la síntesis de antígenos virales mediante un ensayo de marca radiactiva. Como se observa en la figura 67 el silenciamiento de p97 no tuvo efectos considerables en la incorporación de ^{35}S en la banda correspondiente al antígeno viral, en comparación con el silenciamiento de eIF4GI. El efecto del siARNs en la síntesis de p97 fue corroborado mediante un ensayo de WB, en el cual se observó una disminución en la banda correspondiente a dicho factor de traducción. Por otro lado, el análisis de N mediante WB corroboró que el silenciamiento de p97 no tuvo efectos considerables en la síntesis de antígenos virales, confirmando que dicha proteína no cumpliría un rol crucial en la traducción de las proteínas virales.

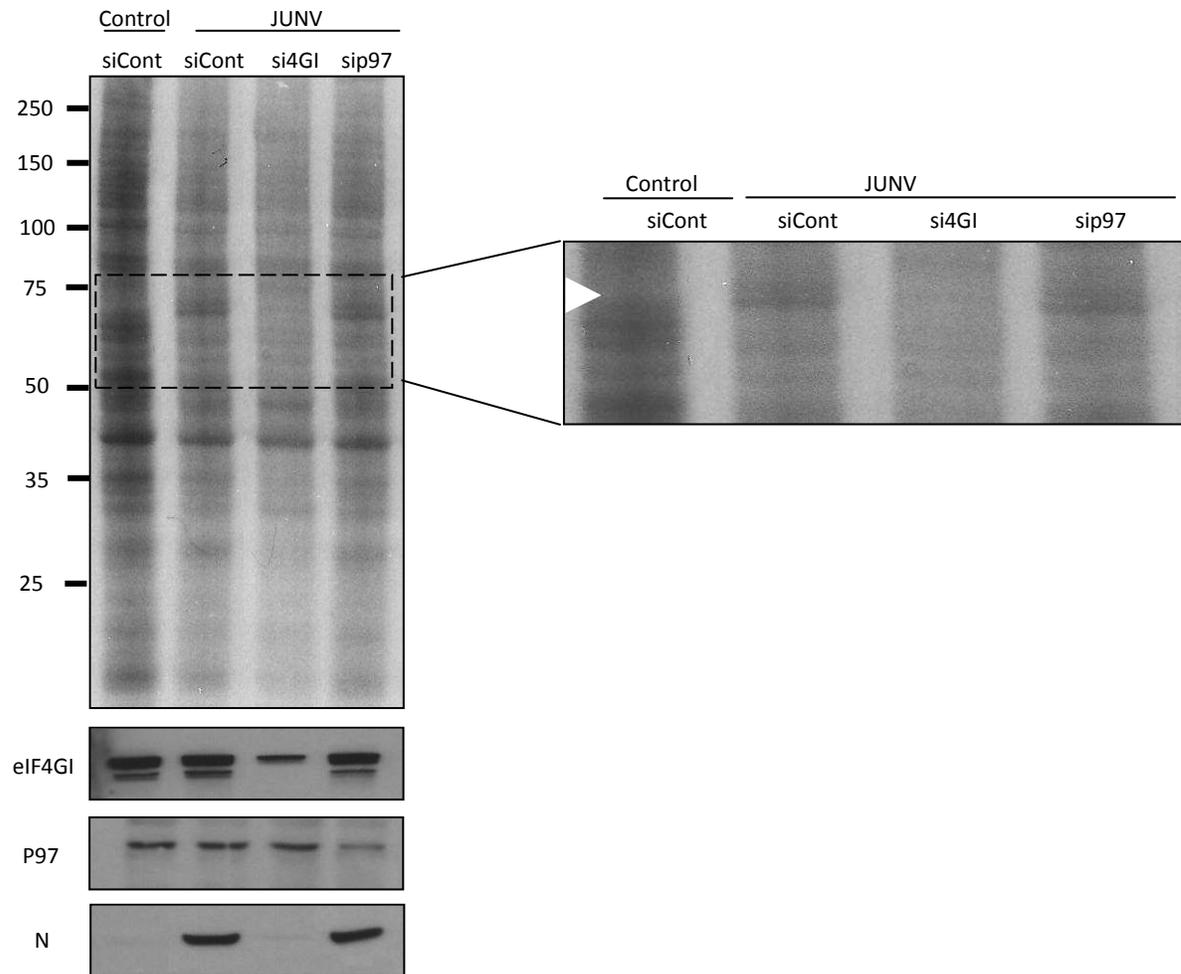


Figura 67. Efecto del silenciamiento de p97 en la multiplicación de JUNV. (a) Células Vero fueron transfectadas 2 veces con un siARN dirigido contra p97, eIF4GI o un siARN control y a las 24 hs luego de la segunda transfección las células fueron infectadas con JUNV a una MOI de 5 ufp/cél. o no infectadas (control). A las 24 hs p.i. las células fueron ayunadas durante 1 h con DMEM deficiente en metionina y cisteína e incubadas posteriormente durante 1 h con DMEM en presencia de metionina y cisteína marcadas con ^{35}S . Las muestras fueron resueltas en geles de Bis-Tris 4-12/ (Nupage). La síntesis de p97, eIF4GI y N fue evaluada mediante WB.

3.4 CONCLUSIONES PARCIALES CAPÍTULO III

- Tanto eIF4GI como eIF4A son requeridos para la replicación de JUNV, ya que la alteración de los mismos tiene efectos negativos en la multiplicación del virus.
- La infección con JUNV induce una alteración en la localización celular de p97/ NAT1/ DAP5 observándose a este factor en los sitios de expresión de N, sin embargo, su inhibición mediante siARNs no tiene efectos en la síntesis de las proteínas virales.
- La proteína viral N se encontraría formando complejos con los factores eIF4GI y eIF4A, pero no con eIF4E.

En el presente trabajo de investigación se estudió la estrategia de reprogramación traduccional utilizada por JUNV para lograr la síntesis eficiente de las proteínas virales durante su ciclo de multiplicación.

Al presente los conocimientos acerca de la estrategia de traducción empleada por los arenavirus son limitados, siendo los estudios de la regulación negativa del factor eIF4E por la proteína viral *Z in vitro* los más relevantes (Campbell Dwyer y col., 2000; Kentsis y col., 2002). A su vez, la complejidad del mecanismo “ambisense” de replicación de estos virus, impone una limitación sustancial en el estudio de su estrategia traduccional, dado que la separación temporal en la síntesis de las proteínas virales podría implicar mecanismos de traducción diferenciales para las mismas. En el presente trabajo se realizó un análisis general del mecanismo de inicio de la traducción de las proteínas de JUNV, evaluando la intervención del complejo celular eIF4F y del factor eIF2. El análisis de la estrategia de traducción fue abordado investigando los dos puntos principales de regulación del inicio de dicho mecanismo: la disponibilidad de eIF4E, mediante la modulación de la vía de señalización de PI3K/Akt y la fosforilación de la subunidad α del factor eIF2, mediante la activación de quinasas celulares específicas. Por otro lado, el estudio de la participación de los factores de traducción eIF4G1 y eIF4A, que junto con eIF4E, constituyen el complejo eIF4F, permitió obtener un cuadro más completo acerca de la posible estrategia traduccional empleada por JUNV.

El proceso de inicio de la traducción constituye el punto principal de competencia por el control de la síntesis proteica entre el virus y su célula hospedadora. En este sentido, el inicio de la traducción mediante la regulación del factor de unión al cap, eIF4E, es uno de los blancos explotados durante la reprogramación traduccional ejercida por muchos virus (Gale y col., 2000; Bushell y Sarnow, 2002). Entre las múltiples características que pueden presentar los mARNs virales, la consideración más evidente surge de aquellos que presentan estructuras cap en sus extremos 5', para los cuales es de esperarse que la presencia de esta estructura implique el empleo del factor eIF4E en el inicio de la traducción, en este caso, cap-dependiente. Esto se cumple para virus tales como adenovirus o HSV-1, cuyas estrategias principales de reprogramación traduccional incluyen la hiperfosforilación de 4E-BP mediante la activación de la vía de PI3K/Akt/mTOR, con la consecuente activación de la traducción cap-dependiente (Feigenblum y Schneider, 1996; Gingras y Sonenberg, 1997; Walsh y Mohr, 2004; Kudchodkar y col., 2004; Walsh y col., 2005). En el otro extremo se encuentran aquellos virus que poseen estructuras IRES en sus mARNs, los cuales inician la traducción en forma independiente de eIF4E, y cuyas estrategias consisten en impedir la traducción cap-dependiente, tal es el caso de los picornavirus (Hellen y Sarnow, 2001).

En el caso de los arenavirus, la presencia de estructuras cap en los extremos 5' de los mARNs virales (Banerjee y col., 1976) nos llevó a plantear la hipótesis del requerimiento del factor eIF4E para

la traducción efectiva de las proteínas virales. Dado que, tal como fue expuesto anteriormente, una de las principales estrategias empleadas por los virus que traducen mediante mecanismos cap-dependientes consiste en la modulación de la vía de PI3K/Akt/mTOR, en una primera aproximación se estudió la capacidad de JUNV de modular dicha vía de señalización. En el marco de este estudio se observó la activación de Akt (mediante la aparición de su forma fosforilada en Ser473), mediada por PI3K, en las etapas tempranas de la infección. Esta activación fue desencadenada durante la entrada del virus a la célula y mostró estar asociada al mecanismo de endocitosis del receptor de Tfr, principal receptor empleado por JUNV para entrar a la célula hospedadora (van Dam y col., 2002; Galvez y col., 2007; Radoshitzky y col., 2007). La activación temprana de PI3K ha sido descrita en la infección de diversos virus, tales como influenza, enterovirus y virus Ebola, constituyendo una estrategia viral tendiente a optimizar la eficiencia de la entrada de estos agentes a la célula hospedadora (Wong y col., 2005; Ehrhardt y col., 2006; Saeed y col., 2008). Sin embargo, esta vía de señalización no está circunscripta a este único evento; en la infección con el virus Vaccinia se ha reportado que la activación de PI3K/Akt sería clave en la regulación de la traducción viral (Zaborowska y Walsh, 2009). De esta manera, la activación temprana de Akt inducida por JUNV, podría además de regular su mecanismo de entrada, tener como finalidad la modulación de la traducción cap-dependiente mediante la activación del complejo mTOR/raptor. En este sentido, el escaso shutoff inducido por el virus durante la infección (Candurra y col., 1990) sugiere la posible modulación del complejo mTOR/raptor como estrategia mediante la cual el virus logra la traducción de sus mARNs sin alterar sustancialmente la síntesis de las proteínas celulares.

Los resultados obtenidos mostraron que la inhibición del complejo mTOR/raptor, mediante el inhibidor específico rapamicina, no tuvo efectos considerables en la síntesis de antígenos de JUNV, lo cual sugeriría que dicho complejo no sería crucial en la replicación del virus. Sin embargo cabe destacar, que si bien la rapamicina se propone como un inhibidor de la traducción cap-dependiente tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha reportado que esta inhibición es solo parcial observándose una reducida disminución en la síntesis de proteínas celulares (Beretta y col., 1996). En este sentido, cuando se evaluó el tratamiento con rapamicina durante la infección con HSV-1, virus que requiere y estimula la traducción cap-dependiente, tampoco se observó una alteración en la replicación de este virus. Una posible explicación para esta observación se desprende de estudios en los cuales se propone que 4E-BP no estaría presente en cantidades suficientes para secuestrar todo el eIF4E celular disponible, de modo que si bien el tratamiento con rapamicina inhibe la fosforilación de 4E-BP estabilizando su unión a eIF4E, una proporción de este último factor quedaría libre y disponible para el inicio de la traducción (Feingenblum y Schneider, 1996; Morley y McKendrick, 1997; Cuesta y col., 2000). Esto explicaría la falta de inhibición observada frente a HSV-1, sin embargo el hecho de que

para este virus se plantea a la fosforilación de eIF4E (Ser209) como evento regulatorio clave de la traducción cap-dependiente del virus (Walsh y Mohr, 2004) cuestiona el efecto dominante de la inhibición de 4E-BP en el tratamiento con rapamicina. Por otro lado, la ausencia de inhibición de rapamicina también ha sido reportada durante la infección con HCMV, aunque en estos estudios se propone que la resistencia al tratamiento con esta droga se debería a una alteración de la afinidad de sustrato ejercida sobre el complejo mTOR/riCTOR. De esta forma, HCMV promueve la fosforilación de 4E-BP mediante el complejo mTOR/riCTOR, superando el efecto inhibitorio que la rapamicina ejerce sobre el complejo mTOR/raptor, encargado de la regulación de este factor en condiciones normales (Kudchodkar y col., 2006). Finalmente el efecto inhibitorio de esta droga ha sido reportado frente a la infección con los retrovirus HIV-1 y HTLV-1, aunque se sugiere que esta inhibición sería ejercida a nivel transcripcional más que a nivel traduccional (Rose y Lever, 2001; Roy y col., 2002).

De esta manera, la complejidad para definir el efecto de la rapamicina en la regulación de mTOR/raptor limitó nuestro uso como única herramienta para definir la estrategia traduccional empleada por JUNV. Por este motivo, se evaluó el requerimiento de eIF4E mediante un ensayo de expresión de un dominante negativo de 4E-BP, el cual mantiene secuestrado al factor eIF4E e impide, por lo tanto, el inicio de la traducción cap-dependiente (Burgui y col., 2007). La expresión de este dominante negativo afectó la replicación de HSV-1 utilizado como control, mientras que no tuvo efectos marcados en la multiplicación de JUNV y VSV. Estos resultados indicarían que a pesar de la presencia de estructuras cap en los mARNs virales, la participación de eIF4E, no sería requerida para la traducción de las proteínas de JUNV. Actualmente, la lista de virus que presentan una independencia del factor eIF4E, a pesar de tener estructuras cap en sus mARNs, está incrementándose continuamente, habiendo sido descrita para adenovirus, flavivirus, bunyavirus y el virus influenza (Cuesta y col., 2000; Edgil y col. 2006; Mir y Panganiban, 2008; Burgui y col., 2007). En el caso del virus influenza, la traducción de los cap-mARNs virales es llevada a cabo en condiciones en las cuales eIF4E es bloqueado experimentalmente mediante distintas estrategias, tales como el silenciamiento directo de eIF4E, el empleo de rapamicina y la expresión de un dominante negativo de 4E-BP. Se propone entonces que la polimerasa viral se uniría a los extremos 5'UTR de los cap-mARNs virales con mayor afinidad que eIF4E y promovería la unión de eIF4GI constituyendo de esta manera un complejo de inicio de la traducción viral. Además, la interacción de la proteína viral NS1 con lo eIF4GI y PABP (de La Luna y col., 1995; Park y col., 1995; Burgui y col., 2003), cooperaría en la formación de estos complejos de inicio de la traducción. Por otro lado, para hantavirus se reportó que el complejo de inicio de la traducción es completamente reemplazado por la nucleoproteína viral (N) (Mir y Panganiban, 2008). De esta manera, la nucleoproteína de hantavirus es capaz de unirse a la estructura cap tanto de los mARNs celulares como virales, sin embargo la presencia en estos últimos

de secuencias cortas 5'UTR facilitaría la unión de la nucleoproteína con mayor afinidad. Esto fue comprobado mediante ensayos de competencia de traducción *in vitro* en los cuales la traducción de los mARNs virales mediada por N predominó sobre la de los mARNs celulares. En el mismo trabajo se comprobó además que la proteína N reemplazaría a la helicasa eIF4A y se uniría establemente al complejo de pre-iniciación 43S prescindiendo de la actividad de eIF4GI. Ensayos de inmunoprecipitación de N de hantavirus comprobaron la presencia de eIF2 y la ausencia de eIF4E, eIF4A y eIF4GI en los complejos inmunoprecipitados (Mir y Panganiban, 2008).

De acuerdo a estos antecedentes la participación de eIF4GI y eIF4A podría entonces no ser necesaria para la traducción de los mARNs de JUNV. Sin embargo, a diferencia de lo reportado para hantavirus, el silenciamiento de eIF4GI afectó la replicación de JUNV, sugiriendo la participación de dicho factor en la multiplicación del virus. El empleo de la proteasa 2A de poliovirus permitió profundizar el estudio acerca de la participación de este factor. La expresión de esta proteasa es una herramienta ampliamente utilizada en los estudios de traducción ya que el corte proteolítico en eIF4G ocasionado por dicha proteasa tiene como consecuencia la inhibición de la traducción cap-dependiente (Etchison y Smith, 1990, Ventoso y col., 2001). Este efecto se explica por el hecho de que el corte de eIF4G produce la ruptura del factor en una porción amino terminal, que contiene los sitios de unión a eIF4E y PABP y otra carboxilo terminal que conserva los sitios de unión a eIF4A y eIF3, donde sólo esta última mantiene la capacidad de reclutar la subunidad ribosomal 40S. El producto carboxilo terminal es suficiente para promover la traducción mediada por IRES de picornavirus, tal es el caso de EMCV (Ziegler y col., 1995; Pestova y col., 2000). Para JUNV, la expresión de la proteasa 2A redujo considerablemente la síntesis de las proteínas virales, indicando que a pesar de la independencia del factor eIF4E, la porción carboxilo terminal sola no sería suficiente para dirigir la síntesis de las proteínas de JUNV. Este resultado constituye un hallazgo llamativo ya que la necesidad de un eIF4GI no clivado sugiere que la presencia de los sitios de unión a eIF4E y/o PABP sería/n fundamental/es para la traducción de las proteínas de JUNV. De acuerdo a lo reportado en bibliografía, los mARNs de los arenavirus se caracterizan por la ausencia de estructuras poli-A en sus extremos 3' (Meyer y Southern, 1993). Según esta observación la proteína PABP no sería requerida para la traducción de los mARNs virales. Sin embargo, es importante destacar que en este trabajo sólo se analizaron los mARNs de N y L, los cuales se encuentran codificados en el mismo sentido (sentido negativo) en los segmentos genómicos S y L, respectivamente. Esta observación no descarta que los mARNs codificados en sentido positivo, correspondientes a las proteínas GPC y Z, posean estructuras poli-A y tengan un mecanismo de traducción alternativo por lo que la ruptura de eIF4GI podría tener entonces consecuencias negativas en su traducción, debido a la ausencia del sitio de unión de PABP, tal como se propone para el virus influenza (Burgui y col., 2007). Sin embargo, en los

experimentos de marcación metabólica es muy probable que la banda que se logra detectar corresponda a la proteína N ya que constituye la proteína viral mayoritaria. De esta manera, la desaparición de esta banda durante la expresión de la proteasa viral, iría en contra de la hipótesis de la participación de PABP ya que el mRNA de N no tiene estructura poli-A. Habiendo concluido que el requerimiento de PABP, es poco probable y considerando la independencia de eIF4E demostrada en este trabajo, una posibilidad que podría explicar los resultados obtenidos mediante este ensayo de la proteasa viral sería la unión de otra proteína, distinta a PABP o eIF4E, a la porción amino terminal de eIF4G1.

La estrategia general de codificar factores transactivadores que aseguren una traducción viral eficiente no estaría restringida a los virus influenza o hantavirus, los mARNs subgenómicos del virus Sindbis, por ejemplo, también son traducidos en ausencia de un eIF4G1 funcional (Castelló y col., 2006), asimismo la expresión de la proteína N del virus Sendai es necesaria para la expresión de un gen reportero en un vector viral (Wiegand y col., 2007) y se postula que podría tener un efecto positivo en la traducción. De esta manera, la integridad del factor eIF4G1 necesaria para la infección de JUNV podría reflejar la intervención de una proteína viral que interactúe con este factor. De acuerdo a esta hipótesis se evaluó la participación de N como posible factor viral de traducción, observándose la presencia de dicha proteína en los complejos inmunoprecipitados contra eIF4G1. En este sentido, el requerimiento de este factor por parte del HCMV se asocia con un aumento en la síntesis del mismo durante la infección (Walsh y col., 2005). Esto no fue observado para JUNV, ya que la síntesis de eIF4G1 se mantuvo constante a pesar de la acumulación progresiva de N durante la infección. Resultados similares han sido reportados para HSV-1 e influenza (Walsh y Mohr, 2004; Burgui y col., 2003). En este último caso se observó la acumulación progresiva de la proteína viral NS1, mientras que la síntesis de los factores celulares con los cuales interactúa, eIF4G1 y PABP, se mantuvo constante. Estos resultados indicarían que los complejos virales serían capaces de competir efectivamente con los mARNs celulares por su unión a los ribosomas, sin inducir un aumento en la síntesis de los factores celulares de traducción. Por otro lado, ensayos de microscopía confocal corroboraron la interacción de N con eIF4G1, observándose una marcada co-localización con este factor en los sitios de expresión de N, mientras que la colocalización con GPC fue despreciable confirmando la especificidad de la interacción entre N y eIF4G1 y sugiriendo que N estaría participando activamente en procesos de traducción. Si bien en este trabajo no pudo comprobarse la presencia de la proteína ribosomal P en los sitios de expresión de N, en una primera aproximación se observó que durante la infección esta proteína es relocalizada en foci citoplasmáticos discretos en los cuales se observa la presencia de eIF4G1. Asumiendo la presencia de N en los complejos de eIF4G1, podría inferirse que estos foci de proteína P corresponderían a sitios de traducción virales. Se ha

reportado que la proteína viral Z interactuaría con la proteína ribosomal P (Borden y col., 1998), por lo cual la presencia de estos foci citoplasmáticos podrían relacionarse con dicha interacción. Sin embargo, se plantea que la interacción de Z con esta proteína ribosomal junto con el secuestro del factor eIF4E sería responsable de la represión traduccional de determinadas proteínas celulares entre las cuales encuentran las ciclinas D1 y E. De hecho tanto la proteína ribosomal P como eIF4E serían incorporados en las partículas virales (Campbell Dwyer y col., 2000). De acuerdo a estas observaciones los foci de proteína P podrían corresponder más que a sitios de traducción activa, a sitios de represión de determinadas proteínas celulares, en los cuales la presencia de eIF4E podría ser una consecuencia de la interacción de este factor con los mARNs secuestrados.

Por otro lado, la función represora de Z respecto de eIF4E apoya la hipótesis de un mecanismo de traducción independiente de este factor, tal como el que aquí se plantea. Sin embargo, dada la disposición genómica de esta proteína y la estrategia de replicación de los arenavirus, tanto la expresión de Z como de GPC es llevada a cabo sólo cuando se produce una cantidad suficiente de N que le permite a la polimerasa viral sintetizar ARN genómico complementario de longitud completa a partir del cual se transcriben los mARNs de GPC y Z. Teniendo en cuenta esta separación temporal resulta complejo plantear que la represión de eIF4E mediada por Z cooperaría con un mecanismo de traducción independiente de cap, ya que esta proteína sería una de las últimas en ser sintetizada. Sin embargo se ha reportado la presencia del mARNs de Z en el virión, y si bien hasta el momento no se ha dilucidado si su presencia se debe a un evento aleatorio, la elevada equivalencia molecular de dicho mARN en el virión plantea una posible función específica durante la infección (Salvato y col., 1992; Salvato y Shimomaye, 1989). De acuerdo a esta observación, la traducción inicial de los mARNs de N, L e incluso del mARN de Z presente en el virión, podría ser mediada por factor eIF4E o dicho de otra manera traducirían en forma cap-dependiente, hasta que los niveles de N sean lo suficientemente elevados para competir con dicho factor. En este sentido la traducción de Z, cooperaría con la actividad traduccional de N mediante el posterior secuestro de eIF4E. De acuerdo a esta teoría la activación temprana de la vía de PI3K/Akt/mTOR, tendría por finalidad favorecer la traducción cap-dependiente para lograr una competencia efectiva de los mARNs virales frente a los mARNs celulares. Esto explicaría que el efecto inhibitorio de Ly294002 sobre PI3K sea efectivo incluso hasta las 3 hs p.i., ya que si solamente actuara a nivel de la entrada del virus a la célula cabría esperar que su efecto no se extendiera más allá de los 30-45 min, tiempo en el cual la mayoría de las partículas virales ya han sido internalizadas. En el mismo sentido, el tratamiento con rapamicina o la expresión del dominante negativo para 4EBP afectaron levemente la replicación de JUNV, mientras que en el caso de VSV, virus que muestra una independencia completa de eIF4E, estos tratamientos indujeron incluso un leve aumento en la replicación del mismo (Connor and Lyles, 2002). Por otro

lado, la idea de una traducción cap-dependiente inicial requerida por JUNV, implicaría una menor eficiencia de traducción en el inicio de la infección, lo cual estaría de acuerdo con un ciclo relativamente lento de replicación observado para este virus. En este sentido el mRNA de Z presente en el virión podría ser clave para favorecer la actividad traduccional de N frente a una traducción cap-dependiente inicialmente favorecida mediante la activación de mTOR/raptor. La hipótesis de una traducción cap-dependiente en etapas tempranas de la infección también ha sido planteada para el virus influenza. Para este virus se propone que la traducción inicial se llevaría a cabo sin la contribución de factores virales, hasta que la síntesis de la polimerasa viral y NS1 serían lo suficientemente elevadas como para formar los complejos virales de traducción independientes de eIF4E (Burgui y col., 2007). En el caso de JUNV la hipótesis de una traducción inicial cap-dependiente hasta que los niveles de N sean lo suficientemente elevados explicaría también la ausencia de efecto de los inhibidores de PI3K en los cultivos persistentemente infectados con este virus. En estos cultivos los niveles altos de expresión de N independizarían al virus de su competencia con eIF4E. De acuerdo a esta observación podría esperarse que la multiplicación del virus sobreinfectante en los cultivos persistentemente infectados se viera favorecida, sin embargo estos cultivos muestran una resistencia a la sobreinfección característica (Ellenberg y col., 2002). La presencia de productos truncados, de N observados durante la etapa persistente de JUNV (Ellenberg y col., 2004), incapaces de actuar en los complejos de traducción virales, podría explicar la ausencia de efecto sobre la traducción del virus sobreinfectante. Sin embargo, si bien esta observación justifica la falta de efecto en sobre el virus sobreinfectante, no explica la elevada resistencia a la multiplicación del mismo, lo cual indicaría que otro evento más allá de la traducción estaría involucrado en esta resistencia. Por otro lado, a favor del posible rol traduccional de N, resultados preliminares mostraron que la infección aguda de células Vero previamente transfectadas con un plásmido de expresión de N, aumentó la replicación de JUNV, apoyando la hipótesis de que esta proteína favorecería la síntesis de las proteínas del virus.

En línea con esta hipótesis de una traducción inicial cap-dependiente es probable que al inicio de la infección la mayoría de los factores celulares sean requeridos para la síntesis de las proteínas virales, entre estos los factores eIF4A y eIF2, analizados en este trabajo. De acuerdo a esta observación el tratamiento con hippuristanol o la expresión del dominante negativo de eIF4A, podrían estar afectando esta traducción inicial y no necesariamente responden a si la intervención de este factor es necesaria para la formación de los complejos virales de traducción en los cuales se encontraría eIF4G1 y N. En el caso de hantavirus, el reemplazo de eIF4A por la proteína viral N, independiza a este factor de los complejos de traducción virales, no detectándose su presencia en ensayos de inmunoprecipitación dirigidos contra la proteína N. Por otro lado, la expresión de N de hantavirus revirtió la inhibición del dominante negativo de eIF4A sobre la expresión de un gen

reportero en ensayos de traducción *in vitro* (Mir y Panganiban, 2008). En el caso de JUNV la presencia de eIF4A en los complejos inmunoprecipitados contra la proteína N sugiere que la participación del mismo sería necesaria para la traducción de los mARN virales. Resultados similares fueron recientemente reportados para el virus influenza en los cuales se demostró que eIF4A no sería reemplazado por proteínas virales, comprobándose su intervención tanto *in vivo* como *in vitro* para la traducción de los mARNs del virus (Yángüez y col., 2011).

De acuerdo a estos resultados, una vez avanzada la infección, la proteína N reemplazaría al factor eIF4E, mientras que la función helicasa sería llevada a cabo canónicamente por eIF4A y el factor eIF4GI mediaría la unión de este probable complejo de traducción viral a la subunidad ribosomal 43S mediante su interacción con eIF3. Sin embargo, otra de las funciones importantes mediada por eIF4GI es la circularización del mARNs, mediante la unión entre eIF4E y la proteína PABP, aumentando de esta manera la eficiencia de traducción (Gale y col., 2000). En el caso de JUNV, la ausencia de estructuras poli-A sugiere que este factor no estaría participando en la traducción de los mARNs virales, indicando que la circularización de los mismos no sería requerida para la traducción de las proteínas virales o bien que sería mediada por un factor aún no identificado. En forma similar a JUNV, los mARNs de hantavirus se caracterizan por la presencia de estructuras cap y la ausencia de poli-A. Para este virus ha sido reportada la ausencia de interacción entre PABP y la proteína N (encargada de mediar la traducción de los mARNs del virus), planteándose que la traducción viral procedería en ausencia de la circularización de los mARNs (Mir y Panganiban, 2008). Sin embargo para el virus dengue ha sido reportado que, a pesar de la ausencia de poli-A en los mARNs virales, PABP se uniría a los extremos 3'UTR de los mismos lo cual permitiría la circularización de los mARNs aumentando, de esta manera, la eficiencia de traducción (Polacek y col., 2009). Si bien para JUNV no fue analizada la participación de esta proteína, no puede descartarse la posibilidad de que, en forma similar a lo reportado para el virus dengue, PABP podría estar participando de la circularización de los mARNs de JUNV. De acuerdo a esta hipótesis la reducción en la síntesis de proteínas de JUNV observada mediante la expresión de la proteasa de poliovirus, también podría deberse a la alteración del sitio de unión a PABP.

La participación de eIF2 requiere un análisis especial ya que la modulación de este factor constituye otro de los principales puntos de regulación de la traducción. En la mayoría de las infecciones virales la modulación de este factor consiste en impedir su fosforilación, proceso que la célula realiza a través de la proteína quinasa de eIF2 α , PKR, en respuesta al estrés que representa la multiplicación del virus y que tiene como consecuencia el bloqueo de la traducción, tal es el caso de poliovirus, virus influenza o HIV-1 (Gale y col., 2000). En el extremo opuesto se encontrarían aquellos virus que inducen la fosforilación de eIF2 α , ya que, o bien inician la traducción prescindiendo del Met-

tARNi, tal es el caso del virus de la parálisis del grillo (Wilson y col., 2000) o bien la presencia de estructuras de ARN estables cercanas al codón de inicio permiten iniciar una traducción canónica con Met-tARNi aún en presencia de p-eIF2 α , tal es el caso de los alfavirus Sindbis y Semliki Forest (Ventoso y col., 2006). En el caso de JUNV, eIF2 α se mantuvo hipofosforilado durante la infección, indicando una modulación negativa ejercida sobre la fosforilación del mismo por el virus. Resultados similares fueron reportados durante la infección con LCMV, indicando que la regulación de este factor sería clave en la biología de los arenavirus (Pasqual y col., 2011). En este sentido, el impedimento de la fosforilación de eIF2 α observado en las células infectadas en forma aguda con JUNV cuando son tratadas con arsenito de sodio, demuestra la necesidad de mantener a dicho factor activo durante la infección. Este proceso involucraría la expresión de las proteínas virales N y GPC. Sin embargo, llamativamente la fosforilación de eIF2 α no logra ser bloqueada por JUNV frente al estrés de RE, en forma similar a lo reportado para LCMV (Pasqual y col., 2011), sugiriendo que la modulación ejercida por los arenavirus sería específica sobre la respuesta a estrés oxidativo. Sin embargo, no es posible descartar la modulación sobre otro tipo de respuesta a estrés, no evaluada en este trabajo. La modulación específica de la respuesta a estrés oxidativo inducida por arsenito de sodio también ha sido reportada para los flavivirus dengue y West Nile (Emara y Brinton, 2007). La identidad de la proteína quinasa activada en respuesta al arsenito de sodio en células de mamíferos es controversial, algunos trabajos postulan que dicha quinasa sería HRI (quinasa regulada por el grupo hemo) mientras que otros sostienen que sería PKR (García y col., 2006, McEwen y col., 2005). Dada la importancia biológica de cada una de estas quinasas resulta difícil comprender la finalidad de la modulación de HRI durante una infección viral, siendo más afín a una infección producida por un virus la modulación de PKR. Independientemente de la quinasa activada durante el estrés inducido por arsenito de sodio, los resultados obtenidos demostraron que la modulación ejercida por JUNV, sería upstream de eIF2, dado que si el blanco de inhibición del virus fuera este factor, tanto el estrés oxidativo como el estrés de RE, deberían haber sido afectados por el virus. La modulación de este factor ha sido reportada para el virus influenza el cual regularía la respuesta global de estrés mediante la activación de la proteína fosfatasa PP1 α la cual mantiene a eIF2 hipofosforilado (He y col., 1997).

Otra de las consecuencias de la respuesta celular al estrés, además de la fosforilación de eIF2 α , es la formación de SGs lo cual resulta potencialmente perjudicial para aquellos virus que requieran alguno de los factores que son secuestrados en estas estructuras. En el caso de la infección con JUNV la presencia de eIF2 α hipofosforilado se correspondió con la ausencia de SGs detectados durante la infección. Resultados similares han sido reportados durante la infección con el virus Dengue y West Nile, en ambos casos el impedimento en la formación de SGs se debería a la relocalización de la proteína TIAR hacia los sitios de replicación viral junto con un impedimento en la

fosforilación de eIF2 α (Emara y Brinton, 2007). Por otro lado, rotavirus constituye un claro ejemplo del efecto perjudicial de la formación de SGs en multiplicación viral ya que durante la infección con este virus a pesar de inducirse la fosforilación de eIF2 α , se impide la formación de SGs mediante la relocalización de la proteína PABP (Montero y col., 2007). En el caso de la infección con JUNV, no se observó la relocalización de PABP ni de TIA-1, por lo cual es muy probable que este mecanismo no sea el responsable del impedimento en la formación de SGs. Sin embargo la relocalización de eIF4A o bien el requerimiento de eIF4GI observada durante la infección podrían explicar la resistencia a la formación de estas estructuras frente al distintos estímulos de estrés. En todos los casos el pre-tratamiento de las células con inductores de estrés que inducen la formación de SGs en forma dependiente o independiente de la fosforilación de eIF2 α , resultó perjudicial para JUNV. Estos resultados sugieren que la respuesta celular de estrés podría resultar perjudicial para JUNV tanto por el bloqueo del factor eIF2 como por el secuestro de los factores de inicio de la traducción, entre estos: eIF4E, eIF4A y eIF4GI, los cuales serían requeridos para la traducción de las proteínas virales. A su vez, el hecho de que los cultivos persistentemente infectados con JUNV no modulen la formación de SGs sugiere un mecanismo de regulación diferencial de la respuesta a estrés celular en la infección aguda y persistente. Los cultivos persistentes, en los cuales la dinámica de los SGs y PBs se encontraría inalterada, no fueron capaces de impedir la formación de SGs frente al tratamiento con distintos inductores. En el caso de la infección aguda la resistencia al estrés oxidativo fue mediada por la expresión de N y GPC. La ausencia de expresión de GPC, y la presencia de productos truncados de N que competirían con la N completa, podría explicar en parte por qué estos cultivos no son capaces de modular esta respuesta de estrés. En este sentido la resistencia a la multiplicación del virus sobreinfectante corrobora el requerimiento de la síntesis de N o GPC en la modulación de la respuesta a estrés.

Finalmente, un resultado llamativo observado en este trabajo fue la relocalización del factor de traducción p97/NAT1/DAP5 durante la infección con JUNV. Este factor presenta moderada homología de secuencia con eIF4GI y se caracteriza por la ausencia de los dominios de unión a eIF4E y PABP, y la presencia de los dominios de unión a eIF4A y eIF3, por lo cual se sugirió en principio que p97 podría actuar como un inhibidor de la traducción global mediante el secuestro de eIF4A y eIF3 en complejos inactivos. Los ensayos de microscopía confocal realizados durante la infección con JUNV mostraron la relocalización de este factor en los sitios de expresión de la proteína N, sugiriendo la presencia del mismo en los complejos de traducción virales. A pesar de la homología de p97 con el factor eIF4GI, su función es controversial y ha sido reportado que la sobreexpresión de p97 reduciría tanto la traducción cap-dependiente como la traducción IRES dependiente de EMCV (Imataka y col., 1997; Yamanaka y col., 1997). Sin embargo, dado que eIF3 y eIF4A se encontrarían en exceso respecto

de eIF4GI, en condiciones endógenas es poco probable que p97 compita con eIF4GI por estos factores (Duncan y Hershey, 1983; Mengod y Trachsel, 1985). De acuerdo con esta observación, se reportó que p97 es expresada abundantemente en células en proliferación activa y su silenciamiento incrementaría los niveles de proteínas inhibitorias del ciclo celular (Lee y McCormick, 2006). A su vez, p97 también ha sido implicada en el mecanismo de muerte celular programada desencadenada por la activación de receptores Fas o por p53, en este caso se ha reportado el clivaje de p97 en un fragmento denominado p86, cuya actividad induce la traducción preferencial de mARNs celulares que continenen IRES tales como XIAP, Apaf-1, HIAP2 y el mismo p97 (Henis-Korenblit y col., 2002; Nevins y col., 2003; Warnakulasuriyarachchi y col., 2004). En el caso de JUNV, el silenciamiento de p97 no tuvo efectos significativos en la traducción de sus proteínas, indicando que su presencia en los complejos de traducción no estaría directamente relacionada con la síntesis de las proteínas virales. En este sentido, pudo observarse que no todas las células infectadas presentaron a p97 relocalizada, apoyando el hecho de que participación no sería clave en la traducción viral. De acuerdo a las funciones reportadas para p97 su presencia en los complejos traduccionales de JUNV podría explicarse desde diferentes ángulos. Dada la estrecha relación entre p97 y p53, una posible causa que explicaría su presencia en los sitios de traducción de JUNV, sería la traducción de proteínas pro-apoptóticas, desencadenada mediante la activación de p53, factor que mostró ser activado durante la infección con JUNV (Fernandez Bell Fano, comunicación personal). La concentración de factores de inicio de la traducción en los complejos de traducción viral (donde se encuentra N), podría ser la causa de la presencia de p97, ya que ambas proteínas requerirían de los mismos factores, eIF4A y eIF3, mientras que prescindirían de eIF4E. De acuerdo a esta teoría la presencia de p97 se debería al requerimiento de factores de inicio de la traducción y su función sería pro-apoptótica. Otra posible hipótesis surge del hecho de considerar que la apoptosis inducida por JUNV es poco marcada. De acuerdo a esta observación la presencia de p97 en los sitios de expresión de N tendría una función opuesta a la planteada anteriormente, en la cual el secuestro mediado por un factor viral, probablemente N, tendría fines anti-apoptóticos, retrasando de esta manera la muerte celular del cultivo infectado. Sin embargo, es importante destacar que el secuestro de p97 mediado por N solo sería posible si se comprobara la interacción directa de N con eIF4GI, en la región de homología con p97.

De acuerdo a los principales resultados obtenidos en el presente trabajo se plantea el siguiente modelo de reprogramación traduccional utilizado por JUNV para llevar a cabo la síntesis de sus proteínas virales durante la infección aguda (Figura 68):

I- JUNV activa la vía de PI3K/Akt durante su entrada a la célula hospedadora.

La activación de PI3K/Akt es mediada por la unión del virus al receptor de Tfr y es necesaria para el reciclaje rápido de dicho receptor. Luego del desnudamiento se transcriben los mARNs de N y L mediante la ARN polimerasa dependiente de ARN a partir del ARN genómico.

II- La activación de mTOR/raptor, mediada por Akt, favorecería la traducción cap-dependiente en las primeras etapas de la infección.

La activación de mTOR/raptor fosforila a 4EBP, liberando a eIF4E y promoviendo por tanto la traducción cap-dependiente.

III- “Traducción temprana”: traducción de N y L.

Los mARNs de N y L serían traducidos en las etapas iniciales mediante la unión de eIF4E a las estructuras cap. Los factores eIF4A, eIF4GI y eIF2 participarían de en dicho mecanismo de traducción. La participación de una proteína celular o viral desconocida (X) podría participar en la circularización de los mARN virales no poliadenilados mediante su interacción con los extremos 3'UTRs. Cuando los niveles de N son suficientemente elevados, dicha proteína competiría y reemplazaría a eIF4E aumentando la eficiencia de la traducción viral. La proteína Z traducida a partir del mARN presente en el virión sería inicialmente traducida como los mARNs de N y L, mediante un mecanismo cap-dependiente, cooperando posteriormente con la actividad de N mediante el secuestro de eIF4E. La síntesis de N permite que la polimerasa sintetice la hebra de ARN antigénomico de longitud completa (replicación) a partir del cual se transcriben los mARNs de GPC y Z.

IV- Inhibición de la fosforilación de eIF2 α y la formación de SGs.

N inhibe la fosforilación de eIF2 α con el consecuente impedimento en la formación de SGs. La fosforilación de eIF2 α podría ser desencadenada por el ARNdc originado a partir de la replicación (lo cual activaría a PKR) e inhibiría la traducción global de las proteínas. La formación de SGs reduciría la disponibilidad de los factores eIF4A y eIF4GI necesarios para la traducción de los mARNs virales.

V- “Traducción tardía”: traducción de GPC y Z.

Los mARNs de GPC y Z serían traducidos en forma independiente de eIF4E, mediante la participación de N, eIF4A, eIF4GI y eIF2. GPC cooperaría con N para impedir la fosforilación de eIF2 α y evitar así la formación de SGs. Z secuestraría a eIF4E cooperando con la actividad traduccional de N. La presencia de p97 en los sitios de expresión de N no se debería a su participación en la traducción de los mARNs virales, sino a su función relacionada con el mecanismo de apoptosis.

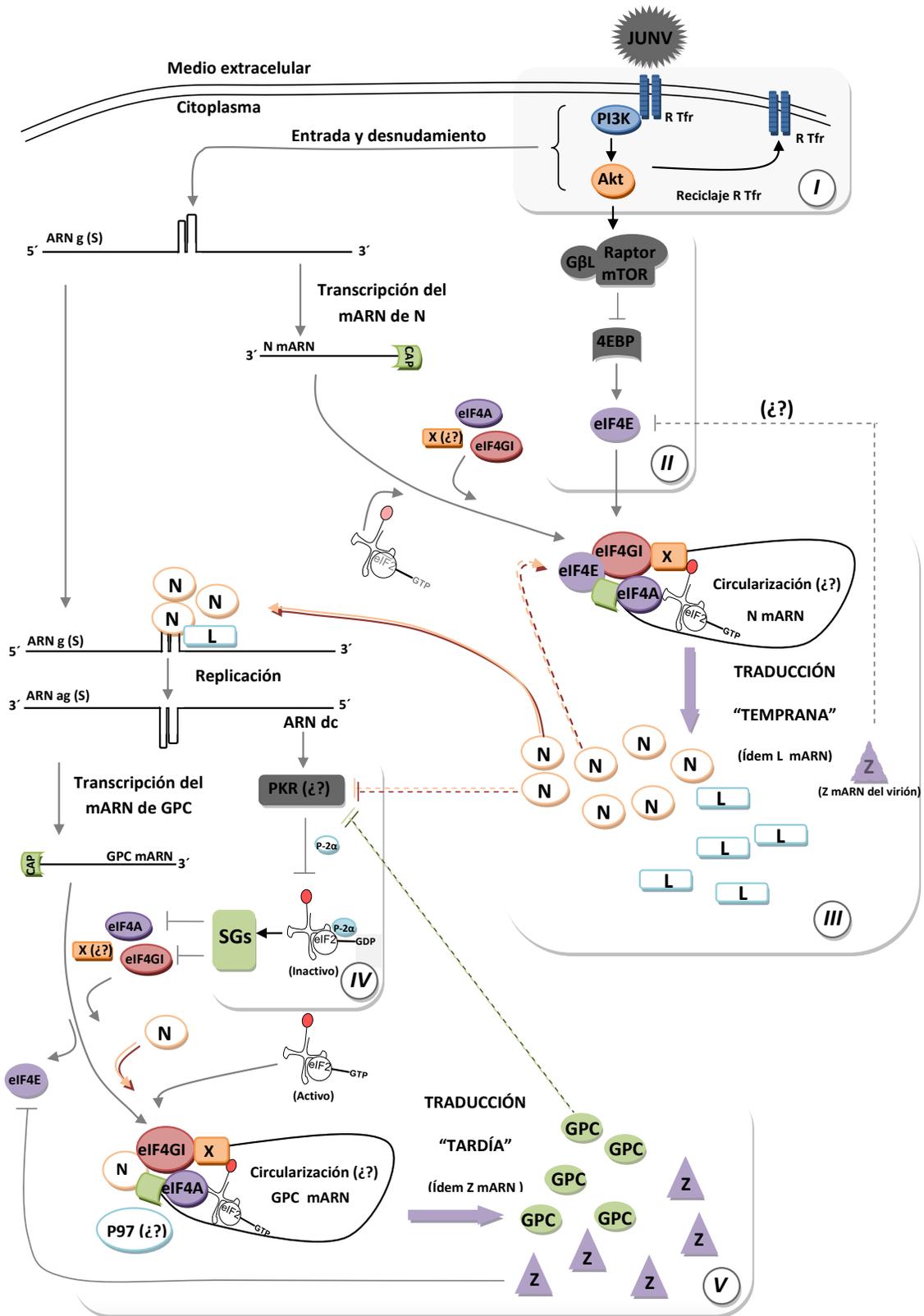


Figura 68. Modelo de reprogramación traduccional de inducido por JUNV durante la infección aguda. Líneas punteadas funciones propuestas para las proteínas virales en este trabajo. (¿?)= propuesto no comprobado. —| = inhibición. —> = activación. ARN g = ARN genómico. ARN ag= ARN antigénico. S= segmento genómico small. ARN dc= ARN doble cadena.

- Aldabe, R., Feduchi, E., Novoa, I. y Carrasco, L. (1995). Expression of poliovirus 2Apro in mammalian cells: effects on translation. *FEBS Lett.* 377(1), 1-5.
- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. (1996) .Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15(23):6541-51.
- Anderson P, Kedersha N. (2008). Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci.* 33(3):141-50. Review.
- Anderson, P. and Kedersha, N. (2002) Stressful initiations. *J. Cell Sci.* 115, 3227–3234.
- Anderson, P. and Kedersha, N. (2006) RNA granules. *J. Cell Biol.* 172, 803–808.
- Andreev DE, Fernandez-Miragall O, Ramajo J, et al. (2007). Differential factor requirement to assemble translation initiation complexes at the alternative start codons of foot-and-mouth disease virus RNA. *RNA* 13(8): 1366–1374.
- Artuso MC, Ellenberg PC, Scolaro LA, Damonte EB, García CC. (2009). Inhibition of Junín virus replication by small interfering RNAs. *Antiviral Res.* 84(1):31-7.
- Auperin, D. D., Galinski, M. & Bishop, D. H. (1984). The sequences of the N protein gene and intergenic region of the S RNA of pichinde arenavirus. *Virology* 134, 208-19.
- Balachandran, S., Roberts, P.C., Brown, L.E., Truong, H., Pattnaik, A.K., Archer, D.R., and Barber, G.N. 2000. Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity* 13: 129–141.
- Balvay L, Soto Rifo R, Ricci EP, Decimo D, Ohlmann. (2008). T. Structural and functional diversity of viral IREs. *Biochim Biophys Acta*; 1789(9–10): 542–557.
- Banerjee SN, Buchmeier M, Rawls WE. (1975-1976). Requirement of cell nucleus for the replication of an arenavirus. *Intervirology* 6(3):190-6.
- Beckman C.J. and Parker R. (2008). P-bodies, stress granules and viral life cycles. *Cell Host Microbe* 3, 206-212.
- Belsham GJ, Sonenberg N. (2000). Picornavirus RNA translation: roles for cellular proteins. *Trends Microbiol* 8(7): 330–335.
- Beretta L, Gingras AC, Svitkin V, Hall MN and Sonenberg N. (1996). Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J.* 15: 658-664
- Beyer, W. R., Popplau, D., Garten, W., von Laer, D. & Lenz, O. (2003). Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *J Virol* 77, 2866-72.
- Bishop D.H., Gay M.E. and Matsuoko Y. (1983). Nonviral heterogeneous sequences are present at the 4'ends of one species of snowshoe hare bunyavirus S complementary RNA. *Nucleic Acids Res* 11: 6409-18.
- Bordeleau, M.E. et al. (2005). Stimulation of mammalian translation initiation factor eIF4A activity by a small molecule inhibitor of eukaryotic translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10460–10465.

- Borden, K. L., Campbell Dwyer, E. J. & Salvato, M. S. (1998). An arenavirus RING (zincbinding) protein binds the oncoprotein promyelocyte leukemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm. *J Virol* 72, 758-66.
- Borrow, P. & Oldstone, M. B. (1994). Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells. *Virology* 198, 1-9.
- Bouloy M., Plotch S.J. and Krug R.M. (1978). Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4886-90.
- Bright, NA, Lindsay,MR, Stewart A and Luzio JP. (2001). The Relationship Between Luminal and Limiting Membranes in Swollen Late Endocytic Compartments Formed After Wortmannin Treatment or Sucrose Accumulation. *Traffic* 2, 631-642.
- Buchkovich, N.J.,Yu,Y.,Zampieri, C.A., Alwine, J.C. (2008). The TORrid affairs of viruses: effects of mammalian DNA viruses on the PI3K-Akt-mTOR signalling pathway. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 266–275.
- Buchmeier MJ, Gee SR, Rawls WE. (1977). Antigens of Pichinde virus I. Relationship of soluble antigens derived from infected BHK-21 cells to the structural components of the virion. *J Virol* 22(1):175-86.
- Buchmeier MJ, Oldstone MB. (1978). Virus-induced immune complex disease: identification of specific viral antigens and antibodies deposited in complexes during chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* 120(4):1297-304.
- Buchmeier, M. J. (2002). Arenaviruses: protein structure and function. *Curr Top Microbiol Immunol* 262, 159-73.
- Burgui I, Yángüez E, Sonenberg N, Nieto A. (2007). Influenza virus mRNA translation revisited: is the eIF4E cap-binding factor required for viral mRNA translation? *J Virol.* 2007 Nov;81(22):12427-38.
- Burgui I, Yángüez E, Sonenberg N, Nieto A. (2007). Influenza virus mRNA translation revisited: is the eIF4E cap-binding factor required for viral mRNA translation? *J.Virol.*, 81:12427-38.
- Burgui, I., T. Aragón, J. Ortín, and A. Nieto. (2003). PABP1 and eIF4GI associate to influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J. Virol.* 84:3263-3274.
- Burns, J. & Buchmeier, M. (1993). Glycoproteins of the Arenaviruses. *The Viruses*. Wagner, R. & Frankel Conrat, H. Eds.. Plenum Press, New York. pp. 17-31.
- Bushell M and Sarnow P. (2002). Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. *J Cell Biol.* 158(3):395-9.
- Cajimat, M.N., Milazzo, M.L., Bradley, R.D., Fulhorst, C.F. (2007). Catarina virus, an arenaviral species principally associated with *Neotoma micropus* (southern plains woodrat) in Texas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 732–736.
- Campbell Dwyer EJ, Lai H, MacDonald RC, Salvato MS, Borden KL. (2000) The lymphocytic choriomeningitis virus RING protein Z associates with eukaryotic initiation factor 4E and selectively represses translation in a RING-dependent manner. *J Virol.* 74(7):3293-300.

- Candurra N.A., Lago M.J., Maskin M., Damonte E.B. (1999). Involvement of cytoskeleton on Junin virus multiplication. *Journal of General Virology*, 80:147-156.
- Candurra N.B. y Damonte E.B. 1999. Acción inhibitoria de la cafeína sobre la multiplicación del virus Junín. *Revista Argentina de Microbiología* 31: 135-141.
- Candurra NA, Scolaro LA, Mersich SE, Damonte EB, Coto CE. (1990). A comparison of Junin virus strains: growth characteristics, cytopathogenicity and viral polypeptides. *Res Virol.* 141:505-15.
- Candurra, N. A. & Damonte, E. B. (1985). Influence of cellular functions on the evolution of persistent infections with Junin virus. *Arch Virol* 86, 275-82.
- Carballal, G., Cossio, P. M., Rabinovich, A., Oubina, J. & Arana, R. M. (1980). Description of a BHK/21 cell line persistently infected with Junin virus: its use in diagnostic procedures. *Intervirology* 14, 173-9.
- Carpenter, C. L., Auger, K. R., Chanudhuri, M., Yoakim, M., Schaffhausen, B., Shoelson, S. & Cantley, L. C. (1993). Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. *J Biol Chem* 268, 9478–9483.
- Castello, A., Sanz, M.A., Molina, S. y Carrasco, L. (2006). Translation of Sindbis virus 26S mRNA does not require intact eukariotic initiation factor 4G. *J Mol Biol* 355(5), 942-56.
- Castilla, V., Mersich, S. E., Candurra, N. A. & Damonte, E. B. (1994). The entry of Junin virus into Vero cells. *Arch Virol* 136, 363-74.
- Charrel R.N., de Lamballerie X. (2010). Zoonotic aspects of arenavirus infections,. *Veterinary Microbiology* 140 213–220.
- Charrel, R. N. & de Lamballerie, X. (2003). Arenaviruses other than Lassa virus. *Antiviral Res* 57, 89-100.
- Clemens, M. J. (1994). Regulation of eukaryotic protein synthesis by protein kinases that phosphorylate initiation factor eIF-2. *Mol. Biol. Rep.* 19:201–210.
- Clemens, M. J., and A. Elia. (1997). The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J. Interferon Cytokine Res.* 17: 503–524.
- Compans, R. (1993). Arenavirus ultrastructure and morphogenesis. *The Viruses*. Wagner, R. & Frankel Conrat, H. Eds.. Plenum Press, New York. pp. 3-14
- Connor JH and Lyles DS. (2002). Vesicular Stomatitis Virus Infection Alters the eIF4F Translation Initiation Complex and Causes Dephosphorylation of the eIF4E Binding Protein 4E-BP1. *Virol.* 2002 October; 76(20): 10177–10187.
- Connor, J.H., Lyles, D.S. (2002). Vesicular stomatitis virus infection alters the eIF4F translation initiation complex and causes dephosphorylation of the eIF4E binding protein 4E-BP1. *J. Virol.* 76, 10177–19187.
- Cooray S.(2004). The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival. *J Gen Virol.*;85:1065-76.
- Cornu, T. I. & de la Torre, J. C. (2001). RING finger Z protein of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) inhibits transcription and RNA replication of an LCMV S-segment minigenome. *J Virol* 75, 9415-26.

- Cornu, T. I. & de la Torre, J. C. (2002). Characterization of the arenavirus RING finger Z protein regions required for Z-mediated inhibition of viral RNA synthesis. *J Virol* 76, 6678-88.
- Coto, C. E., De Vombergar, M. D. & De Tkaczewski, L. Z. (1970). [Interaction of Junin virus with monkey kidney cells]. *Medicina (B Aires)* 30, Suppl 1:38-44.
- Cuesta R, Laroia G and Schneider RJ. (2000). Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes and Dev*, 14: 1460-1470.
- Cuesta R., Xi, Q., and Schneider, R.J. (2000). Adenovirus-specific translation by displacement of kinase Mnk1 from capinitiation complex eIF4F. *EMBO J*. 19: 3465-3474.
- D Feigenblum and R J Schneider. (1996). Cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) and 4E-inactivating protein BP-1 independently regulate cap-dependent translation. *Mol Cell Biol*. 16(10): 5450–5457.
- Damonte, E. B., de Salum, S. B., Larripa, I. & Coto, C. E. (1979). [Virological and cytogenetic characteristics of Vero cells persistently infected with Tacaribe virus]. *Medicina (B Aires)* 39, 589-96.
- Damonte, E. B., Mersich, S. E. & Coto, C. E. (1978). [Viral susceptibility of Vero cells persistently infected
- De Guerrero, L. B., Weissenbacher, M. C. & Parodi, A. S. (1969). [Immunization against Argentinian hemorrhagic fever using an attenuated strain of Junin virus. I. Modified strain of Junin virus. Immunization of guinea pigs]. *Medicina (B Aires)* 29, 1-5.
- de la Luna, S., P. Fortes, A. Beloso, and J. Ortin.(1995). Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J. Virol*. 69:2427-2433.
- De la Torre, J. C. (2005). Arenavirus extinction through lethal mutagenesis. *Virus Res* 107, 207-14.
- Dever, T.E.. (2002). Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 108, 545-556.
- Di Simone, C. & Buchmeier, M. J. (1995). Kinetics and pH dependence of acid-induced structural changes in the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein complex. *Virology* 209, 3-9.
- Di Simone, C., Zandonatti, M. A. & Buchmeier, M. J. (1994). Acidic pH triggers LCMV membrane fusion activity and conformational change in the glycoprotein spike. *Virology* 198, 455-65.
- Djavani, M., Lukashovich, I. S., Sanchez, A., Nichol, S. T. & Salvato, M. S. (1997). Completion of the Lassa fever virus sequence and identification of a RING finger open reading frame at the L RNA 5' End. *Virology* 235, 414-8.
- Duncan R, Hershey JW. (1983). Identification and quantitation of levels of protein synthesis initiation factors in crude HeLa cell lysates by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*. 258(11):7228-35.
- Edgil D, Polacek C, Harris E. (2006). Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited. *J Virol*. 80(6):2976-86.
- Ehrhardt C, Marjuki H, Wolff T, Nürnberg B, Planz O, Pleschka S, Ludwig S. (2006). Bivalent role of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) during influenza virus infection and host cell defence. *Cell Microbiol*. 8(8):1336-48.

- Eichler R, Strecker T, Kolesnikova L, ter Meulen J, Weissenhorn W, Becker S, Klenk HD, Garten W, Lenz O. (2004). Characterization of the Lassa virus matrix protein Z: electron microscopic study of virus-like particles and interaction with the nucleoprotein (NP). *Virus Res* 100 (2):249-55.
- Ellenberg, P., Edreira, M., Lozano, M. & Scolaro, L. (2002). Synthesis and expression of viral antigens in Vero cells persistently infected with Junin virus. *Arch Virol* 147, 1543-57.
- Ellenberg, P.C., Edreira, M.M., Scolaro, L.A. (2004). Resistance to superinfection of Vero cells persistently infected with Junin virus. *Arch. Virol.* 149, 507–522.
- Ellenberg, P.C., Linero, F.N., Scolaro, L.A. (2007). Superinfection exclusion in BHK-21 cells persistently infected with Junin virus. *J. Gen. Virol.* 88, 2730–2739.
- Emara, M.M. and Brinton, M.A. (2007) Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 9041–9046.
- *Enf. Infecc.* 2: 119.
- Etchison, D. y Smith, K. (1990). Variations in cap-binding complexes from uninfected and poliovirus-infected HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 265(13), 7492-500.
- Eulalio, A. et al. (2007) P bodies: at the crossroads of posttranscriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 9–22.
- Feigenblum, D., Schneider, R.J. (1993). Modification of eukaryotic initiation factor 4F during infection by influenza virus. *J. Virol.* 67, 3027–3035.
- Filbin ME and Kieft JS. (2009). Toward a structural understanding of IRES RNA function. *Curr Opin Struct Biol*; 19(3): 267–276.
- Fitzgerald KD, Semler BL. (2009). Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim Biophys Acta.* 1789(9–10): 518–528.
- Fitzgerald KD, Semler BL. (2009). Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim Biophys Acta* 1789(9–10): 518–528.
- Foukas, L.C.. (2002). Direct effects of caffeine and theophylline on p110 σ and other phosphoinositide 3-kinases.
- Fukunaga, R., Hunter, T. (1997). MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J.* 16, 1921–1933.
- Gale, M; Tan, S and Katze M.G. (2000). Translational Control of Viral Gene Expression in Eukaryotes. *Microbiology and molecular biology reviews* 64: 239-280.
- Gallaher, W. R., DiSimone, C. & Buchmeier, M. J. (2001). The viral transmembrane superfamily: possible divergence of Arenavirus and Filovirus glycoproteins from a common RNA virus ancestor. *BMC Microbiol* 1, 1.
- Gallie, D. R. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.*, 5: 2108–2116, 1991. 40.

- Gallie, D.R., Browning, K.S. (2001). eIF4G functionally differs from eIF4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. *J. Biol. Chem.* 276, 36951–36960.
- Galvez T, Teruel MN, Heo WD, Jones JT, Kim ML, Liou J, Myers JW, Meyer T. (2007). siRNA screen of the human signaling proteome identifies the PtdIns(3,4,5)P3-mTOR signaling pathway as a primary regulator of transferrin uptake. *Genome Biol.*8(7):R142.
- García MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E, Rivas C, Esteban M. (2006). Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70(4):1032-60.
- Garcin, D., Rochat, S. & Kolakofsky, D. (1993). The Tacaribe arenavirus small zinc finger protein is required for both mRNA synthesis and genome replication. *J Virol* 67, 807-12.
- Ghazal, P., Gonzalez Armas, J. C., Garcia-Ramirez, J. J., Kurz, S. & Angulo, A. (2000). Viruses: hostages to the cell. *Virology* 275, 233-7.
- Gingras, A.-C., Raught, B., Sonenberg, N. (2001). Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* 15, 807–826.
- Gingras, A.C., Sonenberg, N., (1997). Adenovirus infection inactivates the translational inhibitors 4E-BP1 and 4E-BP2. *Virology* 237, 182–186.
- Gingras, AC, Raught, B. and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 913-963.
- Haghighat, A., Mader, S., Pause, A., Sonenberg, N. (1995). Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *EMBO J.* 14, 5701– 5709.
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M. and Ron, D. (2000a). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* 6, 1099-1108.
- Harding, H.P. et al. (2000b) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell* 5, 897–904.
- Hass, M., Westerkofsky, M., Muller, S., Becker-Ziaja, B., Busch, C. & Gunther, S. (2006). Mutational Analysis of the Lassa Virus Promoter. *J Virol.* 80(24):12414-9.
- Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR. (2006). Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans.* 34:647–662.
- He B, Gross M and Roizman D. (1997). The g134.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1a to dephosphorylate the α subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94, pp. 843–848.
- He, B., Gross, M., and Roizman, B. (1997). The (1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1 α to dephosphorylate the α subunit of the eukaryotic translation initiation factor

- 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 843–848.
- Hellen CU and Sarnow P. (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.* 15(13):1593-612.
 - Help, G. I., Leon, M. E. & Coto, C. E. (1976). [Interference associated with cell cultures chronical by infected with the Junin virus]. *Rev Asoc Argent Microbiol* 8, 45-53.
 - Henis-Korenblit,S., Shani,G., Sines,T., Marash,L., Shohat,G. and Kimchi,A. (2002). The caspase-cleaved DAP5 protein supports internal ribosome entry site-mediated translation of death proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 99, 5400–5405.
 - Henis-Korenblit,S., Strumpf,N.L., Goldstaub,D. and Kimchi,A. (2000). A novel form of DAP5 protein accumulates in apoptotic cells as a result of caspase cleavage and internal ribosome entry site-mediated translation. *Mol. Cell. Biol.*, 20, 496–506.
 - Hentze, M. W. (1997). eIF4G: a multipurpose ribosome adapter? *Science* 275:500–501.
 - Hiles, I. D., Otsu, M., Volinia, S., Fry, M. J., Gout, I., Dhand, R., Panayotou, G., Ruiz-Larrea, F., Thompson, A. & other authors (1992). Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell* 70, 419–429.
 - Huang, J.T., Schneider, R.J. (1991). Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis involves inactivation of cap-binding protein. *Cell* 65, 271–280.
 - Hunt SL, Jackson RJ. (1999). Polypyrimidine-tract binding protein (PTB) is necessary, but not sufficient, for efficient internal initiation of translation of human rhinovirus-2 RNA. *RNA* 5(3): 344–359.
 - Ian Mohr. 2005. Phosphorylation and dephosphorylation events that regulate viral mRNA translation. *Virus Research* 119 (2006) 89–99.
 - Imataka, H., Olsen, H.S., and Sonenberg, N. (1997). A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G. *EMBO J.* 16: 817–825.
 - Jacamo, R., Lopez, N., Wilda, M. & Franze-Fernandez, M. T. (2003). Tacaribe virus Z protein interacts with the L polymerase protein to inhibit viral RNA synthesis. *J Virol* 77, 10383-93.
 - Jackson, R. J. (1996). A comparative view of initiation site selection mechanisms, p. 71–112. In J. W. B. Hershey, M. B. Mathews, and N. Sonenberg (ed.), *Translational control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
 - Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E. (1988). A segment of the 50 nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* 62(8): 2636–2643.
 - Joachims, M., P. C. Van-Breugel, and R. E. Lloyd. (1999). Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. *J. Virol.* 73:718–727.
 - Katze, M. G. (1995). The war against the interferon-induced, doublestranded RNA-activated protein kinase: can viruses win? *J. Interferon Res.* 12:241–248.

- Kaufman, R.J. (1999). Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: A new role for an old actor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 11693–11695.
- Kedersha, N. et al. (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* 169, 871–884.
- Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I. and Anderson, P. (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 147, 1431-1442.
- Kedersha, N., Chen, S., Gilks, N., Li, W., Miller, I., Stahl, J. and Anderson, P. (2002). Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNAMet)-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol. Biol. Cell* 13, 195-210.
- Keiper, B. D., W. Gan, and R. E. Rhoads. (1999). Protein synthesis initiation factor 4G. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31:37–48.
- Kentsis A, Gordon RE, Borden KL. (2002). Control of biochemical reactions through supramolecular RING domain self-assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24):15404-9.
- Kerekatte, V., B. D. Keiper, C. Badorff, A. L. Cai, K. U. Knowlton, and R. E. Rhoads. (1999). Cleavage of poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease in vitro and in vivo: another mechanism for host protein synthesis shutoff? *J. Virol.* 73:709–717.
- Kimball, S.R. (1999). Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31: 25–29.
- Kimball, S.R., Fabian, J.R., Pavitt, G.D., Hinnebusch, A.G., and Jefferson, L.S. (1998). Regulation of guanine nucleotide exchange through phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF2alpha. Role of the alpha- and delta-subunits of eIF2B. *J. Biol. Chem.* 273: 12841–12845.
- Kolakofsky D and Hacker D. (1991). Bunyavirus RNA synthesis: genome transcription and replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 169: 143-59.
- Kolakofsky D, and Garcin D. (1993). The unusual mechanism of arenavirus RNA synthesis. Plenum Press, New York.
- Kozac, M.. (1980). Evaluation of the “scanning model” for initiation of protein synthesis in eucaryotes. *Cell* 22, 7-8.
- Kudchodkar SB, Yu Y, Maguire TG, Alwine JC. (2006). Human cytomegalovirus infection alters the substrate specificities and rapamycin sensitivities of raptor- and rictor-containing complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(38):14182-7.
- Kudchodkar, S.B., Yu, Y., Maguire, T.G., Alwine, J.C. (2004). Human cytomegalovirus infection induces rapamycin-insensitive phosphorylation of downstream effectors of mTOR kinase. *J. Virol.* 78, 11030–11039.
- Kunz, S., Edelmann, K. H., de la Torre, J. C., Gorney, R. & Oldstone, M. B. (2003). Mechanisms for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein cleavage, transport, and incorporation into virions. *Virology* 314, 168-78.

- Lee SH, McCormick F. (2006). p97/DAP5 is a ribosome-associated factor that facilitates protein synthesis and cell proliferation by modulating the synthesis of cell cycle proteins. *EMBO J.* 25(17):4008-19.
- Lee, K. J., Novella, I. S., Teng, M. N., Oldstone, M. B. & de La Torre, J. C. (2000). NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. *J Virol* 74, 3470-7.
- Lenz, O., ter Meulen, J., Klenk, H. D., Seidah, N. G. & Garten, W. (2001). The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12701-5.
- Levy-Strumpf, N., Deiss, L.P., Berissi, H., and Kimchi, A. (1997). DAP-5, a novel homolog of eukaryotic translation initiation factor 4G isolated as a putative modulator of g interferone-induced programmed cell death. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1615–1625.
- Lewis SM, Holcik M. (2008). For IRES trans-acting factors, it is all about location. *Oncogene* 27(8): 1033–1035.
- Li W, Li Y, Kedersha N, Anderson P, Emara M, Swiderek KM, Moreno GT, Brinton MA. (2002). Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-loop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication. *J Virol.* 76:11989-2000.
- Li, W. et al. (2002) Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 30 stem-loop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication. *J. Virol.* 76, 11989–12000.
- Lopez, N. & Franze-Fernandez, M. T. (2007). A single stem-loop structure in Tacaribe arenavirus intergenic region is essential for transcription termination but is not required for a correct initiation of transcription and replication. *Virus Res* 124, 237-44.
- Lopez, N., Jacamo, R. & Franze-Fernandez, M. T. (2001). Transcription and RNA replication of tacaribe virus genome and antigenome analogs require N and L proteins: Z protein is an inhibitor of these processes. *J Virol* 75, 12241-51.
- Mader, S., Lee, H., Pause, A., Sonenberg, N. (1995). The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4G and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4990–4997.
- Mamane Y., Petroulakis E., LeBacquer O. and Sonenberg N. (2006). mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 25, 64-16-22).
- Marcotrigiano, J., Gingras, A.C., Sonenberg, N., Burley, S.K. (1999). Capdependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol. Cell* 3, 707–716.
- Martinez, M.G., Cordo, S.M., Candurra, N.A. (2007). Characterization of Junin arenavirus cell entry. *J. Gen. Virol.* 88, 1776–1784.
- Martínez-Sobrido L, Giannakas P, Cubitt B, García-Sastre A, de la Torre JC. (2007). Differential inhibition of type I interferon induction by arenavirus nucleoproteins. *J Virol* 81(22):12696-703.

- Martínez-Sobrido L, Zúñiga El, Rosario D, García-Sastre A, de la Torre JC. (2006). Inhibition of the type I interferon response by the nucleoprotein of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 80(18):9192-9.
- Mathews, M. B. (1993). Viral evasion of cellular defense mechanisms: regulation of the protein kinase DAI by RNA effectors. *Semin. Virol.* 4:247–258.
- Mathews, M. B. (1996). Interactions between viruses and the cellular machinery for protein synthesis, p. 505–548. In J. W. B. Hershey, M. B. Mathews, and N. Sonenberg (ed.), *Translational control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
- Mazroui, R. et al. (2006) Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 17, 4212–4219.
- McEwen, E. et al. (2005) Heme-regulated inhibitor (HRI) kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2) inhibits translation, induces stress granule formation, and mediates survival upon arsenite exposure. *J. Biol. Chem.* 280, 16925–16933.
- McInerney, G.M. et al. (2005) Importance of eIF2alpha phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation. *Mol. Biol. Cell* 16, 3753–3763.
- Mengod G, Trachsel H. (1985). Eukaryotic protein synthesis initiation factor eIF-3: determination of concentration and association with ribosomes in rabbit reticulocyte and HeLa cell lysates. *Biochim Biophys Acta.*825(2):169-74.
- Meric, F. and Hunt K. (2002). Translation Initiation in Cancer: A novel Target for Therapy. *Mol. Cancer Therap.* 1, 971-979.
- Merrick, W. C., and J. W. B. Hershey. (1996). The pathway and mechanism of eukaryotic protein synthesis, p. 31–70. In J. W. B. Hershey, M. B. Mathews, and N. Sonenberg (ed.), *Translational control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
- Meyer B.J. and Southern P.J. (1993). Current sequence analysis of 5' and 3' RNA termini by intramolecular circularization reveals 5' nontemplated bases and 3' terminal heterogeneity for lymphocytic choriomeningitis virus mRNAs. *J Virol* 67: 2621-7.
- Meyer, B. J., de la Torre, J. C. & Southern, P. J. (2002). Arenaviruses: genomic RNAs, transcription, and replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 262, 139-57.
- Milazzo, M.L., Cajimat, M.N., Haynie, M.L., Abbott, K.D., Bradley, R.D., Fulhorst, C.F. (2008). Diversity among tacaribe serocomplex viruses (family Arenaviridae) naturally associated with the white-throated woodrat (*Neotoma albigula*) in the southwestern United States. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 523–540.
- Mir, M.A., Durana, W. A., Hjelleb, B. L., Yeb, C. and Panganibana, A. T. (2008). Storage of cellular 5' mRNA caps in P bodies for viral cap-snatching. *PNAS* 105, 19294-19299.
- Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S (2005). JNK and PI3k/Akt signaling pathways are required for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *Biochim Biophys Acta* 1741:4-10.

- Montero H, Rojas M, Arias CF, López S. (2007). Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2 α but prevents the formation of stress granules. *J Virol.* 82:1496-504, 2007.
- Morin B, Coutard B, Lelke M, Ferron F, Kerber R, et al. (2010) The N-Terminal Domain of the Arenavirus L Protein Is an RNA Endonuclease Essential in mRNA Transcription. *PLoS Pathog* 6(9): e1001038. doi:10.1371/journal.ppat.1001038).
- Morley S.J. and McKendrick, L. (1997). Involvement of stress-activated protein kinase and p38/RK mitogen activated protein kinase signaling pathways in the enhanced phosphorylation of initiation factor 4E in NIH 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 272: 17887-17893.
- Morley, S. J., P. S. Curtis, and V. M. Pain. (1997). eIF4G: Translation's mystery factor begins to yield its secrets. *RNA* 3:1085–1104.
- Murga, C., Laguinge, L., Wetzker, R., Cuadrado, A., Gutkind, J.S., 1998. Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 273, 19080–19085.
- Neuman, B. W., Adair, B. D., Burns, J. W., Milligan, R. A., Buchmeier, M. J. & Yeager, M. (2005). Complementarity in the supramolecular design of arenaviruses and retroviruses revealed by electron cryomicroscopy and image analysis. *J Virol* 79, 3822-30.
- Nevins, T.A., Harder, Z.M., Korneluk, R.G. and Holcik, M. (2003) Distinct regulation of internal ribosome entry site-mediated translation following cellular stress is mediated by apoptotic fragments of eIF4G translation initiation factor family members eIF4GI and p97/DAP5/NAT1. *J. Biol. Chem.*, 278, 3572–3579.
- Niepman M. 2009. Internal Translation Initiation of picornavirus and Hepatitis C virus. *Biochim Biophys Acta* 1789: 529-541.
- Niepmann M. (2009). Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus. *Biochim Biophys Acta* 1789(9–10): 529–541.
- Nusch, M; Reed, V., BRYSON-RICHARDSON, RJ, CURRIE, P., PREISS T. (2007). The eIF4G–homolog p97 can activate translation independent of caspase cleavage. *RNA* 13: 374-384.
- Ohlmann, T., M. Rau, V. M. Pain, and S. J. Morley. (1996). The C-terminal domain of eukaryotic protein synthesis initiation factor (eIF) 4G is sufficient to support cap-independent translation in the absence of eIF4E. *EMBO J.* 15:1371–1382.
- Pain, V. M. (1996). Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* 236:747–771.
- Parisi, G., Echave, J., Ghiringhelli, D. & Romanowski, V. (1996). Computational characterisation of potential RNA-binding sites in arenavirus nucleocapsid proteins. *Virus Genes* 13, 247-54.
- Park, Y. W., and M. G. Katze. (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.
- Parker, R. and Sheth, U. (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol. Cell* 25, 635–646.

- Pasqual G, Burri DJ, Pasquato A, de la Torre JC, Kunz S. (2011). Role of the host cell's unfolded protein response in arenavirus infection. *J Virol.* 85(4):1662-70.
- Patel, R. C., and G. C. Sen. (1998). PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *EMBO J.* 17:4379–4390.
- Patterson J.L. and Kolakofsky D. (1984). Characterization of La Crosse virus small-genome transcripts. *J virol* 49: 680-5.
- Pause, A., G. J. Belsham, A. C. Gingras, O. Donze', T. A. Lin, J. C. Lawrence, and N. Sonenberg. (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 59-cap function. *Nature* 371: 762–767.
- Pelletier J, Sonenberg N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334(6180): 320–325.
- Perez, M., Craven, R. C. & de la Torre, J. C. (2003). The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12978- 83.
- Pery, T., Mathews, M.B. (2000). Viral translational strategies and host defense mechanisms. In: Sonenberg, N., Hershey, J.W.B., Mathews, M.B. (Eds.), *Translational Control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp. 371–424.
- Pestova, T.V., Lomakin, I.B., Lee, J.H., Choi, S.K., Dever, T.E. y Hellen, C.U. (2000). The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* 403(6767), 332-5.
- Peters C.J., Buchmeier M., Rollin P.E., Ksiazek T.G. (1996). Arenaviruses. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanock, R.M., Melnick, J.L., Monath, T.P., Roizman, R., Straus, S.E. (Eds.), *Fields Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, pp. 1521–1551.
- Pinschewer, D. D., Perez, M. & de la Torre, J. C. (2003). Role of the virus nucleoprotein in the regulation of lymphocytic choriomeningitis virus transcription and RNA replication. *J Virol* 77, 3882-7.
- Pinschewer, D. D., Perez, M. & de la Torre, J. C. (2005). Dual role of the lymphocytic choriomeningitis virus intergenic region in transcription termination and virus propagation. *J Virol.* 79, 4519-26.
- Polacek C, Friebe P and Harris E. (2009). Poly(A)-binding protein binds to the non-polyadenylated 3' untranslated region of dengue virus and modulates translation efficiency. 2009. *J Gen Virol* 90 (2009), 687-692.
- Polacek C, Friebe P, Harris E. (2009). Poly(A)-binding protein binds to the non-polyadenylated 3' untranslated region of dengue virus and modulates translation efficiency. *J Gen Virol.* 90(Pt 3):687-92.
- Prevot D, Darlix JL, Ohlmann T. (2003). Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell* 95(3–4): 141–156.
- Prévôt D, Darlix JL, Ohlmann T. (2003). Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell.* 95(3-4):141-56.

- Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A.-C., Fukunaga, R., Hunter, T., Sonenberg, N. (1999). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J.* 18, 270–279.
- Radoshitzky, S. R., Abraham, J., Spiropoulou, C. F., Kuhn, J. H., Nguyen, D., Li, W., Nagel, J., Schmidt, P. J., Nunberg, J. H., Andrews, N. C., Farzan, M. & Choe, H. (2007). Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature* 446 (7131):92-6.
- Rogers Jr., G.W., Komar, A.A., Merrick, W.C. (2002). eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72, 307–331.
- Roizman, B., Knipe, D. (2001). Herpes simplex viruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields' Virology*, fourth ed. Lippincott/The Williams & Wilkins Co., Philadelphia, pp. 2239–2459.
- Romanowski, V. & Bishop, D. H. (1983). The formation of arenaviruses that are genetically diploid. *Virology* 126, 87-95.
- Rose N, Lever A. (2001). The rapamycin sensitivity of human T-cell leukaemia virus type I-induced T-cell proliferation is mediated independently of the polypyrimidine motifs in the 5' long terminal repeat. *J Gen Virol.* 82(Pt 2):435-9.
- Rose NJ and Lever AM. (2001). The rapamycin sensitivity of human T-cell leukaemia virus type I-induced T-cell proliferation is mediated independently of the polypyrimidine motifs in the 5' long terminal repeat. *Journal of General Virology* 82, 435-439.
- Rowe, W. P., Murphy, F. A., Bergold, G. H., Casals, J., Hotchin, J., Johnson, K. M., Lehmann-Grube, F., Mims, C. A., Traub, E. & Webb, P. A. (1970). Arenoviruses: proposed name for a newly defined virus group. *J Virol* 5, 651-2.
- Roy J, Paquette JS, Fortin JF, and Tremblay MJ. (2002). The Immunosuppressant Rapamycin Represses Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* p. 3447-3455, Vol. 46, No. 11.
- Rugiero, H. R., Astarloa, L., Gonzalez Cambaceres, C., Maglio, F. & Squassi, G. (1969). [Immunization against Argentina hemorrhagic fever using a strain attenuated Junin virus. II. Immunization of volunteers, clinical and laboratory analysis]. *Medicina (B Aires)* 29, 81-7.
- Saeed MF, Kolokoltsov AA, Freiberg AN, Holbrook MR, Davey RA. 2008. Phosphoinositide-3 kinase-Akt pathway controls cellular entry of Ebola virus. *PLoS Pathog.* 4(8):e1000141
- Salvato, M. S. & Shimomaye, E. M. (1989). The completed sequence of lymphocytic choriomeningitis virus reveals a unique RNA structure and a gene for a zinc finger protein. *Virology* 173, 1-10.
- Salvato, M. S., Schweighofer, K. J., Burns, J. & Shimomaye, E. M. (1992). Biochemical and immunological evidence that the 11 kDa zinc-binding protein of lymphocytic choriomeningitis virus is a structural component of the virus. *Virus Res* 22, 185-98.

- Salvato, M.S., Clegg, J.C.S., Buchmeier, M.J., Charrel, R.N., Gonzalez, J.P., Lukashevich, I.S., Peters, C.J., Rico-Hesse, R., Romanowski, V. (2005). Family Arenaviridae. In: Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M.
- Sanchez, A. B. & de la Torre, J. C. (2005). Genetic and biochemical evidence for an oligomeric structure of the functional L polymerase of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 79, 7262-8.
- Sarbassov DS, Guertin DA, Ali SA and Sabatini DM. (2005). Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science* Vol. 307 no. 5712 pp. 1098-1101.
- Scheper, G.C., Morrice, N.A., Kleijn, M., Proud, C.G. (2001). The mitogenactivated protein kinase signal-integrating kinase Mnk2 is a eukaryotic initiation factor 4E kinase with high levels of basal activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 21, 743–754.
- Scheper, G.C., Proud, C.G. (2002). Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur. J. Biochem.* 269, 5350–5359.
- Scheper, G.C., van Kollenburg, B., Hu, J., Luo, Y., Goss, D.J., Proud, C.G. (2002). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA. *J. Biol. Chem.* 277, 3303–3309.
- Semler BL, Waterman ML. (2008). IRES-mediated pathways to polysomes: nuclear versus cytoplasmic routes. *Trends Microbiol* 16(1): 1–5.
- Siddhanta U, McIlroy J, Shah A, Zhang Y, Backer JM. (1998). Distinct roles for the p110alpha and hVPS34 phosphatidylinositol 3'-kinases in vesicular trafficking, regulation of the actin cytoskeleton, and mitogenesis. *J Cell Biol.*, 143: 1647-59.
- Simonsen, A et al., (1998), EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation to endosome function. *Nature* 394, 494-498.
- Skolnik, E. Y., Margolis, B., Mohammadi, M., Lowenstein, E., Fischer, R., Drepps, A., Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1991). Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. *Cell* 65, 83–90.
- Southern, P. J., Singh, M. K., Riviere, Y., Jacoby, D. R., Buchmeier, M. J. & Oldstone, M. B. (1987). Molecular characterization of the genomic S RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 157, 145-55.
- Srivastava, S.P. et al. (1998) Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 2416–2423.
- 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.

- Stojdl, D.F., Abraham, N., Knowles, S., Marius, R., Brasey, A., Lichty, B.D., Brown, E.G., Sonenberg, N., and Bell, J.C. (2000). The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 74: 9580–9585.
- Stoneley M, Willis AE. (2004). Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 23(18): 3200–3207.
- Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R. & other authors (1995). Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 269, 690–693.
- Street, A., Macdonald, A., Crowder, K. & Harris, M. (2004). The hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 279, 12232–12241.
- Sudhakar, A., Ramachandran, A., Ghosh, S., Hasnain, S.E., Kaufman, R.J., and Ramaiah, K.V. (2000). Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 α (eIF2 α) promotes complex formation between eIF2 α (P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B. *Biochemistry* 39: 12929–12938.
- Tarun Jr., S.Z., Wells, S.E., Deardorff, J.A., Sachs, A.B. (1997). Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail-dependent translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9046–9051.
- Thomsen, A. R., Nansen, A., Andreasen, S. O., Wodarz, D. & Christensen, J. P. (2000). Host factors influencing viral persistence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355, 1031-41.
- Tortorici, M. A., Albarino, C. G., Posik, D. M., Ghiringhelli, P. D., Lozano, M. E., Rivera Pomar, R. & Romanowski, V. (2001). Arenavirus nucleocapsid protein displays a transcriptional antitermination activity in vivo. *Virus Res* 73, 41-55.
- Tourriere, H. et al. (2003) The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J. Cell Biol.* 160, 823–831.
- Trachsel H. (1996). Binding of initiator methionyl-tRNA to ribosomes, p113-118. In JWB Hershey, MW matheuw, and N Sonenberg (ed.), *Translational control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y
- Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Yokosawa, H. & Yasuda, J. (2006). Cellular factors required for Lassa virus budding. *J Virol* 80, 4191-5.
- Van Dam, E.M., Ten Broeke, T., Jansen, K., Spijkers, P., Stoorvogel, W. (2002). Endocytosed transferrin receptors recycle via distinct dynamin and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 277, 48876–48883.
- Ventoso I, Sanz MA, Molina S, Berlanga JJ, Carrasco L, Esteban M. (2006). Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2 α phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes Dev.* 20(1):87-100.
- Ventoso, I., Blanco, R., Perales, C. y Carrasco, L. (2001). HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98(23), 12966-71.

- Vezza AC, Clewley JP, Gard GP, Abraham NZ, Compans RW, Bishop DH. (1978). Virion RNA species of the arenaviruses Pichinde, Tacaribe, and Tamiami. *J Virol* 26(2):485-97.
- Vezza AC, Gard GP, Compans RW, Bishop DH. (1977). Structural components of the arenavirus Pichinde. *J Virol* 23(3):776-86
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, and Brown RF. (1994). A Specific Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase, 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (Ly294002). *J. biol. chem.*, 269: 5241-5248.
- Walsh, D., Mohr, I. (2004). Phosphorylation of eIF4E by mnk-1 enhances HSV-1 translation and replication in quiescent cells. *Genes Dev.* 18, 660–672.
- Walsh, D., Perez, C., Notary, J., Mohr, I. (2005). Regulation of the translation initiation factor eIF4F by multiple mechanisms in human cytomegalovirus-infected cells. *J. Virol.* 79, 8057–8064.
- Warnakulasuriyarachchi, D., Cerquozzi, S., Cheung, H.H. and Holcik, M. (2004). Translational induction of the inhibitor of apoptosis protein HIAP2 during endoplasmic reticulum stress attenuates cell death and is mediated via an inducible internal ribosome entry site element. *J. Biol. Chem.*, 279, 17148–17157.
- Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G., Cooper, J.A. (1997). Mitogenactivated protein kinases activate the serine/threonine kinases mnk1 and mnk2. *EMBO J.* 16, 1909–1920.
- Weber, E. L., de Guerrero, L. B. & Boxaca, M. C. (1985). MRC-5 cells, a model for Junin virus persistent infection. *J Gen Virol* 66 (Pt 5), 1179-83.
- Weissenbacher, M. & Damonte, E. (1983). Fiebre Hemorrágica Argentina. *Adel. Microbiol.*
- Wek, S.A. et al. (1995) The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4497–4506
- Welnowska E, Castelló A, Moral P, Carrasco L. (2009). Translation of mRNAs from vesicular stomatitis virus and Vaccinia virus is differentially blocked in cells with depletion of eIF4GI and/or eIF4GII. *J Mol Biol.* 394(3):506-21.
- White, J.P. et al. (2007) Inhibition of cytoplasmic mRNA stress granule formation by a viral proteinase. *Cell Host Microbe* 2, 295–305.
- Wiegand MA, Bossow S, Schlecht S, Neubert WJ. (2007). De novo synthesis of N and P proteins as a key step in Sendai virus gene expression. *J Virol.* 2007 Dec;81(24):13835-44.
- Wilczynska, A. et al. (2005) The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J. Cell Sci.* 118, 981–992.
- Wilson JE, et al. (2000). Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Mol Cell Biol* 20(14): 4990–4999.
- Wilson, J.E., Pestova, T.V., Hellen, C.U., and Sarnow, P. (2000). Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome. *Cell* 102: 511–520.
- Wong, W.R., Chen, Y.Y., Yang, S.M., Chen, Y.L., Horng, J.T. (2005). Phosphorylation of PI3K/Akt and MAPK/ERK in an early entry step of enterovirus 71. *Life Sci.* 78, 82–90.

- Yamanaka, S., Poksay, K.S., Arnold, K.S., and Innerarity, T.L. (1997). A novel translational repressor mRNA is edited extensively in livers containing tumors caused by the transgene expression of the apoB mRNA-editing enzyme. *Genes & Dev.* 11: 321–323.
- Yang, W. and Hinnebusch, A.G. (1996). Identification of a regulatory subcomplex in the guanine nucleotide exchange factor eIF2B that mediates inhibition by phosphorylated eIF2. *Mol. Cell. Biol.* 16: 6603–6616.
- 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 RNAeIF2 dependent protein kinase. *EMBO J.* 14: 6095–6106.
- Yángüez E, Castello A, Welnowska E, Carrasco L, Goodfellow I, Nieto A. (2011). Functional impairment of eIF4A and eIF4G factors correlates with inhibition of influenza virus mRNA translation. *Virology*. Mar 4. Epub ahead of print.
- York, J., Agnihothram, S. S., Romanowski, V. & Nunberg, J. H. (2005). Genetic analysis of heptad-repeat regions in the G2 fusion subunit of the Junin arenavirus envelope glycoprotein. *Virology* 343, 267-74.
- York, J., Romanowski, V., Lu, M. & Nunberg, J. H. (2004). The signal peptide of the Junin arenavirus envelope glycoprotein is myristoylated and forms an essential subunit of the mature G1-G2 complex. *J Virol* 78, 10783-92.
- Young, P. R. & Howard, C. R. (1983). Fine structure analysis of Pichinde virus nucleocapsids. *J Gen Virol* 64: 833-42.
- Zaborowska I, Walsh D. (2009). PI3K signaling regulates rapamycin-insensitive translation initiation complex formation in vaccinia virus-infected cells. *J Virol.* 83(8):3988-92.
- Ziegler, E., Borman, A.M., Deliat, F.G., Liebig, H.D., Jugovic, D., Kean, K.M., Skern, T. y Kuechler, E. (1995). Picornavirus 2A proteinase-mediated stimulation of internal initiation of translation is dependent on enzymatic activity and the cleavage products of cellular proteins. *Virology* 213(2), 549-57.
- Zinchuk V. and Zinchuk O. (2008). Quantitative Colocalization Analysis of Confocal Fluorescence Microscopy Images. *Current Protocols in Cell Biology* 4.19.1-4.19.16.