

2. Biología molecular del virus de la gripe

JUAN ORTÍN

*Profesor de Investigación
Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)*

INTRODUCCIÓN

Los virus de la gripe son los agentes causales de infecciones respiratorias en humanos que aparecen como epidemias anuales con gran morbilidad y ocasionalmente como pandemias con importante mortalidad. La elevada capacidad de estos virus para generar variantes antigénicas ha permitido definir la gripe como una enfermedad constante causada por un virus siempre variable. Los virus gripales son originalmente patógenos de aves, en muchas de cuyas especies, principalmente aves silvestres, replican eficazmente pero no causan enfermedad. Ocasionalmente, estos virus residentes en aves son transmitidos a otras especies animales o a la población humana, que puede ser inmunológicamente virgen para el nuevo patógeno, dando lugar a pandemias de gran impacto. La elevada variabilidad de los virus de la gripe, junto con su alta transmisibilidad y su amplio rango de huésped, han hecho de ellos uno de los patógenos que más mortalidad ha causado en el pasado siglo XX, entre 40 y 100 millones de personas muertas sólo teniendo en cuenta las pandemias de los años 1918, 1957, 1968 y 1977. Por otra parte, las epidemias anuales han ocasionado elevadas pérdidas económicas y un número similar de muertes acumuladas durante el siglo XX. A la vista de estos hechos y de la situación generada por la circulación generalizada en el mundo de virus aviarios altamente patogénicos del subtipo H5N1, y su transmisión ocasional al hombre, recientemente se ha tomado conciencia de que estamos en continuo riesgo de padecer una pandemia de enormes consecuencias. El incremento de nuestro conoci-

miento sobre la biología molecular del virus y de sus mecanismos de patogenicidad nos permitirán mejorar los sistemas de alerta temprana para detectar la aparición de nuevos virus pandémicos, intentar limitar su dispersión y atenuar las consecuencias de una previsible pandemia.

Clasificación de los virus gripales

La familia *Orthomyxoviridae* incluye virus con envuelta membranosa cuyo genoma está formado por varias moléculas de RNA de cadena simple y polaridad negativa. Dentro de esta familia se distinguen cinco géneros, los virus gripales de *tipo A, B y C*, los *Thogotovirus*, que infectan insectos, y los *Isavirus* que infectan peces. Los tres géneros de virus gripales se caracterizan por la ausencia de reactividad serológica cruzada frente a los dos componentes proteicos más abundantes en la partícula vírica (la nucleoproteína —NP— y la proteína matriz —M1—) y por la ausencia de recombinación entre sus genomas en infecciones dobles. Los virus gripales tipo A son los causantes de la mayor parte de los casos de enfermedad en humanos y los únicos que han producido pandemias a lo largo del siglo XX. Se clasifican en numerosos subtipos, en función de la naturaleza antigénica de sus glicoproteínas de superficie: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Existen 16 diferentes subtipos de HA y 9 de NA y el subtipo de cada virus viene definido por la combinación de la HA y la NA que contiene, por lo que la diversidad antigénica es muy amplia.

Morfología y componentes estructurales de la partícula viral

La partícula del virus de la gripe contiene una envuelta lipídica que aparece rodeada por unas espículas o proyecciones que corresponden a las dos proteínas externas mayoritarias en el virión (HA y NA) (Fig. 1). Las partículas virales son pleomórficas, de forma general esférica, con un diámetro de entre 80 y 120 nm, aunque algunas cepas de virus generan partículas filamentosas de hasta varios micrómetros de longitud. En general, las cepas aisladas de casos clínicos suelen contener más partículas filamentosas que las cepas que han sido multiplicadas en cultivos *in vitro*.

La envuelta lipídica contiene tres proteínas de membrana: HA, NA y proteína M2 (Fig. 1). Las proteínas HA y NA son abundantes, siendo la HA mayoritaria en la membrana, mientras que la proteína M2 está presente sólo en unas pocas copias por virión (Zebedee and Lamb, 1988). La HA se encuentra formando homotrímeros mientras que la proteína NA y la proteína M2 forman homotetrámeros. Tanto la proteína HA como la NA están glicosiladas con modificaciones del tipo N-glicosídico, mientras que no se ha descrito glicosilación de la proteína M2. Los tres polipéptidos de la envuelta son proteínas integrales de membrana, y tienen un ectodominio que se proyecta hacia el exterior del virión, una región transmembrana de unos 20 aminoácidos que está contenida en la envuelta y una región citoplásmica que se extiende hacia el interior de la partícula viral, de entre 6 y 54 aminoácidos.

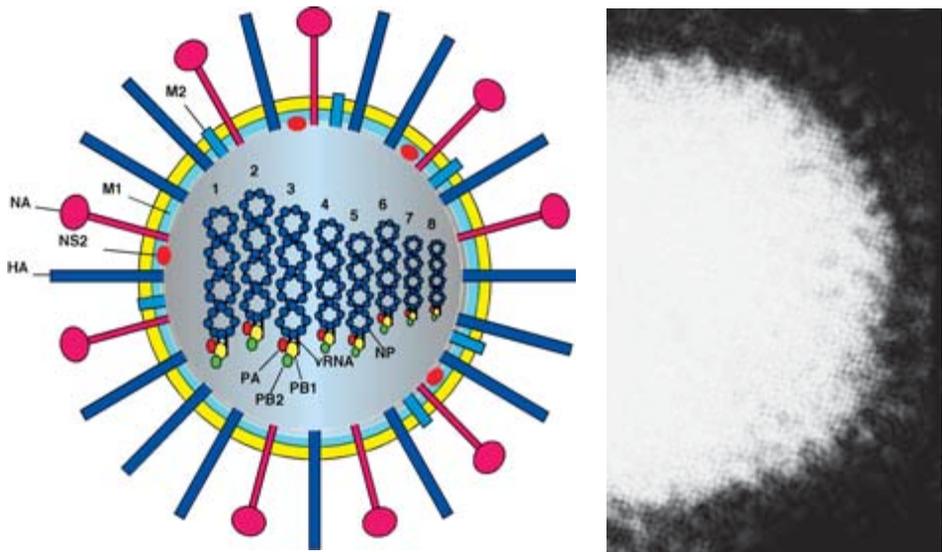


FIGURA 1. Esquema de una partícula viral. (Izquierda) Se presenta un esquema idealizado de una partícula viral esférica, en la que la membrana se representa en color amarillo y la capa de proteína M1 en color azul. Se indica la localización de las proteínas asociadas a la membrana (HA, NA, M1, M2 y NS2/NEP). En el interior de la partícula se muestran las ocho distintas RNP virales, cada una de ellas compuestas de una molécula de RNA asociada a la polimerasa viral (complejo de las proteínas PB1, PB2 y PA) y a un número de monómeros de la nucleoproteína (NP), dependiendo de la longitud de cada segmento de RNA. (Derecha) Imagen de una partícula viral purificada al observarla por microscopía electrónica de transmisión tras tinción negativa. Se aprecia la forma aproximadamente esférica general, con la apariencia membranosa de la superficie en la que resultan aparentes las proyecciones de las proteínas de membrana.

La HA es una glicoproteína tipo I que contiene su extremo C-terminal en el interior de la partícula (equivalente al citoplasma), mientras que la NA es una glicoproteína tipo II y tiene su extremo N-terminal intracelular. Ambas glicoproteínas presentan dos regiones diferenciadas en el ectodominio: Una región alargada o tallo y un dominio globular distal. En estas regiones globulares contienen el dominio proteico que interacciona con el receptor celular (HA), y la actividad neuraminidasa que destruye el receptor celular (NA). Por otra parte, el conjunto de las regiones transmembrana del tetrámero de la proteína M2 forma un canal iónico que permite el paso de protones.

Por debajo de la envuelta lipídica se encuentra la proteína M1, que se asocia consigo misma formando una capa proteica que encierra las ribonucleoproteínas del virus. Por una parte, la proteína M1 está en contacto con la membrana lipídica y con las colas citoplásmicas de las HA y NA, mientras que por otras regiones de la proteína interacciona con las ribonucleoproteínas internas. La proteína M1 es el factor mínimo necesario para la formación de partículas virales (Gómez-Puertas *et al.*, 1999). El papel básico que la proteína M1 ejerce en la infección y la multiplicidad de interacciones que establece se ve reflejada en su estabilidad evolutiva, de modo que M1 es la más conservada entre las proteínas virales (Ito *et al.*, 1991).

Por debajo de la proteína M1 se encuentra el genoma viral, que está constituido por ocho segmentos de RNA diferentes. Cada uno de ellos se encuentra asociado con el complejo de la polimerasa —las proteínas PB1, PB2 y PA— y con monómeros de la NP, formando lo que se denominan ribonucleoproteínas (RNPs) virales. Además de los componentes ya mencionados, el virión incluye la proteína NS2/NEP (*nuclear export protein*, proteína de exportación nuclear), que interacciona con la proteína M1, y cuya función en la partícula vírica se desconoce. En la Tabla I se indican algunas de las características de las diferentes proteínas virales, así como su abundancia relativa en el virión.

TABLA 1. *Características de los genes y las proteínas expresadas por el virus de la gripe A*

Segmento	Longitud ¹	Proteína	Tamaño ²	Abundancia ³	Funciones
1	2.341	PB2	759	30-40	Proteína de unión a cap. Iniciación de transcripción
2	2.341	PB1 PB1-F2	757 87	30-40	Polimerasa Unión a la mitocondria. Apoptosis
3	2.233	PA	716	30-40	Proteasa. Replicación
4	aprox. 1.770	HA	aprox. 566	500	Hemaglutinina. Unión al receptor. Proteína de fusión. Respuesta inmune
5	1.565	NP	498	1.000	Proteína de la nucleocápsida. Replicación. Encapsidación
6	aprox. 1.413	NA	aprox. 454	100	Neuraminidasa. Destrucción del receptor. Respuesta inmune
7	1.027	M1	252	3.000	Unión de la nucleocápsida a la membrana
		M2	96	50	Canal jónico. Fusión de las membranas
8	890	NS1	aprox. 230	—	Modulación de la expresión génica. Virulencia
		NS2	121	50	Exportación de la nucleocápsida del núcleo

¹ Longitud en nucleótidos. ² Tamaño en aminoácidos. ³ Abundancia en la partícula viral.

Características de los RNAs virales

El genoma del virus de la gripe tipo A está formado por ocho segmentos de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa cuya longitud oscila entre 2.341 y 890 nucleótidos. Sus secuencias terminales en los extremos 5' y 3' son conservadas y parcialmente complementarias. Estas secuencias se encuentran asociadas entre sí y unidas al complejo de la polimerasa (Klumpp *et al.*, 1997). Tras el estudio de la estructura de los terminales de los RNAs mediante predicciones de su plegamiento, experimentos de mutagénesis y de resonancia magnética nuclear, se han

propuesto modelos tipo *panhandle* —mango de sartén—, *fork* —tenedor— y *corkscrew* —sacacorchos— para la zona de interacción entre los extremos (Cheong *et al.*, 1999; Flick and Hobom, 1999; Fodor *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 1987) (Fig. 2). Sin embargo, el esclarecimiento de esta estructura no será posible hasta determinar a nivel atómico la estructura del complejo de la polimerasa asociado al molde.

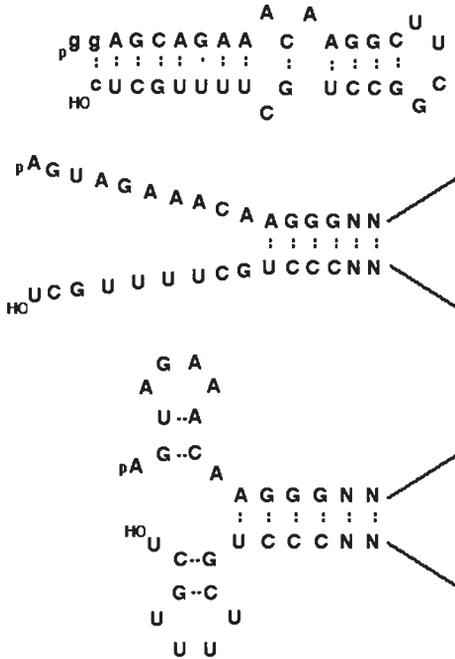


FIGURA 2. Estructura del promotor del RNA viral. La figura muestra distintas posibilidades para la estructura del promotor de transcripción-replicación del RNA viral. En todas ellas, los extremos 5' y 3' del RNA se asocian entre sí, determinando una conformación circular de éste. Arriba se muestra el modelo «mango de sartén» —*panhandle*— determinado por RMN. En el centro se muestra el modelo «tenedor» —*fork*—, mientras que abajo se muestra el modelo «sacacorchos» —*corkscrew*.

En la célula infectada se generan tres tipos de RNA virales: (1) vRNAs, que tienen polaridad negativa y se encapsidan en los viriones de la progenie. (2) cRNAs, que son copia exactamente complementaria de los vRNAs (Hay *et al.*, 1982) y se acumulan en el núcleo de la célula infectada, y (3) mRNAs, que son también de polaridad positiva pero son distintos de los cRNAs porque están poliadenilados en su extremo 3' y contienen una estructura *cap* en su extremo 5'. Los mRNAs virales poseen secuencias celulares variables en su extremo 5', consecuencia del mecanismo de iniciación de la transcripción (Krug *et al.*, 1979) (Fig. 3). Además, los mRNAs no pueden actuar como intermediarios durante la replicación porque carecen del complemento de la secuencia 5'-terminal del vRNA correspondiente.

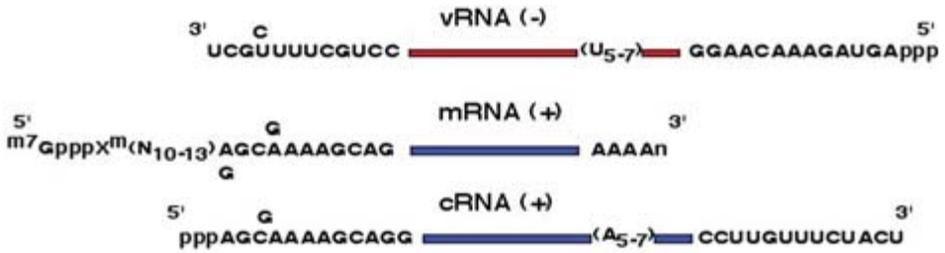


FIGURA 3. RNAs virales presentes en la célula infectada. En la célula infectada se producen tres tipos de RNA para cada uno de los segmentos virales: vRNA, de polaridad negativa; mRNA, de polaridad positiva, y cRNA, también de polaridad positiva. La figura muestra la posición de la señal de poliadenilación U_{5,7} en el vRNA, la presencia de cap y secuencias heterogéneas en el extremo 5' del mRNA y de poliA en su extremo 3'. Asimismo, se indican las secuencias conservadas entre todos los segmentos de RNA viral y la presencia de trifosfato en los extremos 5' de los vRNA y cRNA.

Características de las proteínas virales

Los ocho segmentos de RNA genómicos de los virus gripales tipo A contienen información para once proteínas. En general, cada segmento codifica una proteína, pero algunos de ellos contienen información para dos genes solapados.

Los dos segmentos más pequeños generan dos proteínas distintas cada uno, mediante *splicing* diferencial del transcrito primario (Inglis *et al.*, 1979; Inglis and Brown, 1981; Lamb and Lai, 1980; Lamb *et al.*, 1981). El segmento 7 da lugar a tres mRNAs diferentes: el mRNA transcrito primario, que contiene la información para la proteína M1, y dos transcritos procesados. Uno de ellos codifica la proteína M2 y el otro apenas contiene capacidad codificante (Fig. 4).

El segmento 8 genera dos transcritos diferentes: el transcrito primario, que codifica la proteína NS1, y el transcrito procesado que da lugar a la proteína NS2/NEP (Fig. 4). Tal y como se muestra en la Figura 4, las proteínas M1 y M2 por un lado y las NS1 y NS2/NEP por otro, contienen una región N-terminal común, pero difieren en la mayor parte de su secuencia. El proceso de *splicing* de estos transcritos primarios está regulado de modo que no es completamente eficiente y por tanto se generan ambos tipos de mRNAs y de proteínas.

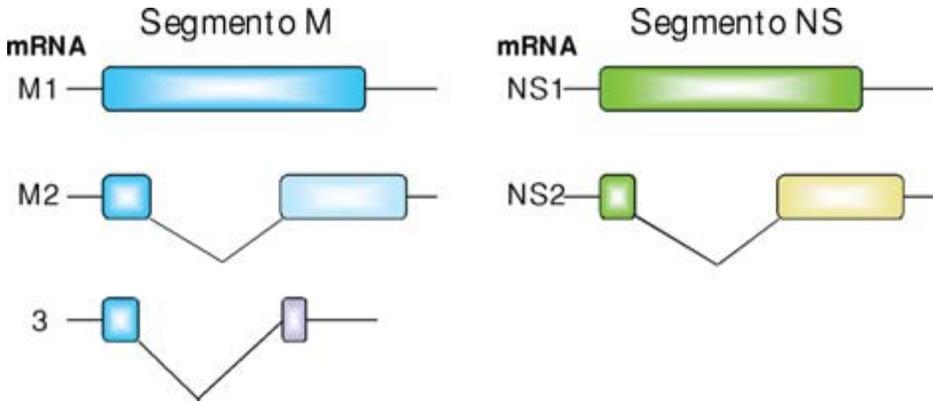


FIGURA 4. Esquema de splicing de los RNA mensajeros virales. La figura muestra la estructura de los mRNAs de los segmentos 7 y 8, que codifican las proteínas NS1 y M1 respectivamente, así como los RNA mensajeros procesados por splicing que derivan de ellos. Se indican las posiciones de los marcos de lectura abierta de proteínas como rectángulos continuos. En los mRNAs procesados se indican los exones como rectángulos, entre los que se señalan los intrones como líneas quebradas. El diferente color de los exones indica que utilizan diferentes fases de lectura de proteínas.

Por otro lado, el transcrito del segmento 2, que codifica normalmente la subunidad PB1 de la polimerasa, también puede ser traducido en una segunda fase de lectura para generar una proteína pequeña, PB1-F2, que se asocia a la mitocondria y parece implicada en la apoptosis celular (Chen *et al.*, 2001).

Las proteínas asociadas a la membrana viral

Los virus de la gripe tipo A expresan una proteína periférica de membrana (M1) y tres proteínas integrales de membrana (HA, NA y proteína M2).

La proteína M1

La proteína M1 es la más abundante de las proteínas virales. Presenta una conformación alargada al microscopio electrónico y posee dos dominios cuya conformación relativa es flexible. De la estructura atómi-

ca de su región N-terminal se puede deducir que una de las superficies está fuertemente cargada positivamente (Sha and Luo, 1997) y es probablemente responsable de su unión a RNA (Ye *et al.*, 1989), mientras que la superficie opuesta es hidrofóbica y sería responsable de la interacción con membranas. Esta superficie puede resultar oculta o no, en función de la conformación relativa de los dos dominios de la proteína. Aunque la proteína M1 se localiza mayoritariamente en el citoplasma de la célula infectada, posee una señal de localización nuclear y aparece en el núcleo a tiempos tempranos de la infección, donde establece interacciones con el RNA viral, con la NP y con la proteína NS2/NEP durante el ciclo infectivo.

La hemaglutinina (HA)

La HA desempeña dos funciones esenciales en la infección viral: (1) Es responsable de la unión al receptor —ácido siálico— en la superficie de la célula susceptible, y (2) Induce la fusión de membranas viral y celular que determina la penetración del genoma viral en la célula infectada. Además, la HA es el antígeno viral contra el que se dirige una parte importante de la respuesta inmunológica neutralizante.

La HA se expresa como un precursor asociado a membranas en el retículo rugoso, con un péptido señal en su extremo N-terminal que se procesa durante la traducción. La proteína resultante —HA0— queda anclada a la membrana por una región hidrofóbica C-terminal y oligomeriza formando trímeros durante su maduración. Además, resulta modificada durante su transporte a la membrana por adición de oligosacáridos en su ectodominio y de palmitato en la cola citoplásmica. Para tener plena actividad biológica, la HA ha de procesarse proteolíticamente, para dar lugar a dos polipéptidos independientes —HA1 y HA2— que permanecen unidos entre sí por puentes disulfuro.

La estructura atómica del trímero de HA (ectodominio) ha sido determinada tanto para el trímero procesado (HA1 + HA2) como del precursor no procesado (HA0) (Chen *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1981) (Fig. 5). En ambos casos, el trímero consta de un tallo formado por la asociación de tres alfa-hélices largas que se enrollan entre sí adoptando una estructura *coiled-coil* y una región globular externa, localizada lejos

de la membrana plasmática. El tallo contiene secuencias de HA2 y la región globular externa está formado por secuencias de HA1. La región globular externa contiene el sitio de unión al receptor celular, que tiene forma de hueco en el que se localizan aminoácidos que están conservados entre las distintas cepas virales. Este hueco es inaccesible a unión por anticuerpos, pero las regiones circundantes están muy expuestas y constituyen las zonas inmunodominantes en la respuesta humoral del huésped. La identidad del sitio de unión al receptor ha sido verificada por el fenotipo de mutantes alterados en los residuos conservados y por la estructura de un co-cristal del trímero de HA unido a un análogo de ácido siálico (Weis *et al.*, 1988).

Las estructuras de la HA antes y después de su activación proteolítica sólo difieren en la zona de procesamiento. Estos residuos forman un lazo situado junto al tallo en la HA0, mientras que en el trímero procesado, el nuevo extremo N-terminal de HA2 queda oculto entre las tres alfa-hélices (Fig. 5). Esta secuencia N-terminal constituye el péptido de fusión, que es responsable de la fusión de las membranas celular y viral durante la penetración.

Sin embargo, la estructura de la HA procesada sufre un cambio muy sustancial cuando la molécula se somete a pH ácido (Bullough *et al.*, 1994), simulando las condiciones que el virus encuentra en el endosoma durante la penetración. La región N-terminal de HA2, que contiene el péptido de fusión, se mueve desde la zona inferior del tallo hasta la parte superior de la alfa-hélice larga del tallo, extendiendo su longitud, mientras que la región basal del tallo se desestructura. Estos cambios no son posibles en la HA0 y permiten, junto con la apertura de las zonas globulares, la exposición del péptido de fusión en la parte superior de la molécula.

La neuraminidasa (NA)

Esta proteína de superficie del virus presenta actividad neuraminidasa (N-acil-neuramidil-hidrolasa). La forma biológicamente relevante de la NA es un tetrámero, que en su región extracelular presenta dos zonas claramente diferenciadas: un tallo de longitud variable (entre 24 y 82 aminoácidos) y una zona globular distal en la que radica la actividad

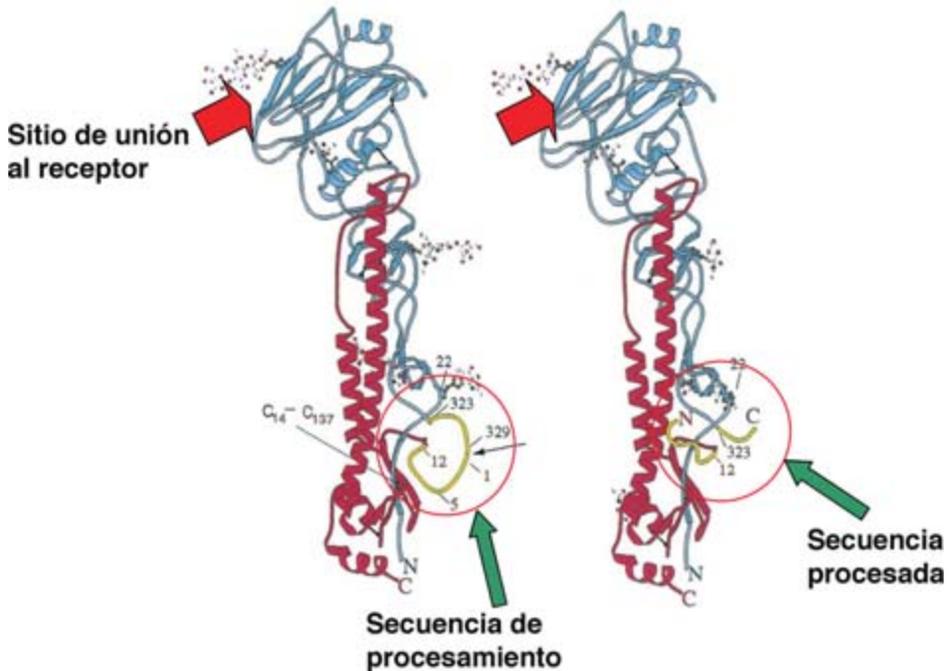


FIGURA 5. Estructura tridimensional de la hemaglutinina. La figura muestra las estructuras tridimensionales del monómero de HA es sus formas procesada (derecha) y no procesada (izquierda). En rojo se muestra la subunidad HA2 y en azul se indica la subunidad HA1. La subunidad HA2 está esencialmente formada con hélices α , mientras que la subunidad HA1 contiene mayor proporción de láminas β . El hueco cercano a la hélice α situada en el extremo superior de la molécula constituye el sitio de unión al receptor (flecha roja). El lazo amarillo en la estructura de HA0 es el sitio de procesamiento proteolítico. La formación del trimero tiene lugar por interacción entre las hélices α largas presentes en la subunidad HA2 (rojo). Además, se indican los restos glicosídicos que se añaden durante la maduración de la molécula en el aparato de Golgi.

enzimática. La estructura atómica de la zona globular es conocida y presenta un plegamiento con seis láminas β antiparalelas organizadas en forma de hélice (Varghese *et al.*, 1983). En esta zona globular se localiza el sitio activo del enzima que consiste en un hueco formado por aminoácidos bastante conservados entre las distintas cepas virales, rodeados por secuencias hipervariables contra las que se dirige la respuesta humoral neutralizante (Colman *et al.*, 1983). La definición del sitio activo ha sido contrastada por determinación de la estructura de un co-cristal del enzima con un análogo de ácido siálico. De hecho, el conocimiento de la estructura de dicho co-cristal ha permitido el diseño y

desarrollo de inhibidores de la NA que son potentes antivirales específicos (Moscona, 2005).

La proteína M2

La proteína M2 es una proteína integral de membrana de 97 aminoácidos que se expresa abundantemente en la membrana plasmática de la célula infectada (Lamb *et al.*, 1985). La región N-terminal de la proteína se localiza extracelularmente, mientras que los 54 aminoácidos C-terminales son intracelulares. La forma biológicamente activa de la proteína M2 es un tetrámero en el que los monómeros están unidos por puentes disulfuro por su zona N-terminal (Holsinger and Lamb, 1991; Sugrue and Hay, 1991). La proteína está fosforilada y contiene residuos de ácido palmítico acoplados a su región intracelular (Sugrue *et al.*, 1990). El conjunto de las regiones transmembrana de los cuatro monómeros forman un canal iónico (Bauer *et al.*, 1999) y la simple expresión de M2 a partir de su gen clonado permite detectar flujo iónico en las células que la expresan (Pinto *et al.*, 1992). Este canal iónico es activable a pH ácido y es fuertemente selectivo para protones (Mould *et al.*, 2000). El canal iónico se puede inhibir por amantadina, un antiviral específico para gripe tipo A, y consecuentemente se han aislado virus mutantes resistentes al inhibidor cuyas mutaciones se localizan a lo largo de la región transmembrana de la proteína M2 (Hay *et al.*, 1985).

La proteína M2 también está presente en el virión, pero en cantidades mucho menores (alrededor de 50 copias por partícula) (Zebedee and Lamb, 1988), por lo que se supone que existe un mecanismo de exclusión de M2 durante la morfogénesis del virión. Este puede estar basado en la localización de las glicoproteínas mayoritarias en los *rafts* de la membrana plasmática, mientras que la proteína M2 queda excluida de éstos (Ali *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000b).

Las proteínas implicadas en replicación-transcripción

Como muchos otros virus, los virus gripales emplean una gran parte de su información génica para generar la maquinaria de transcripción-replicación. Estos procesos tienen lugar en complejos macromoleculares

denominados RNPs, que contienen cuatro proteínas virales: la polimerasa, un heterotrímero formado por las subunidades PB1, PB2 y PA, y la NP. Las RNPs presentan formas super-helicoidales cuando se observan al microscopio electrónico (Pons *et al.*, 1969). Estas estructuras contienen un lazo en uno de sus extremos y el complejo de la polimerasa en el otro (Murti *et al.*, 1988) (Fig. 6). Los extremos de cada segmento de RNA están asociados entre sí y unidos al complejo de la polimerasa (Klumpp *et al.*, 1997) mientras que el resto de la molécula se asocia a la NP a razón de 24 nucleóticos por monómero (Ortega *et al.*, 2000). Cuando se analizan RNPs recombinantes con RNAs de unos 200-300 nucleótidos se observan formas circulares en las que la polimerasa es claramente aparente. Sus estructuras han sido determinadas mediante estudios de microscopía electrónica (Martín-Benito *et al.*, 2001). En estos modelos estructurales se distinguen los monómeros de NP que interaccionan entre sí por la base de la estructura de la RNP de manera mucho más intensa que por la parte superior del anillo, lo que sugiere que es por esta zona por la que la NP interacciona con el RNA genómico. Además, los distintos monómeros de NP muestran una clara vorticidad que puede ser la base de la forma helicoidal que muestran las RNPs nativas.

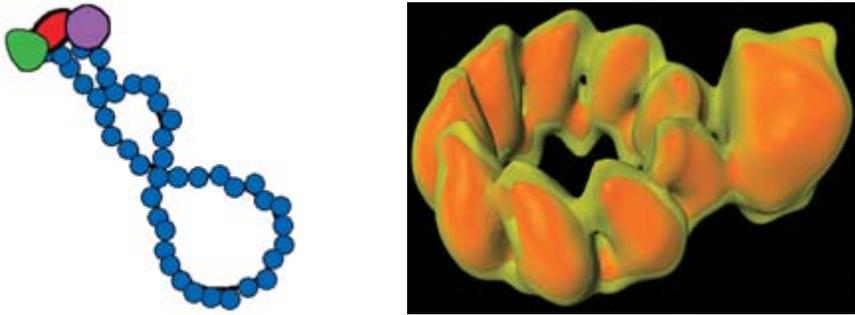


FIGURA 6. Modelo tridimensional de una ribonucleoproteína recombinante del virus de la gripe. (Izquierda) Diagrama de una RNP viral en la que se muestran las NPs en azul y las subunidades de la polimerasa en verde, rojo y violeta. (Derecha) Se muestra el modelo 3D de una RNP recombinante. La estructura circular contiene nueve monómeros de NP asociados entre sí y presumiblemente unidos al RNA viral. Asociada al anillo de NP se observa el complejo de la polimerasa viral que establece contactos diferenciados con los dos monómeros de NP adyacentes. Se presentan dos niveles de representación de masa, en naranja y amarillo.

La nucleoproteína (NP)

La NP es una proteína que está bastante conservada evolutivamente entre las distintas cepas virales. Es rica en arginina, glicina y serina y tiene carga neta positiva a pH neutro. La NP está fosforilada, predominantemente en la serina en posición 3, que está conservada en esencialmente todas las NP del tipo A (Arrese and Portela, 1996). Su estructura a baja resolución indica que tiene forma elongada, parecida a una banana (Martín-Benito *et al.*, 2001). La NP interacciona con RNA con una afinidad considerable pero sin ninguna especificidad de secuencia (Baudin *et al.*, 1994), principalmente mediante la secuencia N-terminal de la proteína (Albo *et al.*, 1995), pero también a través de residuos situados a lo largo de toda la molécula (Elton *et al.*, 1999b). La NP purificada, en ausencia de ningún RNA, es capaz de oligomerizar para dar lugar a estructuras que tienen forma similar a las RNPs (Ruigrok and Baudin, 1995). Dos regiones internas de la molécula son responsables de estas interacciones, mientras que la región C-terminal modula negativamente la oligomerización (Elton *et al.*, 1999a). Además de estas interacciones típicas de una proteína que forma RNPs, la NP establece contactos específicos con la polimerasa a través de sus subunidades PB1 y PB2 (Biswas *et al.*, 1998). Estas interacciones aparecen reflejadas en la estructura tridimensional de la RNP generada por microscopía electrónica y procesamiento de imágenes (Martín-Benito *et al.*, 2001).

Además, la NP establece diversas interacciones con proteínas celulares, entre las que se encuentran receptores de la familia de las importinas α (O'Neill and Palese, 1995), actina, el receptor para exportación nuclear CRM1 (Elton *et al.*, 2001) y la helicasa UAP56 implicada en *splicing* y transporte nucleo-citoplásmico de mRNAs celulares (Momose *et al.*, 2001). La NP y las RNPs de las que forma parte puede traslocar del citoplasma al núcleo y viceversa (*shuttling protein*), como es de esperar por sus interacciones con importinas α y con el receptor CRM1.

El complejo de la polimerasa viral

Las subunidades PB1, PB2 y PA, que están codificadas por los segmentos mayores del RNA genómico, constituyen el complejo de la polimerasa viral. Contienen 757, 759 y 716 aminoácidos, respectiva-

mente. La subunidad PB1 forma el núcleo del complejo, sobre el que interaccionan tanto PB2 como PA (Digard *et al.*, 1989). La arquitectura general del complejo ha sido definida mediante experimentos de interacción entre las subunidades y sus mutantes (González *et al.*, 1996; Perales *et al.*, 1996; Poole *et al.*, 2004; Toyoda *et al.*, 1996; Zürcher *et al.*, 1996). Las subunidades se unen de una manera lineal (PA.C-N.PB1.C-N.PB2), aunque también se ha descrito unión entre los C-terminales de PB1 y PB2, y no se han detectado interacciones entre las subunidades PA y PB2. Sin embargo, el modelo tridimensional del complejo determinado por microscopía electrónica (Area *et al.*, 2004) muestra un empaquetamiento muy compacto del heterotrímero, en el que las interacciones PA-PB2 no son descartables (Fig. 7).

La subunidad PB1 es responsable de la actividad de polimerización. Así, la proteína presenta los motivos de secuencia típicos de las RNA polimerasas RNA-dependientes (Poch *et al.*, 1990), cuya mutación da lugar a complejos de polimerasa no funcionales (Biswas and Nayak, 1994). Además, mutantes virales en este gen son incapaces de sintetizar RNA de cualquier tipo (Mahy, 1983). La subunidad PB2 es una proteína que une RNA con *cap* (Blaas *et al.*, 1982; Ulmanen *et al.*, 1981) y es necesaria para la iniciación de la transcripción viral (Mahy, 1983; Perales *et al.*, 1996). Por otra parte, la subunidad PA es una fosfoproteína (Sanz-Ezquerro *et al.*, 1998) que tiene una actividad proteasa implicada en la replicación del RNA viral (Perales *et al.*, 2000). Mutantes virales en este gen son defectivos en replicación de RNA (Mahy, 1983).

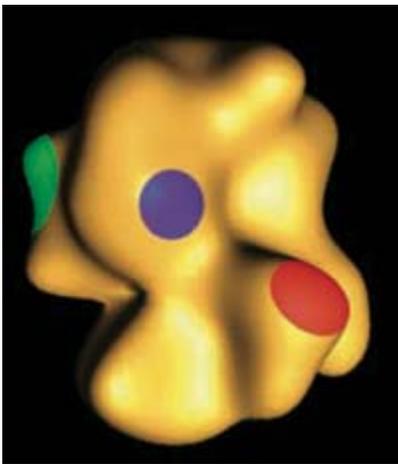


FIGURA 7. *Modelo tridimensional del complejo de la polimerasa del virus de la gripe. Se muestra la estructura determinada por microscopía electrónica del complejo presente en una RNP. Se indican en colores las localizaciones de las subunidades: PB1 en verde, PB2 en rojo y PA en violeta.*

La polimerasa viral interacciona específicamente con los extremos conservados del RNA viral (Fodor *et al.*, 1995; Hagen *et al.*, 1994). Una parte importante de esta interacción tiene lugar a través de la subunidad PB1, específicamente por sus extremos N- y C-terminales (González and Ortín, 1999a). La subunidad PB1 también reconoce específicamente el intermediario de replicación cRNA, a través de regiones parcialmente distintas de las que reconocen el vRNA (González and Ortín, 1999b).

Las proteínas virales accesorias

El segmento 8 contiene la información genética para las proteínas NS1 y NS2/NEP, y las expresa a partir del transcrito primario y del transcrito procesado, respectivamente (Lamb and Lai, 1980). La estructura génica de este segmento viral implica que ambas proteínas comparten la secuencia presente en el primer exón, pero difieren en el segundo, ya que la eliminación del intrón da lugar a un cambio en la fase de lectura de la proteína. Las dos fases de lectura están parcialmente solapadas y el análisis evolutivo de las secuencias de NS1 y NS2/NEP en esta zona indica que la secuencia de NS2 está conservada a expensas de la de NS1. Estos datos sugieren que ancestralmente los genes de NS1 y NS2/NEP no estaban solapados sino eran consecutivos y que la secuencia de NS1 ha crecido por mutación del codón de terminación ancestral (Winter *et al.*, 1981).

La proteína NS1

La proteína NS1 se expresa por traducción del RNA mensajero colineal del segmento 8 y contiene un número variable de alrededor de 230 aminoácidos, en función de la cepa viral que se considere. Se expresa primordialmente al principio de la infección viral, momento en el que se localiza esencialmente en el núcleo (Portela *et al.*, 1985), mientras que más tarde se localiza en el citoplasma celular, en asociación con polisomas (de la Luna *et al.*, 1995; Falcón *et al.*, 1999). La proteína contiene dos señales redundantes para su transporte al núcleo (NLSs), localizadas en las regiones N- y C-terminal de la proteína y además presenta una señal de exportación nuclear (NES) (Li *et al.*, 1998). NS1

tiene capacidad de unir RNA, preferentemente RNA de doble cadena y la estructura *panhandle* del RNA viral (Hatada *et al.*, 1997; Hatada *et al.*, 1992; Marión *et al.*, 1997a) (Fig. 8), pero también reconoce poliA (Qiu and Krug, 1994). La estructura atómica de la región N-terminal de NS1, que contiene el dominio de unión a RNA, presenta un plegamiento no observado en otras proteínas que unen RNA y sugiere que la interacción con RNA tiene lugar en forma de dímero (Liu *et al.*, 1997).

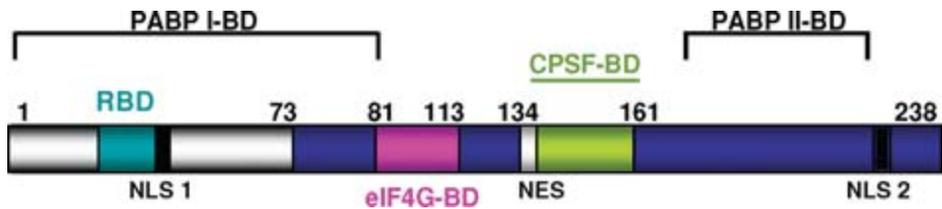


FIGURA 8. *Dominios funcionales de la proteína NS1. Se presenta un diagrama lineal de la proteína NS1 en el que se indican los principales dominios funcionales conocidos. Están señaladas las dos secuencias de localización nuclear (NLS1 y NLS2), así como la señal de exportación nuclear (NES). Además, se muestran las regiones de la proteína que son responsables de la interacción con distintos factores: RNA y PABP I en la región N-terminal, eIF4G en la región central y CPSF y PABP II en la región C-terminal. Los números en los extremos indican las posiciones de los aminoácidos N- y C-terminales.*

Se ha descrito la interacción de NS1 con multitud de factores virales y celulares. Así, es capaz de unirse a las RNPs virales en la célula infectada pero no en la partícula viral (Marión *et al.*, 1997b). En el núcleo interacciona con la subunidad 30kDa del factor de especificidad de corte y poliadenilación (CPSF) (Nemeroff *et al.*, 1998), implicado en el procesamiento y poliadenilación de los RNAs mensajeros celulares, con la proteína nuclear de unión a poliA (PABP II) y con otra proteína que tiene características de factor de *splicing* (Wolff *et al.*, 1998). En el compartimento citoplásmico se une a la subunidad eIF4G del factor de iniciación de traducción eIF4F y a la proteína de unión a poliA (PABP I) (Aragón *et al.*, 2000).

La proteína NS2/NEP

La proteína NS2/NEP es el producto de traducción del RNA mensajero procesado del segmento 8. Se han descrito localizaciones citoplásmi-

ca y nuclear para NS2 (Greenspan *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1987). Esto es consistente con la interacción de la proteína NS2/NEP con nucleoporinas y con el factor de exportación nuclear CRM1 (Neumann *et al.*, 2000; O'Neill *et al.*, 1998). Aunque originalmente se consideraba que la proteína NS2/NEP era no estructural, se ha demostrado que está presente en la partícula viral en asociación con la proteína M1 (Yasuda *et al.*, 1993). No se conoce la función que pueda ejercer en el virión.

El ciclo de infección viral

Adsorción

Los virus de la gripe se adhieren a sus células susceptibles a través de residuos de ácido siálico presentes en glicoproteínas y glicolípidos de la membrana celular, mediante la acción de la HA, que contiene en su extremo más distal el sitio de unión al receptor celular. Aunque la afinidad de unión de la HA por un residuo de ácido siálico es baja, la unión del virus a la célula es eficaz debido al reclutamiento de numerosos receptores y de HAs como consecuencia de la fluidez de las membranas celular y viral. Además, la afinidad de la HA por los residuos de ácido siálico depende de la naturaleza de su enlace a la glicoproteína o glicolípido: Así, los distintos virus de la gripe han evolucionado para adaptar su sitio de unión dependiendo de si este enlace es α 2,3 o α 2,6 y por tanto la interacción con el receptor se constituye en un primer factor de especificidad de especie. Los virus que replican en aves usan residuos de ácido siálico unidos por enlaces α 2,3, que son los más abundantes en el epitelio gastrointestinal en estas especies, mientras que los virus que infectan mamíferos usan residuos de ácido siálico con enlaces α 2,6, que están presentes en el epitelio respiratorio superior (Ito, 2000). De hecho, la replicación de virus humanos en embrión de pollo para su aislamiento lleva consigo una adaptación genética con cambio de aminoácidos específicos en el sitio de unión al receptor de la HA (Robertson *et al.*, 1987).

Entrada del virus en la célula

Los virus adsorbidos sobre la membrana celular utilizan el mecanismo de endocitosis mediada por receptor para penetrar en la célula diana.

Este proceso implica la formación de vesículas en los puntos de adsorción, por debajo de los cuales se recluta la proteína clatrina. Estas vesículas siguen la vía endocítica de entrada y se fusionan a endosomas cuyo pH es más bajo. Esta acidificación de los endosomas tardíos es un paso esencial para la entrada de las RNPs virales al citoplasma, ya que tanto el desensamblado de las RNPs como la fusión de membranas son dependientes de pH.

El descenso de pH activa el flujo de protones desde el endosoma al interior de la partícula, a través de los canales iónicos formados por la proteína M2. Su activación induce la bajada de pH en el interior de la partícula viral y consiguientemente la desestabilización de las interacciones entre las RNPs y la capa de proteína M1 que las recubre (Zhirnov, 1992). Este paso de la entrada del virus es inhibido por el compuesto amantadina, que bloquea el canal iónico de M2 y por tanto impide que las RNPs sean liberadas eficazmente en el citoplasma.

La acidificación del endosoma induce el cambio conformacional de las moléculas de HA presentes en la membrana viral, lo que provoca el disparo del péptido de fusión hacia el extremo de la molécula. Cuando un número adecuado de HAs sufre este cambio, inducen la formación de poros de fusión entre la membrana viral y la del endosoma, con la consiguiente liberación de las RNPs (libres de proteína M1) al citoplasma celular.

Replicación y expresión génica

Transporte de las RNPs al núcleo

Los virus de la gripe transcriben y replican sus RNAs en el núcleo de las células que infectan (Herz *et al.*, 1981; Jackson *et al.*, 1982), por lo que el RNA viral paterno ha de localizarse en este compartimento celular para su transcripción y replicación. Por ello, las RNPs paternas son transportadas al núcleo rápidamente una vez que las membranas viral y endosómica son fusionadas por la HA.

Aunque tanto la NP como cada una de las subunidades de la polimerasa presentes en las RNPs contienen señales de transporte al núcleo,

el más importante determinante para su paso a este compartimento son las moléculas de NP presentes en la RNP, que interactúan directamente con la importina α celular. Esta interacción no tiene lugar por una señal convencional o NLS (O'Neill and Palese, 1995; Wang *et al.*, 1997). Para que este transporte al núcleo tenga lugar, es imprescindible que las RNPs paternas se vean libres de proteína M1, ya que los complejos RNP-M1 son eficazmente exportados del núcleo al citoplasma.

Transcripción primaria

La transcripción primaria tiene lugar a partir de las RNPs paternas por acción de la polimerasa que estaba formando parte de las partículas virales infectantes (Fig. 9).

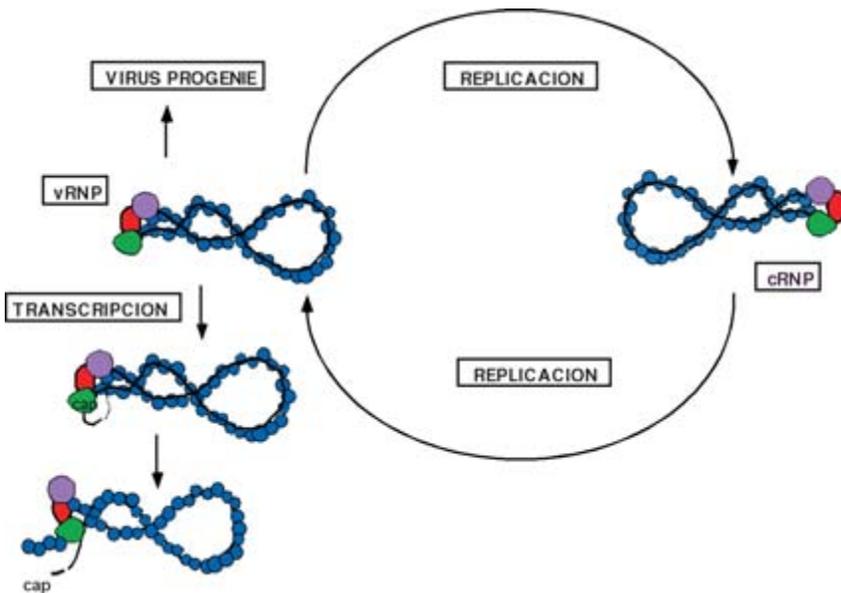


FIGURA 9. *Transcripción-replicación de las ribonucleoproteínas del virus de la gripe.* Se presenta un esquema de los procesos de transcripción y replicación virales. En primer lugar, las RNPs paternas (vRNP; izquierda de la figura) son transcritas (transcripción primaria). Los productos de traducción de estos RNA mensajeros son imprescindibles para comenzar la fase de replicación (ciclo a la derecha de la figura), en el que se distinguen dos fases: producción de cRNPs y producción de vRNPs progenie a partir de las cRNPs. Las vRNPs progenie pueden ser transcritas (transcripción secundaria) y finalmente son exportadas al citoplasma para su encapsidación en viriones.

La transcripción de los virus de la gripe sigue una estrategia muy diferente a la de otros virus. La polimerasa viral, cuando funciona como transcriptasa, no es capaz de iniciar la síntesis de nuevas cadenas de RNA sino que emplea iniciadores que ella misma genera a partir de los transcritos celulares. Por ello, la transcripción del genoma del virus de la gripe es inhibible por actinomicina D, un antibiótico que bloquea todo tipo de transcripción basada en molde de DNA, y por α -amanitina, un inhibidor específico de la RNA polimerasa II celular. Estos datos aparentemente sorprendentes fueron explicados cuando se descubrió que la RNA polimerasa viral reconoce los RNAs celulares con *cap* (transcritos de la RNA polimerasa II) y los corta a unos 10-15 nucleótidos de esta estructura, generalmente después de una secuencia CA (Plotch *et al.*, 1981; Rao *et al.*, 2003). Estos oligonucleótidos con *cap* son usados por el enzima viral como iniciadores a partir de los cuales copia la secuencia del RNA genómico (Krug *et al.*, 1979) (*cap-snatching*), de modo que los RNA mensajeros virales contienen secuencias celulares heterogéneas en sus extremos 5' (Caton and Robertson, 1980). El primer nucleótido incorporado es una G, como resultado del emparejamiento con la C presente en la segunda posición del molde en todos los segmentos del RNA viral.

A pesar de que los RNA mensajeros virales contienen su extremo 3' poliadenilado, el origen de este poliA es completamente distinto del poliA presente en los RNA mensajeros celulares. La poliadenilación de los RNA mensajeros virales no implica la acción de la poliA-polimerasa celular y tiene lugar por la acción de la propia RNA polimerasa viral, que lee reiteradamente una señal de secuencia U_{5-7} presente unos 15-17 nucleótidos antes del extremo 5' del RNA genómico (Robertson *et al.*, 1981). Para que este proceso tenga lugar, la presencia de la propia RNA polimerasa actúa como impedimento para que la secuencia final del RNA genómico pueda ser copiada, ya que se mantiene unida a la secuencia conservada del RNA genómico presente en su extremo 5' (Pritlove *et al.*, 1999). De acuerdo con este mecanismo de poliadenilación del RNA mensajero viral, la sustitución de la señal U_{5-7} por A_{5-7} en el vRNA da lugar a la formación de RNA mensajeros con cola de poliU (Poon *et al.*, 1999).

Las secuencias del RNA genómico viral necesarias para la actividad de transcripción han sido definidas por ensayos de actividad *in vivo* e *in*

vitro, así como de unión a la polimerasa (Flick and Hobom, 1999; Fodor *et al.*, 1995; González and Ortín, 1999a; Tiley *et al.*, 1994). Tanto los extremos 5' como 3' de los vRNAs son necesarios para esta actividad. Así, el reconocimiento de las estructuras *cap* de los RNA mensajeros celulares por el complejo de la polimerasa requiere su asociación con la secuencia conservada en el 5' del vRNA (Tiley *et al.*, 1994). Además, para que este complejo realice el corte endonucleolítico del RNA mensajero celular se necesita la asociación con la secuencia conservada en el 3' del vRNA (Cianci *et al.*, 1997).

Replicación

La generación de vRNPs virales progenie tiene lugar en dos pasos: Primero se producen las cRNPs o RNPs intermedio replicativo y después estas cRNPs dan lugar a muchas copias de nuevas vRNPs (Fig. 9).

La síntesis de las cRNPs a partir de las vRNPs paternas implica varios cambios mecanísticos que contrastan con el proceso de transcripción. Por una parte, la iniciación tiene lugar en ausencia de los oligonucleótidos con *cap* con los que comienza la síntesis de RNAs mensajero. Los cRNAs son iniciados *de novo*, ya que sus extremos contienen un trifosfato (Hay *et al.*, 1982). Esto sugiere que cuando la transcriptasa cambia a replicasa, el enzima viral sufre cambios estructurales que anulan su capacidad para llevar a cabo el proceso de *cap-snatching*, mientras que incrementan sus posibilidades para usar el ATP como iniciador, dado que el primer nucleótido en todos los RNAs virales es A.

Además, este cambio en el mecanismo de iniciación lleva consigo la posibilidad de asociar nuevas moléculas de NP al cRNA naciente, de modo que el producto de replicación no es un RNA sino una nueva RNP, en la que el cRNA está asociado a un complejo de polimerasa y recubierto completamente por monómeros de NP. Dado que la primera secuencia que se produce durante la síntesis de cRNA es el extremo 5' conservado, por el que la polimerasa tiene afinidad (González and Ortín, 1999b), es previsible que un nuevo complejo de RNA polimerasa, distinto del que está presente en la vRNP que sirve de molde, se asocie a esta nueva secuencia. De hecho, experimentos recientes apoyan que el cambio de la transcripción a la síntesis de cRNA viene dirigido por esta

asociación del RNA producto con un complejo de polimerasa (Vreede *et al.*, 2004). Este complejo cRNA naciente-RNA polimerasa serviría de punto de nucleación para la asociación cooperativa de monómeros de NP sobre el cRNA. Esta propuesta se basa en la evidencia de que la RNA polimerasa es capaz de asociarse a la NP a través de sus subunidades PB1 y PB2 (Biswas *et al.*, 1998; Martín-Benito *et al.*, 2001) y permitiría explicar la asociación específica de la NP a las RNPs, a pesar de que la NP se une a RNA sin ninguna especificidad de secuencia (Baudin *et al.*, 1994).

Por otra parte, la generación de las cRNPs implica que la poliadenilación no tiene lugar. Por tanto, se supone que la RNA polimerasa no permanece unida al extremo 5' conservado del molde, tal y como ocurre durante la transcripción, y de este modo se evita la copia reiterada de la señal U_{5-7} .

Hasta el momento no se saben los factores, virales o celulares, que determinan estos cambios mecánicos al pasar de la transcripción a la replicación del RNA viral. Es posible pensar en cambios estructurales de la polimerasa o de la NP de nueva síntesis o en la intervención de factores celulares. Se sabe que existen factores celulares (Huarte *et al.*, 2001; Momose *et al.*, 2001; Momose *et al.*, 2002) y virales (Falcón *et al.*, 2004; Marión *et al.*, 1997b) implicados en la replicación. Estos factores, u otros que todavía desconocemos, podrían alterar la estructura del complejo y determinar los cambios funcionales apuntados. Por otro lado, se ha descrito que las cRNPs permanecen asociadas al núcleo durante toda la infección, hecho consistente con que la síntesis de vRNPs tenga lugar asociada a la matriz nuclear (López-Turiso *et al.*, 1990).

La síntesis de cRNPs es un proceso temprano y transitorio en la infección y es rápidamente sustituido por la síntesis de vRNPs. Probablemente las cRNPs contienen promotores mucho más eficientes que las vRNPs, ya que tan pronto se acumulan cRNPs en cantidad suficiente, la RNA polimerasa de nueva síntesis pasa a replicarlas para acumular grandes cantidades de vRNPs. Otra característica de la generación de vRNPs, en contraste con lo que ocurre con las cRNPs, es que no tiene lugar de manera simultánea para todos los genes virales. Algunos se replican al principio, como los que codifican la NP o las proteínas NS, mientras que otros lo hacen más tarde, como los genes de M1 y HA (Shapiro *et al.*, 1987).

Transcripción secundaria

La transcripción secundaria tiene lugar usando las vRNPs progenie de replicación como molde. Este proceso de transcripción es indistinguible de la transcripción primaria, pero el nivel de síntesis es muy superior, ya que la concentración de vRNPs en la célula infectada después de la replicación es muy elevada. Al principio, la transcripción secundaria está fuertemente acoplada a la replicación, mientras que después cesa completamente y las vRNPs presentes en el núcleo son destinadas a la morfogénesis de nuevas partículas virales. A tiempos tardíos en la infección, los RNAs mensajeros virales representan alrededor de un 5-10% de los mensajeros totales presentes en la célula.

Traducción

No está claro si la exportación de estos RNAs mensajero procede por el mecanismo celular normal o bien ciertos factores virales permiten incrementar la eficiencia de este proceso, pero los RNAs mensajeros virales son muy eficientemente exportados del núcleo al citoplasma celular, donde se asocian a la maquinaria de traducción para producir las proteínas virales.

Después de que el RNA viral sea replicado, la mayor parte de las proteínas que se sintetizan en la célula infectada son virales, mientras que apenas se detecta síntesis de proteínas celulares. Probablemente son varias las razones que explican este hecho: Por una parte, los mRNAs celulares son degradados (Beloso *et al.*, 1992; Inglis, 1982; Zürcher *et al.*, 2000). Ello puede ser debido a que los RNAs mensajeros virales se asocian preferentemente a la subunidad 40S del ribosoma en el proceso de iniciación de la traducción. Esta asociación preferencial se debe a la interacción de la proteína NS1 con la subunidad eIF4G del factor de iniciación eIF4F y a la proteína citoplásmica que une poliA (PABPI), así como su interacción con los extremos 5' conservados de los RNA mensajeros virales (Aragón *et al.*, 2000; de la Luna *et al.*, 1995; Enami *et al.*, 1994; Park and Katze, 1995). Estas interacciones permiten el establecimiento de un proceso de iniciación de traducción viral que competiría con la traducción de los RNA mensajeros celulares.

Morfogénesis

Los viriones se producen por gemación en la membrana plasmática. Por tanto, es necesario que los diferentes componentes estructurales del virus (las RNPs, las proteínas M1, NEP y las proteínas de la envuelta) confluyan en un mismo punto de la membrana plasmática. A continuación se revisan las rutas que siguen cada uno de estos componentes para llegar al punto de ensamblaje del virión.

Transporte nucleo-citoplasmático de las RNPs

Los resultados disponibles involucran a las proteínas M1 y NS2/NEP en este proceso. Inicialmente se propuso que la interacción de la proteína M1 con las vRNPs, que inhibe la actividad transcripcional de éstas (Zvonarjev and Ghendon, 1980), anularía las señales de localización nuclear de la NP y la polimerasa presentes y permitiría su exportación al citoplasma celular. Por otra parte, se ha descrito que la proteína NS2/NEP interacciona con la maquinaria de exportación nucleo-citoplásmica (nucleoporinas y factor CRM1) (Neumann *et al.*, 2000; O'Neill *et al.*, 1998) y que además se asocia con la proteína M1 (Yasuda *et al.*, 1993), por lo que se ha propuesto que las vRNPs son exportadas como complejos con las proteínas M1 y NS2/NEP gracias a la actividad exportadora de ésta. De acuerdo con este modelo, la microinyección de anticuerpos específicos para la proteína NS2/NEP inhibe la exportación de las vRNPs (O'Neill *et al.*, 1998). Asimismo, el fenotipo de mutantes virales que carecen del gen para NS2/NEP apoyan su implicación en este proceso (Neumann *et al.*, 2000). Estos virus son viables si la proteína NS2/NEP se suministra *in trans* por la célula huésped, pero en su ausencia no son capaces de exportar sus vRNPs del núcleo.

A pesar de toda esta evidencia experimental, la presencia de señales NES en la propia NP y la existencia de interacciones directas NP-CRM1 permiten especular con otras vías alternativas de exportación de vRNPs en las que la interacción con M1-NS2/NEP no sería imprescindible (Elton *et al.*, 2001).

Transporte intracelular de las proteínas de membrana

Durante su paso por el retículo endoplásmico y su transporte hasta el aparato de Golgi, las HA y NA se glicosilan y autoasocian en los correspondientes homotrímeros y homotetrámeros. Asimismo, las proteínas HA y M2 adquieren en el aparato de Golgi los restos de ácido palmítico que modifican sus regiones citoplásmicas. Por último, las tres proteínas virales de membrana son transportadas en vesículas hasta la membrana plasmática de la célula huésped. En este proceso, el canal iónico que constituye la proteína M2 regula el pH intracelular de dichas vesículas, impidiendo que en su interior se reduzca el pH, lo que induciría en un momento erróneo el cambio conformacional que activa la capacidad de fusión de membranas de la HA.

La infección natural por el virus de la gripe tiene lugar en epitelios, que contienen células polarizadas. En este tipo de células, las proteínas HA, NA y M2 son transportadas exclusivamente a la membrana apical, dado que contienen señales moleculares que las dirigen a este compartimento. Además, la localización de las glicoproteínas HA y NA en la membrana apical no es al azar, sino que se concentran en regiones definidas, que tienen un alto contenido en colesterol y se denominan *lipid rafts* (Zhang *et al.*, 2000b). Por contra, la proteína M2 no se acumula en *rafts*, lo que explicaría su exclusión parcial de la membrana de los viriones.

Gemación y liberación de los viriones.

El proceso de reconocimiento de los componentes de la partícula viral es poco conocido. Se postula que inicialmente las extensiones intracelulares de las glicoproteínas de membrana HA y NA interaccionan con la proteína M1 para iniciar el proceso de curvatura de la membrana (Ali *et al.*, 2000). Las acumulaciones de estas proteínas en *lipid rafts* serían precursores del proceso de gemación de las partículas virales. Sobre estas estructuras se incorporarían los complejos RNPs-proteína M1-proteína NS2/NEP que habrían sido exportadas del núcleo, para entonces culminar el proceso de gemación.

En este proceso juegan también un papel importante las colas citoplásmicas de las HA y NA, que están bastante conservadas evolutiva-

mente entre los distintos virus del tipo A. Recientemente se ha estudiado su función mediante la generación de virus mutantes que carecen de la cola citoplásmica de HA, la de NA o la de ambas glicoproteínas (Jin *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000a). Mientras que la eliminación de una de las colas citoplásmicas induce un fenotipo casi normal, la eliminación de ambas da lugar a partículas virales gigantes y de formas aberrantes, mientras que el suministro de HA y NA normales mediante expresión en *trans* de los correspondientes genes clonados permite rescatar el fenotipo normal

La NA facilita la liberación de la célula infectada del virión ya formado porque dicho enzima rompe las interacciones que tengan lugar entre las moléculas de HA del virión naciente y los residuos de ácido siálico de la célula que lo ha producido. De esta manera, la actividad enzimática de la NA impide que el virus producido quede atrapado en las secreciones mucosas del tracto respiratorio y permite su difusión por el organismo infectado.

Empaquetamiento de los diferentes segmentos en la partícula viral.

La incorporación de las vRNPs que entran a formar parte de los viriones podría ser al azar o de una manera ordenada. En el caso de un empaquetamiento ordenado, éste sería consecuencia de un reconocimiento específico de las vRNPs virales y un mecanismo de recuento de éstas en la partícula, mientras que un empaquetamiento al azar incluiría la entrada de más de 8 segmentos de RNA en cada partícula. Así, si éstas contuvieran 10-11 vRNPs como media, alrededor del 5-10% de las partículas contendrían un conjunto completo del genoma y serían infecciosas (Enami *et al.*, 1991).

Los experimentos de genética inversa con análogos de vRNA que contienen un gen marcador indicaron que éstos pueden incorporarse a viriones, aunque no son estables durante la replicación en varios ciclos (Luytjes, 1989). Estos resultados sugieren que las secuencias no codificantes de cada segmento son suficientes para el empaquetamiento y, de hecho, fue posible obtener virus mutantes en los que el segmento que codifica la NA contenían las regiones no codificantes de los genes de PB1 o NS (Zheng *et al.*, 1996). El hecho de que estos virus mutantes

contuvieran dos segmentos con las mismas regiones no codificantes sugería que la señal de empaquetamiento no puede estar exclusivamente en estas regiones del RNA. Usando otra estrategia experimental, se generó un virus mutante que contenía 9 segmentos diferentes, ya que se habían separado los genes de NS1 y NS2 en dos RNAs distintos. Estos virus fueron viables, aunque contenían una relación partículas físicas/partículas infecciosas mayor que el virus normal, de acuerdo con la posibilidad de que cada virión contenga 10-11 vRNPs (Enami *et al.*, 1991).

Por otro lado, la proporción de las diferentes vRNPs en la célula infectada no es equimolar, mientras que en la población de viriones si están presentes en proporciones equimolares, sugiriendo un mecanismo ordenado de empaquetamiento. Además, se ha comprobado que la presencia de vRNPs defectivas interferentes procedentes de los segmentos 1 ó 2 compiten eficientemente la incorporación de las vRNPs normales de dichos segmentos, pero no de otros (Duhaut and McCauley, 1996; Odagiri and Tashiro, 1997). Además, se ha generado un virus que ha perdido la información del gen de NA debido a que es replicado seriadamente en presencia de neuraminidasa bacteriana. Este virus mantiene el segmento que codificaba el gen de NA, a pesar de que no contiene un gen funcional y de que no requiere dicha función (Liu and Air, 1993).

Recientemente, el dilema sobre el mecanismo de empaquetamiento de las vRNPs en los viriones gripales se ha decantado hacia un sistema ordenado, gracias al desarrollo de técnicas eficientes de manipulación genética. Así, se han identificado secuencias codificantes y no codificantes de cada segmento de RNA que son importantes para su encapsidación, así como un orden jerárquico para ésta (Fujii *et al.*, 2005; Fujii *et al.*, 2003; Muramoto *et al.*, 2006). De hecho, la organización interna de las RNPs ha sido esclarecida mediante técnicas de microscopía y tomografía electrónicas (Noda *et al.*, 2006).

Interacciones del virus con la célula huésped

Los virus de la gripe son parásitos intracelulares obligatorios y por lo tanto establecen interacciones con las células que infectan, tanto al-

terando las funciones normales de éstas como utilizando factores celulares en su propio beneficio.

Alteraciones de la maquinaria celular inducidas por el virus de la gripe

Las infecciones virales dan lugar a una disminución de la biosíntesis de macromoléculas celulares para que la producción de las proteínas y ácidos nucleicos virales y la generación de virus progenie sea óptima. En algunos casos esta disminución no es muy aparente pero en otros puede ser masiva y se conoce como *shut-off* celular. En las infecciones gripales se produce la alteración de la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas celulares, en muchos casos mediada por la proteína NS1, para la que se han descrito una gran variedad de actividades, probablemente como consecuencia de las múltiples interacciones que establece en la célula infectada (Ortín, 1998).

Inhibición de la síntesis de RNA mensajeros celulares

La infección por virus de la gripe no bloquea la maquinaria de transcripción celular dependiente de la RNA polimerasa II, ya que esta actividad es imprescindible para la propia transcripción viral. Sin embargo, los RNA mensajeros celulares normalmente iniciados son secuestrados y degradados por la transcriptasa viral para obtener sus extremos 5' con *cap* y usarlos como iniciadores en la síntesis de los RNA mensajeros virales. Como consecuencia, la síntesis neta de los RNA mensajeros celulares disminuye durante la infección (Katze and Krug, 1984).

Inhibición del splicing de RNA mensajeros celulares

Mientras que los RNA mensajeros celulares requieren procesamiento por *splicing* antes de ser exportados al citoplasma para su traducción, sólo dos de los RNA mensajeros virales sufre *splicing* y éste ha de ser regulado. La alteración del proceso de *splicing* por el virus de la gripe fue inicialmente observada al estudiar los efectos de la expresión de la

proteína NS1, que en ausencia de infección viral daba lugar a la inhibición del *splicing* de intrones constitutivos y a la alteración de la elección del sitio de *splicing* en el caso de intrones alternativos (Fortes *et al.*, 1994). Asimismo, se producía una redistribución intranuclear de los factores de *splicing* (Fortes *et al.*, 1995). Esta inhibición podría explicar porqué el proceso de *splicing* de los propios RNA mensajeros virales que codifican las proteínas NS1 y M1 no es completamente eficiente y permite la expresión de las proteínas NS2/NEP y M2. La implicación de NS1 en la regulación del *splicing* de los RNA mensajeros virales sería compatible con el fenotipo de ciertos mutantes virales (Smith and Inglis, 1985) y con la regulación temporal de la aparición del RNA mensajero de la proteína M2 (Valcárcel *et al.*, 1991). Una consecuencia indirecta de esta inhibición de *splicing* sería que los precursores de RNA mensajeros celulares no podrían ser procesados y finalmente serían degradados en el interior del núcleo.

Inhibición de la poliadenilación y exportación de RNA mensajeros celulares

También esta inhibición parece consecuencia de la acción de la proteína NS1. Mediante un rastreo genético por el método del doble híbrido, se observó la interacción de la proteína NS1 con la subunidad 30kDa del factor CPSF (factor de especificidad del corte para la poliadenilación) (Nemeroff *et al.*, 1998). Esta interacción afecta a la capacidad de CPSF para reconocer el sitio de poliadenilación e inhibe el corte del precursor y la poliadenilación de éste (Nemeroff *et al.*, 1998). Dado que la poliadenilación del pre-RNA mensajero celular es esencial para su exportación al citoplasma, indirectamente se produce una inhibición general de la exportación de los RNA mensajeros celulares, que no tiene porqué afectar a la exportación de los RNA mensajeros virales, ya que su poliadenilación es independiente de CPSF.

Además de este mecanismo de bloqueo en la poliadenilación, se ha demostrado que la proteína NS1, expresada independientemente de la infección, es capaz de retener los RNA poliadenilados en el núcleo (Fortes *et al.*, 1994; Marión *et al.*, 1997a; Qian *et al.*, 1994).

Inhibición de la traducción de RNA mensajeros celulares

La infección por el virus de la gripe induce una inhibición casi completa de la síntesis de proteínas celulares (*shut-off*). Este hecho no es sólo una consecuencia de las inhibiciones de *splicing*, poliadenilación y transporte de los RNA mensajeros celulares, ya que en el citoplasma existe una población abundante de RNAs celulares activamente implicados en la traducción de proteínas. Durante el ciclo viral (6-8 horas), la mayor parte de los RNA mensajeros celulares citoplásmicos serían estables y podrían continuar la síntesis de proteínas. Sin embargo, los RNA mensajeros celulares son inestables y su concentración disminuye paralelamente al descenso de la síntesis de proteínas celulares (Beloso *et al.*, 1992; Inglis, 1982; Zürcher *et al.*, 2000).

La proteína NS1 podría estar implicada en el proceso de *shut-off*, ya que estimula la traducción de los RNA mensajeros virales (de la Luna *et al.*, 1995; Enami *et al.*, 1994; Marión *et al.*, 1997a). Esta estimulación depende de la presencia de los extremos 5' no codificantes de los RNA mensajeros virales y tiene lugar como consecuencia de un incremento en la tasa de iniciación de la traducción (de la Luna *et al.*, 1995). De hecho, la proteína NS1 se puede asociar a estas secuencias 5'-terminales de los RNA mensajeros virales *in vivo* (Park and Katze, 1995). Se propone por tanto que proteína NS1 actuaría como un factor de iniciación de traducción específico para los RNA mensajeros virales y la traducción de éstos competiría fuertemente con la de los RNAs celulares presentes en el citoplasma de la célula infectada.

En línea con este modelo, la proteína NS1 se asocia a los polisomas de las células a tiempos tardíos de la infección e interacciona con la subunidad eIF4G del factor de iniciación eIF4F (Aragón *et al.*, 2000). Normalmente, el factor eIF4F promueve la asociación de los ribosomas a los RNA mensajeros a través de su interacción con la estructura *cap*. La interacción de NS1 con el factor eIF4G y su asociación a los extremos 5'-terminales de los RNA mensajeros virales (Park and Katze, 1995), podría explicar la traducción selectiva de los RNA mensajeros virales a tiempos tardíos en la infección (Aragón *et al.*, 2000). En ausencia de traducción de los RNA mensajeros celulares, éstos serían más accesibles a degradación (Beloso *et al.*, 1992).

Abuso de funciones celulares por el virus de la gripe

Además de las inhibiciones de procesos celulares inducidas por proteínas virales, en ocasiones el virus de la gripe utiliza ciertos factores celulares para incrementar la eficiencia de la infección, sin aparente alteración de la función celular de éstos. Algunas veces, los factores celulares son empleados por el virus para llevar a cabo una función similar a la que realizan normalmente en la célula, mientras que en otros casos el virus subvierte la función normal de estos factores y los emplea para otros cometidos.

En realidad, el virus usa toda la maquinaria biosintética para su propio beneficio, pero en ciertas ocasiones este «abuso» es más aparente. Así, la importación de las vRNPs al núcleo se lleva a cabo por interacción directa de la NP presente en las vRNPs con la importina α . La importina α es el elemento del transportador que reconoce la NLS o señal de localización nuclear, pero sin embargo la interacción NP-importina α se lleva a cabo por secuencias que no se corresponden con una NLS canónica y que implican una afinidad superior a la normal en el transportador. Es decir, el virus selecciona una variante del procedimiento de transporte que es más eficiente que el normal, a pesar de usar el transportador normal.

Durante la transcripción viral, la RNA polimerasa del virus utiliza los pre-RNA mensajeros celulares transcritos por la RNA polimerasa II celular para generar los oligonucleótidos con *cap* que emplea como iniciadores de su propia transcripción. Se ha demostrado que la RNA polimerasa viral se une al supercomplejo de la RNA polimerasa II y factores asociados (Engelhardt *et al.*, 2005), con lo que se acoplaría estructural y funcionalmente a las maquinarias de síntesis y maduración de RNAs mensajeros celulares.

Por otro lado, se ha descrito la interacción de la NP con el factor de *splicing* UAP56, una proteína de la familia de las ATPasas que contienen una *DEAD box*. La interacción entre UAP56 y la NP tiene lugar por el extremo N-terminal de ésta y ocurre sólo cuando no está asociada a RNA, por lo que se supone que la función que este factor celular ejerce durante la replicación del RNA viral es el facilitar la entrada de moléculas de NP al RNA naciente para constituir las RNPs progenie (Momose *et al.*, 2001). Es decir, actuaría a modo de chaperona molecular y

evitaría que las moléculas de NP se agregaran entre sí y con cualquier RNA celular antes de su incorporación a las RNPs virales.

BIBLIOGRAFÍA

- ALBO, C.; VALENCIA, A. and PORTELA, A. (1995): Identification of an RNA binding region within the N-terminal third of the influenza A virus NP polypeptide. *J. Virol.*, **69**, 3799-3806.
- ALI, A.; AVALOS, R. T.; PONIMASKIN, E. and NAYAK, D. P. (2000): Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J. Virol.*, **74**, 8709-8719.
- ARAGÓN, T.; DE LA LUNA, S.; NOVOA, I.; CARRASCO, L.; ORTÍN, J. and NIETO, A. (2000): Translation factor eIF4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol. Cel. Biol.*, **20**, 6259-6268.
- ÁREA, E.; MARTÍN-BENITO, J.; GASTAMINZA, P.; TORREIRA, E.; VALPUESTA, J. M.; CARRASCOSA, J. L. and ORTÍN, J. (2004): Three-dimensional structure of the influenza virus RNA polymerase: localization of subunit domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 308-313.
- ARRESE, M. and PORTELA, A. (1996): Serine 3 is critical for phosphorylation at the N-terminal end of the nucleoprotein of influenza virus A/Victoria/3/75. *J. Virol.*, **70**, 3385-3391.
- BAUDIN, F.; BACH, C.; CUSACK, S. and RUIGROK, R.W. (1994): Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *Embo J*, **13**, 3158-3165.
- BAUER, C. M.; PINTO, L. H.; CROSS, T. A. and LAMB, R. A. (1999): The influenza virus M2 ion channel protein: probing the structure of the transmembrane domain in intact cells by using engineered disulfide cross-linking. *Virology*, **254**, 196-209.
- BELOSO, A.; MARTÍNEZ, C.; VALCÁRCEL, J.; FERNÁNDEZ-SANTARÉN, J. and ORTÍN, J. (1992): Degradation of cellular mRNA during influenza virus infection: its possible role in protein synthesis shutoff. *J. Gen. Virol.*, **73**, 575-581.
- BISWAS, S. K.; BOUTZ, P. L. and NAYAK, D. P. (1998): Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J. Virol.*, **72**, 5493-5501.
- BISWAS, S. K. and NAYAK, D. P. (1994): Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J. Virol.*, **68**, 1819-1826.
- BLAAS, D.; PATZELT, E. and KEUHLER, E. (1982): Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucl. Acids Res.*, **10**, 4803-4812.
- BULLOUGH, P. A.; HUGHSON, F. M.; SKEHEL, J. J. and WILEY, D. C. (1994): Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature*, **371**, 37-43.
- CATON, A. J. and ROBERTSON, J. S. (1980): Structure of the host derived sequences present at the 5'-ends of influenza virus mRNA. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 2595-2603.
- CHEN, J.; LEE, K. H.; STEINHAUER, D. A.; STEVENS, D. J.; SKEHEL, J. J. and WILEY, D. C. (1998): Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant

- of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell*, **95**, 409-417.
- CHEN, W.; CALVO, P. A.; MALIDE, D.; GIBBS, J.; SCHUBERT, U.; BACIK, I.; BASTA, S.; O'NEILL, R.; SCHICKLI, J.; PALESE, P.; HENKLEIN, P.; BENNINK, J. R. and YEWDELL, J. W. (2001): A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*, **7**, 1306-1312.
- CHEONG, H. K.; CHEONG, C.; LEE, Y. S.; SEONG, B. L. and CHOI, B. S. (1999): Structure of influenza virus panhandle RNA studied by NMR spectroscopy and molecular modeling. *Nucleic Acids Res*, **27**, 1392-1397.
- CIANCI, C.; COLONNO, R. J. and KRYSAL, M. (1997): Differential effect of modified capped RNA substrates on influenza virus transcription. *Virus Res*, **50**, 65-75.
- COLMAN, P. M.; VARGHESE, J. N. and LAVER, W. G. (1983): Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature*, **303**, 41-44.
- DE LA LUNA, S.; FORTES, P.; BELOSO, A. and ORTÍN, J. (1995): Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J. Virol.*, **69**, 2427-2433.
- DIGARD, P.; BLOK, V. C. and INGLIS, S. C. (1989): Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology*, **171**, 162-169.
- DUHAUT, S. D. and McCAULEY, J. W. (1996): Defective RNAs inhibit the assembly of influenza virus genome segments in a segment-specific manner. *Virology*, **216**, 326-337.
- ELTON, D.; MEDCALF, E.; BISHOP, K. and DIGARD, P. (1999a): Oligomerization of the influenza virus nucleoprotein: identification of positive and negative sequence elements. *Virology*, **260**, 190-200.
- ELTON, D.; MEDCALF, L.; BISHOP, K.; HARRISON, D. and DIGARD, P. (1999b): Identification of amino acid residues of influenza virus nucleoprotein essential for RNA binding. *J Virol*, **73**, 7357-7367.
- ELTON, D.; SIMPSON, H. M.; ARCHER, K.; MEDCALF, L.; HALLAM, R.; McCAULEY, J. and DIGARD, P. (2001): Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol*, **75**, 408-419.
- ENAMI, K.; SATO, T. A.; NAKADA, S. and ENAMI, M. (1994): Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J. Virol.*, **68**, 1432-1437.
- ENAMI, M.; SHARMA, G.; BENHAM, C. and PALESE, P. (1991): An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology*, **185**, 291-298.
- ENGELHARDT, O. G.; SMITH, M. and FODOR, E. (2005): Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J Virol*, **79**, 5812-5818.
- FALCÓN, A. M.; FORTES, P.; MARIÓN, R. M.; BELOSO, A. and ORTÍN, J. (1999): Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen *in vivo* and *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2241-2247.
- FALCÓN, A. M.; MARIÓN, R. M.; ZÜRCHER, T.; GÓMEZ, P.; PORTELA, A.; NIETO, A. and ORTÍN, J. (2004): Defective RNA replication and late gene expression in tempe-

- temperature-sensitive (A/Victoria/3/75) influenza viruses expressing deleted forms of NS1 protein. *J. Virol.*, **78**, 3880-3888.
- FLICK, R. and HOBOM, G. (1999): Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the «corkscrew» conformation. *J Gen Virol*, **80 (Pt 10)**, 2565-2572.
- FODOR, E.; PRITLOVE, D. C. and BROWNLEE, G. G. (1994): The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J Virol*, **68**, 4092-4096.
- (1995): Characterization of the RNA-fork model of virion RNA in the initiation of transcription in influenza A virus. *J. Virol.*, **69**, 4012-4019.
- FORTES, P.; BELOSO, A. and ORTÍN, J. (1994): Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks RNA nucleocytoplasmic transport. *The EMBO J.*, **13**, 704-712.
- FORTES, P.; LAMOND, A. I. and ORTÍN, J. (1995): Influenza virus NS1 protein alters the subnuclear localization of cellular splicing components. *J. Gen. Virol.*, **76**, 1001-1007.
- FUJII, K.; FUJII, Y.; NODA, T.; MURAMOTO, Y.; WATANABE, T.; TAKADA, A.; GOTO, H.; HORIMOTO, T. and KAWAOKA, Y. (2005): Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J Virol*, **79**, 3766-3774.
- FUJII, Y.; GOTO, H.; WATANABE, T.; YOSHIDA, T. and KAWAOKA, Y. (2003): Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2002-2007.
- GÓMEZ-PUERTAS, P.; MENA, I.; CASTILLO, M.; VIVO, A.; PÉREZ-PASTRANA, E. and PORTELA, A. (1999): Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *J. Gen. Virol.*, **80**, 1635-1645.
- GONZÁLEZ, S. and ORTÍN, J. (1999a): Characterization of the influenza virus PB1 protein binding to vRNA: Two separate regions of the protein contribute to the interaction domain. *J. Virol.*, **73**, 631-637.
- (1999b): Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *EMBO J.*, **18**, 3767-3775.
- GONZÁLEZ, S.; ZÜRCHER, T. and ORTÍN, J. (1996): Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein responsible for interaction with the PB2 and PA subunits: A model for the viral RNA polymerase structure. *Nucleic Acids. Res.*, **24**, 4456-4463.
- GREENSPAN, D.; KRYSAL, M.; NAKADA, S.; ARNHEITER, H.; LYLES, D. S. and PALESE, P. (1985): Expression of influenza virus NS2 nonstructural protein in bacteria and localization of NS2 in infected eucaryotic cells. *J Virol*, **54**, 833-843.
- HAGEN, M.; CHUNG, T. D.; BUTCHER, J. A. and KRYSAL, M. (1994): Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity. *J Virol*, **68**, 1509-1515.
- HATADA, E.; SAITO, S.; OKISHIO, N. and FUKUDA, R. (1997): Binding of the influenza virus NS1 protein to model genome RNAs. *J. Gen. Virol.*, **78**, 1059-1063.
- HATADA, E.; TAKIZAWA, T. and FUKUDA, R. (1992): Specific binding of influenza virus NS1 protein to the virus minus-sense RNA in vitro. *J. Gen. Virol.*, **73**, 17-25.

- HAY, A. J.; SKEHEL, J. J. and McCAULEY, J. (1982): Characterization of influenza virus RNA complete transcripts. *Virology*, **116**, 517-522.
- HAY, A. J.; WOLSTENHOLME, A. J.; SKEHEL, J. J. and SMITH, M. H. (1985): The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J.*, **4**, 3021-3024.
- HERZ, C.; STAVNEZER, E.; KRUG, R. M. and GURNEY, T. (1981): Influenza virus, an RNA virus, synthesizes its messenger RNA in the nucleus of infected cells. *Cell*, **26**, 391-400.
- HOLSINGER, L. J. and LAMB, R. A. (1991): Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology*, **183**, 32-43.
- HSU, M. T.; PARVIN, J. D.; GUPTA, S.; KRYSTAL, M. and PALESE, P. (1987): Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**, 8140-8144.
- HUARTE, M.; SANZ-EZQUERRO, J. J.; RONCAL, F.; ORTIN, J. and NIETO, A. (2001): PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J. Virol.*, **75**, 8597-8604.
- INGLIS, S. C. (1982): Inhibition of host protein synthesis and degradation of cellular mRNAs during infection by influenza and Herpes simplex virus. *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 1644-1648.
- INGLIS, S. C.; BARRET, T.; BROWN, C. M. and ALMOND, J. W. (1979): The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3790-3794.
- INGLIS, S. C. and BROWN, C. M. (1981): Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nucleic Acid Res.*, **9**, 2727-2740.
- ITO, T. (2000): Interspecies transmission and receptor recognition of influenza A viruses. *Microbiol Immunol*, **44**, 423-430.
- ITO, T.; GORMAN, O. T.; KAWAOKA, Y.; BEAN, W. J. and WEBSTER, R. G. (1991): Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J. Virol.*, **65**, 5491-5498.
- JACKSON, D. A.; CATON, A. J.; MCCREADY, S. J. and COOK, P. R. (1982): Influenza virus RNA is synthesized at fixed sites in the nucleus. *Nature*, **296**, 366-368.
- JIN, H.; LESER, G. P.; ZHANG, J. and LAMB, R. A. (1997): Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase cytoplasmic tails control particle shape. *Embo J*, **16**, 1236-1247.
- KATZE, M. G. and KRUG, R. M. (1984): Metabolism and expression of RNA polymerase II transcripts in influenza virus-infected cells. *Mol Cell Biol*, **4**, 2198-2206.
- KLUMPP, K.; RUIGROK, R. W. and BAUDIN, F. (1997): Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *Embo J*, **16**, 1248-1257.
- KRUG, R. M.; BRONI, B. A. and BOULOY, M. (1979): Are the 5'-ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs? *Cell*, **18**, 329-334.

- LAMB, R. A. and LAI, C. J. (1980): Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. *Cell*, **21**, 475-485.
- LAMB, R. A.; LAI, C. J. and CHOPPIN, P. W. (1981): Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4170-4174.
- LAMB, R. A.; ZEBEDEE, S. L. and RICHARDSON, C. D. (1985): Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell*, **40**, 627-633.
- LI, Y.; YAMAKITA, Y. and KRUG, R. M. (1998): Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 4864-4869.
- LIU, C. and AIR, G. M. (1993): Selection and characterization of a neuraminidase-minus mutant of influenza virus and its rescue by cloned neuraminidase genes. *Virology*, **194**, 403-407.
- LIU, J.; LYNCH, P. A.; CHIEN, C. Y.; MONTELIONE, G. T.; KRUG, R. M. and BERMAN, H. M. (1997): Crystal structure of the unique RNA-binding domain of the influenza virus NS1 protein [letter]. *Nat Struct Biol*, **4**, 896-899.
- LÓPEZ-TURISO, J. A.; MARTÍNEZ, C.; TANAKA, T. and ORTÍN, J. (1990): The synthesis of influenza virus negative-strand RNA takes place in insoluble complexes present in the nuclear matrix fraction. *Virus Res*, **16**, 325-337.
- LUYTJES, W.; KRYSZAL, M.; ENAMI, M.; PARVIN, J. D. and PALESE, P. (1989): Amplification, expression and packaging of a foreign gene by influenza virus. *Cell*, **59**, 1107-1113.
- MAHY, B. W. J. (1983): Mutants of influenza virus. In Palese, P. and Kingsbury, D. W. (eds.), *Genetics of influenza viruses*. Springer Verlag, Wien, pp. 192-253.
- MARIÓN, R. M.; ARAGÓN, T.; BELOSO, A.; NIETO, A. and ORTÍN, J. (1997a): The N-terminal half of the influenza virus NS1 protein is sufficient for nuclear retention of mRNA and enhancement of viral mRNA translation. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4271-4277.
- MARIÓN, R. M.; ZÜRCHER, T.; DE LA LUNA, S. and ORTÍN, J. (1997b): Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo. *J. Gen. Virol.*, **78**, 2447-2451.
- MARTÍN-BENITO, J.; AREA, E.; ORTEGA, J.; LLORCA, O.; VALPUESTA, J. M.; CARRASCOSA, J. L. and ORTÍN, J. (2001): Three dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Reports*, **2**, 313-317.
- MOMOSE, F.; BASLER, C. F.; O'NEILL, R. E.; IWAMATSU, A.; PALESE, P. and NAGATA, K. (2001): Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol*, **75**, 1899-1908.
- MOMOSE, F.; NAITO, T.; YANO, K.; SUGIMOTO, S.; MORIKAWA, Y. and NAGATA, K. (2002): Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J Biol Chem*, **277**, 45306-45314.

- MOSCONA, A. (2005): Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med*, **353**, 1363-1373.
- MOULD, J. A.; LI, H. C.; DUDLAK, C. S.; LEAR, J. D.; PEKOSZ, A.; LAMB, R. A. and PINTO, L. H. (2000): Mechanism for proton conduction of the M(2) ion channel of influenza A virus. *J Biol Chem*, **275**, 8592-8599.
- MURAMOTO, Y.; TAKADA, A.; FUJII, K.; NODA, T.; IWATSUKI-HORIMOTO, K.; WATANABE, S.; HORIMOTO, T.; KIDA, H. and KAWAOKA, Y. (2006): Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol*, **80**, 2318-2325.
- MURTI, K. G.; WEBSTER, R. G. and JONES, I. M. (1988): Localization of RNA polymerases of influenza viral ribonucleoproteins by immunogold labeling. *Virology*, **164**, 562-566.
- NEMEROFF, M. E.; BARABINO, S. M.; LI, Y.; KELLER, W. and KRUG, R. M. (1998): Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol. Cell*, **1**, 991-1000.
- NEUMANN, G.; HUGHES, M. T. and KAWAOKA, Y. (2000): Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *Embo J*, **19**, 6751-6758.
- NODA, T.; SAGARA, H.; YEN, A.; TAKADA, A.; KIDA, H.; CHENG, R. H. and KAWAOKA, Y. (2006): Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature*, **439**, 490-492.
- O'NEILL, R. E. and PALESE, P. (1995): NPI-1, the human homolog of SRP-1, interacts with influenza virus nucleoprotein. *Virology*, **206**, 116-125.
- O'NEILL, R. E., TALON, J. and PALESE, P. (1998): The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *Embo J*, **17**, 288-296.
- ODAGIRI, T. and TASHIRO, M. (1997): Segment-specific noncoding sequences of the influenza virus genome RNA are involved in the specific competition between defective interfering RNA and its progenitor RNA segment at the virion assembly step. *J Virol*, **71**, 2138-2145.
- ORTEGA, J.; MARTÍN-BENITO, J.; ZÜRCHER, T.; VALPUESTA, J. M.; CARRASCOSA, J. L. and ORTÍN, J. (2000): Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J. Virol.*, **74**, 156-163.
- ORTÍN, J. (1998): Multiple levels of post-transcriptional regulation of Influenza virus gene expression. *Seminars in Virology*, **3**, 335-342.
- PARK, Y. W. and KATZE, M. G. (1995): Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation. *J Biol Chem*, **270**, 28433-28439.
- PERALES, B.; DE LA LUNA, S.; PALACIOS, I. and ORTÍN, J. (1996): Mutational analysis identifies functional domains in the Influenza A PB2 polymerase subunit. *J. Virol.*, **70**, 1678-1686.

- PERALES, B.; SANZ-EZQUERRO, J. J.; GASTAMINZA, P.; ORTEGA, J.; FERNÁNDEZ-SANTARÉN, J.; ORTÍN, J. and NIETO, A. (2000): The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis. *J. Virol.*, **74**, 1307-1312.
- PINTO, L. H.; HOLSINGER, L. J. and LAMB, R. A. (1992): Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, **69**, 517-528.
- PLOTCH, S. J.; BOULOY, M.; ULMANEN, I. and KRUG, R. M. (1981): A unique cap(m7 GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell*, **23**, 847-858.
- POCH, O.; SAUVAGET, I.; DELARUE, M. and TORDO, N. (1990): Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.*, **8**, 3867-3874.
- PONS, M. W.; SCHULZE, I. T. and HIRST, G. K. (1969): Isolation and characterization of the ribonucleoprotein of influenza virus. *Virology*, **39**, 250-259.
- POOLE, E.; ELTON, D.; MEDCALF, L. and DIGARD, P. (2004): Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology*, **321**, 120-133.
- POON, L. L. M.; PRITLOVE, D. C.; FODOR, E. and BROWNLEE, G. G. (1999): Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J. Virol.*, **73**, 3473-3476.
- PORTELA, A.; MELERO, J. A.; MARTINEZ, C.; DOMINGO, E. and ORTÍN, J. (1985): A primer vector system that allows temperature dependent gene amplification and expression in mammalian cells: regulation of the influenza virus NS1 gene expression. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 7959-7977.
- PRITLOVE, D. C.; POON, L. L. M.; DEVENISH, L. J.; MIKE B. LEAHY, M. B. and BROWNLEE, G. G. (1999): A hairpin loop at the 5' end of influenza A virus virion RNA is required for synthesis of poly(A)+ mRNA in vitro. *J. Virol.*, **73**, 2109-2114.
- QIAN, X.-Y.; ALONSO-CAPLEN, F. and KRUG, R. M. (1994): Two functional domains of the influenza virus NS1 protein are required for regulation of nuclear export of mRNA. *J. Virol.*, **68**, 2433-2441.
- QIU, Y. and KRUG, R. M. (1994): The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). *J. Virol.*, **68**, 2425-2432.
- RAO, P.; YUAN, W. and KRUG, R. M. (2003): Crucial role of CA cleavage sites in the cap-snatching mechanism for initiating viral mRNA synthesis. *Embo J*, **22**, 1188-1198.
- ROBERTSON, J. S.; BOOTMAN, J. S.; NEWMAN, R.; OXFORD, J. S.; DANIELS, R. S.; WEBSTER, R. G. and SCHILD, G. C. (1987): Structural changes in the haemagglutinin which accompany egg adaptation of an influenza A(H1N1) virus. *Virology*, **160**, 31-37.
- ROBERTSON, J. S.; SCHUBERT, M. and LAZZARINI, R. A. (1981): Polyadenylation sites for influenza mRNA. *J. Virol.*, **38**, 157-163.

- RUIGROK, R. W. and BAUDIN, F. (1995): Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles. *J Gen Virol*, **76**, 1009-1014.
- SANZ-EZQUERRO, J. J.; FERNÁNDEZ SANTARÉN, J.; SIERRA, T.; ARAGÓN, T.; ORTEGA, J.; ORTÍN, J.; SMITH, G. L. and NIETO, A. (1998): The PA influenza polymerase subunit is a phosphorylated protein. *J. Gen. Virol.*, **79**, 471-478.
- SHA, B. and LUO, M. (1997): Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat Struct Biol*, **4**, 239-244.
- SHAPIRO, G. I.; GURNEY, T. J. and KRUG, R. M. (1987): Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J Virol*, **61**, 764-773.
- SMITH, D. B. and INGLIS, S. C. (1985): Regulated production of an influenza virus spliced mRNA mediated by virus-specific products. *EMBO J*, **4**, 2313-2319.
- SMITH, G. L.; LEVIN, J. Z.; PALESE, P. and MOSS, B. (1987): Synthesis and cellular location of the ten influenza polypeptides individually expressed by recombinant vaccinia viruses [published erratum appears in *Virology* 1988 Mar;163(1):259]. *Virology*, **160**, 336-345.
- SUGRUE, R. J.; BELSHE, R. B. and HAY, A. J. (1990): Palmitoylation of the influenza A virus M2 protein. *Virology*, **179**, 51-56.
- SUGRUE, R. J. and HAY, A. J. (1991): Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology*, **180**, 617-624.
- TILEY, L. S.; HAGEN, M.; MATHEWS, J. T. and KRYSTAL, M. (1994): Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5'-end of the viral RNAs. *J. Virol.*, **68**, 5108-5116.
- TOYODA, T.; ADYSHEV, D. M.; KOBAYASHI, M.; IWATA, A. and ISHIHAMA, A. (1996): Molecular assembly of the influenza virus RNA polymerase: determination of the subunit-subunit contact sites. *J. Gen. Virol.*, **77**, 2149-2157.
- ULMANEN, I.; BRONI, B. A. and KRUG, R. M. (1981): The role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7355-7359.
- VALCÁRCEL, J.; PORTELA, A. and ORTÍN, J. (1991): Regulated M1 mRNA splicing in influenza virus-infected cells. *J. Gen. Virol.*, **72**, 1301-1308.
- VARGHESE, J. N.; LAVER, W. G. and COLMAN, P. M. (1983): Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature*, **303**, 35-40.
- VREDE, F. T.; JUNG, T. E. and BROWNLEE, G. G. (2004): Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *J Virol*, **78**, 9568-9572.
- WANG, P.; PALESE, P. and O'NEILL, R. E. (1997): The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol*, **71**, 1850-1856.

- WEIS, W.; BROWN, J. H.; CUSACK, S.; PAULSON, J. C.; SKEHEL, J. J. and WILEY, D. C. (1988): Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*, **333**, 426-431.
- WILSON, I. A.; SKEHEL, J. J. and WILEY, D. C. (1981): Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. **289**, 366-373.
- WINTER, G.; FIELDS, S.; GAIT, M. J. and BROWNLIE, G. G. (1981): The use of synthetic oligodeoxynucleotide primers in cloning and sequencing segment 8 of influenza virus (A/PR/8/34). *Nucleic Acids. Res.*, **9**, 237-245.
- WOLFF, T.; O'NEILL, R. E. and PALESE, P. (1998): NS1-Binding protein (NS1-BP): a novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of infected cells. *J. Virol.*, **72**, 7170-7180.
- YASUDA, J.; NAKADA, S.; KATO, A.; TOYODA, T. and ISHIHAMA, A. (1993): Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology*, **196**, 249-255.
- YE, Z.; BAYLOR, N. W. and WAGNER, R. R. (1989): Transcription-inhibition and RNA-binding domains of influenza A virus matrix protein mapped with anti-idiotypic antibodies and synthetic peptides. *J. Virol.*, **63**, 3586-3594.
- ZEBEDEE, S. L. and LAMB, R. A. (1988): Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J. Virol.*, **62**, 2762-2772.
- ZHANG, J.; LESER, G. P.; PEKOSZ, A. and LAMB, R. A. (2000a): The cytoplasmic tails of the influenza virus spike glycoproteins are required for normal genome packaging. *Virology*, **269**, 325-334.
- ZHANG, J.; PEKOSZ, A. and LAMB, R. A. (2000b): Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J. Virol.*, **74**, 4634-4644.
- ZHENG, H.; PALESE, P. and GARCÍA SASTRE, A. (1996): Nonconserved nucleotides at the 3' and 5' ends of an influenza A virus RNA play an important role in viral RNA replication. *Virology*, **217**, 242-251.
- ZHIRNOV, O. P. (1992): Isolation of matrix protein M1 from influenza viruses by acid-dependent extraction with nonionic detergent. *Virology*, **186**, 324-330.
- ZÜRCHER, T.; DE LA LUNA, S.; SANZ-EZQUERRO, J. J.; NIETO, A. and ORTÍN, J. (1996): Mutational analysis of the influenza virus A/Victoria/3/75 PA protein: Studies of interaction with PB1 protein and identification of a dominant negative mutant. *J. Gen. Virol.*, **77**, 1745-1749.
- ZÜRCHER, T.; MARIÓN, R. M. and ORTÍN, J. (2000): The protein synthesis shut-off induced by influenza virus infection is independent of PKR activity. *J. of Virol.*, **74**, 8781-8784.
- ZVONARJEV, A. Y. and GHENDON, Y. Z. (1980): Influence of membrane (M) protein on influenza A virus virion transcriptase activity and its susceptibility to rimantadine. *J. Virol.*, **33**, 583-586.