



"Estudio de los determinantes moleculares involucrados en la traducción de los ARN mensajeros de arenavirus"

Lic. Sabrina Andrea Foscaldi

**Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires**

Directora de Tesis: Dra. Nora López

Consejero de estudios: Dra. Lucía Cavallaro

**Lugar de trabajo: Centro de Virología Animal-ICT Milstein-
CONICET**

**Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Virología**

- 2016 -

ÍNDICE

Resumen.....	6
Agradecimientos.....	9
INTRODUCCIÓN	
Familia <i>Arenaviridae</i> y virus Tacaribe.....	11
Organización genómica.....	14
Secuencias genómicas no codificantes.....	16
Virion.....	17
Proteínas virales.....	18
• Nucleoproteína (NP).....	18
• Precursor de las glicoproteínas de envoltura (GPC).....	19
• ARN polimerasa dependiente de ARN (L).....	21
• Proteína matriz Z.....	22
Mecanismo de replicación.....	24
Estructura de los ARN mensajeros de arenavirus.....	26
Traducción de ARN mensajeros eucariotas.....	28
Traducción de ARN mensajeros virales.....	31
Rescate de virus a partir de ADN copia.....	33
OBJETIVOS.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Cepas bacterianas.....	39
2. Células.....	39
3. Virus.....	40
4. Sueros y anticuerpos monoclonales.....	41
5. Plásmidos.....	41
• Plásmidos que expresan las proteínas virales: pTCRV-N y pTCRV-L.....	41
• Plásmido pCA-T7.....	42
6. Construcciones plasmídicas.....	42

• Plásmido pTM1-Renilla.....	42
• Plásmido pPol I-MG/FLUC.....	43
• Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'wt.....	44
• Plásmidos pARNm-LUC con mutaciones en la región no codificante 5'.....	45
1-Mutantes por delección.....	45
Plásmido pARNm-LUC/5'ΔD/3'wt.....	46
Plásmido pARNm-LUC/5'ΔP/3'wt.....	46
Plásmido pARNm-LUC/5'ΔT/3'wt.....	46
2-Mutantes por sustitución.....	47
Plásmido pARNm-LUC/5'UNS/3'wt.....	47
Plásmido pARNm-LUC/5'β_Glo/3'wt.....	47
• Plásmidos pARNm LUC con mutaciones en la región no codificante 3'.....	48
1-Mutantes por sustitución.....	48
Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'UNS.....	48
Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'HII_mut1.....	48
Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'his.....	48
Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'poliA.....	48
Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'ΔH+19are.....	48
Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'ΔH+19T.....	48
Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'HI_mut2.....	48
Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'HI_mut1.....	49
Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'rev.....	49
Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'HII_mut2.....	49
Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'HII_mut3.....	50
Plásmido pARNm-LUC/5'β_Glo/3'poliA.....	50
2-Mutantes por inserción.....	50
Plásmidos pARNm LUC/5'wt/3'sp1 y pARNm-LUC/5'wt/3'sp3.....	50
Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'sp2.....	51
• Plásmidos utilizados para la obtención de TCRV recombinante.....	53

Plásmidos pLag wt y pSag wt.....	53
Plásmidos pSag wt _{+C} y pLag wt _{+C}	55
Plásmido pSag GFP _{+C}	56
Plásmido pSag CHERRY _{+C}	57
Plásmido pLag pol (-) _{+C}	58
7. Mutagénesis sitio-dirigida.....	59
8. Síntesis de ARN <i>in Vitro</i>	60
9. Transfecciones de ADN.....	61
10. Transfecciones de ARN.....	62
11. Purificación y Secuenciación de ADN.....	63
12. Ensayo de actividad Luciferasa.....	63
13. Análisis de proteínas mediante SDS-PAGE y Ensayo de Western blot.....	64
14. Purificación de ARN intracelular, Transcripción Reversa (RT) y PCR en tiempo real.....	64
15. Análisis estadísticos.....	66
16. Análisis bioinformático.....	67
17. Materiales.....	67

RESULTADOS

CAPITULO I. Elementos involucrados en la traducción de los ARN mensajeros del arenavirus Tacaribe.....	69
• Breve reseña de los antecedentes.....	70
• Puesta a punto de la metodología empleada para el estudio de la traducción viral.....	71
• Análisis del papel de la estructura Cap y de la región no codificante 3' en la traducción de los ARNm virales.....	75
• Análisis de la estabilidad relativa de los ARN mensajeros mutantes.....	78
• Diseño y evaluación de ARNm con mutaciones en la región 3' no traducible.....	80
• Análisis del papel de la región 5' no codificante en la	

traducción de los ARNm virales.....	91
• Estudio de la influencia de la proteína viral NP en la traducción de los ARNm de arenavirus.....	96
• Implicancia de los factores celulares eIF4G y eIF4E en la traducción de los ARNm de arenavirus.....	99
CAPÍTULO II. Desarrollo de un sistema para la generación de TCRV infeccioso a partir de ADN copia.....	104
• Consideraciones generales.....	105
• Construcción de los plásmidos que expresan los ARN antigenómicos de TCRV.....	106
• Puesta a punto de las condiciones para la generación de TCRV infeccioso a partir de ADNc.....	107
• Rescate de TCRV a partir de ADNc	112
CONCLUSIONES y DISCUSIÓN.....	115
Elementos involucrados en la traducción de los ARN mensajeros del arenavirus Tacaribe.....	116
Desarrollo de un sistema para la generación de TCRV infeccioso a partir de ADN copia.....	125
BIBLIOGRAFÍA.....	127

Resumen

La familia *Arenaviridae* comprende los géneros *Mammarenavirus* y *Reptarenavirus*. El virus Tacaribe (TCRV), prototipo de los *Mammarenavirus* del Nuevo Mundo, es un virus no patógeno filogenéticamente muy cercano a los *arenavirus* patógenos sudamericanos tales como el virus Junín, agente causal de la Fiebre Hemorrágica Argentina.

El genoma de los *Arenavirus* consiste en dos segmentos de ARN de cadena simple (S y L) que codifican para cuatro proteínas: la nucleoproteína (NP), el precursor de las glicoproteínas de envoltura (GPC), la polimerasa L y la proteína matriz Z. En ambos segmentos, las secuencias codificantes se hallan separadas por una región intergénica (RIG) no codificante, rica en residuos C y G. El producto de la transcripción de los ARN S y L son los 4 ARNm subgenómicos a partir de los cuales son traducidas las proteínas virales. Estos ARNm presentan la estructura 7-metil-guanosina Cap en el extremo 5' y una región 3' no traducible (3'UTR) que carece de cola de poli-Adenosinas (poliA). En todos los *arenavirus*, la secuencia 3' UTR de los cuatro ARNm tiene la potencialidad de formar una estructura secundaria muy estable del tipo tallo-bucle (*hairpin* II). En la región 3' no traducible del ARNm NP, además, se observa una región que podría plegarse en un *hairpin* menos estable y una secuencia proximal al codón de terminación, no estructurada.

Uno de los objetivos de este trabajo de Tesis fue investigar el rol de las secuencias 3' y 5' no codificantes de los ARNm; así como la dependencia de factores celulares clave y proteínas virales en su traducción. Para eso, se generó un transcripto sintético que imita al ARNm NP de TCRV, y que porta el gen de la Luciferasa de luciérnaga (FLUC). Asimismo, se generaron ARNm mutantes con modificaciones en las regiones no traducibles 3' y 5'. La evaluación de la eficiencia de traducción de los transcriptos fue determinada luego de la transfección en células eucariotas, mediante la medición de la actividad FLUC y la

determinación de la estabilidad de los transcriptos, por medio de PCR cuantitativa.

Los resultados indicaron que la delección que elimina la totalidad del *hairpin* II, reduce la eficiencia de traducción a niveles que corresponden a 35% de los observados para el transcripto salvaje, sugiriendo que la región 3' no traducible de los ARNm virales, y particularmente la secuencia *hairpin* II, podría ser esencial. Además, el análisis del efecto de una serie de mutaciones en la región 3' no codificante reveló, en conjunto, que la estructura secundaria de la región que comprende al *hairpin* II y/o su contenido en residuos G/C juega un papel modulador de la traducción. Además, la sustitución de los 20 nts. proximales al codón stop causó una reducción significativa en los niveles de detección de FLUC, señalando el requerimiento de la secuencia proximal en el proceso de traducción.

El análisis de la contribución de la región 5' no codificante evidenció que la delección parcial, ya sea de la región proximal o distal al extremo 5', reduce los niveles de traducción del ARNm sintético. Estos datos podrían indicar que ambas regiones contribuyen al proceso de traducción. La sustitución de la secuencia 5'UTR por una secuencia de igual longitud que difiere en su composición nucleotídica, resultó en niveles de traducción aun inferiores a los mostrados por los mutantes con delección parcial. Asimismo, la substitución por la región 5' no traducible del ARNm de β -globina resultó en niveles de traducción menores a los mediados por el transcripto salvaje. Estos datos indicaron que la región 5' no codificante de los ARNm de TCRV contienen elementos de secuencia o estructura que estimulan la traducción.

Un segundo objetivo de este trabajo fue entender cuál es la participación de los factores celulares eIF4G y eIF4E, así como la contribución de proteínas virales en la traducción. Los resultados mostraron que el nivel de actividad FLUC mediado por el transcripto salvaje (con Cap) fue 340 veces mayor que el determinado para el ARN salvaje desprovisto de Cap, sugiriendo la dependencia de la estructura 5' Cap para la traducción de los ARNm de TCRV. Además, se observaron niveles de actividad FLUC determinados en ausencia de NP que fueron

comparables a los detectados en presencia de cantidades crecientes de NP o en el contexto de una infección con TCRV, indicando que la presencia de NP o de otras proteínas virales no afecta la eficiencia de traducción del ARNm viral. Por otra parte, el análisis reveló que la inactivación del factor eIF4GI reduce los niveles de traducción de los ARNm sintéticos, tanto salvaje como de mutantes desprovistos de *hairpin* II. Estos resultados indican que la traducción de arnavirus es dependiente de eIF4G y sugieren que la presencia del *hairpin* II no es determinante para la participación del factor en ese proceso.

Por último, este trabajo de Tesis tuvo como objetivo generar las herramientas necesarias para la obtención de TCRV infeccioso (clon infeccioso) a partir de plásmidos recombinantes. Mediante la utilización de construcciones que expresan proteínas fluorescentes, se establecieron las cantidades y proporciones óptimas de los plásmidos a transfectar. Los resultados demostraron que el sistema desarrollado dirige la generación de TCRV recombinante. Este es un recurso muy valioso que permite no sólo el desarrollo de vacunas recombinantes con modificaciones específicas controladas y predeterminadas, sino también la realización de estudios mecanísticos en el contexto de la infección viral, para responder a cuestiones fundamentales acerca de, entre otras, la patogénesis de las infecciones virales

Agradecimientos.

A Nora, por haber estado siempre presente. Valoro su dedicación y el esfuerzo por hacer las cosas “bien hechas”. Por transmitirme su experiencia de forma constructiva. Por permitirme crecer con todo lo que eso implica, así que por su paciencia también.

Al Dr. José La torre y la Dra. Nora Mattion por recibirme en el instituto.

A la Fundación de Estudios en Virología Animal (FEVAN), por su apoyo en esta tesis.

Al las chicas del lab NL, que están o estuvieron, Eu, Ale, Ani y Clari, por todas las enseñanzas, consejos, buena predisposición y compañerismo.

A toda la gente del CEVAN, principalmente a mis compañeros del lab grande, con quien pasamos lindos momentos y me han ayudado a llegar hasta acá. A Claudia Sepulveda (FCEN, UBA) por su ayuda. A Florencia Linero, Gabriela Noval y Gonzalo de Prat Gay, por su interés en este trabajo y las discusiones que aportaron al mismo.

Muchas gracias Maxx, Carlos Palacios y Ce Calde.

A mis más que compañeras, amigas Ce Lotu y Margarita, por el apoyo incondicional y los deseos auténticos de que las cosas me salgan bien.

A mi papá y Paola.

A mis amigos de toda la vida, Caffé y Ace que me han acompañado y comprendido.... Siempre.

A mis hermanos, que siempre con optimismo se prestaron a colaborar en todo y supieron entender los tiempos y haber cuidado tan bien a Baltún. Haber llegado a esto, es por su apoyo y amor.

Mi mayor agradecimiento para mi ma, no tengo palabras por tu amor y entrega, así que simplemente esta tesis.....te la dedico a vos mamá.

INTRODUCCIÓN

Familia *Arenaviridae* y virus Tacaribe.

La familia *Arenaviridae* está constituida por virus envueltos con genoma de ARN de cadena simple. El nombre arenavirus hace referencia a la apariencia granulosa característica que se observa al analizar los virus por microscopía electrónica (Rowe et al., 1970a). Estos gránulos electrodensos han sido identificados como ribosomas de la célula hospedadora incorporados a las partículas virales durante el proceso de maduración de las mismas (Pedersen, 1979).

La familia comprende el género *Mammarenavirus*, que incluye actualmente 27 especies asociadas mayoritariamente a mamíferos, y el recientemente descrito *Reptarenavirus*, que incluye 3 especies de virus asociados a serpientes (Radoshitzky et al., 2015). En base a su distribución geográfica y a su comportamiento en ensayos serológicos, los arenavirus fueron inicialmente agrupados en arenavirus del Viejo Mundo y arenavirus del Nuevo Mundo o complejo Tacaribe (Figura I1) (Casals et al., 1975; Rowe et al., 1970b; Wulff et al., 1978). Esta clasificación fue posteriormente confirmada luego del análisis de los datos de las secuencias genómicas parciales de varios miembros de la familia (Bowen et al., 1996a; Clegg et al., 1991; Gonzalez et al., 1996; Griffiths et al., 1992). El análisis filogenético mostró que los arenavirus del Nuevo Mundo se agrupan en tres linajes evolutivos designados como linajes A, B y C (Bowen et al., 1996b). El linaje B agrupa a los cinco arenavirus productores de fiebres hemorrágicas en Sudamérica conocidos hasta el momento: los virus Guanarito en Venezuela (GTOV), Junín en Argentina (JUNV), Sabia en Brasil (SABV), y Machupo (MACV) y Chapare (CHPV) en Bolivia (Delgado et al., 2008). Este mismo linaje incluye al virus Tacaribe (TCRV), prototipo de los virus del Nuevo Mundo, que a diferencia de los virus mencionados anteriormente parece no ser patógeno para el hombre.

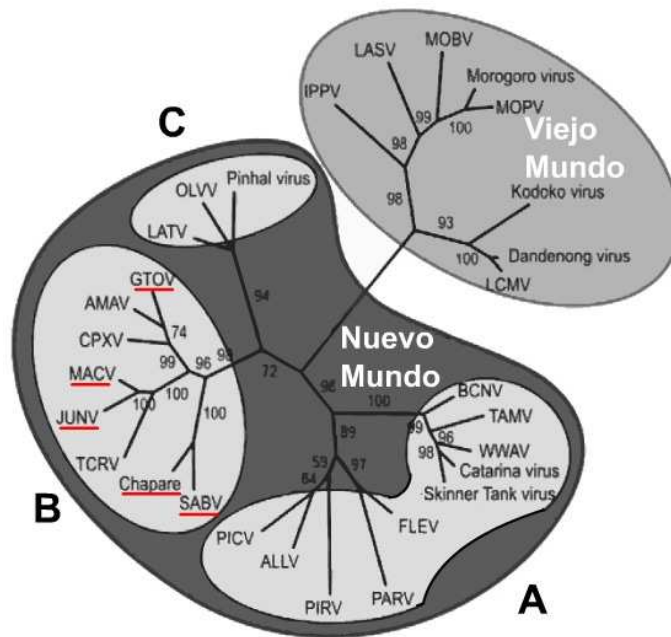


Figura 11. Filogenia de la familia *Arenaviridae*, género *Mammarenavirus*. Filograma construido por el método de máxima verosimilitud, en base a la secuencia aminoacídica de la nucleoproteína de los arenavirus indicados. Los valores numéricos en el filograma indican los porcentajes de *bootstrap* (Tomado de (Charrel et al., 2008)). Se indican dentro de las áreas mayores los grupos del Viejo o del Nuevo Mundo. Los tres clados (A, B y C) de los arenavirus del Nuevo Mundo se indican en las áreas gris claro. Los nombres de los virus patógenos humanos están subrayados en rojo. Alpahuayo (ALLV), Amapari (AMAV), Bear Canyon (BCNV), Cupixi (CPXV), Flexal (FLEV), Guanarito (GTOV), Ippy (IPPV), Junin (JUNV), Lassa (LASV), Latino (LATV), virus de la Coriomeningitis linfocitaria (LCMV), Machupo (MACV), Mobala (MOBV), Mopeia (MOPV), Oliveros (OLVV), Parana (PARV), Pichinde (PICV), Pirital (PIRV), Sabia (SABV), Tacaribe (TCRV), Tamiami (TAMV) y Whitewater Arroyo (WWAV).

Dentro del Clado B, es particularmente notoria la estrecha relación antigénica y genética existente entre los virus Tacaribe y Junín, que se evidencia por la reactividad cruzada de anticuerpos dirigidos hacia cada uno de ellos y por la capacidad de TCRV de proteger cobayos y primates del desafío con dosis letales de JUNV (Martinez Peralta et al., 1993).

Los hospedadores naturales de los *Mammarenavirus* son, en general, mamíferos. La mayor parte de estos virus han sido aislados de un número restringido de especies de roedores. La excepción a esto la constituye TCRV, que fue originalmente aislado de murciélagos frugívoros en Trinidad Tobago (Downs et al., 1963) y, más recientemente, a partir de garrapatas recolectadas en Florida, EEUU (Saylor et al., 2014). Los arenavirus se distribuyen en áreas geográficas bien definidas, a excepción del virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV), prototipo de la familia, cuya distribución es cosmopolita. La dispersión de estos virus

está determinada por la distribución geográfica del hospedador, siendo ésta probablemente la causa de la restricción geográfica de la mayoría de las especies de la familia Arenaviridae (Arata and Gratz, 1975). Una característica saliente de los arenavirus es su facilidad para establecer infecciones persistentes en roedores y en cultivo celulares (Gimenez and Compans, 1980; Rawls et al., 1981). Así, partículas contaminadas con restos de heces, orina y secreciones de los roedores persistentemente infectados, pueden ser aspiradas o entrar en contacto con piel dañada, favoreciendo la propagación.

Muchos arenavirus del Nuevo Mundo son patógenos productores de fiebres hemorrágicas en humanos. Entre ellos, JUNV es particularmente relevante pues es el agente causal de la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA), una severa enfermedad endemoepidémica de la región central de nuestro país. La zona endémica de la FHA abarca una extensa superficie (150.000 km²), que comprende parte de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe y La Pampa, un área de gran desarrollo agroindustrial, con una población en riesgo que supera los 5 millones de personas. En los últimos años se suma un nuevo grupo de riesgo que son los trabajadores rurales migrantes que se desplazan cada año principalmente desde la provincia de Santiago del Estero al área endémica para trabajar en el despajonado del maíz, lo que aumenta el alerta (Briggiler et al., 2015).

El principal reservorio natural de JUNV es el ratón maicero (*Calomys musculus*). La transmisión del virus a humanos ocurre usualmente durante el trabajo en el campo, principalmente en las estaciones de otoño e invierno, con pico en el mes de mayo (Castilla and Enria, 2013; Enria et al., 1998), coincidente con el tiempo de cosecha.

El periodo de incubación de la enfermedad (de 1 a dos semanas) es seguido por una fase asociada a síntomas inespecíficos que incluyen fiebre, dolor muscular y retro-ocular, anorexia, agrandamiento de nódulos linfáticos y petequias cutáneas. La viremia está presente durante toda la fase febril. En ausencia de tratamiento, luego de 8 a 12 días de la aparición de los primeros síntomas, pueden desarrollarse manifestaciones hemorrágicas o neurológicas severas, shock e

infecciones bacterianas secundarias. La tasa de mortalidad se estima entre el 15 y el 30% en pacientes no tratados. El único tratamiento específico disponible hasta el momento consiste en la administración de plasma inmune de pacientes convalecientes, que puede reducir la tasa de mortalidad al 1%. Sin embargo, el tratamiento carece de efectividad en pacientes con más de 8 días de evolución y se asocia a la aparición de un síndrome neurológico tardío en el 10% de los pacientes tratados (Enria et al., 2008).

El único arenavirus contra el cual se ha desarrollado una vacuna es JUNV. Ésta es una vacuna a virus atenuado (Candid #1), que ha demostrado ser eficaz. No obstante, las bases de su atenuación o los riesgos potenciales de reversión a la virulencia, no han sido aun completamente esclarecidos.

Organización genómica.

La información genética de los arenavirus está contenida en dos segmentos de ARN de cadena simple denominados ARN S (Small) y ARN L (Large), que comprenden alrededor de 3500 y 7000 nucleótidos (nts.), respectivamente. En el caso de TCRV, el ARN S consta de 3421 nts y el ARN L, de 7102 nts. (Franze-Fernandez et al., 1987; Iapalucci et al., 1989a; Iapalucci et al., 1989b; Raju et al., 1990) (Figura I2).

Ambos segmentos genómicos contienen dos marcos abiertos de lectura (Open Reading Frame - ORF) (Auperin et al., 1988; Auperin et al., 1984a; Auperin et al., 1984b; Auperin et al., 1986; Clegg and Oram, 1985; Clegg et al., 1991; Franze-Fernandez et al., 1987; Ghiringhelli et al., 1991; Romanowski et al., 1985; Southern et al., 1987; Wilson and Clegg, 1991). En el ARN S genómico, uno de ellos se ubica en la mitad 5', posee sentido positivo y codifica para la proteína GPC, el precursor intracelular de las glicoproteínas de envoltura. El otro marco de lectura abierto, de sentido negativo, se ubica en la mitad 3' del ARN S genómico y codifica para la nucleoproteína (NP). Esta estrategia de codificación se conoce como bisentido (“*ambisense*”) (Auperin et al., 1984b) debido a que los dos genes se encuentran codificados en sentido opuesto.

La secuencia nucleotídica del ARN L y su organización genómica fue descrita inicialmente para TCRV (Iapalucci et al., 1989a; Iapalucci et al., 1989b) y LCMV (Salvato et al., 1989; Salvato and Shimomaye, 1989), y más tarde para otros arenavirus (Delgado et al., 2008; Lan et al., 2008; Vieth et al., 2004). En todos los casos, el ARN L mostró una organización similar a la del ARN S. La región 5' del ARN L genómico posee un marco de lectura abierto, en sentido genómico o positivo, que codifica para una proteína de aproximadamente 11 kDa denominada Z (Franze-Fernández et al., 1993). En la región 3' del ARN L genómico se ubica el otro marco de lectura abierto que tiene sentido negativo o antígenómico y codifica para la proteína L, una ARN polimerasa dependiente de ARN (RpRd) (Figura I2).

En síntesis, los arenavirus poseen un sistema de codificación bisentido en ambos segmentos genómicos, los cuales codifican para cuatro proteínas: dos en el segmento S (GPC y NP) y dos en el segmento L (Z y L). Los arenavirus son los únicos virus animales conocidos que presentan esta modalidad de codificación en los dos segmentos de ARN que constituyen su genoma, mientras que algunos de los miembros de la familia Bunyviridae presentan una organización bisentido en al menos uno de sus tres segmentos genómicos (Auperin et al., 1984b; Bouloy, 1991).

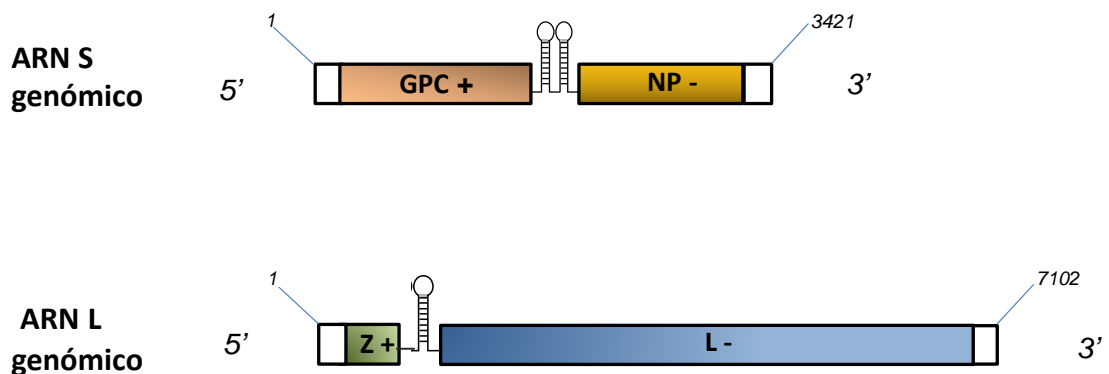


Figura I2. Organización genómica de los arenavirus. Las cajas de colores en el esquema de los segmentos genómicos S y L representan las secuencias codificantes de cada una de las 4 proteínas virales, el sentido de codificación de los marcos abiertos de lectura está indicado por los signos. En ambos segmentos, los genes virales están separados por secuencias intergénicas no codificantes, que forman estructuras secundarias de tipo horquilla (*hairpin*). Las cajas blancas representan las regiones no codificantes 5' y 3' de cada ARN genómico. Los números indican el tamaño (nts.) de los fragmentos S y L.

Secuencias genómicas no codificantes.

Tanto en el segmento S como en el L de todos los arenavirus, las secuencias codificantes no se encuentran superpuestas. Por el contrario, se hallan separadas por una región intergénica (RIG) no codificante, cuya secuencia nucleotídica es muy rica en C y G, y tiene la potencialidad de formar estructuras secundarias muy estables del tipo tallo-bucle (*hairpin*). En el segmento S, la estructura secundaria predicha exhibe una conformación de doble *hairpin*, mientras que en el segmento L conforma un *hairpin* simple (Auperin et al., 1984a; Auperin et al., 1986; Franze-Fernández et al., 1993; Romanowski and Bishop, 1985).

Ambos segmentos genómicos poseen además secuencias no codificantes (NC) en las regiones 5' y 3' terminales. La longitud de estas secuencias en el genoma de los virus del Clado B (Nuevo Mundo) oscila entre los 30 y los 102 nts. En el caso de TCRV, éstas comprenden 68 y 76 nts. en el ARN S, y 69 y 30 nts. en el ARN L. La secuencia de los primeros 19 nucleótidos del extremo 3' de los ARN genómicos S y L muestra un alto grado de conservación en todos los arenavirus examinados hasta el momento. A su vez, el extremo 5' contiene la correspondiente secuencia invertida complementaria, pudiendo los extremos de cada segmento genómico hibridizar, para dar lugar a estructuras "*panhandle*" pseudocirculares (Franze-Fernández et al., 1993). Acorde a esto, se ha observado que gran parte de las nucleocápsides purificadas de viriones de TCRV aparecen como estructuras circulares en estudios de microscopía electrónica (Compans, 1993).

Recientemente se ha reportado evidencia que indica que las 19 bases terminales de los extremos 5' y 3' contienen señales requeridas para la unión de la proteína L al ARN *in vitro* y para promover la síntesis de ARN viral (Hass et al., 2006; Kranzusch et al., 2010; Perez and de la Torre, 2003).

Virion.

Los viriones de arenavirus son pleomórficos con un diámetro de entre 50 a 300 nm (Dalton et al., 1968). Las partículas virales (Figura I3) contienen una envoltura lipídica que obtienen durante la brotación desde las células infectadas. La envoltura viral presenta en toda su superficie proyecciones en forma de espículas, que están constituidas por las glicoproteínas virales (Burns and Buchmeier, 1993; Gard, 1977).

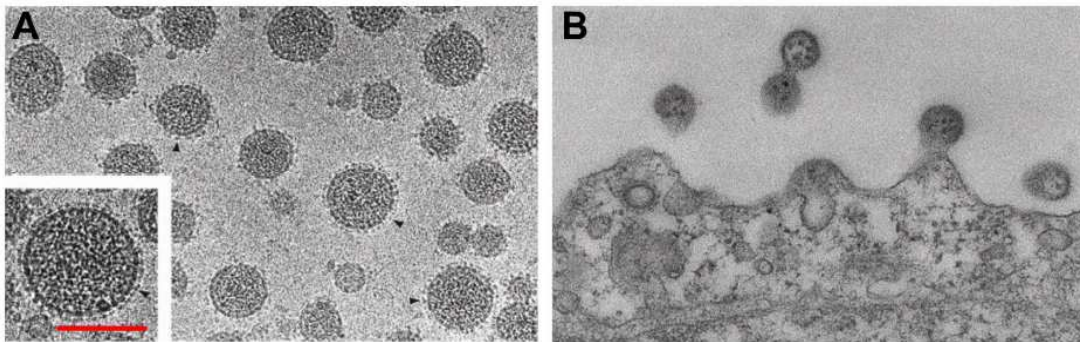


Figura I3. Partículas de arenavirus. A). Criomicroscopía electrónica de partículas del virus Tacaribe. La barra roja indica 100 nm. B). Partículas de arenavirus en el proceso de brotación desde la membrana celular. Las micrografías electrónicas fueron amablemente cedidas por Benjamín Neuman y Michael Buchmeier (The Scripps Research Institute, la Jolla, California).

En el interior de los viriones, se ha descrito una capa electrodensa que fue asignada a la proteína matriz Z (Neuman et al., 2005). Asimismo, se ha observado la presencia de gránulos electrodensos de 20 a 25 nm de diámetro identificados como ribosomas provenientes de la célula huésped (Dalton et al., 1968; Neuman et al., 2005). Hasta el momento no se ha determinado su funcionalidad, aunque estudios realizados con el virus Pichinde (Nuevo Mundo) sugieren que no serían necesarios para la propagación viral (Leung and Rawls, 1977).

El genoma se encuentra asociado a numerosas moléculas de la nucleoproteína viral (NP) conformando las nucleocápsides, que se asocian además a la ARN polimerasa viral (proteína L). Observadas al microscopio electrónico, las nucleocápsides tienen un aspecto de

“cadena de cuentas”, con longitudes que varían entre 450 y 1300 nm (Palmer et al., 1977; Vezza et al., 1977; Young and Howard, 1983).

Proteínas virales.

Nucleoproteína (NP).

La nucleoproteína o proteína NP es una proteína no glicosilada, cuyo peso molecular varía entre 60 y 68 kDa, según el arenavirus considerado, siendo en el caso de TCRV de 64 kDa (Gard, 1977; Vezza et al., 1977; Young and Howard, 1983). Esta proteína representa hasta un 60% de las proteínas totales de un arenavirus (Vezza et al., 1978; Vezza et al., 1977) y, como se menciona mas arriba, se asocia al ARN viral constituyendo el componente proteico mayoritario de las nucleocápsides. Además, se considera que posee los determinantes antigénicos específicos de grupo (Buchmeier et al., 1977; Buchmeier and Oldstone, 1978). La comparación de la secuencia de aminoácidos (aa) predicha de la proteína NP de TCRV con la correspondiente de JUNV muestra una identidad del 77%, en concordancia con la estrecha relación antigénica existente entre estos dos virus (Franze-Fernandez et al., 1987; Ghiringhelli et al., 1989).

NP se pliega en dos dominios principales (amino- y carboxilo-terminal), que poseen funciones diferenciales dadas por su participación en diversas interacciones proteína-proteína (Brunotte et al., 2011; D'Antuono et al., 2014; Hastie et al., 2011; Levingston Macleod et al., 2011; Qi et al., 2010; Zhang et al., 2013). En todos los arenavirus hasta ahora secuenciados, se ha encontrado un motivo conservado en la región C-terminal de NP que guarda similitud con el clásico motivo de unión al zinc (Parisi et al., 1996). La capacidad de la proteína de asociar zinc ha sido demostrada para LCMV (Salvato and Shimomaye, 1989) y JUNV (Tortorici et al., 2001b). Asimismo se ha determinado que tanto la integridad del motivo de unión a zinc como la oligomerización de NP es un requerimiento para el correcto ensamblado de las nucleocápsides (D'Antuono et al., 2014; Levingston Macleod et al., 2011). Para algunos

arenavirus, tales como TCRV y LCMV, se encontró que la proteína NP puede estar fosforilada (Bruns et al., 1986; Gimenez et al., 1983; Knopp et al., 2015).

Ademas de su rol estructural como parte de las nucleocápsides, la proteína NP cumple multiples funciones en el ciclo viral. Se ha demostrado que NP participa en el reclutamiento de las nucleocápsides en partículas infecciosas, a través de su interacción con la proteína Z (Casabona et al., 2009). Asimismo, varios estudios dan cuenta de la participación de NP en interacciones con proteínas celulares que resultan en el bloqueo de la inducción del Interferon de tipo I (IF I) (Martinez-Sobrido et al., 2007; Martinez-Sobrido et al., 2006; Pythoud et al., 2012) o que son relevantes para la morfogénesis viral (Shtanko et al., 2011). Otras funciones asignadas a NP incluyen su participación como un factor inhibidor de la apoptosis (Wolff et al., 2013). Además, se ha propuesto para NP un rol como antiterminador de la transcripción de los ARNm virales (Tortorici et al., 2001a). El desarrollo de sistemas de genética reversa para TCRV (Lopez et al., 2001) y LCMV (Lee et al., 2000), permitieron demostrar que NP junto con L son esenciales y suficientes para la síntesis de los ARNs virales y que ambas proteínas interactúan entre si (Jacamo et al., 2003), resultados que fueron luego corroborados para otros arenavirus (Hass et al., 2004; Iwasaki et al., 2015; Kerber et al., 2011). Mas recientemente, se ha propuesto que NP desempeña un papel en la traducción de los ARNm virales (Linero et al., 2013), que se discute en el Capitulo I.

Precursor de las glicoproteínas de envoltura (GPC).

Todos los miembros de la familia *Arenaviridae* poseen glicoproteínas de envoltura derivadas de un único precursor glicoproteico. Este precursor (GPC) tiene un peso molecular aparente de 70-80 kDa en su forma glicosilada y es detectado únicamente en las células infectadas. GPC es clivado intracelularmente para dar lugar a tres subunidades: el péptido señal SSP (que es miristilado en el residuo glicina en posición 2), la glicoproteína integral de membrana GP2, y la

glicoproteína periférica GP1. Estas subunidades permanecen unidas no covalentemente formando el complejo glicoproteico maduro GP. A su vez, GP forma trímeros que son transportados hacia la membrana plasmática, donde ocurre el ensamblado y brotación de los viriones (Burri et al., 2012).

El proceso de maduración de GPC ha sido objeto de múltiples estudios (Buchmeier and Parekh, 1987; Candurra and Damonte, 1997; Lenz et al., 2001; Wright et al., 1990). En particular, se ha demostrado para el virus Lassa que el clivaje del precursor GPC ocurre en el retículo endoplásmico (RE) o en el cis-Golgi y es llevado a cabo por una proteasa celular denominada subtilasa SKI-1/S1P que reconoce la secuencia RXL/I/V-L (Lenz et al., 2001). Esta proteasa está también involucrada en el procesamiento de GPC de los arenavirus sudamericanos Guanarito, Machupo y Junín (Rojek et al., 2008). El clivaje mediado por SKI-1/S1P es esencial para la infectividad de la progenie viral (Beyer et al., 2003; Kunz et al., 2003; Lenz et al., 2001).

Las primeras observaciones indicando que anticuerpos monoclonales contra la proteína GP1 de LCMV son más efectivos para neutralizar la infectividad que aquellos dirigidos contra la proteína GP2 (Buchmeier et al., 1981; Parekh and Buchmeier, 1986), sugirieron que GP1 estaría más expuesta que GP2 en las partículas virales. Experimentos posteriores en los que partículas virales de LCMV fueron tratados con Tritón X-114, permitieron corroborar que GP1 es una proteína periférica, que contiene los epitopes reconocidos por anticuerpos neutralizantes (Burns and Buchmeier, 1991). La unión inicial del virión a la superficie celular es mediada por interacción de GP1 con el receptor celular. Varios de los arenavirus del Viejo Mundo utilizan el α -dystroglycano como receptor (Cao et al., 1998; Spiropoulou et al., 2002), mientras que el grupo de virus patógenos sudamericanos usa el receptor de transferrina 1 (TfR1) de su huésped natural (Abraham et al., 2009; Radoshitzky et al., 2007). Sin embargo, se ha demostrado la participación de otros factores, tales como DC-SIGN y L-SIGN, en el proceso de ingreso de los arenavirus a la célula blanco (Martinez et al., 2013). La interacción de GP1 con el receptor conduce a la internalización del virión mediante vesículas

endocíticas. La acidificación del endosoma produce la disociación de GP1 y GP2, exponiendo en GP2 un péptido hidrofóbico que permite la fusión de la membrana endosomal con la envoltura viral (Burri et al., 2012; Di Simone et al., 1994; Nunberg and York, 2012).

ARN polimerasa dependiente de ARN (L).

La proteína L de todos los arenavirus posee motivos de secuencia conservados que también se encuentran conservados en todas las polimerasas ARN dependientes de virus y de eucariontes (Delarue et al., 1990; Poch et al., 1990). Ese análisis llevó tempranamente a proponer que la proteína L de los arenavirus tiene la función de ARN polimerasa ARN dependiente (RpRd). Mas tarde, utilizando los sistemas de genética reversa desarrollados para TCRV y LCMV se obtuvo la primera evidencia directa del papel esencial de la proteína L en la transcripción y la replicación del ARN viral (Cornu and de la Torre, 2001; Lopez et al., 2001).

L es una proteína que posee un PM cercano a los 250 kDa (Djavani et al., 1997; Iapalucci et al., 1989b; Salvato et al., 1989; Vieth et al., 2004; Zhang et al., 2001). Como se mencionó previamente, se ha demostrado que L interactúa con la Nucleoproteína (Jacamo et al., 2003). En este sentido, es interesante hacer notar que en el caso de otras familias de virus con genoma a ARN de cadena negativa, se han identificado proteínas virales o celulares asociadas a la RpRd viral que contribuyen, o son esenciales para que estos procesos ocurran (Holmes and Moyer, 2002; Qanungo et al., 2004). Por ejemplo, la proteína P de los virus a ARN negativo no segmentado tales como los Paramyxovirus y Rhabdovirus, entre otros, es un cofactor de la polimerasa y presenta también actividad chaperona sobre la Nucleoproteína N. Los arenavirus no poseen una contrapartida de la proteína P, por lo que podría pensarse que el papel de P en la síntesis y/o encapsidación del ARN viral podría ser desempeñado por la misma proteína L.

Como se indica mas arriba, la proteína L interviene en la transcripción de los ARN mensajeros (ARNm) virales. En este proceso utiliza como cebador oligonucleótidos con estructura Cap terminal,

presumiblemente adquiridos de ARNm celulares mediante un mecanismo de “secuestro del Cap” (Raju et al., 1990). Al respecto, es interesante notar que mediante cristalografía y ensayos funcionales pudo determinarse que los primeros 196 aminoácidos de la región amino-terminal de L constituyen un dominio con actividad endonucleasa, que estaría implicada en el secuestro de Cap (Morin et al., 2010). Además, la región C-terminal de L ha sido reportada como importante para la síntesis de los ARNm (Lehmann et al., 2014). En resumen, la proteína L es una proteína polifuncional, con participación en múltiples etapas durante la replicación, que complementarían su función como ARN polimerasa-ARN dependiente.

Proteína matriz Z.

La existencia de la proteína Z fue revelada al conocerse la secuencia completa del ARN L de los virus LCMV y TCRV (Iapalucci et al., 1989a; Salvato et al., 1989; Salvato and Shimomaye, 1989). El polipéptido de 10-11 kDa predicho a partir de la secuencia genómica, contiene una disposición particular de residuos cisteína e histidina que guardan una gran similitud con los motivos “zinc finger” descritos inicialmente por Miller y colaboradores (Miller et al., 1985). Posteriormente, pudieron detectarse ARNs subgenómicos que fueron asignados a ARNm de Z en células infectadas por LCMV (Salvato and Shimomaye, 1989) y TCRV (Iapalucci et al., 1991; Iapalucci et al., 1989a), y pudo visualizarse la proteína Z tanto en los viriones como en células infectadas por estos virus, además de demostrarse que la proteína Z se une al zinc (Salvato and Shimomaye, 1989).

El dominio de unión al zinc de la proteína Z ha sido caracterizado como un dominio RING (Borden et al., 1998a). Este dominio, denominado así por haber sido encontrado originalmente en el gen humano *ring 1*, ha sido detectado en un gran número de otras proteínas y cumple un papel asociado principalmente con interacciones proteína-proteína (Borden et al., 1998b; Freemont, 1993; Lovering et al., 1993; Saurin et al., 1996). De hecho, estudios realizados con la proteína Z del LCMV, demostraron que

ésta interactúa con diversas proteínas celulares tales como la proteína de la leucemia promielocítica (PML: promyelocytic leukemia protein) (Borden et al., 1998a), la proteína ribosomal P (Borden et al., 1998b) y el factor de iniciación eucariota eIF4E (Campbell Dwyer et al., 2000; Volpon et al., 2010). Aunque la relevancia funcional de esas interacciones no ha sido completamente definida, estudios bioquímicos han mostrado que la interacción de Z con eIF4E, mediada por su dominio RING, reduce 100 veces la afinidad de eIF4E por la estructura Cap. Además, los estudios han reportado que Z inhibe la traducción dependiente de eIF4E, sin afectar los niveles de expresión o la estabilidad del factor, sugiriendo para Z una función como potencial represor de la traducción de ARNm celulares especialmente sensibles al nivel de eIF4E (Kentsis et al., 2001; Kentsis et al., 2002; Volpon et al., 2010). Como en el caso de otras proteínas virales, Z exhibe polifuncionalidad. Por una parte, utilizando sistemas de genética reversa desarrollados para los virus TCRV, LCMV y LASV, se encontró que la proteína Z es un potente inhibidor de la transcripción y replicación viral (Cornu and de la Torre, 2001; Hass et al., 2004; Lopez et al., 2001), demostrándose que Z inhibe la actividad polimerasa por interacción directa con L (Jacamo et al., 2003; Wilda et al., 2008). Además, la proteína Z es un componente estructural de los viriones (Rossi et al., 1996; Salvato et al., 1992) y muestra propiedades características de las proteínas matriz de muchos virus envueltos de ARN negativo, incluyendo la capacidad de asociarse a la superficie interna de la membrana celular (Capul et al., 2007; Perez et al., 2003; Strecker et al., 2003). Como otras proteínas matriz, Z es la responsable de impulsar la brotación viral (Perez et al., 2003; Strecker et al., 2003). La demostración de que Z interactúa con la proteína NP tanto en los viriones (Salvato et al., 1992) como en el citoplasma de células que expresan ambas proteínas (Eichler et al., 2004), llevó inicialmente a postular un papel de Z en la morfogénesis viral. Estudios realizados en nuestro laboratorio, han demostrado que la interacción entre la proteína Z y NP es requerida para la incorporación de nucleocápsides y glicoproteínas a partículas virales (Casabona et al., 2009). El rol de NP en la formación de partículas infectivas ha sido reportado por otros grupos (Groseth et al., 2010;

Shtanko et al., 2010). Asimismo, existe evidencia que indica que la proteína Z de varios arenavirus contribuye al bloqueo de la inducción del Interferon de tipo I (IF I) en células infectadas (Fan et al., 2010; Xing et al., 2015a; Xing et al., 2015b).

Mecanismo de replicación.

El ciclo viral comienza con la interacción del virus con la superficie celular y la entrada del virión a la célula blanco por endocitosis mediada por GP. Se ha demostrado que la entrada de JUNV involucra la formación de vesículas recubiertas de clatrina y requiere de la integridad del citoesqueleto celular (Martinez et al., 2007, 2008), mientras que el virus Lassa utiliza una vía inusual, independiente de clatrina, caveolina, dinamina, y actina; y que involucra factores del complejo endosomal requerido para el transporte, ESCR (Pasqual et al., 2011; Rojek et al., 2008). Luego de la fusión de la membrana endosomal con la envoltura viral y la subsecuente liberación de las nucleocápsides al citoplasma (Di Simone et al., 1994; York et al., 2005; York and Nunberg, 2006), tiene lugar la transcripción y replicación del ARN viral (Figura I4). Si bien la región 5' de los segmentos S y L de los arenavirus contiene un ORF en sentido positivo, los ARNs genómicos no funcionan como mensajero. Asociados a la proteína NP, los ARN genómicos forman las nucleocápsides que funcionan como molde para la replicación viral. Ésta es una propiedad fundamental que los arenavirus comparten con los virus de cadena negativa. En dicho proceso, en primer lugar, los ARN genómicos sirven de molde para la síntesis de los ARN mensajeros (ARNm) subgenómicos de las proteínas NP y L, a partir del extremo 3' del respectivo segmento genómico (transcripción primaria). Posteriormente, la polimerasa L sintetiza ARNs complementarios a los ARN genómicos S y L de longitud completa, llamados ARN antígenómicos S y L, respectivamente. Los ARN antígenómicos se asocian a su vez a la proteína NP, formando nucleocápsides que son utilizadas como molde para sintetizar los ARNm

de GPC y Z y, además, para la síntesis *de novo* de los dos segmentos genómicos (Franze-Fernández et al., 1993; Kolakofsky and Garcin, 1993).

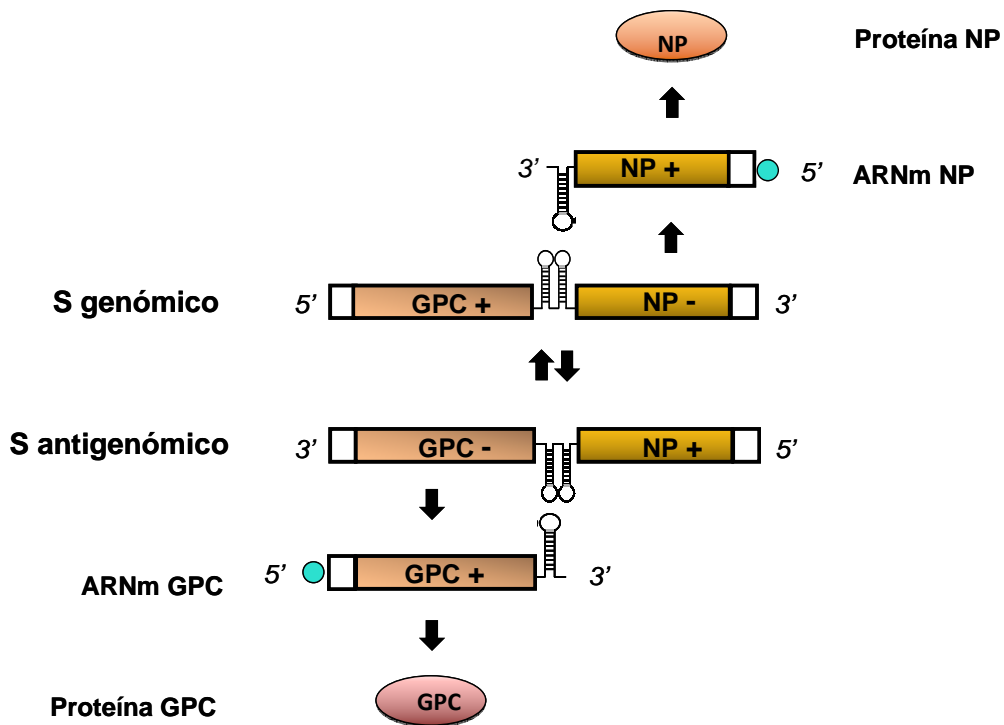


Figura 14. Representación esquemática del mecanismo de replicación propuesto para los arnavirus. Para mayor claridad, se muestra únicamente el segmento S. La replicación del segmento L ocurre mediante el mismo mecanismo. El sentido de codificación de los ORF, representados con las cajas de colores, está indicado por signos. Los cuadrados blancos indican las regiones no codificantes 5' y 3' terminales. Las estructuras secundarias predichas de la RIG y de la región 3' no codificante del ARNm se representan por dibujos del tipo tallo-bucle. Los círculos verdes indican la estructura 5' Cap en los ARNm. Las flechas negras indican la dirección de la síntesis del ARN o de la proteína. Las proteínas virales se representan con óvalos.

Los extremos 5' de los genomas y antigenomas contienen un residuo G adicional que no posee correlato en el ARN templado. Este hallazgo, así como evidencia experimental obtenida *in vitro*, llevó a postular un mecanismo novedoso para la iniciación de la replicación de los arnavirus, denominado "*prime and realign*". El proceso comienza cuando la polimerasa L inicia la replicación en una posición interna sobre la región 3' terminal, generando un oligonucleótido pppGpC. El complejo L-ARN luego se realinea con el nucleótido terminal para continuar con la síntesis del ARN de cadena completa (Garcin and Kolakofsky, 1990, 1992; Kolakofsky and Garcin, 1993).

El modo en que la polimerasa viral realiza el cambio de la transcripción primaria a la replicación no ha sido esclarecido. El análisis de ARN extraído de células infectadas por TCRV, mediante Northern blot utilizando sondas específicas para el ARN S, demostró que la síntesis del ARNm de NP tiene lugar en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas, mientras que tanto la síntesis del ARN S antigenómico como la del ARNm de la GPC, requieren de la síntesis proteica para llevarse a cabo, sugiriendo la necesidad de la síntesis de NP para la replicación (Franze-Fernandez et al., 1987). Sin embargo, aunque ambos procesos, transcripción y replicación, son estrictamente dependientes de la presencia de NP, el aumento de los niveles de expresión de NP no favorece selectivamente la primera, por lo que aun no hay evidencia experimental para sostener la participación de NP en el balance entre dichos procesos (Pinschewer et al., 2003).

Estructura de los ARN mensajeros de arenavirus.

El producto de la transcripción de los ARN S y L son los 4 ARNm subgenómicos a partir de los cuales son traducidas las proteínas virales. Estos ARNm presentan la estructura 7-metil-guanosina Cap en el extremo 5' (Figura 14), como lo demuestra el hecho de que los ARNm virales inmunoprecipitan con anticuerpos contra Cap (Kolakofsky and Garcin, 1993; Meyer and Southern, 1993). En dirección 5'>3', la estructura Cap es seguida por unos pocos (3 a 7) nucleótidos sin contraparte en el templado. Tal como se menciona mas arriba, tanto la estructura Cap, como estos nucleótidos adicionales, serian adquiridos de ARNm celulares mediante un mecanismo de "secuestro del Cap", similar al utilizado por el virus de Influenza (Bouloy et al., 1978) y los bunyavirus (Bishop et al., 1983; Jin and Elliott, 1993; Kolakofsky and Garcin, 1993; Kolakofsky and Hacker, 1991; Patterson and Kolakofsky, 1984). Aunque los detalles son desconocidos en el caso de los arenavirus, se postula que la actividad endonucleolítica asociada a la polimerasa L probablemente juegue un rol en ese proceso (Morin et al., 2010). Ubicada

entre estos residuos adicionales y el codón de iniciación de la traducción, existe una región no traducible (5'UTR), cuya secuencia es complementaria a la región 3' no codificante del ARN templado.

Los ARNm de arenavirus presentan además una región 3' no codificante (3'UTR) que carece de la cola de poli-Adenosinas (poliA) característica de la mayoría de los ARNm celulares. Resultados obtenidos en el laboratorio demostraron que el extremo 3' de los cuatro ARNm de TCRV mapea dentro de la RIG del correspondiente segmento genómico. Esto sugirió tempranamente que las regiones intergénicas contienen las señales de terminación de la transcripción de los ARNm virales (Iapalucci et al., 1991). Asimismo, en base al hallazgo que en la región 3' de los cuatro ARNm se predice la formación de una estructura de tipo "*hairpin*", se sugirió que dicha estructura secundaria y no secuencias específicas del templado funcionaría como la señal de terminación para la RpRd de TCRV (Franze-Fernández et al., 1993). Mapeos posteriores del extremo 3' de ARNm derivados del ARN S de LCMV y JUNV (Meyer and Southern, 1993; Tortorici et al., 2001a) fueron consistentes con aquellos resultados, sugiriendo un esquema general para la terminación de la transcripción entre los arenavirus. Mediante la utilización de un sistema de genética reversa para el TCRV nuestro laboratorio mostró que la terminación de la transcripción correlaciona con la predicción de una estructura consistente en un único *hairpin* estabilizado por una alta energía libre en 3'UTR del ARNm (Lopez and Franze-Fernandez, 2007). Aunque se ha postulado además que la estructura *hairpin* podría tener un rol en la traducción de los ARNm virales (Pinschewer et al., 2005), al inicio de este trabajo de Tesis no se disponía de estudios previos que hubieran evaluado directamente esa hipótesis.

Traducción de ARN mensajeros eucariotas.

La gran mayoría de los ARNm de células eucariotas poseen estructura Cap en el extremo 5' y una cola de poli-Adenosinas (poliA) en su extremo 3', que puede tener hasta varios cientos de nucleótidos de longitud. El proceso de traducción de estos ARNm puede subdividirse en las etapas de iniciación, elongación y terminación, cada una de las cuales involucra la participación de factores celulares específicos. Gran parte de la regulación de la traducción recae en la etapa de iniciación, la cual implica el reclutamiento del ribosoma en el ARNm. Juegan un papel crítico en dicha etapa el complejo de iniciación eIF4F y la proteína de unión a poliA (PABP) (Jackson et al., 2010; Sonenberg and Hinnebusch, 2009). El complejo de iniciación eIF4F reconoce la estructura Cap en el extremo 5' del ARNm. Este complejo consiste en los factores eIF4E (proteína de unión al Cap), eIF4G (proteína adaptadora que une eIF4E, eIF4A y eIF3) y la DEAD-box ARN helicasa eIF4A que funciona asociada al co-factor eIF4B. El factor eIF4E puede ser fosforilado por una quinasa asociada a eIF4G, Mnk. Los factores del complejo eIF4F desenrollan cooperativamente la región 5' no traducible del ARNm (proximal al Cap), permitiendo la unión del complejo de preiniciación 43S. Este último está constituido por la subunidad ribosomal 40S, un complejo ternario (constituido por el factor eIF2, el ARN de transferencia iniciador Met-ARNt y GTP) y los factores eIF3, eIF1 y eIF1A, y eIF5. La unión del complejo 43S da lugar a la formación del complejo 48S. La proteína PABP se une a la región no codificante 3' del ARNm, y su interacción con el factor eIF4G (como parte de eIF4F) permite que los ARNm adopten una topología de "círculo cerrado" por acercamiento de los extremos 5' y 3'. En el caso de los ARNm carentes de poliA, la secuencia 3'UTR es esencial para la traducción. Por ejemplo, se ha demostrado que los ARNm de histonas de animales, además de poseer estructura Cap en 5', presentan una estructura *hairpin* altamente conservada en lugar de la cola de poliA en el extremo 3'. Este *hairpin* interactúa con proteínas Stem Loop Binding Proteins (SLBP) que facilitan la circularización del ARNm y su eficiente traducción (Ling et al., 2002; Marzluff, 2005; Marzluff et al., 2008).

El complejo 48S escanea el ARNm hasta localizar el codón de iniciación AUG (Figura I5), cuyo reconocimiento es facilitado por los factores eIF3, eIF1 y 1A. La unión de la subunidad ribosomal 60S es seguida por la liberación de los factores de iniciación, lo cual requiere de la participación de eIF5B. Luego del reconocimiento del codón AUG y de la formación del complejo 80S, comienza la etapa de elongación de la traducción (Jackson et al., 2010). El complejo 80S decodifica la secuencia del ARNm y media la adición de aminoácidos para elongar la cadena polipeptídica naciente, con la contribución de los factores eucariotas de elongación eEF1 (compuesto por eEF1A y eEF1B) y eEF2 (Groppo and Richter, 2009; Kapp and Lorsch, 2004). La elongación del polipéptido continúa hasta que un codón de terminación desencadena la etapa de terminación de la traducción. Este proceso es mediado por los factores eRF1 y eRF3, que facilitan el reconocimiento del codón de terminación y la liberación del péptido, respectivamente (Jackson et al., 2012).

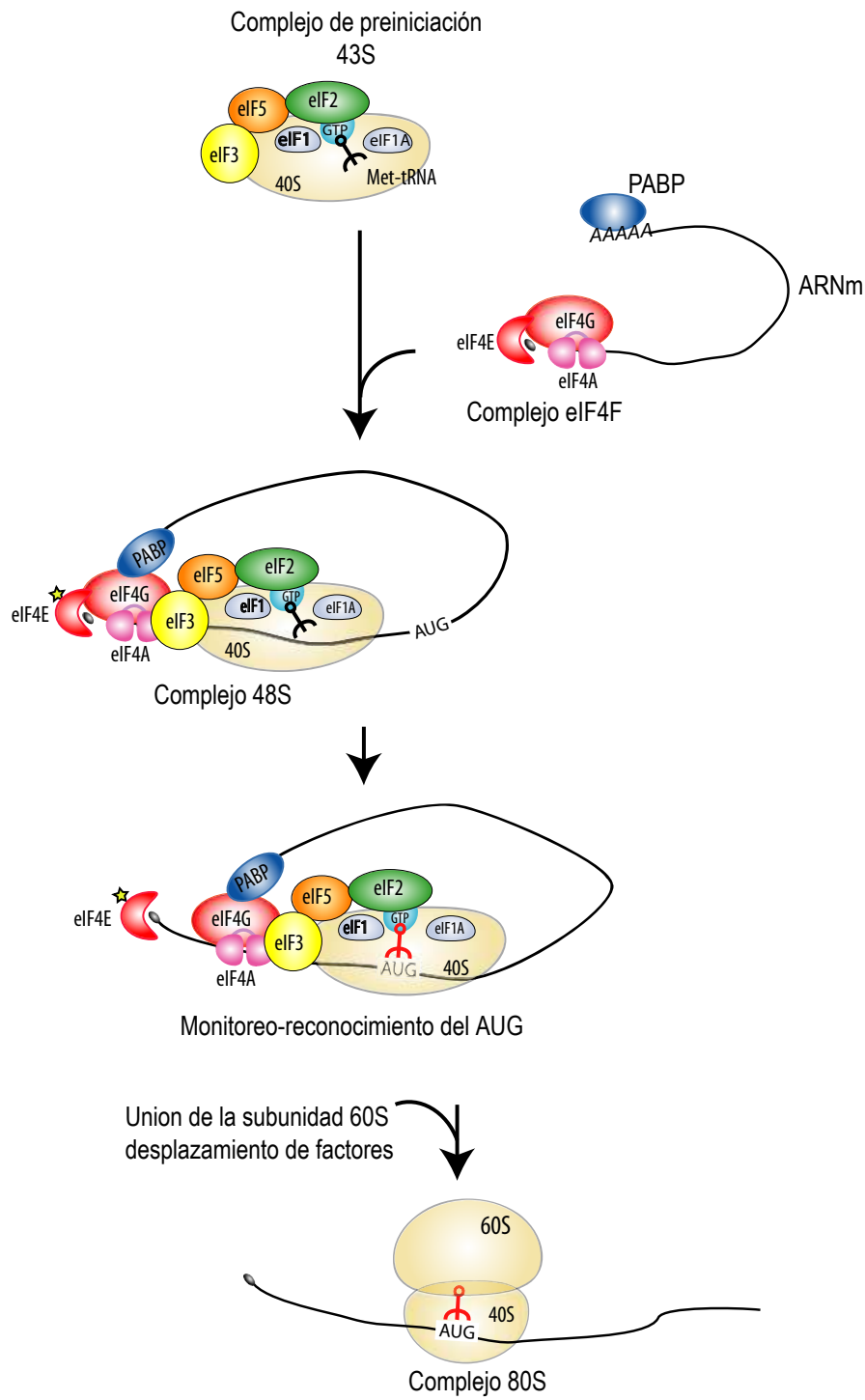


Figura 15. Etapa de iniciación de la traducción de ARN mensajeros eucariotas. El proceso es precedido por la formación del complejo de preiniciación 43S, mediante el ensamblado del ARNt iniciador (Met-ARNt), eIF2, una molécula de GTP y la subunidad 40S ribosomal, así como los factores eIF1, 1A, 3 y 5. La asociación del ARNm a eIF4F y a PABP permite que el ARNm adopte la conformación circular. En ese punto, se constituye el complejo 48S y se inicia el monitoreo de la secuencia 5'UTR que progresa hasta que el codón de iniciación AUG es detectado. Finalmente, la subunidad ribosomal 60S es reclutada y los factores de iniciación desplazados, para formar el complejo ribosomal 80S. Adaptado de (Mohr and Sonenberg, 2012).

Los factores que influyen en la eficiencia de traducción en eucariotas comprenden la longitud y complejidad estructural de las regiones 5' y 3' no traducibles, así como con la posición y el contexto del codón de iniciación AUG, la estabilidad y accesibilidad de la estructura Cap para el complejo de unión a Cap, y la presencia de codones AUG alternativos (Gale et al., 2000). En lo referente a la longitud y complejidad de la estructura secundaria de la secuencia 5'UTR, se ha observado que, mientras estructuras con $\Delta G = -30$ kcal/mol ubicadas en forma distal al extremo 5' dificultan pero no impiden la iniciación, otras estructuras más estables ($\Delta G = -60$ kcal/mol) la anulan. Además, se ha demostrado una estimulación de la traducción relacionada con el aumento de longitud de la secuencia 5' no codificante de 20 a 80 nts (Kozak, 1991).

Traducción de ARN mensajeros virales.

Los virus usan la maquinaria celular de síntesis de proteínas valiéndose de diversas estrategias, para asegurar que sus propios mensajeros sean traducidos a pesar de la competencia representada por los ARNm celulares. Por ejemplo, muchos virus, entre ellos Influenza y hantavirus poseen estructura Cap en sus ARNm. Sin embargo, la traducción de esos ARNm presenta baja dependencia de eIF4E y es estimulada por proteínas virales (Burgui et al., 2007; Guerrero et al., 2015; Mir and Panganiban, 2008, 2010; Walsh and Mohr, 2011; Yanguéz and Nieto, 2011; Yanguéz et al., 2012). Otros virus con genoma a ARN de polaridad negativa utilizan secuencias específicas en las regiones 5'UTR y/o 3'UTR para la eficiente traducción de sus ARNm (Blakqori et al., 2009; Geerts-Dimitriadou et al., 2012).

En relación a los arenavirus, la información disponible acerca del mecanismo de traducción de sus ARNm es escasa. Por un lado, un estudio reciente ha mostrado que la multiplicación de JUNV en células en cultivo no se ve afectada luego del silenciamiento del factor eIF4E y que en las células infectadas NP no colocaliza con eIF4E. Dichos estudios han reportado además que NP inmunoprecipita con 7-metil-guanosina (Cap), pero no con eIF4E. Resultados similares fueron obtenidos para TCRV,

proponiéndose que ambos virus prescindan de eIF4E para su multiplicación a través del reemplazo de dicho factor por la proteína NP para la traducción de los ARNm virales (Linero et al., 2013).

Respecto a las señales que actúan para regular la traducción de los ARNm de arenavirus, no existen estudios anteriores a este trabajo de Tesis que hayan caracterizado las secuencias 5' y 3' UTR involucradas en dicho proceso. Las primeras evidencias indirectas disponibles que sugerían un posible papel de la región intergénica (RIG) en la traducción de los genes virales surgen de trabajos donde se analizó la expresión de genes reporteros en sistemas minireplicon (Bergeron et al., 2012; Pinschewer et al., 2005). En uno de esos trabajos, los investigadores reemplazaron el ORF GPC con el gen reportero *Cypridina* luciferasa (CLuc) en el segmento S y el ORF Z en el segmento L con el gen *Gaussia* luciferasa (GLuc). Luego, compararon los niveles de expresión de CLuc y GLuc en células de mamífero que expresaban ya sea el replicón S junto con el replicón L salvaje, o S con un mutante de L que porta una delección en la RIG. Los resultados indicaron que la mutación en la RIG de L modificó los niveles de expresión de GLuc (L) pero no los de CLuc (S), sugiriendo un defecto en transcripción y/o traducción del ARNm GLuc (Bergeron et al., 2012). Mas recientemente, mediante un enfoque similar, se utilizó un sistema minireplicon basado en ARN sintéticos similares al segmento S o al segmento L de LCMV, en los que los genes virales fueron sustituidos por dos genes reporteros diferentes. Empleando diferentes combinaciones de minigenoma/RIG, así como intercambiando la ubicación de los genes reporteros en un dado minigenoma, se observó que las secuencias RIG entre ambos segmentos influyen en el nivel de expresión de los genes reporteros (Iwasaki et al., 2015).

Rescate de virus a partir de ADN copia.

El estudio de los virus con genoma a ARN mediante mutagénesis dirigida se apoya en la posibilidad de obtener virus infeccioso a partir de la copia ADN del ARN genómico. Este desafío fue logrado tempranamente para virus con genoma a ARN positivo, tales como el bacteriófago Q β y poliovirus, cuyo genoma funciona como ARNm y es infeccioso cuando es introducido en células susceptibles (Racaniello and Baltimore, 1981; Taniguchi et al., 1978). Esta metodología, basada en la transfección de ARN genómico sintetizado *in vitro* a partir de clones de ADNc, ha sido utilizada intensivamente en estudios sobre diversos virus a ARN positivo (Enjuanes et al., 2005; Filomatori et al., 2006; Kummerer et al., 2012; Rieder et al., 2005).

El desarrollo de sistemas análogos para los virus con genoma a ARN negativo ha demostrado ser mas dificultoso, debido a que su ARN genómico no es utilizado como ARNm ni es infeccioso. Por el contrario, la iniciación de la replicación requiere la síntesis *de novo* de proteínas virales, mediada por la ARN polimerasa viral, y además, los ARN genómico y antígenómico deben ser encapsidados por la Nucleoproteína viral para ser reconocidos como templados para la transcripción y replicación.

El primer sistema desarrollado para un virus a ARN negativo consistió precisamente en la reconstitución *in vitro* de nucleocápsides del virus Influenza (cuyo genoma consiste en 8 segmentos de ARN), que fueron transfectadas en células preinfectadas con el virus. Las nucleocápsides fueron replicadas, y los virus reasortantes pudieron ser recuperados luego de una selección adecuada (Enami et al., 1990; Garcia-Sastre and Palese, 1993; Luytjes et al., 1989). Si bien este sistema resultó útil para los estudios sobre virus Influenza, no pudo ser aplicado a los virus con genoma a ARN no segmentado de polaridad negativa, debido al tamaño de sus ARN genómicos (11-18 kb) que no permite el ensamblado de nucleocápsides virales *in vitro*. El rescate de virus a ARN negativo no segmentado mediante genética reversa pudo ser conseguido en el año

1994 para el virus de la rabia (Schnell et al., 1994). Los autores encontraron que la expresión intracelular del ARN antigénico junto con la polimerasa y Nucleoproteína virales permitieron el rescate de virus infeccioso. Mas tarde, mediante esa estrategia, que parte del ARN de polaridad positiva (antigenoma), fue posible también rescatar virus respiratorio sincicial (Collins et al., 1995), virus de la estomatitis vesicular (Lawson et al., 1995; Whelan et al., 1995), Sendai (Garcin et al., 1995), sarampión (Radecke et al., 1995; Takeda et al., 2000), virus de Newcastle (Ayllon et al., 2013) y Marburg (Albarino et al., 2013), entre otros.

En 1996, Bridgen y colaboradores desarrollaron el primer sistema para un virus segmentado, el virus Bunyamwera (familia *Bunyaviridae*) (Bridgen and Elliott, 1996). El sistema es similar al desarrollado para el virus de la rabia, pues se basa en la síntesis intracelular de los 3 segmentos de ARN viral complementarios (antigenomas) junto con las proteínas virales N y L a partir de construcciones de ADNc. El desarrollo de un clon infeccioso para otros virus de las familia *Bunyaviridae* tuvo lugar muchos años después (Billecocq et al., 2008; Bird et al., 2008; Bird et al., 2007; Blakqori and Weber, 2005; Gerrard et al., 2007; Habjan et al., 2008; Ikegami et al., 2006; Lowen et al., 2004; Ogawa et al., 2007). En particular, el caso del nairovirus CCHFV (Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus) demostró mayor dificultad, ya que el sistema solo pudo ser establecido en el año 2015, mediante el empleo de optimización de codón para la polimerasa viral (Bergeron et al., 2015).

La estrategia utilizada inicialmente para el virus de la rabia fue luego desafiada, demostrándose la factibilidad del rescate de diversos virus recombinantes, entre ellos LCMV, a partir la síntesis intracelular del ARN genómico (de polaridad negativa) luego de la transfección de plásmidos (Emonet et al., 2011; Neumann and Kawaoka, 2004), Mas aún, evidencia experimental obtenida por diferentes laboratorios llevó a cuestionar el supuesto de que la generación de virus a ARN negativo biológicamente activos a partir de ADNc, requiere de la complementación del ARN viral con las proteínas que forman el complejo polimerasa (NP y L) (Blakqori and Weber, 2005; Lowen et al., 2004). En efecto, estos trabajos demostraron la formación de virus infeccioso a partir de la

síntesis intracelular de los segmentos de ARN viral-complementarios (antigenomas), en ausencia de la complementación con NP y L. Se piensa que, en el contexto celular, los ARN antigenómicos generan una cantidad basal de las proteínas virales, suficiente para iniciar la transcripción/replicación del ARN, que provee NP y L adicional. Un enfoque similar ha permitido el rescate de los arenavirus Junín, Pichinde, y Lassa (Albarino et al., 2009; Albarino et al., 2011; Lan et al., 2009).

La generación de virus recombinante mediante técnicas de genética reversa es sin duda un recurso muy valioso que permite no sólo el desarrollo de vacunas recombinantes con modificaciones específicas controladas y predeterminadas, sino también la realización de estudios mecanísticos en el contexto de la infección viral, que permiten responder a cuestiones fundamentales acerca de, entre otras, la patogénesis de las infecciones virales (Cheng et al., 2015; Flatz et al., 2010; Schickli et al., 2001). En suma, el desarrollo de sistemas de rescate de virus recombinantes a partir de ADNc ha contribuído enormemente a la comprensión de la biología de los virus a nivel molecular.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue caracterizar los elementos involucrados en la regulación de la traducción de los ARNm de arenavirus utilizando al virus Tacaribe como modelo de estudio.

Específicamente, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- **Poner a punto la metodología necesaria y comenzar con el análisis del rol de las secuencias no codificantes 5' y 3' de los ARNm virales en su traducción.**
- **Evaluar la implicancia de proteínas virales relevantes y de los factores celulares eIF4E y eIF4G en dicho proceso.**
- **Por otro lado, para futuros estudios de éste y otros procesos virales en un contexto de infección, este trabajo de Tesis tuvo como objetivo generar las herramientas necesarias que permitan la obtención de TCRV infectivo a partir de de ADN copia.**

MATERIALES y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas.

Escherichia coli cepa DH5 α F': (endA1, hsdR17 (rk-,mk+), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, Δ lacU169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) [F']) (Hanahan, 1983). Estas células fueron utilizadas para obtener ADN plasmídico de las construcciones descritas en el Capítulo I.

SURE (Stop Unwanted Rearrangement Events): Esta cepa (provista por Stratagene (CA, USA)) es deficiente en componentes de la vía que cataliza el rearreglo y delección de estructuras secundarias y terciarias que impiden el clonado de ciertos genes en cepas convencionales. Específicamente, estas células son deficientes en restricción (McrA-, McrCB-, McrF-, Mrr-, HsdR-), endonucleasa (endA), y recombinación (recB recJ). La cepa SURE fue utilizada para la preparación de ADN plasmídico de las construcciones descritas en el Capítulo II.

Escherichia coli cepa GM 119 (rm - , dam - , dcm -): Esta cepa fue utilizada para preparación de ADN plasmídico de las construcciones que requerían corte con enzimas de restricción sensibles a metilación, tales como Stul y BclI.

2. Células.

Se utilizaron las siguientes líneas celulares:

-BHK-21 clon 13, fibroblastos de riñón de hámster lactante, *Mesocricetus auratus* (Macpherson and Stoker, 1962).

-Vero clon 76, fibroblastos de riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops* (Yasumura and Kawakita, 1963).

-HEK-293T, línea derivada de HEK-293, células de riñón embrionario humano (Graham et al., 1977).

Estas tres líneas celulares fueron provistas por American Type Cell Culture, USA.

-BSR, derivadas de BHK-21 (Buchholz et al., 1999), gentilmente cedidas por el Dr. C. Conzelman (Department of Clinical Virology, Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals, Munich, Alemania).

-BHK/T7-9 (Ito et al., 2003). Estas células expresan la ARN polimerasa del fago T7 (T7ARNPol) en forma estable. Fueron provistas por Naoto Ito (Gifu, Japón).

Los medios de cultivo y suplementos usados para el mantenimiento de las líneas celulares se detallan en la Tabla M1.

Tabla M1. Líneas celulares y medios de mantenimiento.

Nombre de la línea	Medio de mantenimiento*
BHK-21 (Clon 13)	Glasgow Minimun Essencial Medium (GMEM), suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 0.1 mM Aminoácidos no Esenciales, 5 mM HEPES.
Vero (Clon 76)	Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM), 10% SFB, 5 mM HEPES.
BSR	Glasgow Minimun Essencial Medium (GMEM), 5% SFB.
BHK/T7-9	Glasgow Minimun Essencial Medium (GMEM), 10% SFB.
HEK-293T	Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM), 10% SFB, 0.1 mM Aminoácidos no Esenciales, 1 mM Piruvato Sódico.

* Todos los medios de mantenimiento fueron además suplementados con L-Glutamina (2 mM) y con una mezcla de antibióticos (Penicilina (100 UI/ml) y Estreptomina (100 µg/ml)).

Las células fueron mantenidas mediante pasajes sucesivos en botellas descartables de 25 cm² (Falcon), a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. En el caso de las células BHK/T7-9, el medio de cultivo fue adicionado con el antibiótico Hygromicina (600 µg/mL) cada 3 pasajes sin tratamiento, para mantener la presión de selección de las células que expresan la T7ARNPol.

3. Virus.

El virus Tacaribe (TCRV) (cepa TRVLII573 de C.T. Pfau, Rensselaer Polytechnical Institute, Troy, N.Y. U.S.A.), fue originalmente provisto por la Dra. M. Weissenbacher (Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires). La amplificación de TCRV fue realizada en células BHK-21,

siguiendo los procedimientos descritos en trabajos previos del grupo (López y Franze-Fernández, 1985). La titulación viral fue llevada a cabo por el método de placas, en células Vero cultivadas bajo medio sólido, según la técnica descrita por Mifune y colaboradores (Mifune et al., 1971).

4. Sueros y anticuerpos monoclonales.

El suero α -NP es un suero de conejo dirigido contra la proteína NP del virus Tacaribe, que fue previamente obtenido en el laboratorio (Lopez et al., 2000). El suero α -actina es un policlonal de conejo que reconoce la proteína celular actina, y fue provisto por Sigma Chemical Company. Los sueros de conejo α -4E y α -4G reconocen respectivamente a los factores celulares de iniciación de la traducción eIF4E y eIF4G, y fueron provistos por Cell Signalling. El antisuero α -conejo, conjugado con peroxidasa de rabanita, fue suministrado por Jackson Immuno Research®.

5. Plásmidos.

- **Plásmidos que expresan las proteínas virales: pTCRV-N y pTCRV-L.**

Los plásmidos pTCRV-N y pTCRV-L, utilizados en este trabajo de Tesis para la expresión de las proteínas NP y L de TCRV respectivamente, fueron generados previamente en el laboratorio (Casabona et al., 2009; D'Antuono et al., 2014). El marco abierto de lectura (ORF, Open Reading Frame) correspondiente a cada proteína se encuentra clonado bajo el control del promotor de la T7ARNPol en el vector pTM1 (Moss et al., 1990) (ver Figura M1).

- Plásmido pCA-T7.

Este plásmido expresa la enzima T7ARNPol bajo el control del promotor de actina de pollo (Niwa et al., 1991) y fue utilizado para la expresión de la proteína viral NP. Fue provisto por Ian Wickersham, MIT, The Salk Institute for Biological Studies, EEUU (Addgene plasmid # 59926).

6. Construcciones plasmídicas.

En esta sección se describen los plásmidos construidos para este trabajo de Tesis.

- Plásmido pTM1-Renilla.

Este plásmido fue utilizado para la generación de un ARN mensajero (ARNm) sintético, que expresa la enzima luciferasa de *Renilla reniformis* (REN). Para su construcción, un fragmento de ADN conteniendo la secuencia codificante de la enzima fue sintetizado mediante PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando los oligonucleótidos FW NcoI-Ren (que incluye el sitio de restricción NcoI) y RV Ren Sma (incluye el sitio de restricción SmaI) (Tabla M2), así como el plásmido pGL4.70hRLuc (Promega) como templado. El producto de reacción fue digerido con las enzimas NcoI y SmaI, y el fragmento correspondiente al ORF REN fue purificado e insertado bajo el control del promotor de la T7ARNPol entre los sitios de restricción NcoI y SmaI del vector pTM1 (Moss et al., 1990). En el plásmido recombinante, la secuencia codificante de interés (en este caso, REN) queda ubicada río abajo del Sitio Interno de Entrada de Ribosomas (IRES) del virus de la Encefalomiocarditis (EMCV) que provee el vector. Esto permite que los ARNm transcritos por la T7ARNPol sean traducidos eficientemente en ausencia de estructura 7-metil guanosina (Cap) en el extremo 5' (Elroy-Stein et al., 1989).

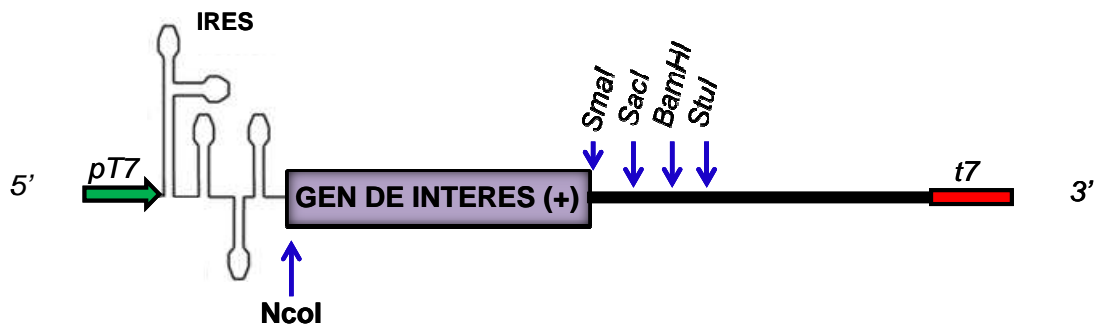


Figura M1. Representación esquemática (no a escala) de los plásmidos pTM1 Renilla, pTCRV-N y pTCRV-L. La flecha verde indica la posición del promotor de la T7ARNPol (pT7). Se indica la posición del Sitio Interno de Entrada de Ribosomas (IRES) de EMCV. La caja violeta indica la posición y sentido de la secuencia codificante para la proteína de interés. La caja roja indica la posición del terminador de la T7ARNPol (t7) provisto por el vector pTM1. Las flechas azules señalan sitios de restricción del vector.

- Plásmido pPol I-MG/FLUC.

El plásmido pPol I-MG/FLUC (Figura M2) expresa un minigenoma análogo al ARN S de TCRV que contiene (de 5' a 3'): la región 5' no codificante (5'NC) completa del ARN S genómico, seguida por 171 nucleótidos (nts.) de una secuencia espaciadora, luego la región intergénica (RIG) del ARN S, la secuencia codificante para la enzima luciferasa de *Photinus pyralis* (de aquí en adelante FLUC), en sentido negativo y la región 3' no codificante (3'NC) completa del ARN S genómico. El plásmido fue generado mediante la sustitución de la secuencia codificante del gen de la enzima bacteriana Cloramfenicol Acetil Transferasa (CAT) por el ORF FLUC en el plásmido pS-CAT (Casabona et al., 2009). Para esto, un fragmento de ADN conteniendo la secuencia codificante para FLUC fue obtenido mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos FW LUC (con sitio de restricción BsaAI) y RV LUC (con sitio de restricción SacI) (Tabla M2) y el vector pGL4.10[luc2] (Promega) como templado. El producto de la reacción fue digerido con las enzimas BsaAI y SacI, y el fragmento de interés fue purificado en gel de

agarosa e insertado entre los sitios BsaAI y SacI del plásmido pS-CAT, siguiendo protocolos clásicos de clonado (Sambrook, 2001). En el minigenoma, el ORF FLUC se encuentra ubicado en la misma posición y orientación que presenta el ORF NP en el ARN S.



Figura M2. Representación esquemática del plásmido pPol I-MG/FLUC (no a escala). Se indica la posición de las regiones no codificantes 5' (5'NC), 3' (3'NC) e intergénica (RIG) del ARN S de TCRV. En gris se grafica la secuencia espaciadora. La posición de la secuencia del gen de la enzima FLUC (en sentido negativo) se indica con la caja verde. Se indican las posiciones del promotor (pPoll) y del terminador (tPoll) de la ARN polimerasa I murina, provistos por el vector pRF42 (Flick and Pettersson, 2001).

- Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'wt.

El plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'wt contiene la información necesaria para la síntesis *in vitro* de un ARNm análogo al ARNm de la nucleoproteína de TCRV. Para su construcción, el plásmido pPol I-MG/FLUC fue utilizado como templado en una reacción de PCR, en la que se emplearon los oligonucleótidos Fw T7-5' mRNA y Rev IGR-3' mRNA (Tabla M2). El cebador sentido Fw T7-5' mRNA contiene la secuencia del promotor T7 seguido de 5 nucleótidos no virales, elegidos al azar, y de los primeros 18 residuos de la región 5'NC del ARN S antigenómico de TCRV. El oligonucleótido reverso corresponde a la secuencia ubicada entre las posiciones 1519 a 1539 del ARN S de TCRV, que comprende 19 nucleótidos (nts.) de la RIG. El fragmento de ADN obtenido contiene el promotor de la T7ARNPol seguido, en dirección 5' a 3', de 5 nucleótidos no virales, de la secuencia 5' no codificante del segmento antigenómico S de TCRV, luego la secuencia codificante para FLUC y finalmente la región intergénica completa del segmento antigenómico S de TCRV (Figura M3). El producto de PCR fue fosforilado mediante el tratamiento con la enzima T4 quinasa, según indicaciones del fabricante (Promega), y luego fue insertado en el sitio PVUII del vector pAT153/PVUII/8 (Anson et al., 1984).

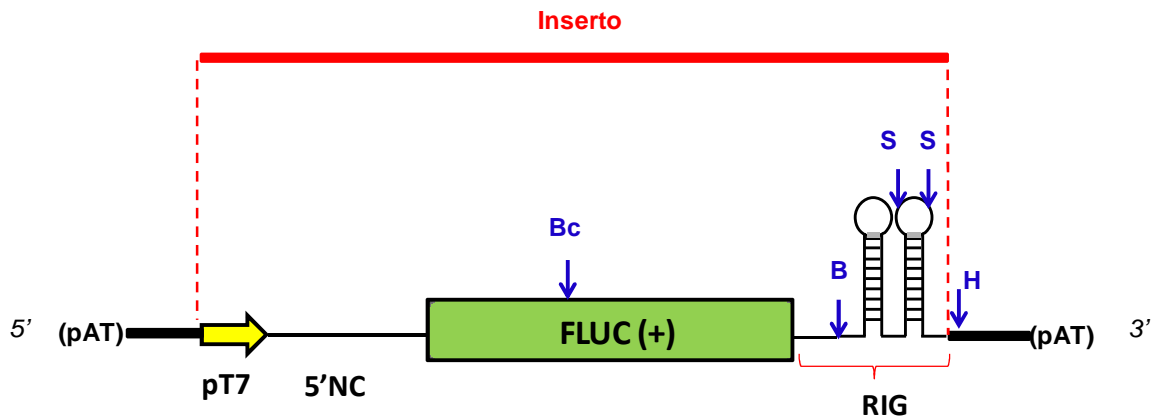


Figura M3. Esquema del plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'wt. Se señala el inserto clonado en pAT153/PVUII/8. La flecha amarilla indica la posición del promotor de la ARN polimerasa del fago T7 (pT7). Se señalan la región 5' no codificante del segmento antigenómico S (5'NC) y la región intergénica del ARN S antigenómico (RIG). La secuencia codificante para FLUC se representa con la caja verde. Las flechas verticales indican la posición de los sitios de restricción utilizados en este trabajo: BclI (Bc), BsaAI (B), SmaI (S), HindIII (H).

Cabe señalar que tanto el plásmido pPol I-MG/FLUC como el plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'wt contienen dos cambios puntuales en la RIG respecto a la secuencia del ARN S de TCRV. Estos cambios fueron introducidos en pS-CAT (Casabona et al., 2009) mediante mutagénesis sitio dirigida (descrita más adelante) para incorporar un sitio de corte para la enzima BsaAI, requerido para la generación de transcritos mutantes (Capítulo I, Resultados).

- Plásmidos pARNm-LUC con mutaciones en la región no codificante 5'.

1-Mutantes por delección.

Los plásmidos pARNm-LUC/5' Δ D/3'wt, pARNm-LUC/5' Δ P/3'wt, pARNm-LUC/5' Δ T/3'wt permiten obtener ARNs mensajeros sintéticos mutantes, con delecciones en la región 5' no traducible (5'UTR) (Figura R14, Capítulo I, Resultados). Estos plásmidos fueron generados mediante una estrategia de clonado similar a la utilizada para el pARNm-LUC/5'wt/3'wt. En todos los casos, un fragmento de ADN fue obtenido mediante PCR, utilizando pPol I-MG/FLUC como templado, el

oligonucleótido reverso Rev IGR-3' mRNA y un oligonucleótido directo, que contiene la secuencia del promotor de la T7ARNPol y la secuencia que incluye la mutación de interés (Tabla M2). El fragmento obtenido fue insertado en el vector pAT153/PVU II/8 previamente digerido con la enzima de restricción PVUII.

Las características de cada una de las construcciones mutantes se describen a continuación.

Plásmido pARNm-LUC/5'ΔD/ 3'wt.

El plásmido pARNm-LUC/5'ΔD/3'wt contiene una deleción de 43 nucleótidos en la región central de la secuencia 5'NC. Fue utilizado para la síntesis *in vitro* de un ARNm mutante cuya región 5'UTR contiene (en sentido 5' a 3') 5 nucleótidos no virales, seguidos por 33 nucleótidos virales, que corresponden a las posiciones 1 a 21 y 65 a 76 de la región 5'UTR del ARNm NP (se toma como posición 1 el extremo 5'). Un esquema de la región NC del ARNm mutante se presenta en la Figura R14A (Capítulo I, Resultados).

Plásmido pARNm-LUC/5'ΔP/3'wt.

El plásmido pARNm-LUC/5'ΔP/3'wt contiene una deleción de 24 nts. en la región 5' terminal de la secuencia no codificante viral. El ARN 5'ΔP/3'wt presenta (de 5' a 3'), 5 nucleótidos no virales seguidos de 52 nucleótidos, correspondientes a las posiciones 25 a 76 de la región 5'UTR del ARNm NP (Figura R14A, Capítulo I, Resultados).

Plásmido pARNm-LUC/5'ΔT/3'wt.

La secuencia 5'UTR del ARN sintetizado a partir de esta construcción posee solo 7 nts., que corresponden a las posiciones 70 a 76 del ARNm de NP (Figura R14A, Capítulo I, Resultados).

2-Mutantes por sustitución.

Plásmido pARNm-LUC/5'UNS/3'wt.

En este plásmido, la secuencia 5'UTR del ARNm de NP fue substituida por una secuencia aleatoria no relacionada, rica en bases pirimidínicas, de igual longitud.

Como primer paso para su obtención, generamos un plásmido de transición denominado pARNm-LUC/5'UTR(-)/Stul(+). Este plásmido contiene, de 5' a 3', la secuencia del promotor T7, un sitio de restricción Stul, la secuencia del ORF FLUC y la secuencia 3'UTR del ARNm de NP. Fue generado mediante mutagénesis sitio dirigida del vector pARNm-LUC/5'ΔT/3'wt (ver más adelante), con los oligonucleótidos F-inserc-Stul/NcoI y R-inserc-Stul/NcoI (Tabla M2). Una vez construido el plásmido de transición, se procedió a sintetizar un fragmento de ADN mediante PCR, con los oligonucleótidos cebadores Fw11 5' unstruct (con sitio de restricción Stul) y Rev IGR-3' mRNA y el plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'wt como templado. El fragmento obtenido fue digerido posteriormente con la enzima Stul y con BclI, cuyo sitio de corte se encuentra situado dentro del ORF FLUC. Este fragmento fue purificado y luego clonado entre los sitios de restricción Stul y BclI del plásmido de transición pARNm-LUC/5'UTR(-)/Stul(+).

Plásmido pARNm-LUC/5'β Glo/3'wt.

En este plásmido la secuencia 5'UTR del ARNm de NP fue reemplazada por la secuencia 5'UTR del gen de la hemoglobina beta humana (Genbank: NM_000518). Para esto, se sintetizó un fragmento de ADN mediante PCR, con los oligonucleótidos Fw 5UTR_globin (con sitio de restricción Stul) y Rev IGR-3'mRNA (Tabla M2) y el plásmido pPol I-MG/FLUC como templado. Tal como se describe en el punto anterior, el fragmento de ADN fue digerido con las enzimas Stul y BclI e insertado entre los sitios Stul y BclI del plásmido de transición pARNm-LUC/5'UTR(-)/Stul(+).

- **Plásmidos pARNm LUC con mutaciones en la región no codificante 3'.**

1-Mutantes por sustitución.

Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'UNS.

Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'HII mut1.

Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'his.

Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'poliA.

Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'ΔH+19are.

Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'ΔH+19T.

Estas construcciones plasmídicas fueron generadas siguiendo una estrategia de clonado similar a la utilizada para el pARNm-LUC/5'wt/3'wt. Brevemente, ésta implica la síntesis de un fragmento de ADN mediante PCR, utilizando pPol I-MG/FLUC como templado, el oligonucleótido directo Fw T7-5' mRNA y un cebador reverso conteniendo la mutación a introducir (Tabla M2). En todos los casos, el producto de PCR fue fosforilado e insertado en el vector pAT153/PVUII/8 previamente digerido con la enzima de restricción PVUII.

Las secuencias 3'UTR de los transcritos derivados se presentan en el Capítulo I, Resultados.

Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'HI mut2.

En este plásmido la secuencia correspondiente a las posiciones 15 a 27 de la región no codificante 3' del ARNm viral (se toma como 1 el primer nucleótido hacia 3' a partir del codón de terminación) fue sustituida por la secuencia autocomplementaria. Para ello, se sintetizó un fragmento de ADN mediante PCR, con los oligonucleótidos Fw T7-5' mRNA y rv_mutloop1 (Tabla M2) y el plásmido pPol I-MG/FLUC como templado. El producto de la reacción fue digerido con las enzimas SmaI y

BclI, purificado y luego insertado entre los sitios SmaI y BclI del plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'wt.

Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'HI_mut1.

En este plásmido la secuencia correspondiente a las posiciones 1 a 20 de la región no codificante 3' del ARNm viral fue sustituida por la secuencia autocomplementaria. Para su construcción, los oligonucleótidos Fw T7-5' mRNA y Rv8 mut pre-H fueron utilizados en una reacción de PCR, con el plásmido pPol I-MG/FLUC como templado. El producto de la reacción fue digerido con las enzimas BclI y BsaAI y luego de su purificación, el fragmento de interés fue insertado entre los sitios BclI y BsaAI del plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'wt.

Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'rev.

El plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'rev posee 2 sustituciones puntuales (C21/T y G23/C) que generan un sitio BsaAI. Este plásmido fue construido mediante mutagénesis sitio-dirigida, tal como se describe más adelante, utilizando los oligonucleótidos looplpSag_FW y looplpSag_Rv (Tabla M2).

Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'HII_mut2.

En este plásmido, la secuencia ubicada entre las posiciones 28 a 63 de la región no codificante 3' del ARNm viral fue sustituida por parte de la misma secuencia 3'UTR (posiciones 7 a 25 y 37 a 55, separadas por el dinucleótido TA) (Figura R8A, Capítulo I, Resultados). Para ello, los oligonucleótidos complementarios Fw2 hairpin corto y Rv2 hairpin corto (Tabla M2), fosforilados en el extremo 5', fueron hibridizados en buffer STE (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0) en un volumen final de 50 µl, mediante incubación a 80°C durante 5 minutos, se guía de enfriamiento lento hasta temperatura ambiente. El ADN dúplex generado

fue insertado entre los sitios BsaAI y SmaI del plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'wt, en reemplazo del fragmento salvaje.

Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'HII_mut3.

Este plásmido fue construido de forma similar a la indicada para pARNm-LUC/5'wt/3'HII_mut2, en este caso utilizando los oligonucleótidos Fw3 Hcomp3' y Rv3 Hcomp3' (Tabla M2). En esta construcción, las posiciones 47 a 63 de la secuencia 3'UTR del ARNm de NP fue sustituida por la secuencia complementaria a sí misma (Figura R8A, Capítulo I, Resultados).

Plásmido pARNm-LUC/5'βGlo/3'poliA.

El plásmido pARNm-LUC/5'βGlo/3'poliA posee la sustitución de las regiones 5' y 3' no codificantes virales, por la secuencia 5'UTR del gen de la hemoglobina beta humana y por la cola de poliA, respectivamente. Para su generación, el plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'poliA fue digerido con las enzimas HindIII y BclI y el fragmento que contiene el tracto de poliA, fue purificado y ligado entre los sitios HindIII y BclI del plásmido pARNm-LUC/5'βGlo/3'wt.

2-Mutantes por inserción.

Plásmidos pARNm LUC/5'wt/3'sp1 y pARNm-LUC/5'wt/3'sp3.

Para la construcción de estos plásmidos, un par de oligonucleótidos complementarios entre sí (Fw1 3Xsp y Rv1 3Xsp, Tabla M2), fosforilados en sus extremos 5', fueron sometidos a un tratamiento de hibridización, siguiendo el protocolo indicado en la sección anterior. El ADN dúplex, que comprende las posiciones 1 a 23 de la secuencia 3'UTR del ARNm de NP, fue ligado al plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'wt previamente digerido con la enzima BsaAI. Entre los plásmidos que

incorporaron el inserto, fueron seleccionados clones con inserción simple o múltiple. Así, el plásmido recombinante pARNm-LUC/5'wt/3'sp1 posee una inserción de 9 copias en tándem, mientras que el plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'sp3 contiene una inserción de 2 copias en tándem, orientadas en sentido inverso. Los ARN sintéticos generados a partir de estos plásmidos se esquematizan en la Figura R10A (Capítulo I, Resultados).

Plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'sp2.

Para la obtención de este plásmido, un fragmento de ADN de 100 pares de bases (pb), obtenido mediante digestión del vector pTM1 con la enzima de restricción Alul, seguido de fraccionamiento en gel de agarosa y purificación, fue ligado al plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'wt previamente digerido con la enzima BsaI.

Tabla M2. Oligonucleótidos utilizados en la generación de los plásmidos descritos en el Capítulo I.

PLASMIDO	OLIGONUCLEOTID O	SECUENCIA (5' a 3')
pTM1-Renilla	FW NcoI-Ren	ttaatcgc ccATGG CTTCCAAGGTGTACGACC
pTM1-Renilla	RV Ren Sma	cgat cccGGG CTAGAATTACTGCTCGTTCTTCAGCACGCG
pPol I-MG/ FLUC	FW LUC	CACT GAGCTC TTTTTGAATCCTTGCTTTGATCGCCATA ATGGA A GACGCCAAAAACATAAAGAAAGGC
pPol I-MG/ FLUC	RV LUC	GAGG CACGTA TGGTGC GA AAGTCTTACAGC TTACACGGCGATC T TTCCGCC
pARNm-LUC/5'wt/3'wt	Fw T7-5' mRNA	CGCTTTAATACGACTCACTATA GGACTCGCACAGTGGATCCTAG G
pARNm-LUC/5'wt/3'wt	Rev IGR-3'mRNA	TAGGACAGCACATTTGCGCTCC
pARNm-LUC/5'ΔD/3'wt	Delta 5UTR mRNA NP	CGCTTTAATACGACTCACTATA GGACTCGCACAGTGGATCCTAG GCAATTGATCGCCATA ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAA GG

pARNm-LUC/5'wt/3'HII_mut3	Fw3 HIIcomp3' (fosforilado)	GTGCCTCCCCGATCCGCGGGCAACCGGGCCTAGCCCCGCGCAC ACCGGCCCGggg
pARNm-LUC/5'wt/3'HII_mut3	Rv3 HIIcomp3' (fosforilado)	cccGGG CCGGTGTGCGCGGGGCTAGGCGCCGGTTGCCGCGGAT C GGGGAGGCAC
pARNm LUC 5'wt/3'sp1 pARNm LUC 5'wt/3'sp3	Fw1 3Xsp (fosforilado)	GCTGTAAGACTTCCGCACCATAGCTGCTGTAAGACTTCCGCACC A TAC
pARNm LUC 5'wt/3'sp1 pARNm LUC 5'wt/3'sp3	Rv1 3Xsp (fosforilado)	GTATGGTGCGGAAGTCTTACAGCAGCTATGGTGCGGAAGTCTTA CAGC

Tabla M2. Oligonucleótidos utilizados en la construcción de los plásmidos indicados. La secuencia del promotor de la T7ARNPol se indica con letras rojas. En los oligonucleótidos Fw T7-5' mRNA y Pr 19deltaH la secuencia subrayada corresponde a los 19 nts. terminales de los extremos 5' y 3', respectivamente, del ARN S antigenómico de TCRV. En los oligonucleótidos restantes, los segmentos resaltados en rosa corresponden a sitios de restricción, en verde se muestra la secuencia proveniente del ORF FLUC, en celeste los nucleótidos no virales, en amarillo las sustituciones puntuales.

- Plásmidos utilizados para la obtención de TCRV recombinante.

Plásmidos pLag wt y pSag wt.

Para la obtención de pLag wt, se utilizó como base el plásmido pAgenCAT (Lopez et al., 2001), que expresa un minireplicón análogo al segmento antigenómico S de TCRV, bajo el control del pT7. Este mini-antigenoma contiene el gen reportero CAT flanqueado por las regiones 3' y 5' no codificantes del ARN S antigenómico (Sag) de TCRV. Mediante mutagénesis sitio-dirigida, el plásmido pAgenCAT fue modificado para introducir dos cambios puntuales en la secuencia 5' terminal no codificante del minireplicón (T6G y A8T), de tal manera que en el mutante esta secuencia corresponde a la del ARN L antigenómico. El plásmido resultante fue denominado pLagCAT. A efectos de facilitar el clonado posterior, el sitio BamHI del vector en el plásmido pLagCAT fue suprimido mediante la misma técnica de mutagénesis sitio-dirigida, generándose un sitio KpnI en esa posición. El plásmido resultante fue denominado pLagCAT_KpnI.

Por otra parte, se generó el plásmido pLg que contiene la secuencia completa del segmento L de TCRV en el vector pTV2.0, mediante el clonado secuencial de fragmentos de restricción obtenidos a partir de plásmidos previamente construidos en el laboratorio (Iapalucci et al., 1989a; Iapalucci et al., 1989b; Lopez et al., 2001). Finalmente, el plásmido pLagCAT_KpnI fue digerido con la enzima BamHI y el fragmento mayor, que comprende el vector y los primeros 9 nts. de las regiones 5' y 3' NC del ARN L de TCRV, fue purificado en gel de agarosa y desfosforilado mediante el tratamiento con la enzima CIAP según protocolos clásicos (Sambrook, 2001). El fragmento resultante fue ligado a un fragmento que corresponde a las posiciones 10 a 7088 del ARN L de TCRV, obtenido a partir del plásmido pLg previamente digerido con la enzima BamHI (Figura M4).

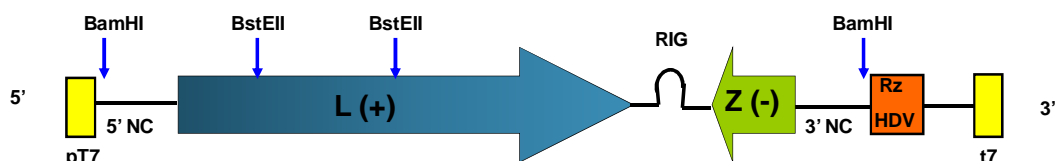


Figura M4. Esquema del plásmido pLag wt, que expresa el ARN L antigenómico. El segmento L antigenómico de TCRV se encuentra clonado en el vector pTV2.0, río abajo del promotor de la T7ARNpol (pT7) y río arriba del sitio de corte de la Ribozima del virus de la Hepatitis delta (Rz HDV) y del terminador (t7). Se señalan las regiones no codificantes 5' (5' NC), 3' (3' NC), e intergénica (RIG). Las flechas gruesas señalan los ORFs de la polimerasa L (L) y la proteína matriz Z (Z), los signos indican el sentido en el que están dispuestos. Las flechas verticales indican sitios de restricción relevantes.

Para la construcción de pSag wt, el plásmido p15-2 (Lopez et al., 2001), que fuera obtenido como paso previo a la generación de pAgenCAT, fue digerido con las enzimas NcoI y BstEII. Luego de la separación de los productos de la digestión en gel de agarosa, el fragmento mayor, que contiene el vector pTV2.0 y las secuencias no codificantes terminales del ARN S de TCRV, fue recuperado y ligado a un fragmento de ADN que contiene la secuencia comprendida entre las posiciones 67 a 3066 del segmento S de TCRV, obtenido luego de la

digestión del clon p2b2 (Franze-Fernandez et al., 1987) con las mismas enzimas (Figura M5).

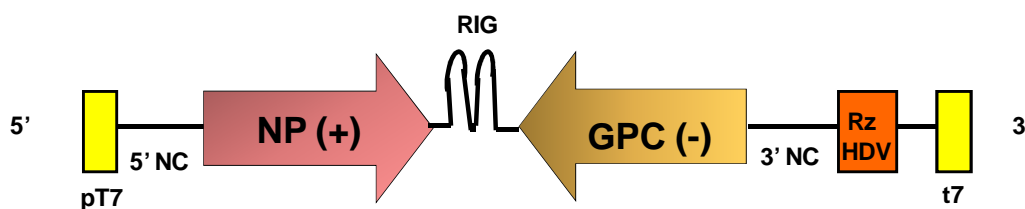


Figura M5. Esquema del plásmido pSag wt, que expresa el ARN S antigenómico. La secuencia completa del segmento S antigenómico de TCRV fue clonada en el vector pTV2.0 río abajo del promotor de la T7ARNpol (pT7) y río arriba del sitio de corte de la Ribozima del virus de la Hepatitis delta (Rz HDV) y del terminador (t7). Se señalan las regiones no codificantes 5' (5' NC), 3' (3' NC), e intergénica (RIG). Las flechas señalan los ORFs de la nucleoproteína (NP) y del precursor de las glicoproteínas de envoltura (GPC), los signos indican el sentido en que están dispuestos.

Plásmidos pSag wt_{+c} y pLag wt_{+c}.

Los plásmidos pSag wt y pLag wt fueron modificados para incluir un nucleótido C extra en el extremo 3' de la secuencia antigenómica. La modificación fue introducida mediante mutagénesis sitio-dirigida, siguiendo el procedimiento descrito más adelante. En ambos casos, se utilizaron los oligonucleótidos Lag extra C Fw y Lag extra C Rv, los cuales incluyen la mutación deseada (Tabla M3), debido a la estricta conservación de la secuencia de los 19 nts. terminales en el extremo 3' de los segmentos S y L.

Para la selección de los clones mutantes, se procedió al secuenciamiento de la región pertinente en cada caso. Una vez corroborada la secuencia, el plásmido pSag mutante fue digerido con las enzimas HpaI y PstI, mientras que el plásmido pLag mutante lo fue con las enzimas XhoI y KpnI (Figura M6). Los fragmentos conteniendo la mutación fueron purificados y luego insertados en reemplazo del fragmento homólogo correspondiente, en los plásmidos pSag wt y pLag wt, previamente digeridos con las enzimas HpaI y PstI o XhoI y KpnI, respectivamente.

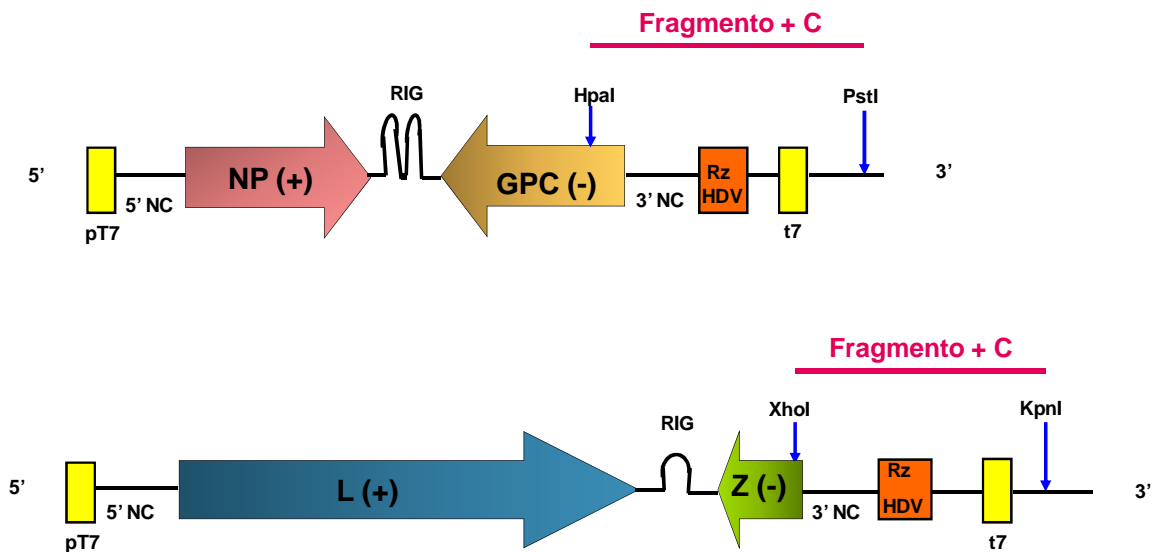


Figura M6. Esquema de la generación de pSag wt_{+C} (arriba) y pLag wt_{+C} (abajo). Con flechas verticales se señalan los sitios de restricción utilizados en el clonado de pSag wt_{+C} y pLag wt_{+C}. La línea roja señala el inserto que contiene el nucleótido C extra, generado por mutagénesis sitio-dirigida.

Plásmido pSag GFP_{+C}.

El fragmento de ADN correspondiente al ORF de la proteína GFP fue obtenido mediante PCR, utilizando como templado el plásmido pGFPVector (Clontech), el cebador sentido FwGFP fosforilado y el cebador reverso RvGFP (Tabla M3), que contiene la secuencia del sitio de corte para la enzima de restricción SfiI (Figura M7). Luego de su purificación en gel de agarosa, el producto de PCR fue digerido con la enzima SfiI. Por otra parte, pSag wt_{+C} fue digerido con la enzima de restricción NcoI (el sitio comprende al codón de inicio del ORF GPC), y luego tratado con la enzima Klenow para rellenar los extremos cohesivos generando un extremo romo. Luego de su purificación, el ADN linealizado fue digerido con la enzima SfiI. Los productos de la digestión fueron separados en gel de agarosa, y el fragmento mayor, que carece de la secuencia codificante para GPC, fue purificado y ligado al producto de PCR que contiene la secuencia de GFP (digerido por SfiI). En el plásmido recombinante, la secuencia codificante para GFP sustituye al ORF GPC.

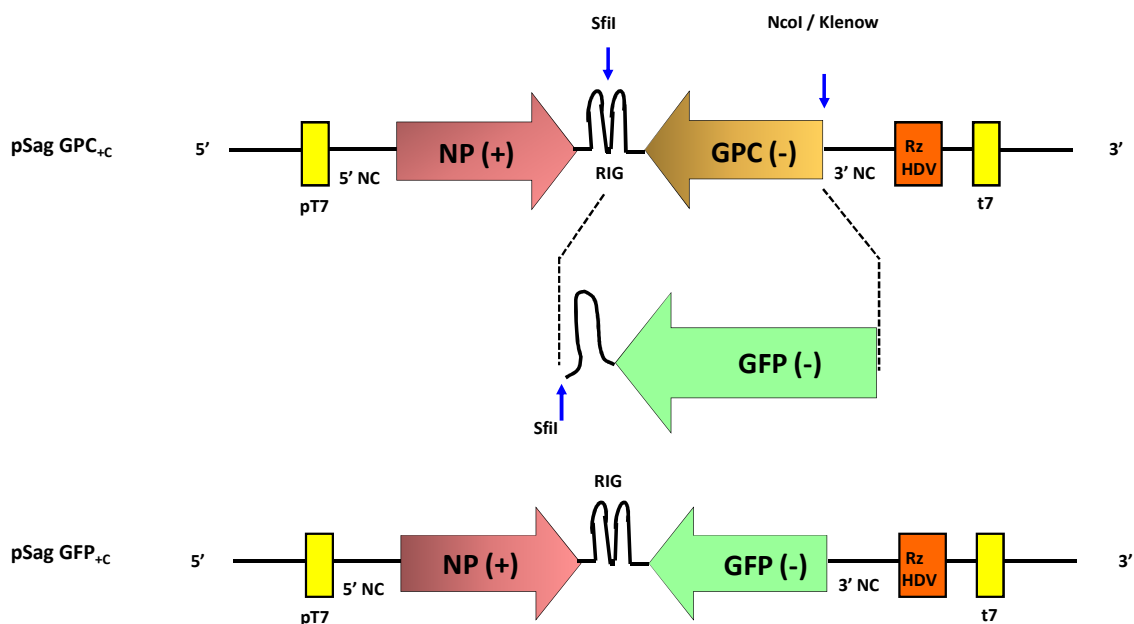


Figura M7. Estrategia de clonado del plásmido pSag GFP_{+C}. Las flechas verticales señalan los sitios de restricción utilizados en el clonado.

Plásmido pSag CHERRY_{+C}.

El ORF de la proteína CHERRY fue obtenido mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos específicos Fw S-CHERRY SacI y Rv S-CHERRY SfiI (Tabla M3) y el plásmido pm-Cherry-N1 (Clontech) como templado. El producto de PCR fue digerido con las enzimas SacI y SfiI, los productos de la digestión fueron separados en gel de agarosa y el fragmento de mayor tamaño, que contiene la secuencia codificante para CHERRY, fue purificado mediante kit comercial. Este fragmento fue insertado entre los sitios SacI y SfiI de pSag wt_{+C}, en reemplazo del ORF de la proteína NP de TCRV (Figura M8).

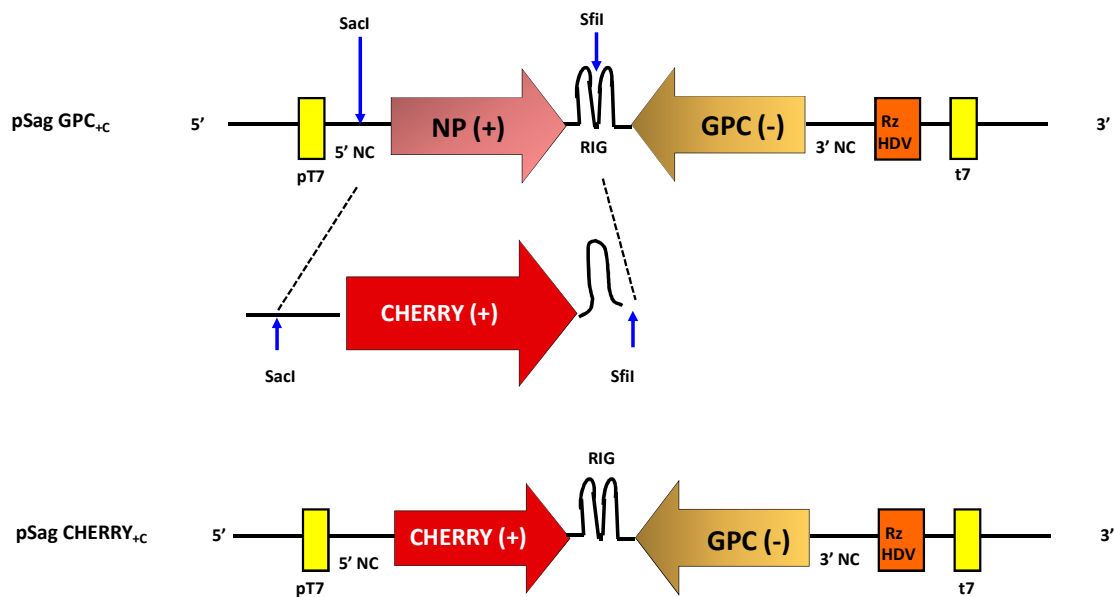


Figura M8. Estrategia de clonado del plásmido pSag CHERRY_{+c}. Las flechas verticales señalan los sitios de restricción utilizados.

Plásmido pLag pol (-)_{+c}.

El plásmido pLag pol(-)_{+c} fue obtenido mediante la introducción de una mutación puntual en el ORF L dentro del plásmido pLag wt_{+c}. Para su construcción, el plásmido L C2 (Wilda et al., 2008), que codifica para la proteína L mutante, fue digerido con la enzima de restricción BstEII (ver Figura M4). El fragmento de menor tamaño, portador de la mutación, fue insertado entre los sitios BstEII de pLag wt_{+c}, en reemplazo del fragmento salvaje. Este cambio hace que la proteína L pierda su actividad polimerasa (Wilda et al., 2008).

Tabla M3. Oligonucleótidos utilizados en la generación de los plásmidos presentados en el Capítulo II.

OLIGONUCLEOTIDO	SECUENCIA (5' a 3')
Lag ExtraC Fw	GGATCCCCGGTGC G GGGTCGGCATGGC
Lag ExtraC Rv	GCCATGCCGACCC G CGCACCGGGGATCC
Fw GFP	ATG AGTAAAGGAGAAGAAC
Rv GFP	atcggg GGCCACACCGGC CGGGCAAAGCCCGGGCCGGTGGGAGCGCAAATGGCTGTC TAA TTTGTATAGTTCATCCATGC
Fw S-Cherry SacI	cact GAGCTC TTTTTTGAAATCCTTGCTTTGATCGCCATA ATG GTTTCTAAGGGTGAAGAA GATAACATGG
Rv S-Cherry SfiI	cccg GGCCGGTGTGGC CCCCGATCCGCGGGTGGCCGCGGATCGGGGAGGCACCTGT GGTGC GA AGTCTTACAGC TAA CTTGACAATTCATCCATACCACC

Se indican los nombres y las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la generación de un clon infeccioso de TCRV. Cuando corresponde, se señalan los sitios de restricción (fucsia) y los codones de iniciación (verde) o de terminación (rojo) de ORF. En amarillo se marca el nucleótido extra (C) introducido en pLag wt y pSag wt.

7. Mutagénesis sitio-dirigida.

Los cambios puntuales descritos en este trabajo fueron introducidos mediante la metodología descrita en el Quick Change® Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene™ con algunas modificaciones. Brevemente y de forma general, la técnica implica la realización de una PCR sobre el plásmido templado adecuado (indicado en cada caso) con dos oligonucleótidos (directo y reverso) de secuencia complementaria, que incluyen el cambio deseado. Los parámetros de la reacción se fijan para que el templado sea amplificado completamente, incluyendo la mutación. Posteriormente, los productos de PCR son tratados con la endonucleasa DpnI, para digerir específicamente el ADN plasmídico templado que se encuentra metilado, seleccionando así el ADN sintetizado (no metilado) que contiene la mutación. Este ADN es utilizado para transformar bacterias competentes. Cada colonia transformante corresponde a un clon de ADN que puede contener el

cambio deseado. Para constatar la introducción del cambio, por lo menos tres clones de cada variante fueron seleccionados para su secuenciación nucleotídica.

8. Síntesis de ARN *in vitro*.

Para la síntesis *in vitro* de los ARNm, el plásmido templado adecuado fue linealizado con la enzima de restricción indicada en cada caso, tal como se especifica en la Tabla M4. Luego, el plásmido linealizado fue extraído con fenol-cloroformo, precipitado con etanol y resuspendido en agua libre de RNAsas. El ADN purificado (200 ng) fue utilizado como templado en una reacción de síntesis *in vitro* mediante la enzima ARN polimerasa del fago T7 (MEGAScript® T7 Kit, Ambion), con 0,4 mM de GTP, 1 mM de cada uno de los restantes ribonucleótidos (ATP, CTP y UTP), y, salvo que se indique lo contrario, 1 mM del análogo Cap m7G(5')ppp(5')G (S1404S, New England BioLabs inc.), en un volumen final de 20 µl. La mezcla de reacción fue incubada durante 3 horas a 37°C y luego el templado fue eliminado mediante tratamiento con DNAsa libre de RNAsas (MEGAScript® T7 Kit, Ambion). El transcripto obtenido como producto de la reacción fue purificado mediante columna Sephadex G-50 (Illustra™ MicroSpin™, GE Healthcare). Su concentración fue determinada mediante cuantificación de la densidad óptica utilizando un equipo Nanodrop y su integridad fue controlada mediante electroforesis en gel de agarosa.

Para la síntesis del ARN control REN, el plásmido pTM1 Renilla fue linealizado con la enzima SmaI y luego utilizado en la síntesis *in vitro*, en ausencia del análogo de Cap, siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Tabla M4. Plásmidos utilizados para la síntesis y características de los ARN sintéticos.

ARN sintético	Cap ^a	Templado para síntesis <i>in vitro</i> ^b	5'UTR ^c (nts.)	3' UTR ^c (nts.)
5'wt/3'wt	+	pARNm-LUC/5'wt/3'wt/SmaI	81	74
5'wt/3'RIG	+	pARNm-LUC/5'wt/3'wt/HindIII	81	124
5'wt/3'rev	+	pARNm-LUC/5'wt/3'rev/SmaI	81	74
5'wt/3' Δ H	+	pARNm-LUC/5'wt/3'wt/BsaAI	81	23
5'wt/3' Δ H+19are	+	pARNm-LUC/5'wt/3' Δ H+19are/HindIII	81	61
5'wt/3' Δ H+19T	+	pARNm-LUC/5'wt/3' Δ H+19T/HindIII	81	54
5'wt/3'UNS	+	pARNm-LUC/5'wt/3'UNS/HindIII	81	61
5'wt/3'his	+	pARNm-LUC/5'wt/3'his/HindIII	81	61
5'wt/3'poliA	+	pARNm-LUC/5'wt/3'poliA/HindIII	81	61
5'wt/3'HII_mut1	+	pARNm-LUC/5'wt/3'HII_mut1/SmaI	81	74
5'wt/3'HII_mut2	+	pARNm-LUC/5'wt/3'HII_mut2/SmaI	81	74
5'wt/3'HII_mut3	+	pARNm-LUC/5'wt/3'HII_mut3/SmaI	81	74
5'wt/3'sp1	+	pARNm-LUC/5'wt/3'sp1/SmaI	81	283
5'wt/3'sp2	+	pARNm-LUC/5'wt/3'sp2/SmaI	81	174
5'wt/3'sp3	+	pARNm-LUC/5'wt/3'sp3/SmaI	81	122
5'wt/3'HI_mut1	+	pARNm-LUC/5'wt/3'HI_mut1/SmaI	81	73
5'wt/3'HI_mut2	+	pARNm-LUC/5'wt/3'HI_mut2/SmaI	81	74
5' Δ D/3'wt	+	pARNm-LUC/5' Δ D/ 3'wt/SmaI	38	74
5' Δ P/3'wt	+	pARNm-LUC/5' Δ P/ 3'wt/SmaI	57	74
5' Δ T/3'wt	+	pARNm-LUC/5' Δ T/ 3'wt/SmaI	7	74
5' β _Glo/3'wt	+	pARNm-LUC/5' β Glo/3'wt/SmaI	55	74
5' β _Glo/3'poliA	+	pARNm-LUC/5' β Glo/3'poliA/HindIII	55	61
5'UNS/3'wt	+	pARNm-LUC/5'UNS/3'wt/SmaI	84	74
5'wtCap-/3'wt	-	pARNm-LUC/5'wt/3'wt/SmaI	81	74
ARN REN	-	pTM1-Renilla/SmaI	-	-

- a. Se indica presencia (+) o ausencia (-) de estructura Cap en el extremo 5' del transcrito.
- b. Nombre del plásmido usado como templado seguido de la enzima utilizada para su linealización.
- c. La longitud de las regiones 5' y 3' UTR de cada transcrito se indican en número de nucleótidos.

9. Transfecciones de ADN.

Monocapas de células BSR, cultivadas en placas de 24 pocillos (aproximadamente 4×10^5 células por pocillo) fueron lavadas con medio de transfección (Optimen, Invitrogen) y posteriormente transfectadas con los plásmidos adecuados a cada experimento, utilizando el reactivo Lipofectamina™2000 según especificaciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific). La cantidad total de ADN plasmídico transfectada en

cada pocillo, se llevó a un valor constante mediante el agregado de la cantidad apropiada de ADN del vector pTM1 vacío. Los plásmidos que codifican las proteínas virales fueron cotransfectados con 0,5 µg/pocillo del plásmido pCA-T7. En todos los casos, la mezcla de transfección fue retirada a las 4 horas posttransfección (h.p.t.), las monocapas celulares fueron lavadas con medio sin suero y luego cubiertas con 0,5 ml (por pocillo) de medio de cultivo de mantenimiento, conteniendo de 2% a 10% de SFB, de acuerdo a la confluencia de la monocapa.

Las transfecciones de células HEK-293T, fueron realizadas sobre monocapas cultivadas hasta un 50% de confluencia en placas de 24 pocillos, mediante el método de fosfato de calcio (Graham and van der Eb, 1973). Brevemente, por cada pocillo, se preparó una mezcla conteniendo 20 µl de buffer 2XBS/1XHepes (Hepes 25 mM, NaCl 278 mM, KCl 10 mM, NaHPO₄ 1,5 mM, dextrosa 11 mM, pH 7,05), 4 µl de 5XCloruro de Calcio/Hepes (CaCl₂ 1,25 M, Hepes 125 mM, pH 7,05), la cantidad adecuada de ADN y Tris-EDTA (Tris-HCl 1mM, EDTA 0,1 mM, pH 8), en un volumen final de 40 µl. La mezcla fue incubada 5 minutos a 37°C, y luego de vigorosa agitación fue dispensada al medio de mantenimiento (0,5 ml/pocillo) sobre la monocapa celular. La incubación a 37°C fue continuada por el tiempo indicado en cada caso.

10. Transfecciones de ARN.

Monocapas celulares, cultivadas en placas de 24 pocillos, fueron lavadas con medio de transfección sin suero y posteriormente transfectadas con los ARNs indicados en cada caso, utilizando el reactivo Lipofectamina™2000 (Thermo Fisher Scientific) según especificaciones del fabricante, excepto que el agregado de suero al medio de transfección fue omitido. A las 4 h.p.t., la mezcla de transfección fue retirada, las monocapas celulares fueron lavadas con medio sin suero y luego cubiertas con 0,5 ml (por pocillo) de medio de cultivo de mantenimiento, conteniendo 2% de SFB.

11. Purificación y Secuenciación de ADN.

Los plásmidos fueron purificados mediante Qiagen tip-100 (Qiagen Inc., Valencia, CA) o utilizando el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Para la purificación de los fragmentos de ADN empleados en los clonados se utilizó el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Todas las construcciones generadas fueron analizadas mediante secuenciación automática de ADN, a través de la empresa MACROGEN Inc. (Corea).

12. Ensayo de actividad Luciferasa.

La obtención de los lisados celulares y la determinación de actividad de los genes reporteros FLUC y REN fueron realizadas mediante el kit Dual Luciferase Assay System (Promega), siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. Brevemente, las monocapas celulares fueron lavadas con 1 ml de buffer fosfato salino (PBS) 1X y luego incubadas con agitación constante durante 8 minutos en el Buffer de Lisis Pasiva 1X (provisto en el kit). Los lisados fueron colectados y centrifugados durante 1 minuto a máxima velocidad. Los sobrenadantes fueron recuperados y transferidos a un nuevo tubo para ser evaluados inmediatamente o ser congelados a -85° C para la posterior medición. La determinación de actividad FLUC y REN fue realizada utilizando un luminómetro (FLx800, Biotek).

En los casos en que los lisados fueron utilizados también en ensayos de Western blot, una alícuota fue separada y procesada como se indica más abajo.

13. Análisis de proteínas mediante SDS-PAGE - Ensayo de Western blot.

Alícuotas de los lisados celulares, obtenidos como se indica en el punto anterior, fueron resueltas en geles de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE), en las condiciones de Laemmli (Laemmli, 1970). En los experimentos mostrados en el Capítulo I, se emplearon geles con 10% de poliacrilamida para el análisis de NP y del factor eIF4E y geles separadores de dos pasos (8% en el superior y 12 % poliacrilamida en el inferior) para el análisis del factor eIF4G.

Las proteínas resueltas mediante SDS-PAGE, fueron transferidas a una membrana de Hybond ECL Nitrocellulose (GE Healthcare), que fue luego teñida con rojo Ponceau (1%), para evidenciar la presencia de las proteínas transferidas. La membrana fue lavada con agua bidestilada y luego incubada durante 16 hs a 4°C en una solución de PBS + 0,1% Tween 20 (PBS-T), conteniendo 5% de leche descremada, para ser posteriormente incubada con una dilución del anticuerpo primario en PBS-T + 3% de leche descremada, durante 2 horas a 37°C. Luego de varios lavados con PBS-T, la membrana fue incubada con el segundo anticuerpo conjugado, durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar la membrana exhaustivamente con PBS-T, las proteínas fueron detectadas mediante quimioluminiscencia (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific), utilizando placas AGFA CP-BU.

Las diluciones utilizadas para los anticuerpos primarios fueron: α -NP, 1:3000; α -4G, α -4E y α -actina, 1:1000. El anticuerpo secundario α -conejo fue utilizado en una dilución 1:6000.

14. Purificación de ARN intracelular, Transcripción Reversa (RT) y PCR en tiempo real.

Para la obtención del ARN total intracelular, monocapas de células BSR transfectadas fueron lavadas tres veces con PBS 1x estéril y luego lisadas mediante el Reactivo TRIZOL (Invitrogen). El ARN total fue extraído siguiendo las instrucciones del fabricante, y una alícuota del

ARN purificado fue posteriormente tratada con DNasa RQ1, libre de RNasa (Promega). Luego, 100 ng del ARN total tratado fue utilizado como templado para la síntesis de ADN copia (ADNc) del gen FLUC, mediante la enzima SuperScript® (Invitrogen) y los oligonucleótidos LUC 1471 R o LUC633 RT, según se indique (Tabla M5). El cebador GAPDHq rv (Tabla M5), específico para el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), fue incluido en todos los casos para la síntesis del ADNc de GAPDH. La mezcla de reacción fue incubada durante 1 hora a 42°C, seguido de 10 minutos a 65°C para la inactivación de la enzima. El ADNc fue fraccionado y conservado a -85°C hasta su uso.

Para determinar el nivel intracelular de ARNm FLUC, un fragmento de 100 pb fue amplificado a partir de una dilución 1/20 del ADNc adecuado mediante una reacción de qPCR, utilizando el kit SYBR® Green PCR Master Mix (Invitrogen) y los oligonucleótidos LUC1362_FW/ LUC1471_RV (Par A) o LUC148_FW qPCR/ LUC148_RV qPCR (Par B), según se indique. Para normalizar los resultados respecto a la cantidad de ARN total, todas las muestras fueron sometidas en paralelo a la amplificación con cebadores específicos para el gen de la enzima de expresión constitutiva GAPDH (Tabla M5, GAPDHq fw/ GAPDHq rv). La eficiencia de reacción, determinada previamente utilizando diluciones seriadas del ADNc templado adecuado, fue de 99,889% para GAPDH, y 95,15% (par A) o 79,572% (par B) para FLUC.

Tabla M5. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT y qPCR. Se indican los nombres y las secuencias correspondientes.

Oligonucleotidos	Par	Secuencia (5' a 3') *
LUC1362_FW	A	GGAATCCATCTTGCTCCAACA
LUC1471_RV	A	TTCCGTGCTCCAAAACAAC
LUC633 RT	-	ACGCAGGCAGTTCTATGAG
LUC148_FW qPCR	B	GACATCACTTACGCTGAG
LUC148_RV qPCR	B	CACTGCATACGACGATT
GAPDHq fw	-	TGCTGGTGCCGAGTATGTTG
GAPDHq rv	-	CAGAAGGTGCCGAGATGATGA

* Los oligonucleótidos fueron diseñados mediante el software Primer Express® Software (Applied Biosystems), fijando como criterio de selección valores de Tm entre los 55 y 60°C, con una diferencia entre los dos oligonucleótidos que no superara 1°C. El número en el nombre de los oligonucleótidos directos (FW) representa la posición del extremo 5' dentro del ORF LUC, tomando como 1 el primer nt en el codón AUG.

La reacción de qPCR fue realizada por triplicado, en un volumen final de 20µl, con una concentración final de 15 µM para cada uno de los oligonucleótidos. El ciclado consistió en un paso a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos (de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C). La identidad de los productos de la reacción fue evaluada mediante la realización de una curva de disociación. Para eso, al finalizar la reacción de qPCR las muestras fueron tratadas durante 15 segundos a 95°C, seguido de 1 minuto a 60°C, 30 segundos a 95°C y 15 segundos a 60°C.

La cantidad de ARNm intracelular remanente al finalizar los experimentos de transfección, fue estimada mediante el método de $\Delta\Delta Ct$. Específicamente, para cada tiempo experimental, el promedio de los valores de Ct obtenidos para FLUC fue normalizado con el promedio de los valores de Ct obtenido para GAPDH, obteniéndose un valor de ΔCt . Para un dado transcripto, el valor ΔCt del tiempo inicial fue restado al valor ΔCt del tiempo final, obteniéndose el valor de $\Delta\Delta Ct$. La cantidad porcentual de ARNm remanente fue estimada mediante la fórmula $R=(2^{-\Delta\Delta Ct})\times 100$.

15. Análisis estadísticos.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el paquete SPSS Statistics 17.0. Específicamente, los experimentos de análisis de actividad luciferasa relativa fueron analizados mediante un test ANOVA de un factor o test de Welch. Los experimentos en los que se estudió la participación de factores celulares fueron evaluados con un t-Test. Por último, los resultados obtenidos en las determinaciones del nivel relativo de ARNm intracelular mediante qPCR fueron analizados con el test de Wilcoxon y ANOVA de un factor.

En todos los casos, se consideró un valor de significancia (p) de 0,05, por debajo del cual las diferencias en las medias son estadísticamente significativas.

16. Análisis bioinformático.

Para los alineamientos de secuencias de ADN se utilizó el servicio Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). Las herramientas mfold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>) (Zuker, 2003) y LocARNA (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de>) (Will et al., 2012) fueron empleadas para el análisis del plegado del ARN, así como para el alineamiento de secuencias de ARN y análisis de estructuras secundarias conservadas.

17. Materiales.

Todas las drogas utilizadas en el presente trabajo fueron provistas por Merck (Alemania), Sigma Chemical Company (USA), Mallinckrodt Chemical Work (USA), Carlo Erba (Italia), GIBCO BRL (Gaithersburg, Md., USA). Los medios de cultivo bacteriano y para células eucariotas fueron adquiridos a INVITROGEN (USA). El material de cultivo descartable fue provisto por Nunc (Dinamarca) o Falcon (USA). En los experimentos de manipulación de ADN se utilizaron reactivos y enzimas para biología molecular de New England Biolabs (USA), GIBCO BRL (USA), Boehringer Mannheim (Alemania), Thermo Scientific™ (USA), Promega (USA) y Fermentas (USA). El marcador de peso molecular de proteínas empleado fue PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (10 a 250 kDa, Thermo Scientific™).

RESULTADOS

CAPITULO I.

**Elementos involucrados en la
traducción de los ARN mensajeros del
arenavirus Tacaribe.**

Breve reseña de los antecedentes.

Como se describe en Introducción, los ARN mensajeros (ARNm) de arenavirus poseen estructura Cap en el extremo 5' y carecen de cola de poliA en su extremo 3'. En cambio, poseen una región 3' no codificante cuya secuencia es rica en residuos G y C, y puede plegarse en una estructura secundaria muy estable. Trabajos previos del laboratorio demostraron, por primera vez para los arenavirus, que el extremo 3' de los ARNm virales mapea dentro de la correspondiente región intergénica (Iapalucci et al., 1991). Además, demostraron que mientras la correcta terminación de la transcripción de los ARNm virales no es dependiente de una señal de secuencia, se correlaciona con la predicción de una estructura estable de tipo “*hairpin*” en la región no traducible 3' (Lopez and Franze-Fernandez, 2007). Además de su rol en la terminación de la transcripción, algunas evidencias indicaban que la región intergénica (y en consecuencia, posiblemente la secuencia 3'UTR de los ARNm) podría participar en la regulación de la traducción de los ARNm virales (Pinschewer et al., 2005). Sin embargo, las señales involucradas en ese proceso no habían sido analizadas.

Por otra parte, en lo que respecta a la secuencia 5'UTR de los ARNm virales, se sabe que las 19 bases terminales de los segmentos genómicos contienen señales requeridas para promover la replicación del ARN viral (Hass et al., 2006; Kranzusch et al., 2010; Perez and de la Torre, 2003) y que la delección de secuencias 5' y/o 3' no codificantes, contiguas a las mismas, resulta en la atenuación del crecimiento en cultivo y de la virulencia *in vivo* de virus Lassa recombinante (Albarino et al., 2011). Esos antecedentes sugerían la participación de dichas secuencias en alguna de las etapas del ciclo viral, incluyendo la traducción de los ARNm virales.

En resumen, al comienzo de este trabajo de Tesis, los datos acerca de los elementos intervinientes en la traducción de los ARNm de los arenavirus eran escasos y la función de las regiones no codificantes de los ARNm en ese proceso no había sido esclarecida.

En este Capítulo se presentan los resultados de experimentos enfocados a conocer el rol de las secuencias 3' y 5' no codificantes de los ARNm en su traducción; así como la dependencia de factores celulares clave para dicho proceso.

Puesta a punto de la metodología empleada para el estudio de la traducción viral.

Para abordar el estudio de los factores que regulan la traducción de los ARNm de arenavirus, se generó un ARN modelo sintético que imita al ARNm de la proteína NP de TCRV. Este ARN, denominado 5'wt/3'wt, fue obtenido mediante transcripción *in vitro* con la T7ARNPol en presencia del análogo de Cap m7G(5')ppp(5')G, utilizando como templado el plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'wt previamente linealizado con la enzima SmaI (Materiales y Métodos). El transcripto 5'wt/3'wt posee estructura Cap en su extremo 5', seguida de cinco nucleótidos que no se encuentran en el genoma viral, cuya secuencia fue seleccionada en forma aleatoria. A continuación, en dirección 5'>3', el ARN 5'wt/3'wt contiene la secuencia no codificante 5' del ARNm NP, seguida del gen reportero FLUC en reemplazo de la secuencia codificante de NP, y la región 3' no traducible del ARNm viral. El extremo 3' fue diseñado tomando en consideración datos experimentales obtenidos en el laboratorio (Franze-Fernández et al., 1993). En consecuencia, la región 3' no traducible del ARNm sintético incluye la secuencia completa de la estructura *hairpin* proximal al ORF NP (Figura R1). Los residuos no virales en 5' corresponden a los oligonucleótidos que, como se menciona en Introducción, serían secuestrados de ARNm celulares, para ser utilizados como cebador por la polimerasa viral.

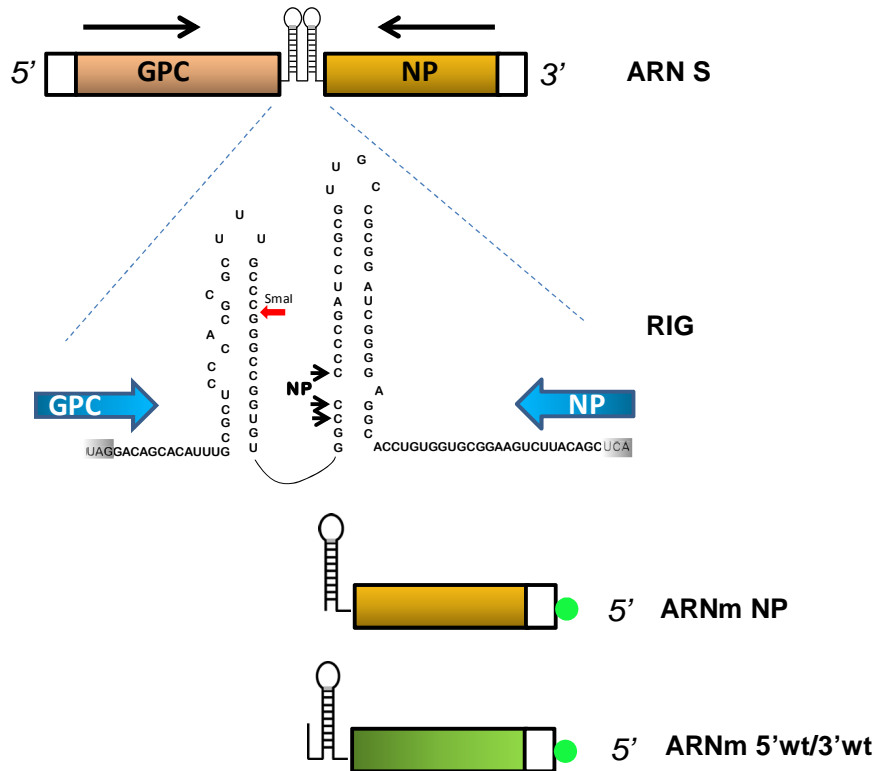


Figura R1. Representación esquemática del ARNm NP y del transcripto 5'wt/3'wt. En la parte superior se grafica el ARN S, con el detalle de la región intergénica (RIG), delimitada por la posición de los codones de terminación de GPC y NP (gris). El sitio de terminación de la transcripción del ARNm NP en la RIG se indica con flechas negras. La flecha roja muestra la posición del sitio de restricción SmaI, utilizado para la preparación del templado a partir del cual se obtuvo el transcripto sintético 5'wt/3'wt. En la parte inferior de la figura, se esquematizan el ARNm NP y el ARNm 5'wt/3'wt. El círculo verde representa la estructura Cap.

En líneas generales, la estrategia experimental elegida para el estudio de la traducción viral consistió en la evaluación, en un contexto celular, de la eficiencia de traducción del transcripto sintético salvaje o de ARNm mutantes con modificaciones en las regiones no traducibles. Experimentalmente, esta estrategia implica la transfección de los ARN sintéticos en células eucariotas y la medición de la actividad FLUC en los lisados celulares. Por lo tanto, en primer lugar se realizó una serie de experimentos preliminares para la puesta a punto de la metodología de trabajo. Los resultados de un experimento representativo se presentan en

la Figura R2. En este experimento, con el objeto de definir el tiempo óptimo de incubación a implementar, el transcripto 5'wt/3'wt fue transfectado en células BSR cultivadas en multiplaca de 24 pocillos, como se indica en Materiales y Métodos. A los tiempos post-transfección indicados, las células fueron lisadas y alícuotas de los lisados celulares fueron utilizados para determinar la actividad FLUC mediante un kit comercial (Materiales y Métodos).

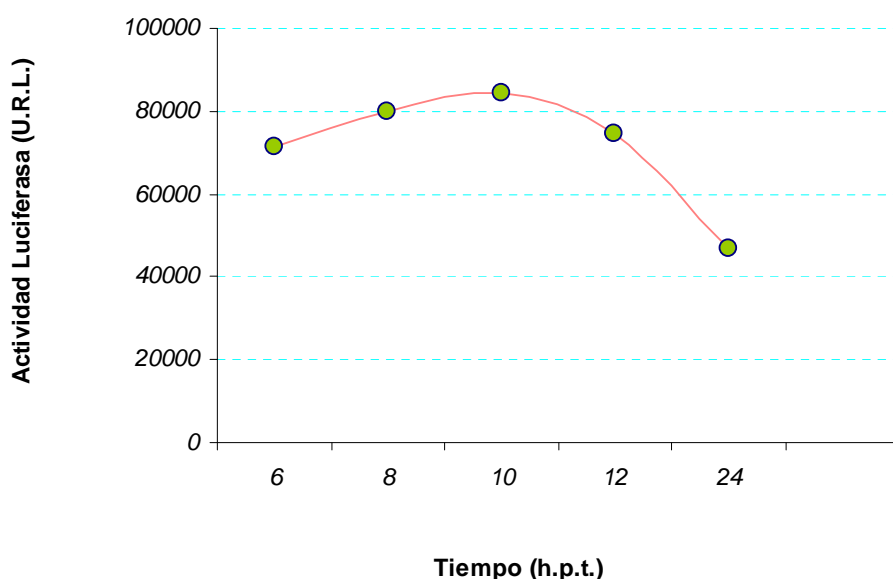


Figura R2. Determinación de la actividad FLUC en función del tiempo. Células BSR cultivadas en placas de 24 pocillos, fueron transfectadas con 100 nanogramos (ng) por pocillo del ARNm 5'wt/3'wt. Las células fueron lisadas a 6, 8, 10, 12 y 24 horas post-transfección (h.p.t.) y procesadas para la determinación de la actividad FLUC. Los datos corresponden a valores absolutos expresados en Unidades Relativas de Luz (U.R.L.).

Los resultados mostraron un incremento en los valores de actividad FLUC en función del tiempo, con un pico de actividad a las 10 h.p.t., y niveles de actividad a las 24 h.p.t. que correspondieron al 50% respecto del máximo (Figura R2). En base a los resultados se definió al periodo entre las 7 y las 10 h.p.t. como adecuado para la medición de actividad FLUC en los subsiguientes experimentos.

Con el objeto de contar con un control interno que nos permitiera normalizar los datos de expresión de FLUC, de forma tal de

independizarlos de posibles fluctuaciones en la eficiencia de transfección, se generó un transcripto control que fue denominado ARN REN. Este transcripto fue obtenido mediante transcripción *in vitro* a partir del plásmido pTM1-Renilla, tal como se indica en Materiales y Métodos. El ARN REN contiene (de 5' a 3') el IRES del cardiovirus EMCV seguido de la secuencia codificante para la enzima Luciferasa de *Renilla reniformis* (REN) (Figura R3). La traducción de REN a partir de este transcripto es independiente de Cap.

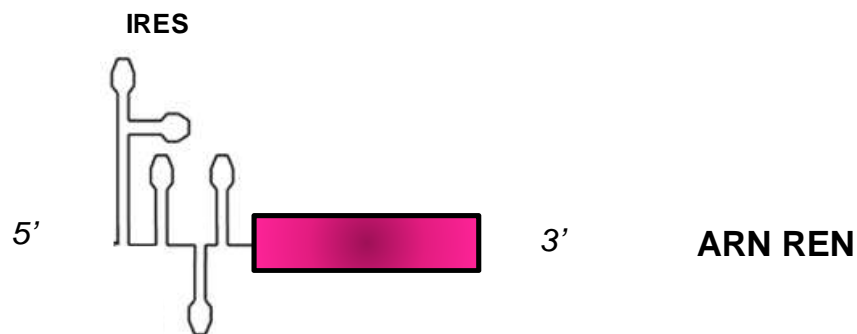


Figura R3. Esquema del ARN REN, utilizado como control interno en los experimentos de transfección de los ARNm sintéticos. Se grafica la posición del IRES, aguas arriba del ORF REN, representado con el rectángulo rosa.

A continuación, debieron establecerse las condiciones de cotransfección del ARNm FLUC y el ARN control, necesarias para la detección de las actividades de FLUC y de REN. Para eso, una cantidad constante del ARN 5'wt/3'wt (100 ng) fue cotransfectado con cantidades crecientes (entre 50 y 150 ng) de ARN REN en monocapas de células BSR cultivadas en placa de 24 pocillos. A las 8 h.p.t. las células fueron cosechadas y lisadas, y alícuotas de los lisados celulares fueron procesadas para la detección de la actividad FLUC y REN. Los resultados indicaron que la cotransfección de 50 ng de ARN REN permite la detección consistente de ambas señales, FLUC y REN, con valores estables por sobre el ruido de fondo (resultados no mostrados).

A partir de estos resultados, se establecieron para los siguientes ensayos de cotransfección las cantidades por pocillo (placa de 24) de 100 ng del ARN a testear y 50 ng de ARN REN control.

Análisis del papel de la estructura Cap y de la región no codificante 3' en la traducción de los ARNm virales.

Como se indica en la Introducción, los cuatro ARNm de TCRV poseen estructura Cap en su extremo 5', que adquirirían mediante un mecanismo de "secuestro del Cap". Por otra parte, el extremo 3' de los mismos mapea dentro de la RIG del correspondiente segmento genómico, de forma tal que las regiones 3' de los ARNm pueden teóricamente adoptar la forma de una estructura de tipo *hairpin* (Iapalucci et al., 1991). La evidencia experimental disponible hasta el momento indica que dichas estructuras se encuentran conservadas en todos los arenavirus, y en conjunto, los antecedentes sugerían la participación de estas estructuras en el proceso de traducción.

En base a esas consideraciones, se comenzó evaluando el requerimiento de la estructura Cap y de la secuencia 3'UTR para la traducción de los ARNm de TCRV, mediante la metodología establecida en el punto anterior. Para eso, el plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'wt, linealizado en el sitio SmaI, fue utilizado como templado para la síntesis del ARN 5'wt/3'wt tanto en presencia como en ausencia del análogo de Cap, obteniéndose el ARN 5'wt/3'wt salvaje o el ARN sin Cap 5'wtCap-/3'wt, respectivamente. Por otra parte, para evaluar el requerimiento de la región 3' no traducible, se generaron dos diferentes transcritos. Por un lado, el plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'wt fue linealizado con la enzima BsaAI, y utilizado como templado para la síntesis *in vitro* del ARN 5'wt/3' Δ H. Este transcripto porta una delección que comprende 51 de los 74 nts. de la secuencia 3'UTR (Figura R4A). Además, se generó a partir del mismo plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'wt previamente linealizado con la enzima HindIII, un ARNm (5'wt/3'RIG) cuya región 3' no codificante incluye no solo la secuencia 3'UTR del ARNm salvaje, sino que se extiende comprendiendo la totalidad de la RIG del segmento S antígenómico viral (Figura R4A). La secuencia 3' no traducible de este último ARNm comprende 124 nts. (Tabla M4, Materiales y Métodos).

Como se mencionó previamente, el plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'wt contiene dos cambios puntuales en la RIG respecto a la secuencia del

ARN S de TCRV, introducidos con el fin de crear un sitio BsaAI (Materiales y Métodos). Dado que el mencionado plásmido sería utilizado como base para la futura construcción de ARNm mutantes, en este punto fue necesario determinar si dicha modificación de la secuencia 3'UTR del ARNm podría tener algún efecto sobre la traducción. Para eso, se generó el plásmido revertante pARNm-LUC/5'wt/3'rev, mediante mutagénesis sitio-dirigida (Materiales y Métodos). Este plásmido fue digerido con la enzima SmaI y luego utilizado como templado para la síntesis del ARNm 5'wt/3'rev, cuya secuencia 3'UTR es idéntica a la del ARNm de NP y a la correspondiente región en el ARN S antigenómico de TCRV (Figura R4A).

Luego, cada uno de los transcritos sintéticos fue transfectado en células de mamífero. La actividad de los genes reporteros FLUC y REN fue cuantificada 8 horas más tarde (Figura R4B).

A

```

5' wt/3' rev      TAA GCTGTAAGACTTCCGCACCA CAG GTGCCTCCCCGATCCGCGGCAACGCCGCGGATCGGGGG
5' wt/3' wt      TAA GCTGTAAGACTTCCGCACCA TACGTG CCTCCCCGATCCGCGGCAACGCCGCGGATCGGGGG
5' wt/3' RIG     TAA GCTGTAAGACTTCCGCACCA TACGTG CCTCCCCGATCCGCGGCAACGCCGCGGATCGGGGG
5' wt/3' DH      TAA GCTGTAAGACTTCCGCACCATAC-----
                    ***** *

5' wt/3' rev      GCCACACCGGCC-----
5' wt/3' wt       GCCACACCGGCC-----
5' wt/3' RIG     GCCACACCGGCCGGGCAAAGCCCGGGCCGGTGGGAGCGCAAATGTGCTGTCTActgaagct
5' wt/3' DH      -----
  
```

B

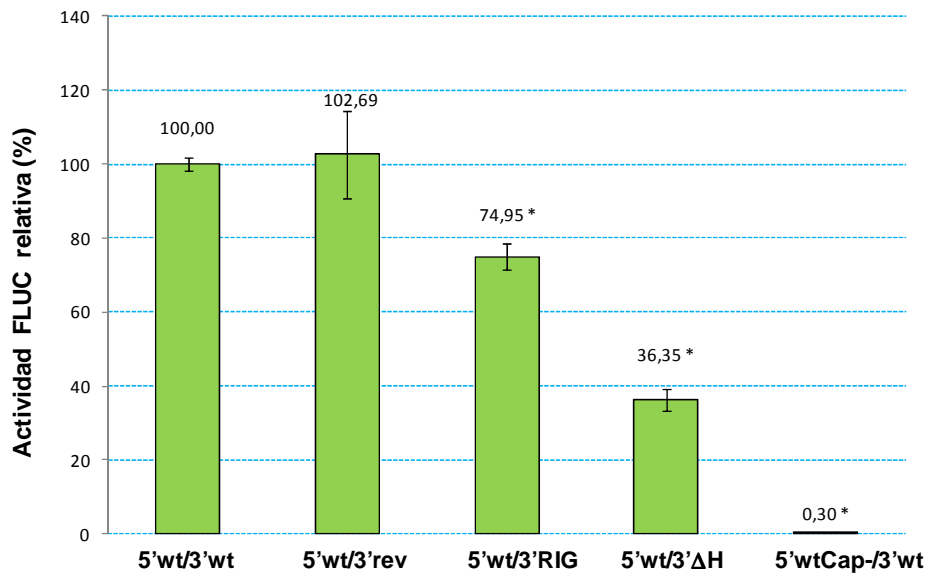


Figura R4. Análisis del papel de la estructura Cap y de la región 3' no codificante en la traducción viral. A). Alineamiento de las secuencias 3' no traducibles de los transcritos salvaje (5'wt/3'wt) y mutantes, obtenido mediante el programa Clustal Omega. Se indica el codón de terminación de traducción de FLUC (rosa), la secuencia del sitio BsaAI (negritas, subrayado) y los cambios puntuales que revierten la secuencia BsaAI a la secuencia del ARN viral S antigenómico (en celeste). B). Determinación de la actividad FLUC. Células BSR fueron transfectadas con 100 ng del ARNm indicado, junto con 50 ng del ARN REN. A las 8 h.p.t. las células fueron lisadas y la actividad de ambos genes reporteros (FLUC y REN) fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Para cada muestra, los datos de actividad FLUC fueron normalizados con los correspondientes valores de actividad REN. El promedio de al menos dos experimentos independientes, cada uno medido por triplicado, se expresa como porcentaje de la actividad observada para el ARNm 5'wt/3'wt, tomado como 100%. Se indican las barras de error. El asterisco indica diferencia significativa con el valor determinado para el ARNm salvaje (*p<0,05).

Los resultados mostraron que el nivel de actividad FLUC mediado por el transcripto 5'wt/3'wt salvaje fue 340 veces mayor que el determinado para el ARN carente de Cap (5'wtCap-/3'wt), sugiriendo la dependencia de la estructura 5' Cap para la traducción de los ARNm de

TCRV. Además, los datos revelaron que la introducción de los cambios puntuales que generan el sitio BsaAI no tiene incidencia sobre la traducción del transcripto sintético, ya que la transfección con el ARN 5'wt/3'rev resultó en niveles de actividad de FLUC similares a los observados para el transcripto 5'wt/3'wt. Este resultado validó la utilización del plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'wt, así como la de todos los plásmidos mutantes derivados del mismo, como templados para la síntesis de los ARNm utilizados en los subsiguientes experimentos.

Por otra parte, se observó que la transfección del transcripto ARNm 5'wt/3' Δ H, que porta una delección que elimina gran parte de la secuencia 3'UTR, resultó en una reducción promedio de 65% de actividad FLUC en comparación con la mediada por el transcripto salvaje. Sin embargo, el transcripto 5'wt/3'RIG, cuya región 3' no traducible presenta una longitud que supera en casi el 70% a la del transcripto salvaje, medió niveles de actividad de gen reportero que fueron 25% más bajos que aquellos dirigidos por 5'wt/3'wt salvaje, indicando que el aumento de longitud de de la región no estimula la traducción. En conjunto, estos resultados sugirieron que la región 3' no traducible del ARNm viral contiene elementos que participan en la modulación de la traducción.

Análisis de la estabilidad relativa de los ARN mensajeros mutantes.

La aparente diferencia en la eficiencia de traducción demostrada por los transcriptos 5'wt/3' Δ H y 5'wt/3'RIG respecto del transcripto salvaje en los experimentos anteriores, bien podría deberse a inestabilidad de estos ARNm asociada a la mutación y no al proceso de traducción en sí mismo. Para estudiar esta posibilidad, en primer lugar se puso a punto una reacción de transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa (RT-qPCR) que permite cuantificar los niveles intracelulares de ARN sintético (Materiales y Métodos). Luego, para determinar la estabilidad relativa de los ARNm 5'wt/3' Δ H, 5'wt/3'RIG y 5'wtCap-/3'wt, células BSR fueron transfectadas con el transcripto salvaje o cada uno de estos ARNm testeados, por duplicado. Para cada transcripto, la monocapa celular de

uno de los pocillos fue procesada a las 4 h.p.t. (“tiempo inicial”), mientras que la del segundo pocillo lo fue a las 8 h.p.t. (“tiempo final”), para la obtención del ARN intracelular total (Materiales y Métodos). El ARN purificado fue utilizado para sintetizar ADN copia (ADNc) con oligonucleótidos específicos tanto para FLUC como para el gen celular GAPDH (Materiales y Métodos). Estos ADNc sirvieron luego como templado para la amplificación de un fragmento de FLUC o de GAPDH mediante PCR en tiempo real (Figura R5).

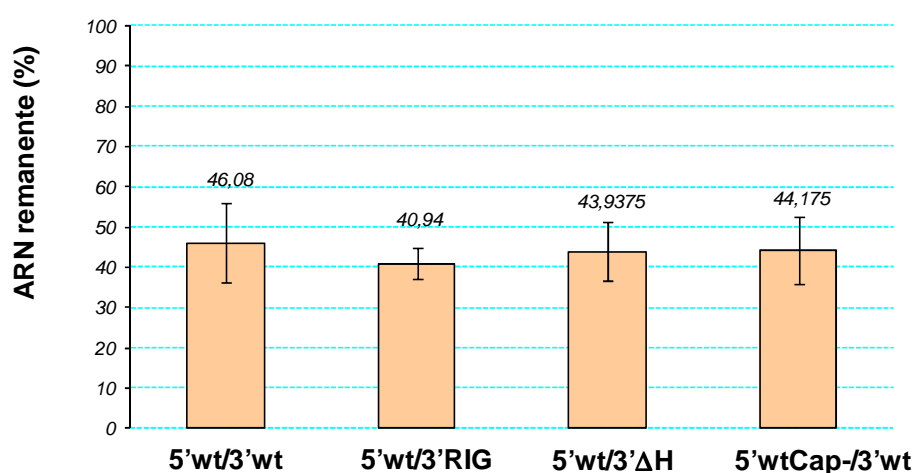


Figura R5. Determinación de la estabilidad relativa de los transcritos sintéticos. Células BSR fueron transfectadas por duplicado con 100 ng por pocillo de cada uno de los ARN indicados. Las monocapas celulares fueron lisadas a 4 y 8 h.p.t., respectivamente, para la obtención del ARN celular total. El nivel de cada uno de los transcritos o del ARNm GAPDH a ambos tiempos posttransfección fue posteriormente determinado mediante RT-qPCR, por triplicado, como se indica en Materiales y Métodos. La amplificación del fragmento de FLUC fue llevada a cabo con los oligonucleótidos LUC1471_R (para RT), y LUC1362_FW y LUC1471_RV (para qPCR, Par A, ver Tabla M5, Materiales y Métodos). Los datos corresponden a dos experimentos, y son expresados como la relación R(%) que representa la cantidad porcentual remanente de un dado ARNm, al finalizar el experimento (Materiales y Métodos). Se indican las barras de error.

Los datos mostraron que la cantidad intracelular del transcripto salvaje decae alrededor de un 50% a lo largo del tiempo experimental. Resultados comparables fueron obtenidos para los transcritos mutantes 5'wt/3'ΔH, 5'wt/3'RIG, y 5'wtCap-/3'wt, indicando que ni la delección de gran parte de la secuencia 3'UTR, ni la inserción de una secuencia de 50 nts. en el extremo 3' o la ausencia de estructura Cap en 5', modificaron

sustancialmente la estabilidad de los transcritos durante el tiempo experimental empleado.

Estos resultados apoyaron la idea de que los reducidos niveles de actividad FLUC mediados por el ARNm 5'wt/3' Δ H respecto al transcripto salvaje reflejan una menor eficiencia de traducción asociada a la delección y no se deben a una menor estabilidad del ARN mutante.

Diseño y evaluación de ARNm con mutaciones en la región 3' no traducible.

Los resultados descriptos más arriba dieron sustento a la hipótesis según la cual la región 3' no traducible podría contener elementos estructurales o motivos de secuencia con un papel importante en la regulación de la traducción de los ARNm virales. Sobre esa base, y como un primer intento para identificar dichos elementos, la secuencia 3' no codificante del ARNm NP de TCRV (Iapalucci et al., 1991) fue alineada con la secuencia homóloga de otros arenavirus del Nuevo Mundo, y la estructura secundaria consenso en dicha región fue determinada mediante el programa LocARNA (Will et al., 2012) (Figura R6A y B). Este análisis confirmó los reportes previos que daban cuenta de la predicción de una estructura secundaria de tipo *hairpin* en la región 3' no traducible, tanto en el ARNm de NP como en los restantes ARNm virales (Iapalucci et al., 1991; Tortorici et al., 2001a). Además, surgió de este análisis la predicción de un segundo *hairpin* conservado, mucho menos estable que el primero, ubicado en forma proximal al codón de terminación (*hairpin* I, Figura R6A y B). El análisis de la secuencia 3'UTR del transcripto 5'wt/3'wt arrojó un resultado similar (Figura R6C). Un esquema de la organización de la región 3' no traducible de este ARNm se presenta en la Figura R6D.

sintetizados transcritos mutantes con sustituciones parciales o totales de la secuencia 3' no codificante. Así, se obtuvo el ARN 5'wt/3'ΔH+19are, en el cual la secuencia de 47 nts. que comprende el *hairpin* II y la región distal (HII y R_D, Figura R6D) fue sustituida por una secuencia de 34 nts. con un contenido de residuos G y C algo menor al de la secuencia salvaje (68% y 81%, respectivamente). Además, se construyó el ARNm 5'wt/3'ΔH+19T en el cual la región que comprende a HII y R_D fue sustituida por una secuencia de 26 nts. con alto contenido de residuos T; así como el transcripto 5'wt/3'poliA, que porta la sustitución de la región 3' no codificante completa por una cola de poliA. Asimismo, se generó el transcripto 5'wt/3'his mediante la sustitución de la región 3' no traducible por una secuencia aleatoria de residuos C y T seguida por la secuencia 3' terminal del ARNm de histona humano; y el ARNm 5'wt/3'UNS cuya región 3' no codificante posee una secuencia con alto contenido (90%) de residuos C y T (Figura R7).

5'wt/3'poliA	TAAaaaCtga
5'wt/3'his	TAAtctttctctctctctctccTctccTCctTccaaaggctcttttcagagccacccaaCtga
5'wt/3'UNS	TAAtctttctctctctctctccTctccTCctcCcCtccTccttctctCtTcCccTctcCtga
5'wt/3'wt	TAA <u>GCTGTAAGACTTCCGCACCATACGTGC</u> CTCCCCGATCCGCGGCCAACGCCGCGGATCG
5'wt/3'ΔH+19are	TAA <u>GCTGTAAGACTTCCGCACCATACGTGC</u> GCCTAGGATCCCCGGTGCGGTACCCCctga
5'wt/3'ΔH+19T	TAA <u>GCTGTAAGACTTCCGCACCATACGTGC</u> Gttttttttttttttttttttttctga <u>agct</u> ---

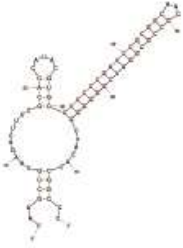


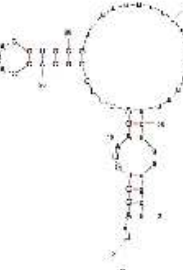

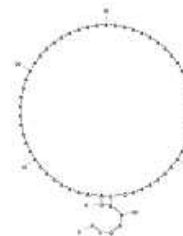
5'wt/3'poliA	<u>agct</u> -----
5'wt/3'his	<u>agct</u> -----
5'wt/3'UNS	<u>agct</u> -----
5'wt/3'wt	GGGGCCACACCGGCC
5'wt/3'ΔH+19are	<u>agct</u> -----
5'wt/3'ΔH+19T	-----

Figura R7. Alineamiento de la secuencia 3' no traducible del ARNm 5'wt/3'wt con la correspondiente región de los ARNm mutantes. Se indica el codón de terminación de traducción de FLUC (rosa), y cuando corresponde, la secuencia proximal (amarillo), y las secuencias *hairpin* I (celeste) y *hairpin* II (gris). La secuencia terminal (subrayado, minúsculas) queda definida por el corte del plásmido templado con la enzima de restricción correspondiente, previo a la síntesis de cada transcripto (ver Tabla M4, Materiales y Métodos). La posición correspondiente al sitio de corte para la enzima BsaAI se indica con subrayado y letras mayúsculas.

La habilidad de los ARNm mutantes para mediar la traducción del gen reportero FLUC fue evaluada en un experimento similar al descrito en la Figura R4B. La actividad FLUC mediada por cada uno de los ARNm

mutantes, relativa a la determinada para el transcripto salvaje, se muestra en la Tabla R1.

Tabla R1. Estructura secundaria predicha en 3'UTR y traducción de los ARNm mutantes.

ARNm ^a	3'UTR ^b	Estructura ^c	ΔG ^d	FLUC% ^e
5'wt/3'wt	74		-41.02	100 (+/-2)
5'wt/3' Δ H+19are	61		-16.10	71 (+/-7)*
5'wt/3' his	61		-9.70	120 (+/-20)
5'wt/3' Δ H+19T	54		-8.80	251(+/-27)*
5'wt/3'UNS	61		-0.30	378 (+/-30)*
5'wt/3'poliA	61		+6.55	1298(+/-79)*

^aNombre del ARN sintético.

^bLongitud de la secuencia 3'UTR (nts.).

^cEstructura secundaria predicha en 3' UTR mediante mfold (Materiales y Métodos).

^dValor de energía libre, ΔG , en kcal/mol, obtenido como c.

°Células BSR fueron transfectadas con 100 ng del ARNm indicado, junto con 50 ng del ARN REN, y a las 8 h.p.t. las células fueron lisadas para la determinación de la actividad de FLUC y REN, según se describe en Materiales y Métodos. Los datos de actividad FLUC fueron normalizados con los valores de actividad REN determinados en cada muestra. El promedio de tres experimentos independientes, cada uno medido por triplicado, se presenta como porcentaje de la actividad observada para el ARNm 5'wt/3'wt, tomado como 100% (+/- el desvío estándar). El asterisco indica diferencia significativa con el valor determinado para el ARNm salvaje (*p<0,05).

El análisis de los resultados reveló que el reemplazo total de la región 3' no traducible por la cola de poliA (ARN 5'wt/3'poliA) o por una secuencia rica en pirimidinas (en el ARN 5'wt/3'UNS) resultó en un incremento de casi 14 o 4 veces, respectivamente, de la actividad FLUC respecto al ARNm salvaje. Por otra parte, la sustitución de la secuencia *hairpin* II y de la región distal (R_D) por la secuencia que comprende 19 residuos T (ARN 5'wt/3' Δ H+19T) llevó a niveles de actividad FLUC que fueron 2,5 veces mayores a los mediados por el transcripto salvaje, mientras que su reemplazo por la secuencia que comprende al *hairpin* terminal del ARNm de histonas (ARN 5'wt/3'his) no tuvo efecto significativo sobre la traducción. En contraposición, el reemplazo de la secuencia *hairpin* II y R_D por una secuencia rica en G/C (5'wt/3' Δ H+19are) resultó en niveles de actividad FLUC cercanos al 70% respecto al ARNm salvaje.

Estos resultados sugirieron, por un lado, que el papel desempeñado por la región 3' no traducible del mensajero viral no sería funcionalmente homólogo al de la cola de poliA de los ARNm celulares. Además, el análisis de los datos obtenidos para el resto de los transcriptos mutantes reveló una correlación inversa entre los niveles de traducción de FLUC y la estabilidad de la estructura predicha en el 3'UTR del correspondiente transcripto (comparar 5'wt/3' Δ H+19are con 5'wt/3' Δ H+19T; o ARN 5'wt/3'his con ARN 5'wt/3'UNS, Tabla R1).

En conjunto, los datos presentados más arriba sugirieron que la estructura secundaria de la secuencia *hairpin* II podría tener una función reguladora de la traducción. Para evaluar esa hipótesis, a continuación, se generó una serie de mutantes con sustituciones o inserciones diseñadas para reducir la estabilidad de la estructura secundaria, sin alterar la longitud de la región. Así, en las mutantes 5'wt/3'HII_mut3 y

5'wt/3'HII_mut1, la secuencia de la mitad 3' del *hairpin* II fue sustituida por la correspondiente secuencia complementaria o por una secuencia de residuos A/T, respectivamente. En la mutante 5'wt/3'HII_mut2, 16 de los 35 nts. comprendidos en el *hairpin* II, ubicados en la mitad 5' de la estructura, fueron sustituidos por parte de la secuencia precedente (Figura R8A). Como resultado de las modificaciones, la estabilidad de las estructuras secundarias predichas en la región 3' no traducible de cada uno de estos transcritos mutantes resulta menor a la de la correspondiente región en el transcrito salvaje (Figura R8B, ver Figura R6C).

A

```

5'wt/3'HII_mut2  TAAAGCTGTAAGACTTCCGCACCATACAGACTTCCGCACCATACGTTACCGCGGCAACGCC
5'wt/3'wt        TAAAGCTGTAAGACTTCCGCACCATACGTGCTCCTCCCGATCCGCGGCAACGCCCGGGATCG
5'wt/3'HII_mut1  TAAAGCTGTAAGACTTCCGCACCATACGTGCTCCTCCCGATCCGCGGCAACattataaATta
5'wt/3'HII_mut3  TAAAGCTGTAAGACTTCCGCACCATACGTGCTCCTCCCGATCCGCGGCAACcggcgcttagc
                    ***** * * * * *

```



```

5'wt/3'HII_mut2  GCGGATCACACCGGCC
5'wt/3'wt        GGGGGCCACACCGGCC
5'wt/3'HII_mut1  aaaaaCCACACCGGCC
5'wt/3'HII_mut3  cccGcgCACACCGGCC
                    *****

```

B

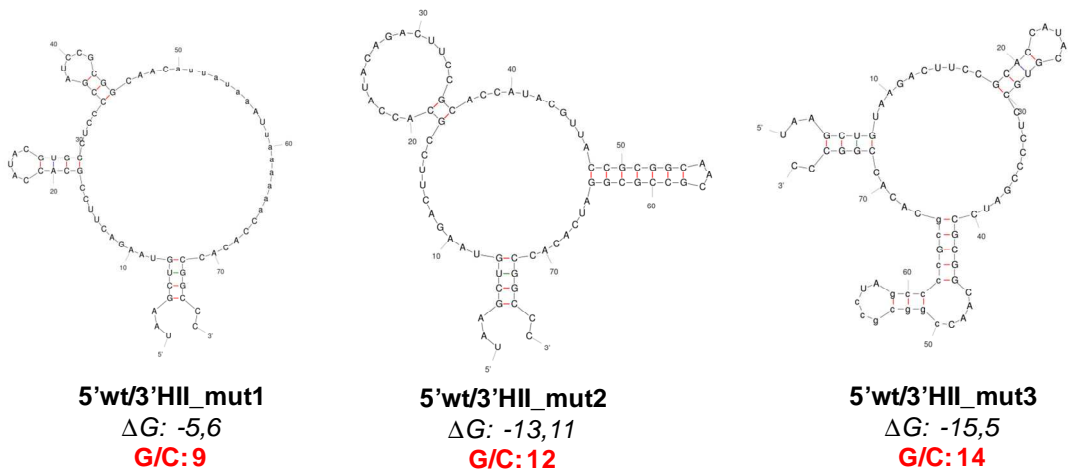


Figura R8. Región 3' no codificante de los ARNm mutantes. A). Alineamiento de la secuencia 3' no traducible del ARNm 5'wt/3'wt con la correspondiente región de los ARNm mutantes. Se marca el codón de terminación de traducción de FLUC (rosa), y cuando corresponde, la secuencia proximal (amarillo), y las secuencias *hairpin* I (celeste) y *hairpin* II (gris). En los ARN 5'wt/3'HII_mut3 y 5'wt/3'HII_mut1, las letras rojas corresponden a las secuencias sustituyentes. B). Estructura secundaria predicha para la región 3' no traducible de los ARNm sintéticos mutantes indicados. Los valores de ΔG (kcal/mol) fueron obtenidos mediante el programa mfold. G/C: indica el número de pares G/C predichos en la estructura.

La capacidad de los ARNm mutantes de mediar la traducción del gen reportero fue evaluada en experimentos similares al los descritos en la Figura R4. Los resultados mostraron niveles de actividad FLUC en las células transfectadas con el ARN 5'wt/3'HII_mut1, cuya secuencia 3'UTR podría plegarse en una estructura poco compleja (Figura R8B), que fueron superiores respecto a los determinados para el transcripto salvaje (175%). En contraste, los transcritos 5'wt/3'HII_mut2 y 5'wt/3'HII_mut3, con estructuras predichas relativamente más estables, mediaron niveles de actividad FLUC que no difirieron significativamente de los observados para el ARNm salvaje (Figuras R8B y R9).

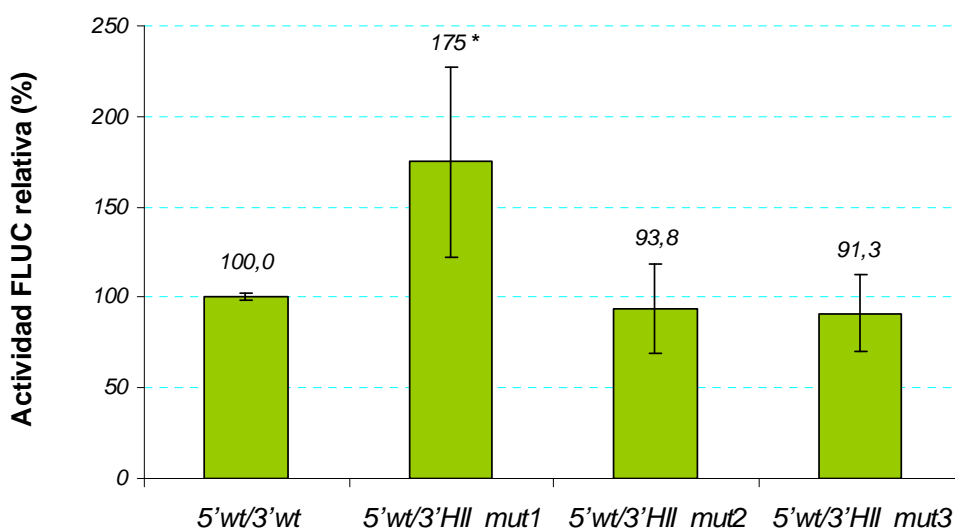


Figura R9. Determinación de la actividad FLUC. Células BSR fueron transfectadas con 100 ng del ARNm indicado, junto con 50 ng del ARN REN. A las 8 h.p.t. las células fueron lisadas y la actividad de FLUC y REN fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Para cada muestra, los datos de actividad FLUC fueron normalizados con los correspondientes valores de actividad REN. Los datos promedio provenientes de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado, se presentan como porcentaje de la actividad promedio observada para el ARNm 5'wt/3'wt, tomado como 100%. Se indican las barras de error. El asterisco indica diferencia significativa con el valor determinado para el ARNm salvaje (* $p < 0,05$).

Los resultados presentados en la Figura R9 parecían confirmar que la estabilidad de la estructura secundaria predicha en la secuencia *hairpin* II, que se relaciona con su contenido en pares G/C, desempeñaría un papel importante en la regulación de la traducción de los ARNm virales.

Sobre esa base, se investigó luego si la posición del *hairpin II* respecto al codón de terminación de FLUC tiene también influencia sobre la traducción. Para eso, se construyeron plásmidos mutantes mediante la inserción de secuencias homólogas o heterólogas, de diferente longitud, en el sitio BsaAI del plásmido pARNm-LUC/5'wt/3'wt (Materiales y Métodos). La región 3' no traducible de los transcritos mutantes 5'wt/3'sp1; 5'wt/3'sp2 y 5'wt/3'sp3, derivados de esos plásmidos, se esquematiza en la Figura R10A.

Las inserciones mencionadas más arriba no solo modificarían la posición relativa del *hairpin II*, sino que además resultarían en la ruptura de la estructura *hairpin I*, ubicada entre el *hairpin II* y el codón stop (Figura R6D). Por lo tanto, el análisis fue extendido para evaluar específicamente la relevancia de las secuencias afectadas. Con ese fin, se generó el ARNm 5'wt/3'HI_mut1, en el que la secuencia proximal al codón stop (R_P), y la mitad 5' de la secuencia *hairpin I* (HI), fue sustituida por la secuencia autocomplementaria. Se construyó además el transcripto 5'wt/3'HI_mut2, en el que se sustituyó únicamente la secuencia *hairpin I* (Figura R10B).

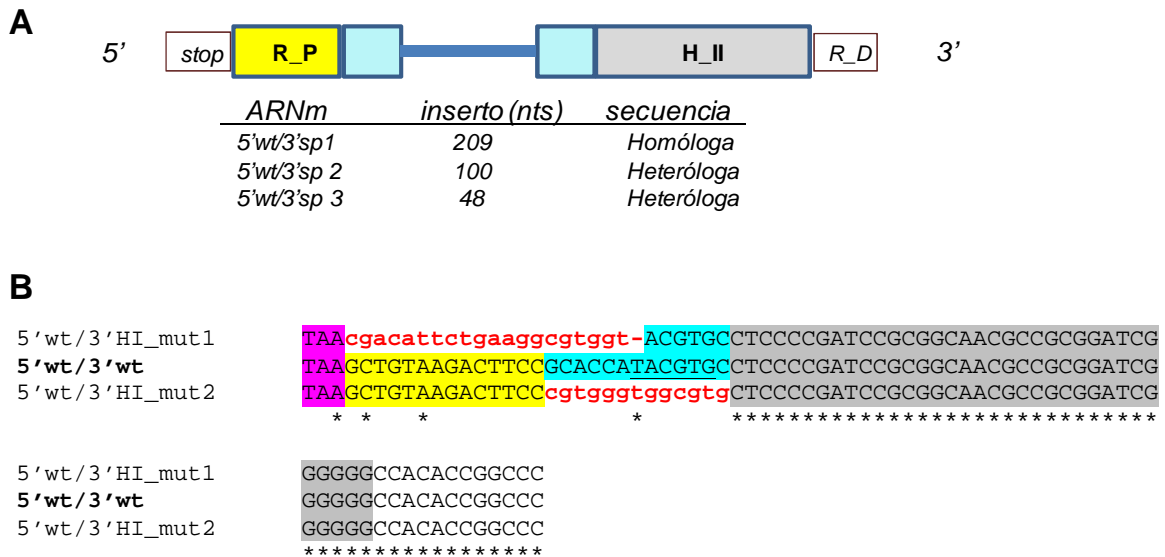


Figura R10. Región 3' no traducible de los ARNm mutantes. A). Representación esquemática de los transcritos con inserción en 3'UTR. B). Alineamiento de la secuencia 3'UTR del ARNm salvaje con la de los ARNm mutantes. Se indica el codón de terminación de traducción de FLUC (rosa), y cuando corresponde, la secuencia proximal (R_P, amarillo), el *hairpin I* (HI, celeste) y el *hairpin II* (HII, gris). La secuencia substituyente se marca en rojo.

A continuación, células BSR fueron transfectadas con el ARNm 5'wt/3'wt o cada uno de los ARNm mutantes. Alícuotas de los lisados celulares, obtenidos luego de 8 hs de incubación, fueron ensayadas para la determinación de la actividad FLUC (Figura R11). Los resultados indicaron que la inserción de secuencias, ya fueran homólogas u heterólogas, en la región que precede al *hairpin* II, o la sustitución de la secuencia que comprende únicamente al *hairpin* I redujeron levemente los niveles de actividad FLUC (14-16%). En contraste, la sustitución de la secuencia de 20 nts. adyacentes al codón stop, que incluye R_P y parte del *hairpin* I, causó una reducción significativa (30%) en los niveles de detección del gen reportero (ARN 5'wt/3'HI_mut1, Figura R11). En conjunto, estos resultados mostraron la participación de la secuencia proximal R_P en la traducción del ARNm viral, y además, indicaron que la posición del *hairpin* II respecto al codón stop no tendría influencia sobre ese proceso.

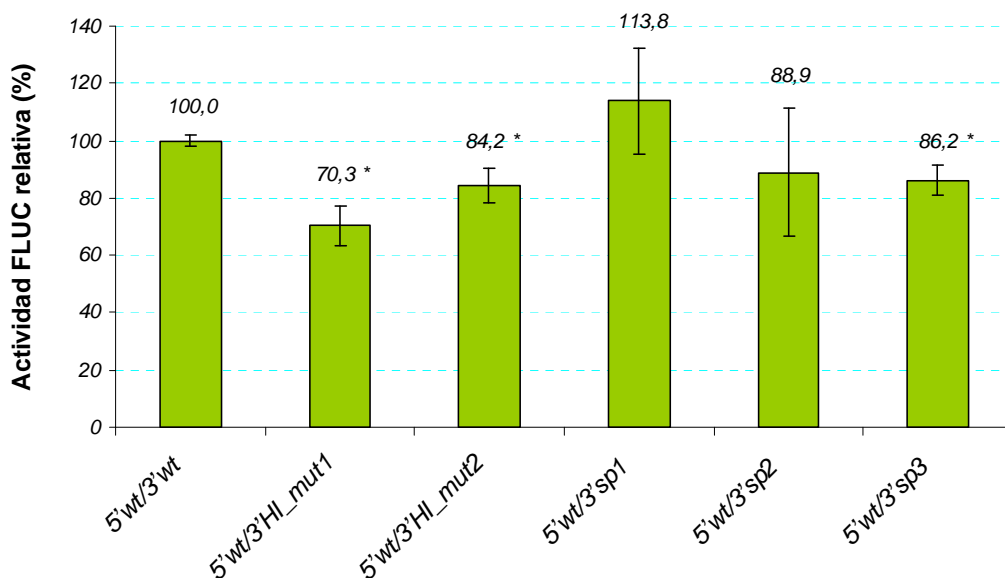


Figura R11. Determinación de la actividad FLUC. Células BSR fueron transfectadas con 100 ng del ARNm indicado, junto con 50 ng del ARN REN. A las 8 h.p.t. las células fueron lisadas y la actividad de los genes reporteros FLUC y REN fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Para cada muestra, los datos de actividad FLUC fueron normalizados con los correspondientes valores de actividad REN. Los datos promedio provenientes de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado, se presentan como porcentaje de la actividad promedio observada para el ARNm 5'wt/3'wt, tomado como 100%. Se indican las barras de error. El asterisco indica diferencia significativa con el valor determinado para el ARNm salvaje (* $p < 0,05$).

Para corroborar los resultados obtenidos precedentemente, la estabilidad relativa del ARNm mutante 5'wt/3'HI_mut1, que media niveles reducidos de actividad FLUC, fue analizada en paralelo con la del ARNm salvaje y los transcritos mutantes 5'wt/3'HII_mut2 y 5'wt/3'HII_mut3 (ver Figura R8). Para eso, células BSR fueron transfectadas con cada uno de los ARNm mencionados y el porcentaje de ARNm intracelular remanente a las 8 h.p.t. fue cuantificado mediante RT-qPCR (Figura R12).

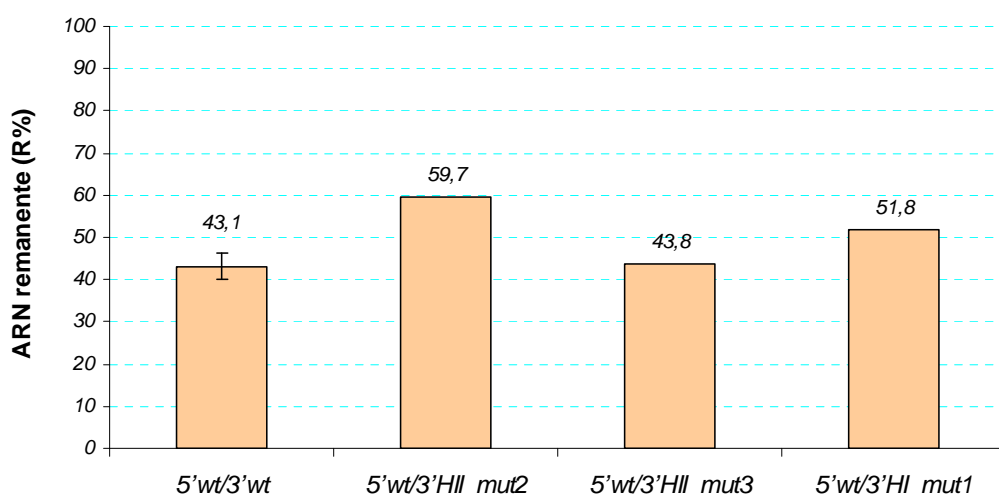


Figura R12. Determinación de la estabilidad relativa de los transcritos sintéticos. Células BSR fueron transfectadas por duplicado con 100 ng de cada uno de los ARN indicados. Las monocapas celulares fueron lisadas a las 4 y 8 h.p.t., respectivamente, para la obtención del ARN celular total. El nivel de cada uno de los transcritos (FLUC) o del ARNm GAPDH a ambos tiempos posttransfección fue posteriormente determinado mediante RT-qPCR, por triplicado, como se indica en Materiales y Métodos. La amplificación del fragmento de FLUC fue llevada a cabo con los oligonucleótidos LUC633 RT (para RT), y LUC148_FW qPCR / LUC148_RV qPCR (Par B, Tabla M5, Materiales y Métodos). Los datos promedio (+/- desvío estándar) provienen de un experimento para los transcritos mutantes y de 4 experimentos para el transcrito salvaje, y son expresados como R(%) que representa el porcentaje remanente de un dado ARNm, al finalizar el experimento.

Los datos obtenidos para el ARNm 5'wt/3'wt fueron concordantes con los obtenidos previamente con el par A de oligonucleótidos empleados en la reacción (ver Figura R5). Por otra parte, los resultados indicaron que la estabilidad de los transcritos mutantes evaluados fue comparable a la del ARNm salvaje durante el tiempo experimental. Así, los

valores promedio de actividad FLUC determinados previamente son una medida de la eficiencia de traducción de los ARNm mutantes. Estos resultados convalidaron la conclusión de que la secuencia R_P modularía positivamente la traducción del ARNm viral.

Análisis del papel de la región 5' no codificante en la traducción de los ARNm virales.

La secuencia 5'UTR de los ARNm de arenavirus posee una longitud que varía entre los 52 y 81 nts. En particular, el análisis bioinformático de esta región en el ARNm NP de los arenavirus del Nuevo Mundo, predice la formación de una estructura secundaria consenso, consistente en un pequeño *hairpin* que involucra los primeros 20 nts. en el extremo 5' (Figura R13A y B). Una estructura consenso similar surge del análisis de las secuencias 5'UTR de los ARNm GPC, L y Z de todos los Mammarenavirus (resultados no mostrados). Sin embargo, el análisis particular de la secuencia 5'UTR del ARNm NP de TCRV muestra una estructura alternativa estable (ΔG : -14,30) que involucra la casi totalidad de la región (Figura R13C).

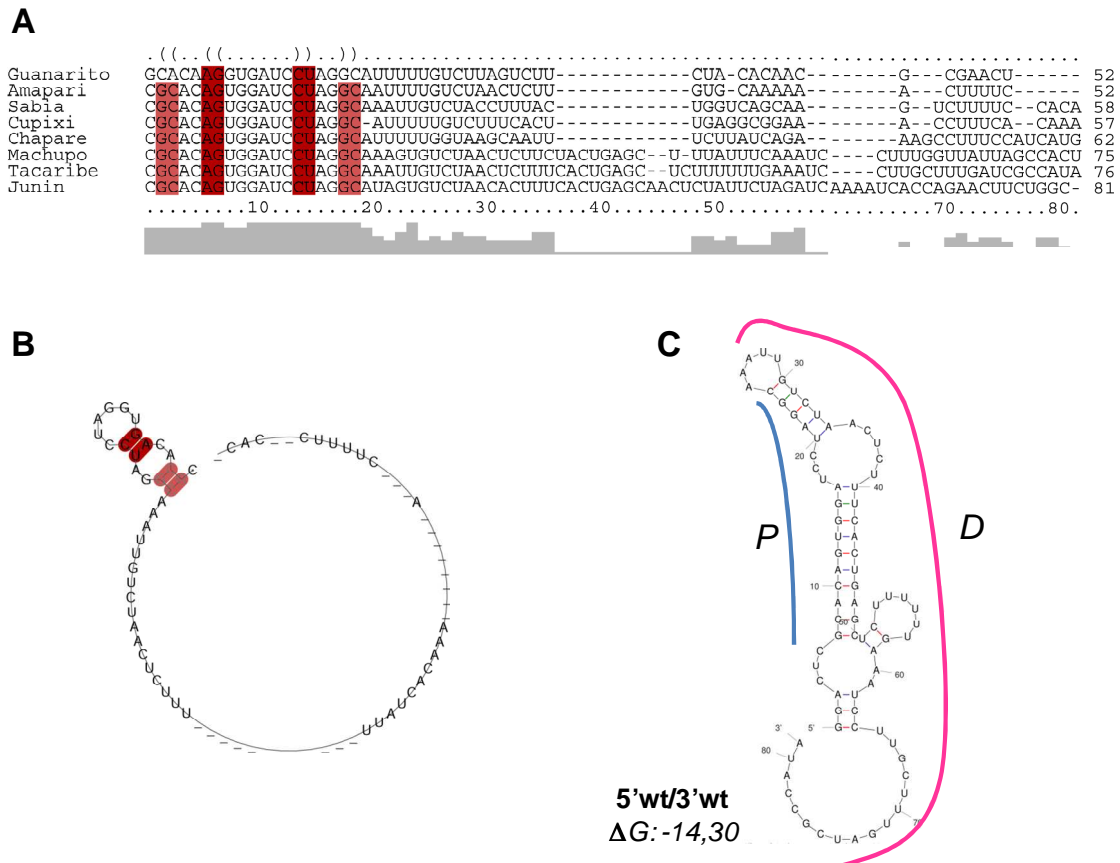


Figura R13. Secuencia 5' no codificante del ARNm NP de Mammarenavirus del Nuevo Mundo. A). Alineamiento de la secuencia 5'UTR del ARNm NP de Mammarenavirus del Nuevo Mundo. Los códigos de GenBank correspondientes a las secuencias analizadas son: NC_005077.1 (Guanarito); NC_010247.1 (Amapari); NC_006317.1 (Sabia); NC_010254.1 (Cupixi); NC_010562.1 (Chapare); NC_005078.1 (Machupo); NC_004293.1 (Tacaribe); NC_005081.1 (Junin). B). Predicción de la estructura secundaria consenso obtenida en base al alineamiento mostrado en (A) mediante el programa LocaRNA. C). Estructura secundaria predicha para la secuencia 5'UTR del transcripto 5'wt/3'wt, mediante el programa mfold (Materiales y Métodos). La línea azul sobre la secuencia indica la región proximal (P), la línea rosa, la región distal (D) al extremo 5' (ver Figura R14). ΔG : energía libre en kcal/mol.

Para analizar el papel que las estructuras predichas en el 5'UTR pudieran desempeñar en la traducción, se diseñaron y evaluaron ARNm mutantes con delección o sustitución en dicha región. En el ARNm 5'UNS/3'wt, la secuencia 5'UTR casi completa, con excepción de los 7 residuos proximales al codón de iniciación de la traducción, fue sustituida por trectos de residuos C y T separados por residuos A o G. Esta secuencia puede plegarse para formar una estructura poco estable.

celulares obtenidos a las 8 h.p.t. Tal como se esperaba en base a datos de la bibliografía reportando que la eficiencia de traducción *in vitro* de ARNm sintéticos disminuye drásticamente cuando la longitud de la secuencia 5'UTR es menor a 30 nts. (Kozak, 1991), los resultados mostraron una caída muy pronunciada en los niveles de actividad FLUC para el transcripto con delección total de la región 5' no traducible (Figura R15A). Además, se observó una reducción de entre 30 y 40% en los niveles de actividad del gen reportero en las células transfectadas con los ARNm con delección parcial, ya sea en la región proximal o distal, lo que podría indicar que ambas regiones facilitan el proceso de traducción. Una caída aun mayor (51%) en los niveles de FLUC fue observada para el ARNm 5'UNS/3'wt, sugiriendo que parte de la participación de la región distal y/o proximal podría depender de algún motivo de secuencia o estructural específico, del cual el ARN mutante carece (Figura R15A).

Por último, se evaluó el efecto de la sustitución de la secuencia 5'UTR por la de la correspondiente región de un ARNm celular. Así, la región 5' no codificante de los ARNm 5'wt/3'wt y 5'wt/poliA fue sustituida por la secuencia 5'UTR del ARNm de β _globina, obteniéndose los ARNm 5' β _glo/3'wt y 5' β _glo/3'poliA, respectivamente. En experimentos similares a los anteriormente descritos, se observó que el transcripto 5' β _glo/3'wt medió niveles de traducción de FLUC alrededor de 30% menores a los determinados para el ARNm viral 5'wt/3'wt, indicando que la secuencia 5'UTR del ARNm celular puede suplir solo parcialmente la función de la región 5' no codificante viral (Figura R15A). Asimismo, el transcripto 5' β _glo/3'poliA, que es un modelo de ARNm celular pues contiene tanto la secuencia 5'UTR del ARNm de β globina como la cola de poliA en 3'UTR, dirigió niveles de traducción de FLUC que quintuplicaron aquellos mediados por el ARNm salvaje. Estos datos confirmaron las observaciones previas acerca de la estimulación relativa aportada por la cola de poliA (Figura R15A, ver también Tabla R1).

La estabilidad relativa de los ARNm mutantes fue establecida en experimentos similares al descrito en la Figura R5. En base a los resultados obtenidos (Figura R15B), que mostraron niveles remanentes

de los ARN mutantes al final del experimento comparables a los del transcripto salvaje, se validó la conclusión de que la secuencia 5'UTR contiene determinantes que estimulan la traducción de los ARNm virales.

A

Transcripto	FLUC%
<i>5'wt/3'wt</i>	100
<i>5'ΔT/3'wt</i>	13 (+/-0,5)*
<i>5'ΔP/3'wt</i>	69 (+/-3,6)*
<i>5'ΔD/3'wt</i>	63 (+/-3,8)*
<i>5'UNS/3'wt</i>	49 (+/-5,0)*
<i>5'b_Glo/3'wt</i>	71 (+/-23)
<i>5'b_Glo/poliA</i>	500 (+/-80)*

B

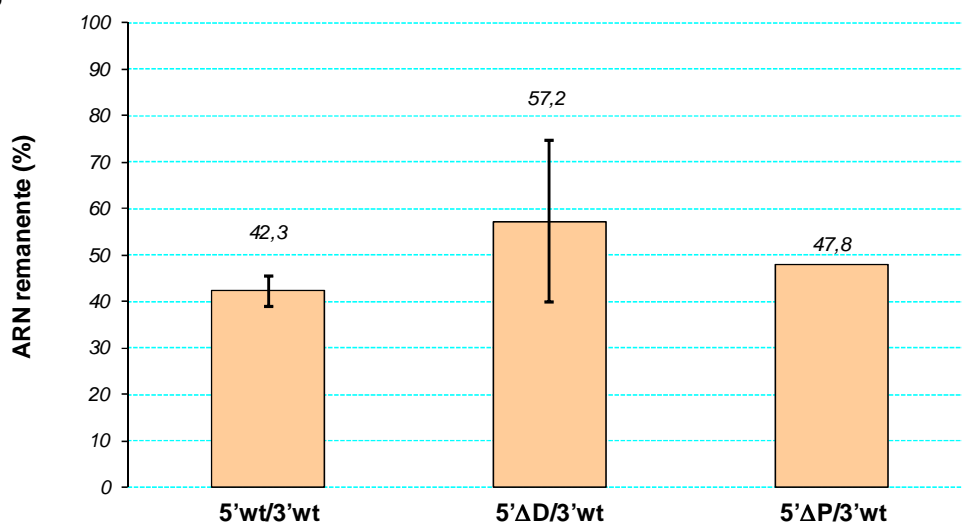


Figura R15. Rol de la secuencia 5'UTR en la traducción viral. A). Determinación de la actividad FLUC. Células BSR, transfectadas con cada uno de los transcriptos indicados, fueron procesadas para la determinación de la actividad FLUC, como se indica en Materiales y Métodos. Los valores corresponden al promedio (+/- el desvío estándar) de 2 a 4 experimentos independientes, y se expresan como porcentaje de la actividad observada para el ARNm *5'wt/3'wt* (100%). El asterisco indica diferencia significativa con el valor determinado para el ARNm salvaje (* $p < 0,05$). B). Determinación de la estabilidad relativa de los transcriptos sintéticos. Células BSR fueron transfectadas por duplicado con 100 ng de cada uno de los ARN indicados. El porcentaje remanente de cada uno de los transcriptos al finalizar el experimento, expresado como R(%), fue determinado mediante RT-qPCR, en la forma indicada en Materiales y Métodos y en la leyenda de la Figura R5. En este caso, la amplificación del fragmento de FLUC fue llevada a cabo con los oligonucleótidos LUC633 RT (para RT), y LUC148_FW qPCR / LUC148_RV qPCR (Par B, Tabla M5, Materiales y Métodos). Los datos promedio (+/- desviación estándar) corresponden a uno (ARN *5'ΔP/3'wt*) o 3 experimentos independientes (ARNs salvaje y *5'ΔD/3'wt*).

Estudio de la influencia de la proteína viral NP en la traducción de los ARNm de arenavirus.

Como se menciona en Introducción, existen antecedentes de la participación de proteínas virales en la modulación de la traducción de los ARNm de varios virus, tales como el virus Influenza, rotavirus y hantavirus, entre otros (Walsh and Mohr, 2011). Por ejemplo, la ARN polimerasa del virus Influenza es capaz de asociarse al complejo de preiniciación de la traducción 43S en células infectadas, y estimular la asociación de eIF4GI a la estructura Cap. La proteína N de hantavirus se une al Cap y puede mediar la interacción de esta estructura con el complejo de preiniciación 43S, a través de la interacción directa con la subunidad ribosomal 40S. El hecho de que en ambos casos, la traducción de los ARNm virales ocurra aún en condiciones de bajos niveles de eIF4E, llevó a sugerir un rol de las proteínas virales como sustituto de este factor celular (Burgui et al., 2007; Mir and Panganiban, 2008; Yanguez and Nieto, 2011; Yanguez et al., 2012).

Por otra parte, reportes recientes han mostrado que si bien la multiplicación de JUNV o TCRV requiere de la actividad funcional de los factores eIF4GI y eIF4A, no depende de la función de eIF4E, ya que el silenciamiento de este factor en células infectadas no reduce la síntesis de las proteínas virales (Linero et al., 2013). Coincidentemente, Baird y colaboradores (Baird et al., 2012) han mostrado la asociación de NP con diversos factores celulares tales como eIF4G, eIF4A, y proteínas ribosomales, en estructuras denominadas complejos de replicación (RTC). En contraste, eIF4E no pudo ser detectado en los RTC, ya sea empleando anticuerpos monoclonales o policlonales específicos. Por otra parte Linero y colaboradores han mostrado en experimentos de coimmunoprecipitación, que la nucleoproteína de JUNV o TCRV es capaz de interactuar con la estructura Cap. De acuerdo a esos resultados, los autores han propuesto que la proteína NP podría reemplazar a eIF4E durante la traducción de los ARNm virales (Linero et al., 2013).

En base a esos antecedentes, se investigó si la proteína NP de TCRV participa en el proceso de traducción de los ARNm virales. Así, la

metodología descrita en las secciones precedentes fue utilizada para evaluar la eficiencia de traducción del transcripto salvaje en presencia (o ausencia) de la proteína NP. Células BSR fueron transfectadas con cantidades crecientes del plásmido que expresa la proteína NP (pTCRV-N, Materiales y Métodos) y 4 horas más tarde fueron transfectadas con el ARN 5'wt/3'wt, junto con el ARN REN como control. Por un lado, los lisados celulares fueron analizados para cuantificar la actividad de FLUC y REN y por otra parte, fueron sometidos a un análisis de Western Blot para determinar el nivel intracelular de NP en cada condición (Figura R16A).

Como puede verse en la Figura 16, los resultados mostraron niveles de actividad FLUC determinados en ausencia de NP que fueron comparables a los detectados en presencia de cantidades crecientes de NP. Estos datos indicaron que, en las condiciones experimentales utilizadas, la presencia de NP no afectó la eficiencia de traducción del transcripto.

Para confirmar estos resultados, se intentó evaluar el efecto de la presencia de NP sobre la traducción viral, en el contexto de una infección auténtica con TCRV. Para eso, células BHK-21 fueron infectadas con el virus y 24 horas después fueron transfectadas con el ARNm 5'wt/3'wt. La determinación de actividad FLUC en los lisados celulares obtenidos a las 8 h.p.t., confirmó que la presencia de NP no afecta la eficiencia de traducción del ARNm sintético (Figura R16B). En suma, estos datos sugieren que NP no tendría un papel central en la traducción de los ARNm de TCRV.

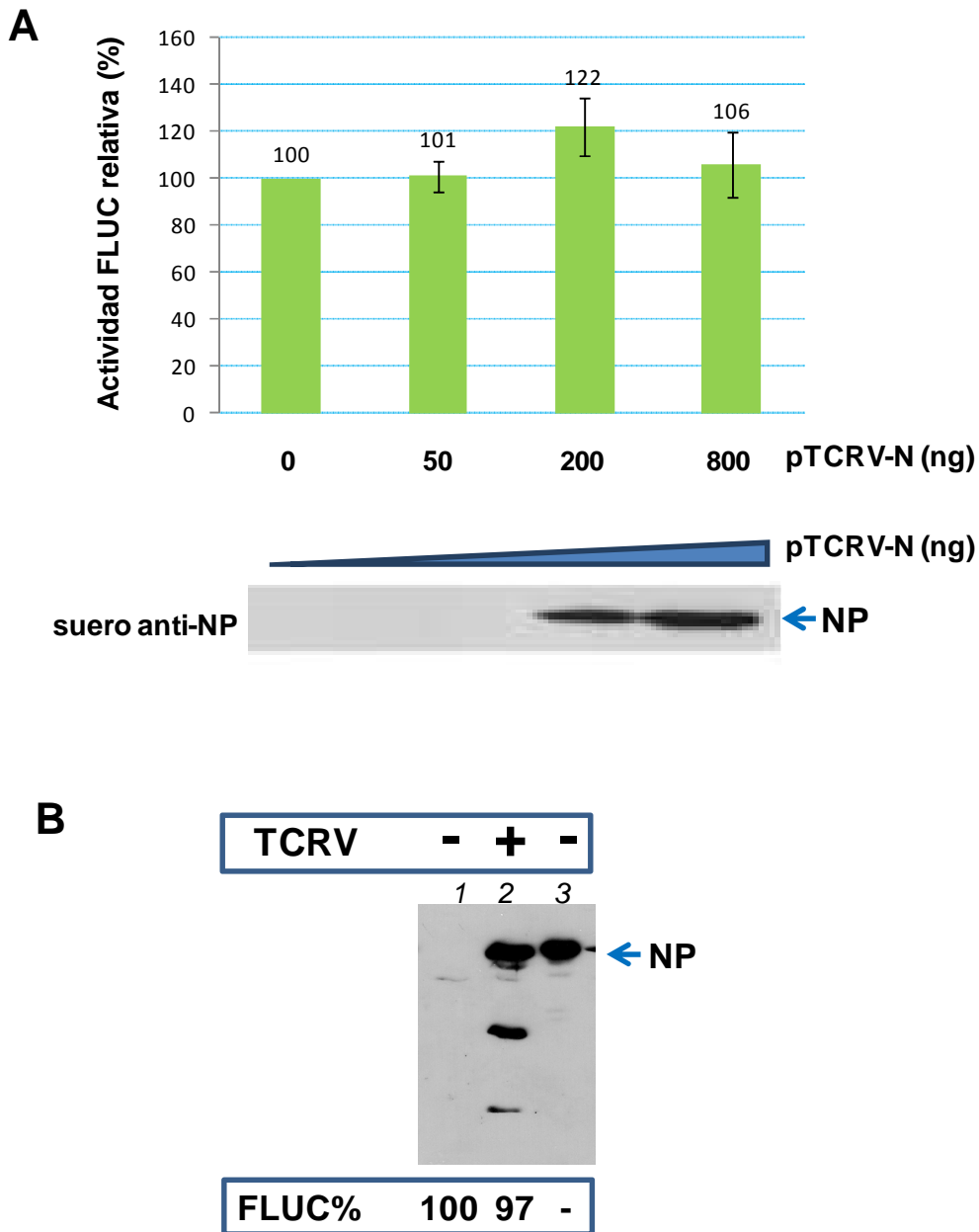


Figura R16. Análisis del requerimiento de la proteína NP para la traducción de los ARNm de TCRV. A). Células BSR fueron transfectadas con las cantidades indicadas del plásmido pTCRV-N o con 800 ng del plásmido pTM1 vacío como control. Cuatro horas más tarde, las células fueron transfectadas con el ARNm 5'wt/3'wt, junto con el ARN control (ARN REN), los lisados celulares fueron obtenidos a las 8 h.p.t. y fueron ensayados para determinar la actividad de FLUC y de REN (Panel superior). Los datos corresponden al promedio de dos experimentos (+/- desviación estándar). El valor obtenido en las células que no expresan NP fue tomado como 100%. Panel inferior: los lisados fueron analizados mediante Western blot, con un anticuerpo anti-NP de TCRV. Se muestra una imagen representativa. B). Células BHK-21 fueron infectadas con TCRV a una multiplicidad de infección de 0,1 unidades formadoras de placas (UFP)/célula (línea 2), o no fueron infectadas (línea 1). A las 24 hs postinfección las células fueron transfectadas con el transcripto 5'wt/3'wt y el control ARN REN, como se indica en Materiales y Métodos. Los lisados celulares, obtenidos a las 8 h.p.t., fueron utilizados para determinar la actividad de FLUC y para evaluar la presencia de NP mediante Western blot, en la forma indicada en (A). Como control, se analizó un lisado de células transfectadas con pTCRV-N (línea 3). Los valores normalizados de actividad FLUC (%) se muestran en la parte inferior de la Figura.

Implicancia de los factores celulares eIF4G y eIF4E en la traducción de los ARNm de arnavirus.

Con el objetivo de contribuir al conocimiento del mecanismo por el cual son traducidos los ARNm de arnavirus, se diseñaron experimentos destinados a evaluar la relevancia de los factores eucariotas de iniciación de la traducción eIF4G y eIF4E en ese proceso.

En primer lugar, se investigó la participación del factor eIF4G utilizando una estrategia que emplea la proteasa 2A de poliovirus (2APro). Esta proteína cliva las isoformas eIF4GI y eIF4GII del factor eIF4G, inactivándolas. En el contexto de la infección por poliovirus, 2APro constituye uno de los elementos que contribuyen a la inhibición de la síntesis de proteínas celulares por parte de esos virus (Gradi et al., 1998). Así, el ARNm salvaje o ARNm mutantes fueron cotransfectados en células BSR junto con un plásmido que expresa 2APro. Los lisados obtenidos a las 8 h.p.t. fueron analizados para cuantificar la actividad FLUC (Figura R17A). Como control, la integridad de eIF4GI en los lisados fue evaluada mediante Western blot.

Como muestra la Figura R17B, el anticuerpo anti-eIF4G reveló una única banda de PM aparente cercano a 250 kDa correspondiente al factor eIF4G en los lisados de las células transfectadas con el plásmido control (líneas 2, 4, 6 y 8). En contraste, el análisis de los lisados de células transfectadas con el plásmido que expresa 2APro, reveló una serie de bandas de PM aparente cercano a los 160 kDa, correspondiente a los productos del clivaje de eIF4GI (líneas 1, 3, 5 y 7). La incubación de la membrana con el anticuerpo anti-actina (panel inferior) permitió confirmar que el gel contenía cantidades equivalentes de muestra en todas las calles.

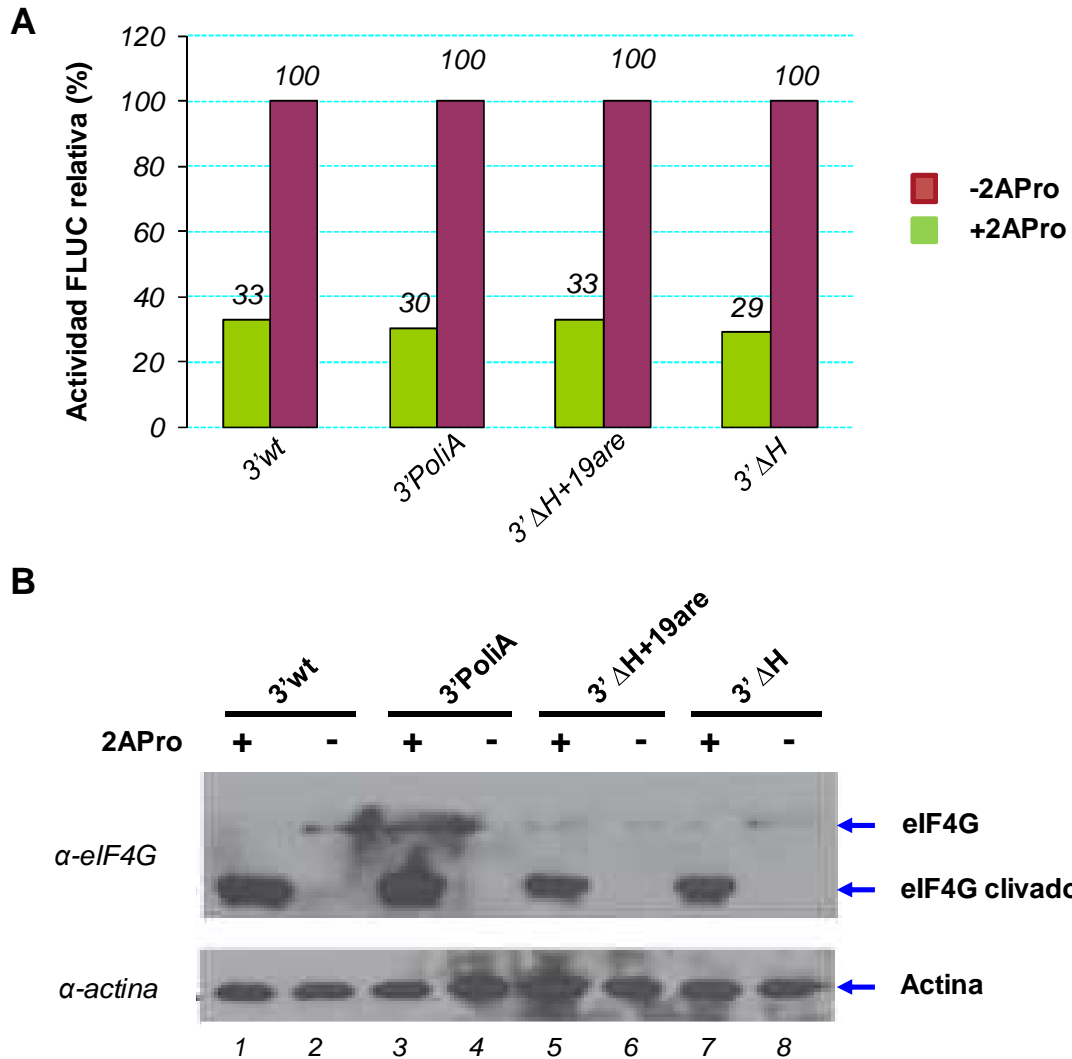


Figura R17. Efecto del clivaje del factor eIF4G sobre la traducción de los ARNm sintéticos. A). Células BSR fueron transfectadas por duplicado con el ARN sintético 5'wt/3'wt (salvaje) o cada uno de los ARN mutantes indicados, junto con un plásmido que expresa la proteasa 2APro de enterovirus (+2APro) o pTM1 vacío como control (-2APro), según se indica. Ocho más tarde, los lisados celulares fueron analizados para cuantificar la actividad relativa de FLUC, como se indica en Materiales y Métodos y en la leyenda de la Figura R4. B). Los lisados de las células transfectadas fueron analizados mediante Western blot utilizando un suero específico anti-eIF4G (panel superior) o un anticuerpo anti-actina, para control de carga del gel (panel inferior). En (A) y (B) los nombres de los transcritos se indican consignando únicamente la característica de la secuencia 3'UTR.

Por otra parte, el análisis de la actividad FLUC en los lisados celulares reveló una disminución cercana al 70% en los niveles de traducción de los ARNm sintéticos en presencia de 2APro, respecto a los niveles detectados en ausencia de la proteasa. Notablemente, el efecto del clivaje de eIF4G se manifestó en niveles comparables tanto para el

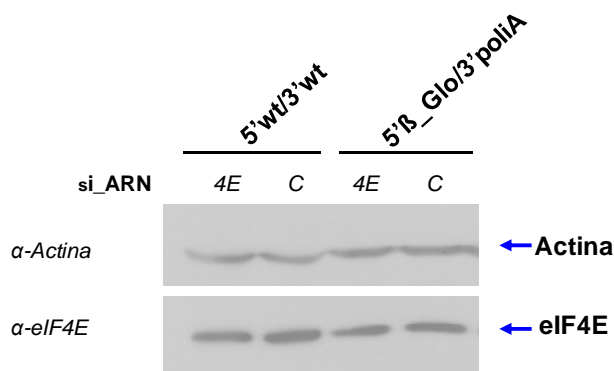
ARNm salvaje (5'wt/3'wt), como para los mutantes que presentan la delección de la secuencia *hairpin* II (5'wt/3' Δ H o 5'wt/3' Δ H+19are) o para el ARNm 5'wt/3'poliA, que presenta la sustitución total de la secuencia 3'UTR por la cola de poliA. Cabe señalar que estos resultados fueron confirmados para el ARNm salvaje, obteniéndose valores de actividad FLUC en presencia de 2APro que fueron 70 a 50% menores a los determinados para el control que no expresa la proteasa (resultados no mostrados). En conjunto, estas observaciones indicaron que la traducción de los transcritos virales es dependiente del factor eucariota eIF4E y que dicha dependencia no está determinada por la presencia del *hairpin* II en el ARNm.

Luego, se abordó el análisis del requerimiento del factor eIF4E para la traducción de los ARNm virales. El plásmido pSuperGFP_4E, que expresa un ARN de interferencia (si_ARN) específico de eIF4E, fue utilizado para disminuir el nivel intracelular de este factor. Como control, se empleó el plásmido pSuper_GFP_TM, el cual expresa un siARN inespecífico que reconoce un ARNm bacteriano (Burgui et al., 2007). En estos experimentos, células humanas HEK-293T fueron transfectadas, en primer lugar, con pSuperGFP_4E o con pSuper_GFP_TM. Dado que ambos plásmidos codifican además para la Proteína Fluorescente Verde (Green Fluorescent Protein-GFP), la eficiencia de la transfección fue evaluada luego de una incubación por 12 horas, mediante la detección de GFP en un microscopio de fluorescencia. En ese punto, el experimento fue proseguido únicamente cuando la eficiencia de transfección resultó cercana o mayor al 70%. A las 36 h.p.t., entonces, las células fueron lavadas exhaustivamente y luego transfectadas con el ARNm 5'wt/3'wt o con el ARNm 5' β _Glo/3'poliA. Doce horas más tarde, las células fueron lisadas, y una alícuota de los lisados celulares fue analizada para cuantificar la actividad FLUC, mientras otra alícuota fue analizada mediante Western blot para cuantificar el nivel intracelular de eIF4E.

Los resultados de experimentos preliminares indicaron un bajo nivel de depleción del factor eIF4E (Figura R18A). A pesar de numerosos intentos en los que se variaron las condiciones experimentales, como la cantidad de plásmido transfectada y el tiempo de incubación previo a la

transfección del ARN (resultados no mostrados), el nivel de depleción intracelular de eIF4E no superó el 20% del total, determinado mediante la cuantificación densitométrica de las imágenes.

A



B

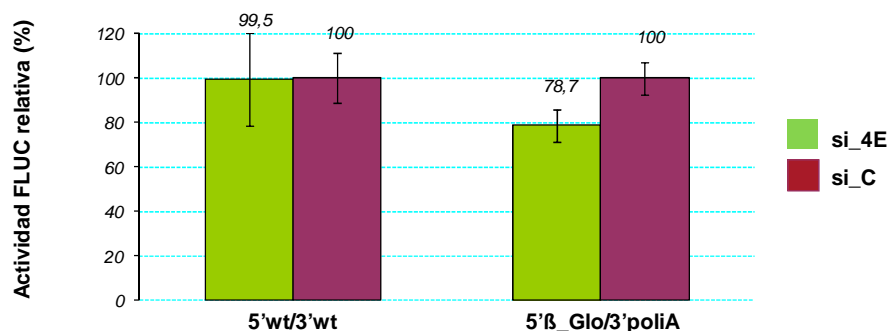


Figura R18. Efecto de la depleción del factor eIF4E sobre la traducción de los ARNm sintéticos. Células HEK-293T fueron transfectadas con 800 ng del plásmido pSuperGFP_4E (si_4E) o del plásmido control pSuper_GFP_TM (si_C), como se indica en Materiales y Métodos. A las 36 h.p.t., las células fueron transfectadas con 450 ng del ARN 5'wt/3'wt o del 5'β_Glo/3'poliA, junto con 75 ng de ARN REN como control. Ocho horas más tarde, alícuotas de los lisados celulares fueron analizadas mediante Western blot utilizando anticuerpos α-eIF4E (A, panel inferior) o α-actina como control de carga del gel (A, panel superior). Se presenta una imagen representativa de los resultados. Una segunda alícuota de los lisados celulares fue utilizada para la determinación de la actividad FLUC, como se indica en la leyenda de la Figura R4 (B). Los datos presentados corresponden al promedio (+/- desviación estándar) de 2 experimentos independientes, realizados por triplicado.

El ARNm 5'β_Glo/3'poliA fue tomado como modelo de un ARNm celular, por lo que se esperaba que, en condiciones de depleción de eIF4E, la actividad FLUC mediada por el mismo resultara disminuida. En concordancia con los bajos niveles de depleción de eIF4E observados, los niveles de actividad FLUC detectados en las células transfectadas con el ARNm 5'β_Glo/3'poliA y el plásmido pSuperGFP_4E no presentaron

diferencias significativas con los de las células control (Figura R18B). En base a estos resultados se concluyó que la metodología utilizada para el silenciamiento de eIF4E es inadecuada. En experimentos futuros, se planea abordar el silenciamiento de eIF4E mediante la utilización de si_ARNs comerciales.

CAPÍTULO II.

**Desarrollo de un sistema para la
generación de TCRV infeccioso a partir
de ADN copia.**

Consideraciones generales.

La generación de virus infeccioso a partir de clones de ADN copia (ADNc), es una herramienta de suma importancia para el estudio de las bases moleculares de la replicación viral. Una de las estrategias usadas con éxito para rescatar virus con genoma a ARN negativo segmentado a partir de clones de ADNc, fue desarrollada inicialmente para el virus Bunyamwera (familia *Bunyaviridae*). La estrategia se basa en la síntesis intracelular de los segmentos de ARN viral complementarios (antigenomas), en ausencia de plásmidos que codifiquen para las proteínas virales, o del uso de virus “colaborador”, lo cual implicaría pasos de selección de los virus generados (Lowen et al., 2004). Un enfoque similar ha permitido el rescate de otros arenavirus (Albarino et al., 2009; Albarino et al., 2011; Lan et al., 2009).

Una consideración importante es que los extremos 5' y 3' de los antigenomas a partir de los cuales se parte, deben ser precisos y predeterminados. Para esto, se han utilizado en general dos sistemas transcripcionales. Uno de ellos involucra un *cassette* que comprende las secuencias especie-específicas del promotor y terminador de la ARN polimerasa I. El otro sistema, más versátil pues es aplicable en todo tipo de línea celular, es el *cassette* T7, que utiliza las secuencias del promotor y terminador de la T7ARNPol, seguido este último de la secuencia de la ribozima del virus de la Hepatitis Delta (HDV) (Bouloy and Flick, 2009).

Sobre la base de esos antecedentes, se diseñó la estrategia empleada para la generación de TCRV infeccioso a partir de ADNc. Básicamente, ésta consistió en la expresión intracelular de los segmentos antigenómicos S y L, a partir de construcciones plasmídicas que utilizan el *cassette* T7 de expresión, en una línea celular (BHK/T7-9) que expresa la T7ARNPol en forma constitutiva.

En este Capítulo se describen los plásmidos utilizados y los experimentos llevados a cabo para el rescate de TCRV recombinante.

Construcción de los plásmidos que expresan los ARN antigenómicos de TCRV.

El primer paso para la obtención del clon infeccioso del virus Tacaribe, implicó la generación de los plásmidos denominados pLag wt y pSag wt (Figuras M4 y M5, Materiales y Métodos) que expresan, respectivamente, la copia complementaria completa del ARN L y del ARN S de TCRV. En ambos casos, el inserto se encuentra clonado aguas abajo del promotor de la T7ARNPol y aguas arriba de la secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV) en el vector pTV2.0 (Pattnaik et al., 1992). La actividad autocatalítica de la ribozima determina el extremo 3' del ARN transcrito por la T7ARNPol. Por lo tanto, los extremos 5' y 3' de los ARN sintetizados a partir de pSag y pLag, corresponden a la de los auténticos ARN antigenómicos. A priori, esta es una condición necesaria para la replicación posterior del ARN viral y eventualmente para su ensamblado en partículas infecciosas. En efecto, reportes previos han demostrado que el último residuo G en el extremo 3' de los segmentos genómicos de arenavirus es absolutamente requerido para promover la síntesis del ARN viral (Hass et al., 2006; Perez and de la Torre, 2003). Por otra parte, se sabe que la eficiencia de corte de la ribozima HDV responde a un patrón C>U>A>G respecto al nucleótido localizado inmediatamente hacia 5' del sitio de clivaje (Perrotta and Been, 1991). En consecuencia, es esperable que el clivaje de ARNs portadores de un residuo G en su extremo 3', sea ineficiente. Por esos motivos, tanto pSag wt como pLag wt fueron modificados por medio de mutagénesis sitio-dirigida (Materiales y Métodos), para introducir un nucleótido (C) extra, no viral, inmediatamente aguas abajo del extremo 3' del correspondiente ARN viral. Se esperaba que esta modificación resultara en un aumento de eficiencia de la ribozima, que daría lugar a un número mayor de moléculas de ARN antigenómicos procesados, con extremos 3' muy similares al de los ARN virales. Los plásmidos resultantes fueron denominados pSag wt_{+C} y pLag wt_{+C}, respectivamente (Figura M6, Materiales y Métodos). La identidad de los insertos fue controlada mediante la secuenciación completa de ambas construcciones.

Puesta a punto de las condiciones para la generación de TCRV infeccioso a partir de ADNc.

Como se mencionó previamente, el sistema de generación de TCRV recombinante se basa en la transfección de pLag wt_{+c} junto con pSag wt_{+c} en células que expresan la T7ARNPol. Hipotéticamente, esto llevaría a la síntesis de niveles basales de NP y L a partir de los ARN antigenómicos inicialmente sintetizados por la T7ARNPol, permitiendo el inicio de la transcripción y replicación (Figura R19). Sin embargo, la posibilidad de que fuera necesario suplementar el sistema con niveles adicionales de proteínas NP y/o L, no podía ser descartada.

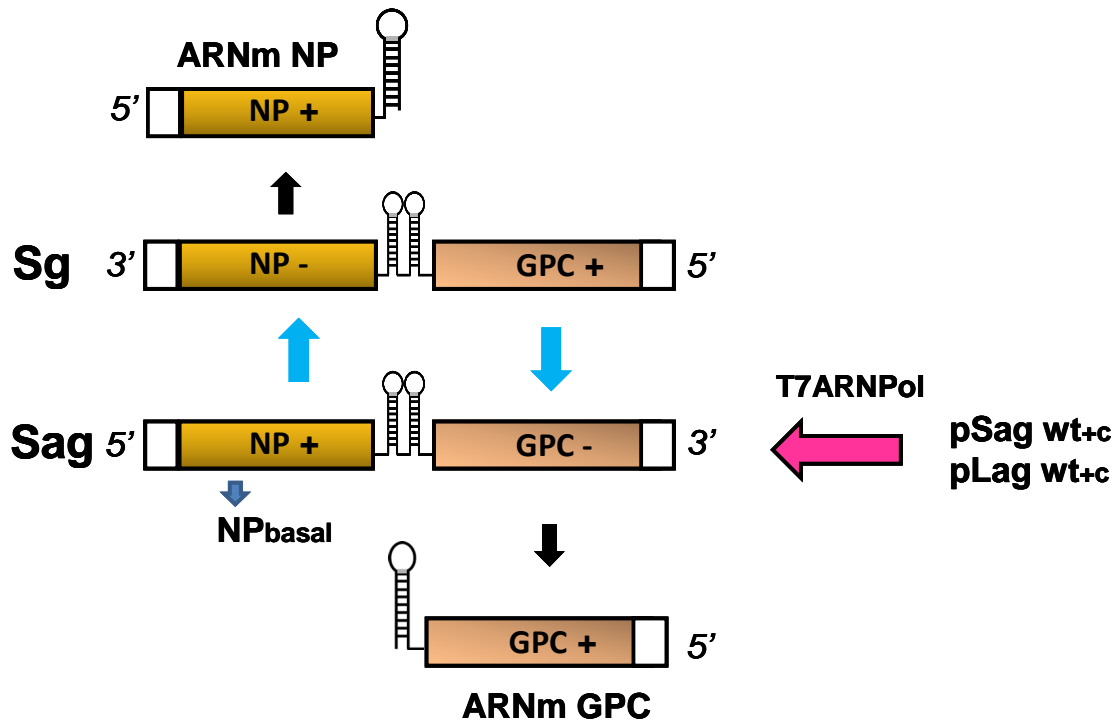


Figura R19. Representación esquemática del funcionamiento del sistema de genética inversa, ilustrado únicamente para el ARN S. En células transfectadas con los plásmidos pSag wt_{+c} y pLag wt_{+c}, los ARN Sag y Lag dirigen la síntesis de niveles basales de NP y L, respectivamente. Estas proteínas inician (a partir del ARN Sag) la transcripción del ARNm GPC y la síntesis del ARN S genómico (Sg). A partir de Sg, son sintetizados el ARNm de NP y nuevo ARN antigenómico Sag. La transcripción y replicación del ARN Lag ocurre en forma similar (no se muestra). Los ARN genómicos son incorporados a las partículas virales que son liberadas al medio extracelular.

Con el objeto de establecer condiciones propicias para obtener TCRV recombinante infeccioso, se generaron construcciones adicionales basadas en el plásmido pSag wt_{+C}, que facilitarían la detección de los productos de la transcripción y replicación de los ARN antígenómicos. Por un lado, se construyó el plásmido pSag GFP_{+C}, que contiene el gen de la proteína verde fluorescente GFP en remplazo del gen GPC. Por otra parte, el plásmido pSag CHERRY_{+C}, que contiene el gen de la proteína roja fluorescente (CHERRY) en remplazo del gen NP. Además, con el fin de contar con un control negativo en los subsiguientes experimentos de rescate de virus recombinante, se generó el plásmido pLag pol(-)_{+C}, que contiene la secuencia codificante para una mutante de la proteína L que no presenta actividad polimerasa (Materiales y Métodos).

Los plásmidos pSag GFP_{+C} y pSag CHERRY_{+C} fueron utilizados como herramienta para la puesta a punto de las condiciones de transfección que, con mayor probabilidad, permitieran la generación de TCRV recombinante. En la primera serie de experimentos, células BHK/T7-9 fueron transfectadas con pSag GFP_{+C} y pLag wt_{+C}. En paralelo, para evaluar el eventual requerimiento de niveles intracelulares de la proteína L por encima de los basales, ambos plásmidos fueron transfectados junto con el plásmido pTCRV-L (Materiales y Métodos). Como control, pSag GFP_{+C} fue transfectado junto con el plásmido pLag pol(-)_{+C}. La expresión de GFP fue evaluada mediante la observación de los cultivos en un microscopio de fluorescencia (Figura R20).

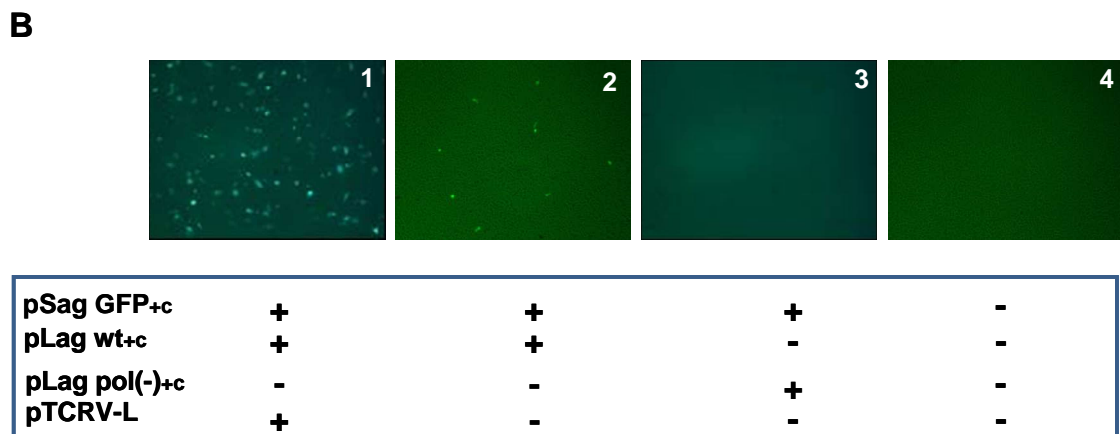
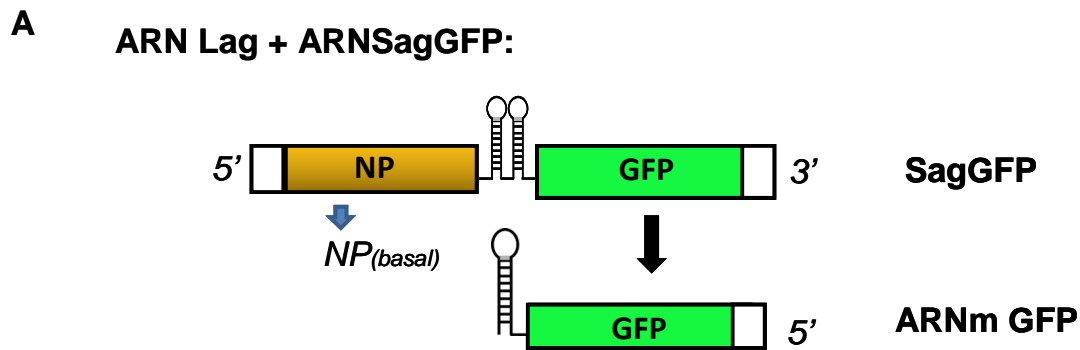


Figura R20. Puesta a punto de la metodología para el rescate de TCRV recombinante. A) Esquema de la síntesis de ARNm GFP a partir del ARN SagGFP. B) Células BHK/T7-9 en placas de 24 pocillos fueron transfectadas con 1µg del plásmido pSag GFP_{+c} junto con 0,5 µg de pLag wt_{+c}, o como control, con 0,5 µg de pLag pol(-)_{+c}, en presencia o ausencia de 50 ng de pTCRV-L, según se indica. Las células fueron observadas a las 48 h.p.t. mediante microscopio invertido de fluorescencia (aumento 20X).

Como puede observarse en la Figura R20B, los resultados mostraron la acumulación de GFP en las monocapas celulares transfectadas con pSagGFP_{+c} y pLag wt_{+c}, detectándose un mayor número de células positivas por campo en aquellas que fueron cotransfectadas con pTCRV-L, respecto a lo observado en ausencia de L suplementaria (comparar paneles 1 y 2). Como se esperaba, el nivel de fluorescencia en las células transfectadas con pSagGFP_{+c} y pLag pol(-)_{+c} (Panel 3) fue comparable al detectado en células no transfectadas (panel 4). Estos resultados indicaron que el sistema es capaz de transcribir el ARNm GFP (ver Figura R20A).

Experimentos similares, en los que se evaluaron diferentes cantidades y proporciones de los plásmidos pSag GFP_{+C}, pTCRV-L y pLag wt_{+C}, en presencia o ausencia del plásmido que expresa la proteína NP (pTCRV-NP), permitieron definir que la coexpresión de NP no resulta en un aumento del número de células fluorescentes, así como a determinar las cantidades de 1,2 µg de pSag GFP_{+C}, 20 ng de pTCRV-L y 0,65 µg de pLag wt_{+C} por pocillo de placa de 24 pocillos, como óptimas para la expresión de GFP (resultados no mostrados). Esas condiciones fueron utilizadas en los ensayos subsiguientes.

Los experimentos descritos en el punto anterior permitieron comprobar que el sistema sustenta la primera ronda de transcripción del ARN antigenómico Sag, y presumiblemente la del ARN Lag. Para poder determinar si el sistema es capaz de mediar el ciclo de replicación completo de los ARN antigenómicos, debíamos poder verificar específicamente que el ARN genómico y el ARNm derivado del mismo fueron sintetizados. Para eso, los plásmidos pSag GFP_{+C} y pLag wt_{+C} (o pLag pol(-)+_C como control), fueron transfectados en células BHK/T7-9 en las cantidades previamente determinadas, junto con 1,2 µg de pSag CHERRY_{+C}. La observación de las células al microscopio de fluorescencia permitió detectar proteína CHERRY en las células transfectadas con pSag GFP_{+C} y pSag CHERRY_{+C} en presencia de proteína L activa (Figura R21B, Panel 1). Como se esperaba, la proteína CHERRY no fue detectada en las células control, que expresaban la versión inactiva de la proteína L (Figura R21B, Panel 2).

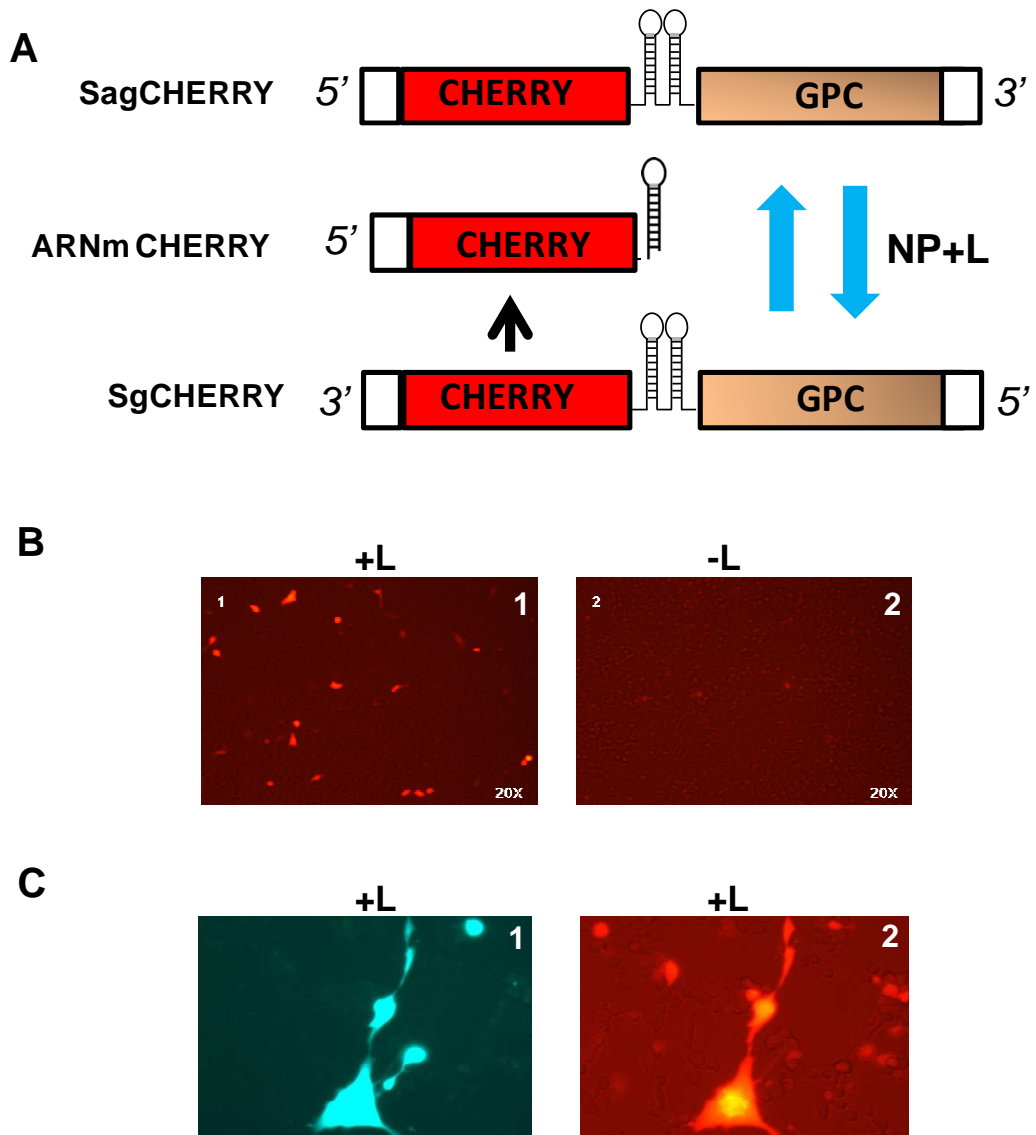


Figura R21. Puesta a punto de la metodología para el rescate de TCRV recombinante. A). Representación esquemática de la síntesis del ARNm CHERRY, la cual requiere síntesis previa del ARN genómico Sg de cadena completa (replicación). B). Células BHK/T7-9 fueron transfectadas con los plásmidos pSag GFP_{+C} y pSag CHERRY_{+C} junto con pLag pol(-)+c (Panel 2) o con pLag wt_{+C} y pTCRV-L (Panel 1). Las células fueron observadas a las 72 h.p.t. mediante microscopio invertido de fluorescencia (aumento 20X). C) Células BHK/T7-9, transfectadas en las condiciones indicadas para el panel 1 (B). La imagen fue tomada con un aumento 40X, con el filtro correspondiente a verde (GFP, panel 1) o rojo (CHERRY, panel 2).

Asimismo, la observación al microscopio de fluorescencia permitió detectar tanto la presencia de GFP como de CHERRY en algunas de las células transfectadas (Figura R21C). Estos resultados indicaron que el ARN antigenómico fue replicado por la proteína L, dando lugar al ARN genómico Sg CHERRY, el cual fue a su vez usado como template

para la transcripción del ARNm CHERRY (Figura R21A). En conjunto, los ensayos confirmaron que en las condiciones experimentales establecidas, el sistema permite el ciclo completo de transcripción y replicación de los ARN sintetizados a partir de los plásmidos transfectedados. Estas condiciones fueron por lo tanto empleadas para realizar los ensayos de generación de virus Tacaribe recombinante que se describen a continuación.

Rescate de TCRV a partir de ADNc.

Sobre la base de los resultados obtenidos previamente, a continuación se intentó lograr la producción de TCRV recombinante (TCRVrec). Células BHK/T7-9 fueron transfectedadas con pSag wt_{+C} y pLag wt_{+C} junto con pTCRV-L en las cantidades establecidas previamente. Como control, las células fueron transfectedadas en paralelo con pSag wt_{+C} y pLag pol(-)_{+C}. Luego de 72 hs de incubación, los sobrenadantes de las células transfectedadas fueron colectados (P0) y diluidos al medio, para ser luego inoculados sobre células BHK-21 cultivadas en placas de 12 pocillos. Los sobrenadantes de estas células (P1) fueron colectados a los tres días post-infección (p.i.) y fueron luego usados para inocular nuevamente células BHK-21, cultivadas en botella de 25 cm². Este procedimiento fue repetido hasta el pasaje 4 (P4). Como control, se procedió de la misma manera con el sobrenadante de las células transfectedadas en paralelo con pSag wt_{+C} y pLag pol(-)_{+C}. La presencia de partículas virales infectivas en los sobrenadantes colectados en cada etapa fue evaluada mediante titulación de virus con el método de Placas de Lisis en células Vero. La Figura R22 y la Tabla R2 muestran los resultados de dos experimentos independientes.

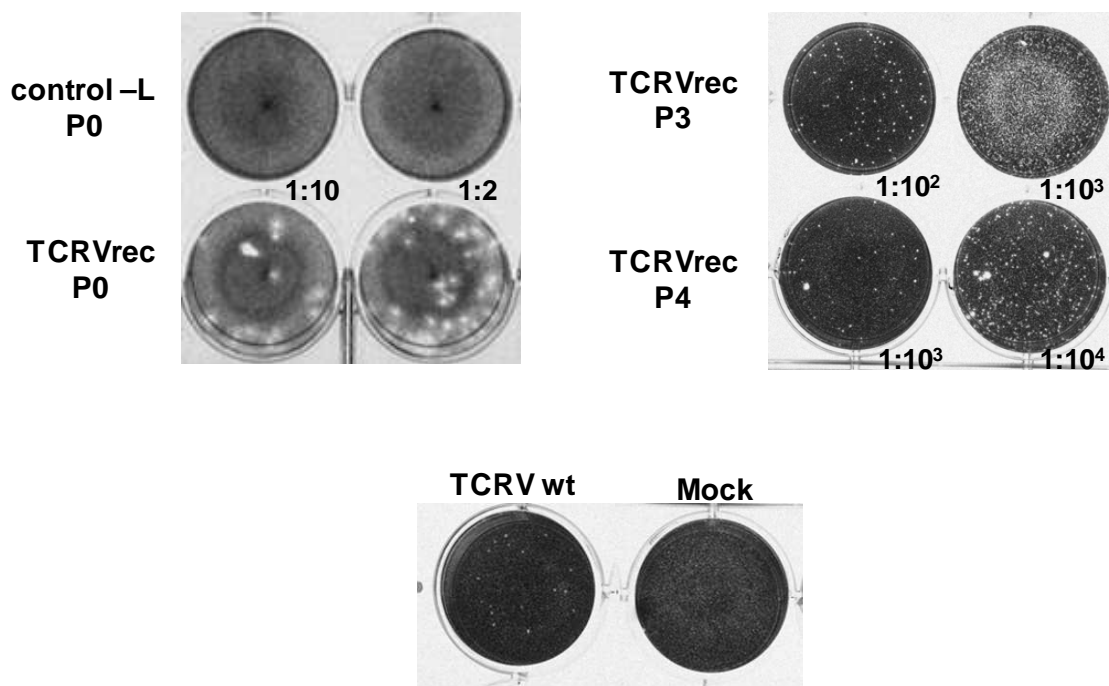


Figura R22. Titulación de TCRV recombinante generado en el experimento 1. Células BHK/T7-9 fueron transfectadas con pSag wt_{+c}, pTCRV-L y pLag wt_{+c} (TCRVrec) o con pSag wt_{+c} y pLag pol(-)_{+c} (control -L). Los sobrenadantes de las células transfectadas, colectados a los 3 d.p.i. (P0), o los pasajes P3 y P4 en células BHK-21, fueron titulados mediante el método de placas de lisis. Se muestra el control de células no infectadas (Mock), y el control de infección con TCRV salvaje (TCRV wt). Debajo de cada pocillo, se indica la dilución de inóculo utilizada. Las imágenes corresponden a titulaciones independientes.

En el primer experimento pudo detectarse virus en el sobrenadante P0 de las células transfectadas, con un título de 10^2 UFP por ml. Como se esperaba, no se detectó virus infectivo en los sobrenadantes de las células transfectadas con pSag wt_{+c} y pLag pol(-)_{+c} (Figura R22, control -L). El stock viral fue amplificado luego de 4 pasajes de los sobrenadantes en células BHK-21, obteniéndose un título final de 10^6 UFP/ml. El fenotipo de las placas de lisis producidas por los pasajes P3 y P4 de TCRVrec fue similar al de las placas del TCRV wt, titulado en paralelo (Figura R22).

En el segundo experimento, células BHK/T7-9 fueron transfectadas en la forma indicada anteriormente. La amplificación del sobrenadante P0 fue realizado en paralelo sobre células BHK-21 y BHK/T7-9, cultivadas en botella de 25 cm². Los resultados mostraron un máximo título viral

registrado en los pasajes 1 y 2, amplificados en células BHK-21 (Tabla R2).

Tabla R2. Titulación de los sobrenadantes obtenidos en el proceso de generación de TCRV recombinante.

	EXP 1	EXP 2a	EXP2b
P0	$1,0 \times 10^2$	ND	
P1	NT	$3,2 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$
P2	NT	$2,0 \times 10^5$	$5,7 \times 10^3$
P3	$1,0 \times 10^5$	NR	$2,8 \times 10^4$
P4	$1,0 \times 10^6$	NR	$8,0 \times 10^3$

Exp1- En el experimento 1, el sobrenadante P0 fue inoculado en células BHK-21. Todas las amplificaciones subsiguientes fueron realizadas también en células BHK-21.

Exp2^a-Experimento 2a. Los sobrenadantes P1 y P2 fueron obtenidos luego de la inoculación de células BHK-21.

Exp2^b-Experimento 2b. La amplificación de P0 (P1) fue llevada a cabo en células BHK/T7-9; las subsiguientes amplificaciones en células BHK-21.

ND: indetectable. NT: no testeado. NR: no realizado.

Cabe señalar que las titulaciones de TCRV salvaje fueron separadas espacial y temporalmente de los experimentos de transfección y amplificación presentados en la Figura R22 y Tabla R2. Si bien resta confirmar la identidad molecular de los virus amplificados, los resultados sugieren fuertemente que el sistema desarrollado en este trabajo de Tesis es capaz de dirigir la generación de TCRV recombinante. Esta es una herramienta fundamental que abre la posibilidad de realizar futuros estudios sobre las señales involucradas en el proceso de traducción en el contexto de una infección viral auténtica.

CONCLUSIONES y DISCUSIÓN

Elementos involucrados en la traducción de los ARN mensajeros del arenavirus Tacaribe.

Como se menciona en Introducción, durante la traducción dependiente de Cap en organismos eucariotas, el complejo de iniciación eIF4F reconoce la estructura Cap en el extremo 5' del ARNm. Este complejo participa en el desenrollamiento de la región del ARNm proximal al Cap permitiendo la unión del complejo 43S, que comprende la subunidad ribosomal 40S, el ARNt iniciador y los factores eIF2-GTP, eIF3, eIF1 y eIF1A, para formar el complejo 48S. Esta etapa es crítica, representando un punto de control, que es mediado por la fosforilación de eIF2a por quinasas específicas (Gale et al., 2000; Jackson et al., 2010). Otros factores que afectan la eficiencia de traducción incluyen la longitud y complejidad estructural de las secuencias 5' y 3' no traducibles, la posición y contexto del codón iniciador AUG, y la estabilidad y accesibilidad tanto del Cap como del complejo de unión al Cap (Gale et al., 2000; Jackson et al., 2010).

Los virus dependen de la maquinaria celular para la traducción de las proteínas esenciales para su replicación y han desarrollado diversas estrategias para tomar control de la misma. Así, los virus pueden controlar los pasos de iniciación, la elongación o la terminación mediante interacciones con los diferentes factores intervinientes. En cuanto a estrategias utilizadas para el control del ensamblaje del complejo eIF4F, por ejemplo, algunos virus impiden la traducción del hospedador removiendo elementos clave como la estructura Cap o el factor eIF4G, o inactivando el complejo eIF4F a través de proteínas de unión al mismo (Walsh and Mohr, 2011). Las proteasas de enterovirus, retrovirus y calicivirus clivan el factor eIF4G. Sin embargo, la inhibición de la traducción dependiente de Cap no bloquea la traducción de los ARNm virales, debido a que muchos virus a ARN poseen sitios internos de entrada de ribosomas (IRES) que dirigen la traducción independiente de Cap (Guerrero et al., 2015; Walsh and Mohr, 2011). Algunos virus que carecen de cola de poliA, utilizan un mecanismo que involucra la interacción de los extremos 5' y 3' para la estimulación de la traducción

de las proteínas virales. Por ejemplo, la estimulación de la traducción de rotavirus se asocia a la interacción de la proteína viral NSP3 con una secuencia consenso en la región 3' no traducible que sustituye funcionalmente a la cola de poliA (Piron et al., 1998; Vende et al., 2000).

Escasos son los antecedentes acerca de la estrategia que utilizan los arenavirus para controlar la traducción de sus ARNm, los cuales, como se describe en Introducción, son subgenómicos, poseen estructura Cap en el extremo 5' y carecen de cola de poliA en el extremo 3'. Trabajos previos habían demostrado que stocks de TCRV, preparados en condiciones tales que la proporción de partículas defectivas interferentes (DI) respecto a las partículas formadoras de placas (o partículas estándar) es baja, son capaces de inducir la inhibición de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos celulares, en presencia de síntesis activa de las proteínas virales. Por el contrario, los stocks enriquecidos en DI no inhiben las funciones celulares (Lopez and Franze-Fernandez, 1985). Sin embargo, la naturaleza de las partículas DI es desconocida, y la forma en que las partículas estándar de TCRV toman control de la maquinaria celular no ha sido explorada.

Por otra parte, la inhibición de la traducción celular en respuesta a estímulos tales como la infección viral es mediada por la fosforilación y consecuente inactivación de la subunidad alfa de eIF2 (eIF2a). Asociada a la inhibición de la traducción, se da la formación de gránulos de estrés (Stress Granules, SG) citoplasmáticos, estructuras donde son reclutados ARNm poliadenilados y factores de iniciación de la traducción como eIF3; eIF4E y eIF4G entre otros. En relación a este proceso, se ha reportado que la infección aguda con el virus Junín se asocia con la inhibición de la fosforilación de eIF2a y la formación de SG, especulándose que ésta podría representar una estrategia viral para tener acceso a los factores de traducción que de otro modo quedarían secuestrados en los SG (Linero et al., 2011).

En resumen, al inicio de este trabajo de Tesis, eran escasos los datos sobre la estrategia utilizada por los arenavirus para dirigir la traducción de sus ARNm sobrepasando la competencia representada por los ARNm celulares.

El objetivo general de este trabajo fue caracterizar los elementos involucrados en la traducción de los ARNm de TCRV, como modelo de los Mammarenavirus del Nuevo Mundo. En la primera parte, el trabajo se enfocó en la elucidación del rol de las secuencias no codificantes 5' y 3' de los ARNm virales en su traducción. La región 3' no traducible, tanto en el ARNm de NP como en los restantes ARNm de arenavirus, presenta una secuencia que permite predecir la formación de una estructura secundaria de tipo *hairpin* muy estable (*hairpin* II, Figura R6). En el ARNm NP de TCRV, además, el análisis bioinformático predice un segundo *hairpin* conservado, mucho menos estable que el primero, ubicado en forma proximal al codón de terminación (*hairpin* I, Figura R6). Los resultados indicaron que el transcripto 5'wt/3' Δ H, que posee una delección que elimina la totalidad del *hairpin* II, presenta una eficiencia de traducción reducida a niveles que corresponden a 35% de los observados para el transcripto salvaje. Dado que la delección no representa una desventaja aparente en la estabilidad del mensajero, estos resultados sugirieron que la región 3' no traducible de los ARNm virales, y particularmente la secuencia *hairpin* II, podría ser esencial para la traducción (Figuras R4 y R5).

El análisis de los efectos de una serie de mutaciones en la región 3' no codificante reveló que, independientemente de su longitud, la composición de bases y la estabilidad de las estructuras secundarias predichas en la región parecen determinar la eficiencia de traducción de los ARNm. Así, los ARNm cuya región 3' no codificante es potencialmente poco estructurada mediaron niveles de traducción mayores a los dirigidos por ARNm con secuencias 3'UTR que se plegarían en estructuras secundarias más estables (comparar 5'wt/ Δ H+19are, 5'wt/his y 5'wt/3'HII_mut3 con 5'wt/3'UNS, 5'wt/ Δ H+19T y 5'wt/3'HII_mut1, Tabla R1, Figura R9 y Figura D1). En conjunto, los datos obtenidos con las mutantes por sustitución de la secuencia *hairpin* II sugieren que la estructura secundaria de la región y/o su contenido en residuos G/C juega un papel modulador de la traducción.

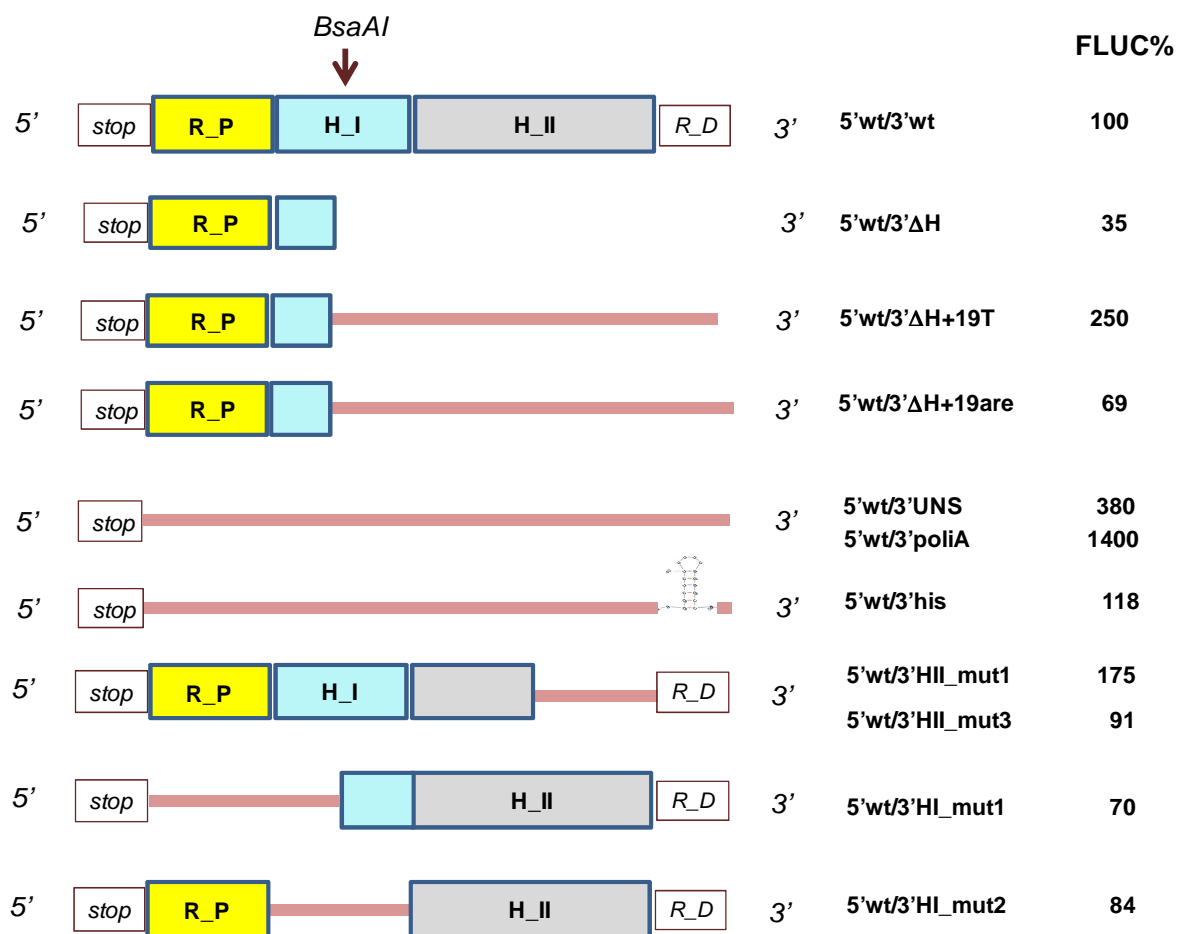


Figura D1. Representación esquemática de la región 3' no traducible del ARNm salvaje (5'wt/3'wt) y de los mutantes indicados. En cada esquema, se indica la posición del codón de terminación del ORF FLUC (stop), la secuencia proximal (R_P), las estructuras *hairpin* I (H_I) y *hairpin* II (H_II) y la secuencia distal (R_D). La posición correspondiente al sitio de corte para la enzima *BsaAI* se señala con la flecha vertical. La línea rosa representa la secuencia mutada. FLUC%: valores promedio de actividad FLUC (Resultados).

Por otra parte, la modificación de la posición del *hairpin* II respecto al codón stop no tuvo efecto sobre la traducción (Figura R11). Esa observación concuerda con otros datos que indicaron que la longitud de la secuencia 3' UTR no es determinante en ese proceso. Por ejemplo, el transcripto 5'wt/3'RIG (Figura R4), cuya secuencia 3' UTR tiene una longitud de 124 nts., exhibió una menor eficiencia de traducción, y el transcripto 5'wt/3' Δ H+19T, con una región 3' no traducible 20 nts. más corta, medió niveles 2,5 veces mayores respecto al ARNm salvaje (Tabla R1). Sin embargo, sería necesario analizar la eficiencia de traducción de mutantes con deleciones menores a la que presenta el ARNm 5'wt/3' Δ H

para descartar la posibilidad de que exista una longitud crítica (mayor a 23 y menor a 54 nt) del 3'UTR requerida para la traducción de los ARNm virales.

En contraste con las observaciones precedentes, que parecen indicar una función represora de la traducción para el *hairpin* II, la sustitución de los 20 nts. proximales al codón stop causó una reducción significativa en los niveles de detección del gen reportero (Figura R11). Estos datos señalan el requerimiento de la secuencia proximal en el proceso de traducción. Notablemente, la región 3' no codificante de los ARNm de NP y GPC contiene dos tramos de polipirimidinas, conservados en los Mammarenavirus del Nuevo Mundo, uno de los cuales se sitúa en la región proximal al codón stop (Figura D2). Este tipo de motivo es reconocido por la proteína de unión a tramos de polipirimidina (PTB/PTBP1/hnRNPI), una proteína de unión a ARN que regula varias etapas de la expresión génica (Kafasla et al., 2012; Keppetipola et al., 2012; Ray et al., 2013; Sawicka et al., 2008). Aunque no se dispone de evidencia que demuestre la interacción de ésta u otra proteína celular con la región 3' no codificante de los ARNm de arenavirus, es interesante notar que uno de esos motivos está afectado en el ARNm 5'wt/3'HI_mut1, cuya eficiencia de traducción es 30% menor a la del ARNm salvaje (Figura R10). La estructura secundaria predicha en la región 3' no traducible de este ARNm mutante es muy estable (ΔG : -48 kcal/mol, Figura D2). Una estructura muy similar se predice en la secuencia 3'UTR del ARNm 5'wt/3'HI_mut2. Este transcripto, que conserva el tramo proximal de polipirimidinas pero porta la mutación de la secuencia *hairpin* I, media niveles de traducción de FLUC superiores a los observados para 5'wt/3'HI_mut1 (Figura R10). Esta observación apoyaría la idea de que, más que la estructura secundaria, la influencia estaría dada por la secuencia de la región proximal, y que la secuencia *hairpin* I no tendría un papel relevante en traducción.

transcripto celular (ARNm 5' β _glo/3'poliA) fue traducido en niveles relativos muy inferiores a los mediados por el ARN 5'wt/3'poliA (Tabla R1 y Figura R15A). Estos datos sugieren fuertemente que la región 5' no codificante de los ARNm de TCRV contienen elementos de secuencia o estructura que estimulan la traducción.

A pesar que la presencia de la estructura Cap en los ARNm de arenavirus sugiere un mecanismo de iniciación Cap-dependiente, que implicaría la participación de eIF4E, reportes previos sugerían un mecanismo alternativo independiente del mencionado factor (Baird et al., 2012; Linero et al., 2013). En estudios sobre TCRV en células infectadas, se ha demostrado la formación de complejos citoplasmáticos de replicación, donde se localiza mayoritariamente la proteína NP y hay síntesis de ARN genómico viral *de novo*. Estos complejos se asocian a phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) y a los factores eIF4E y eIF4G, entre otras proteínas celulares. Sin embargo, la presencia de ARNm virales en dichos complejos no ha podido ser demostrada (Baird et al., 2012). Por otra parte, resultados obtenidos para el virus Junín y TCRV han demostrado que la multiplicación viral no es afectada por la depleción o inactivación del factor eIF4E. Estos estudios han mostrado, además, que la proteína NP coimmunoprecipita con eIF4A y eIF4G pero no con eIF4E; y que cuando se incuban lisados de células infectadas con complejos resina-Cap, NP es retenida junto con eIF4A y eIF4E. Esos datos sugieren que NP podría interactuar, directa o indirectamente, con la estructura Cap (Linero et al., 2013). Por otra parte, una estructura cristalina de NP purificada de virus Lassa, obtenida en ausencia de ARN, predijo la presencia de un bolsillo de unión a Cap en el dominio amino-terminal (Qi et al., 2010). No obstante, los intentos de cocrystalizar NP con el análogo de Cap (m7GTP) fueron infructuosos (Hastie et al., 2011; Qi et al., 2010); y estudios realizados con LCMV demostraron que, contrariamente a lo observado para TCRV, los complejos de replicación se asocian tanto con eIF4A y eIF4G, como con eIF4E, pero ninguna de esas proteínas coimmunoprecipita con NP, sugiriendo que NP no reemplazaría a eIF4E en la iniciación de la traducción de los ARNm virales (Knopp et al., 2015).

Un segundo objetivo de este trabajo fue entender cuál es la participación de los factores celulares eIF4E y eIF4G, así como la contribución de proteínas virales en la traducción. Los experimentos presentados en el Capítulo I muestran que el nivel de actividad FLUC mediado por el transcripto 5'wt/3'wt salvaje fue 340 veces mayor que el determinado para el ARN 5'wt/3'wt desprovisto de Cap, sugiriendo la dependencia de la estructura 5'Cap para la traducción de los ARNm de TCRV (Figura R4). Los resultados mostraron, además, niveles de actividad FLUC determinados en ausencia de NP que fueron comparables a los detectados en presencia de cantidades crecientes de NP. Este hallazgo fue confirmado cuando se evaluó el efecto de NP sobre la traducción en el contexto de una infección auténtica con TCRV (Figura R16), indicando que la presencia de NP o de otras proteínas virales no afecta la eficiencia de traducción del ARNm viral.

Por otra parte, el análisis reveló que la coexpresión de la proteasa 2A de enterovirus reduce los niveles de traducción de los ARNm sintéticos. Estos resultados concuerdan con resultados obtenidos por otros investigadores para el virus Junín (Linero et al., 2013), e indican que la traducción de arenavirus es dependiente de eIF4G.

La dependencia de la estructura Cap y del factor eIF4G podría implicar a su vez la participación de eIF4E y de algún otro factor celular que permitiera la circularización de los transcriptos mediante su unión a algún elemento en la región 3' no traducible. Si bien la participación (o no) de eIF4E no ha podido ser establecida aun, el hecho de que el reemplazo de la secuencia 3'UTR del mensajero viral por una cola de poliA cause una fuerte estimulación de la traducción (Tabla R1), sugiere un mecanismo alternativo al utilizado por los ARNm poliA+, que eventualmente involucraría la unión a factores celulares diferentes a la PABP. En ese sentido, es interesante notar que en presencia de la proteína 2APro, niveles comparables de inhibición (70%) fueron exhibidos tanto por el ARNm salvaje (5'wt/3'wt), como por los mutantes que carecen del *hairpin* II (5'wt/3' Δ H o 5'wt/3' Δ H+19are) o para el ARNm 5'wt/3'poliA, que presenta la sustitución total de la región 3' no codificante por la cola de poliA (Figura R17). Estos resultados indican que el *hairpin* II no tiene

influencia sobre la función de eIF4G1, lo que podría implicar que no interviene en una hipotética interacción entre la región 3' no traducible de los transcritos virales con el mencionado factor.

La etapa de iniciación de la traducción es un paso crítico limitante y el grado en que diversos ARNm dependen de los niveles intracelulares de eIF4F ha sido asociado a la estructura secundaria de sus 5'UTR (Walsh and Mohr, 2011). Varios ejemplos existen de virus que, a pesar de portar estructura Cap en el extremo 5' de sus ARNm, utilizan estrategias de traducción que exhiben una baja dependencia del factor eIF4E. Esos ejemplos incluyen virus influenza (Burgui et al., 2007), y hantavirus (Mir and Panganiban, 2008). El virus del dengue (DENV) y otros flavivirus contienen Cap en el extremo 5' de sus genomas, los cuales son traducidos mediante un mecanismo dependiente de Cap. No obstante, se ha reportado que la traducción de DENV ocurre eficientemente bajo circunstancias en las que la traducción celular es suprimida a través de la depleción de eIF4E, proponiéndose un modelo de alternancia entre un mecanismo canónico y un mecanismo no canónico en condiciones de bajo nivel intracelular de eIF4E (Edgil and Harris, 2006). Tales condiciones involucrarían por ejemplo un escenario de respuesta antiviral mediada por interferón (Gil et al., 1999), o de infección de células mieloides o dendríticas (Grolleau et al., 1999; Krichevsky et al., 1999), reconocidas como blanco primario de la infección tanto de DENV como de arenavirus. Asimismo, trabajos más recientes han informado que la ARN helicasa DDX3 interactúa con la secuencia 5'UTR del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1), así como con eIF4G y PABP promoviendo la iniciación de la traducción del ARN genómico viral (Soto-Rifo et al., 2012). En ese proceso, el ARN genómico de HIV-1 parece localizarse en gránulos citoplasmáticos junto con DDX3, eIF4G y PABP, pero no con CBP20/80 o eIF4E (Soto-Rifo et al., 2013). Experimentos *in vitro* han revelado que DDX3 puede unirse a la estructura m7G-Cap independientemente de eIF4E, por lo que los autores han concluido que DDX3 sustituye a eIF4E para estimular la iniciación de la traducción del ARNm no procesado de HIV-1 en compartimientos especializados (Soto-Rifo et al., 2013).

En cuanto a los arenavirus, sería necesario contar con evidencias suplementarias a las disponibles actualmente para descartar la posibilidad de que, bajo condiciones de baja disponibilidad de eIF4E, un mecanismo de traducción alternativo fuera utilizado por estos virus. En ese escenario, NP eventualmente podría desempeñar un rol en la traducción de los ARNm virales, que no ha podido ser evidenciado hasta el momento. Queda abierta la pregunta, de si la secuencia *hairpin II*, aparentemente desventajosa en lo referente al proceso de traducción, juega un papel importante en un escenario de bajos niveles intracelulares de eIF4E.

Desarrollo de un sistema para la generación de TCRV infeccioso a partir de ADN copia.

Los sistemas de genética reversa que permiten la generación de virus recombinantes han sido desarrollados para una amplia variedad de virus, demostrando su utilidad en varios aspectos tanto básicos como aplicados. En particular, estos sistemas han permitido abordar el análisis profundo de los determinantes de atenuación. En el caso de los arenavirus, trabajos recientes muestran que el reemplazo de la RIG en el segmento L por la del segmento S permite generar LCMV recombinante que resulta altamente atenuado *in vivo* y capaz de inducir la protección contra una descarga letal de virus salvaje. Estos resultados llevaron a hipotetizar que el intercambio entre segmentos altera la eficiencia de traducción, por lo que los autores han propuesto que la manipulación de la eficiencia de traducción de los genes virales puede ser una herramienta para la generación de virus recombinantes con determinantes de atenuación precisos (Cheng et al., 2015; Iwasaki et al., 2015).

En este trabajo de Tesis se generaron las herramientas necesarias que permiten la obtención de TCRV infeccioso (clon infeccioso) a partir de plásmidos recombinantes. Mediante la utilización de construcciones con genes reporteros de proteínas fluorescentes, se establecieron las cantidades y proporciones óptimas de los plásmidos a transfectar,

orientadas a obtener el máximo rendimiento de TCRV recombinante infeccioso. Los resultados demostraron que el sistema desarrollado en este trabajo de Tesis dirige la generación de TCRV recombinante. Esta es una herramienta fundamental que abre la posibilidad de realizar futuros estudios sobre las señales involucradas en el proceso de traducción en el contexto de una infección viral auténtica. Dado que no toda modificación resulta en la disminución en el nivel de expresión de los genes virales, como lo demuestran los datos obtenidos con algunos de los transcritos sintéticos (Capítulo I), el análisis detallado de la función de las secuencias no codificantes puede contribuir a evitar posibles consecuencias inesperadas sobre la atenuación de virus recombinantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, J., Kwong, J.A., Albarino, C.G., Lu, J.G., Radoshitzky, S.R., Salazar-Bravo, J., Farzan, M., Spiropoulou, C.F., Choe, H., 2009, Host-species transferrin receptor 1 orthologs are cellular receptors for nonpathogenic new world clade B arenaviruses. *PLoS Pathog* 5, e1000358.
- Albarino, C.G., Bergeron, E., Erickson, B.R., Khristova, M.L., Rollin, P.E., Nichol, S.T., 2009, Efficient reverse genetics generation of infectious junin viruses differing in glycoprotein processing. *J Virol* 83, 5606-5614.
- Albarino, C.G., Bird, B.H., Chakrabarti, A.K., Dodd, K.A., Erickson, B.R., Nichol, S.T., 2011, Efficient rescue of recombinant Lassa virus reveals the influence of S segment noncoding regions on virus replication and virulence. *J Virol* 85, 4020-4024.
- Albarino, C.G., Uebelhoer, L.S., Vincent, J.P., Khristova, M.L., Chakrabarti, A.K., McElroy, A., Nichol, S.T., Towner, J.S., 2013, Development of a reverse genetics system to generate recombinant Marburg virus derived from a bat isolate. *Virology* 446, 230-237.
- Anson, D.S., Choo, K.H., Rees, D.J., Giannelli, F., Gould, K., Huddleston, J.A., Brownlee, G.G., 1984, The gene structure of human anti-haemophilic factor IX. *EMBO J* 3, 1053-1060.
- Arata, A.A., Gratz, N.G., 1975, The structure of rodent faunas associated with arenaviral infections. *Bull World Health Organ* 52, 621-627.
- Auperin, D.D., Esposito, J.J., Lange, J.V., Bauer, S.P., Knight, J., Sasso, D.R., McCormick, J.B., 1988, Construction of a recombinant vaccinia virus expressing the Lassa virus glycoprotein gene and protection of guinea pigs from a lethal Lassa virus infection. *Virus Res* 9, 233-248.
- Auperin, D.D., Galinski, M., Bishop, D.H., 1984a, The sequences of the N protein gene and intergenic region of the S RNA of pichinde arenavirus. *Virology* 134, 208-219.
- Auperin, D.D., Romanowski, V., Galinski, M., Bishop, D.H., 1984b, Sequencing studies of pichinde arenavirus S RNA indicate a novel coding strategy, an ambisense viral S RNA. *J Virol* 52, 897-904.
- Auperin, D.D., Sasso, D.R., McCormick, J.B., 1986, Nucleotide sequence of the glycoprotein gene and intergenic region of the Lassa virus S genome RNA. *Virology* 154, 155-167.
- Ayllon, J., Garcia-Sastre, A., Martinez-Sobrido, L., 2013, Rescue of recombinant Newcastle disease virus from cDNA. *J Vis Exp*.

- Baird, N.L., York, J., Nunberg, J.H., 2012, Arenavirus infection induces discrete cytosolic structures for RNA replication. *J Virol* 86, 11301-11310.
- Bergeron, E., Chakrabarti, A.K., Bird, B.H., Dodd, K.A., McMullan, L.K., Spiropoulou, C.F., Nichol, S.T., Albarino, C.G., 2012, Reverse genetics recovery of Lujo virus and role of virus RNA secondary structures in efficient virus growth. *J Virol* 86, 10759-10765.
- Bergeron, E., Zivcec, M., Chakrabarti, A.K., Nichol, S.T., Albarino, C.G., Spiropoulou, C.F., 2015, Recovery of Recombinant Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus Reveals a Function for Non-structural Glycoproteins Cleavage by Furin. *PLoS Pathog* 11, e1004879.
- Beyer, W.R., Popplau, D., Garten, W., von Laer, D., Lenz, O., 2003, Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *J Virol* 77, 2866-2872.
- Billecocq, A., Gaudiard, N., Le May, N., Elliott, R.M., Flick, R., Bouloy, M., 2008, RNA polymerase I-mediated expression of viral RNA for the rescue of infectious virulent and avirulent Rift Valley fever viruses. *Virology* 378, 377-384.
- Bird, B.H., Albarino, C.G., Hartman, A.L., Erickson, B.R., Ksiazek, T.G., Nichol, S.T., 2008, Rift valley fever virus lacking the NSs and NSm genes is highly attenuated, confers protective immunity from virulent virus challenge, and allows for differential identification of infected and vaccinated animals. *J Virol* 82, 2681-2691.
- Bird, B.H., Albarino, C.G., Nichol, S.T., 2007, Rift Valley fever virus lacking NSm proteins retains high virulence in vivo and may provide a model of human delayed onset neurologic disease. *Virology* 362, 10-15.
- Bishop, D.H., Gay, M.E., Matsuoko, Y., 1983, Nonviral heterogeneous sequences are present at the 5' ends of one species of snowshoe hare bunyavirus S complementary RNA. *Nucleic Acids Res* 11, 6409-6418.
- Blakqori, G., van Knippenberg, I., Elliott, R.M., 2009, Bunyamwera orthobunyavirus S-segment untranslated regions mediate poly(A) tail-independent translation. *J Virol* 83, 3637-3646.
- Blakqori, G., Weber, F., 2005, Efficient cDNA-based rescue of La Crosse bunyaviruses expressing or lacking the nonstructural protein NSs. *J Virol* 79, 10420-10428.

- Borden, K.L., Campbell Dwyer, E.J., Salvato, M.S., 1998a, An arenavirus RING (zinc-binding) protein binds the oncoprotein promyelocyte leukemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm. *J Virol* 72, 758-766.
- Borden, K.L., Campbell Dwyer, E.J., Carlile, G.W., Djavani, M., Salvato, M.S., 1998b, Two RING finger proteins, the oncoprotein PML and the arenavirus Z protein, colocalize with the nuclear fraction of the ribosomal P proteins. *J Virol* 72, 3819-3826.
- Bouloy, M., 1991, Bunyaviridae: genome organization and replication strategies. *Adv Virus Res* 40, 235-275.
- Bouloy, M., Flick, R., 2009, Reverse genetics technology for Rift Valley fever virus: current and future applications for the development of therapeutics and vaccines. *Antiviral Res* 84, 101-118.
- Bouloy, M., Plotch, S.J., Krug, R.M., 1978, Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 4886-4890.
- Bowen, M.D., Peters, C.J., Mills, J.N., Nichol, S.T., 1996a, Oliveros virus: a novel arenavirus from Argentina. *Virology* 217, 362-366.
- Bowen, M.D., Peters, C.J., Nichol, S.T., 1996b, The phylogeny of New World (Tacaribe complex) arenaviruses. *Virology* 219, 285-290.
- Bridgen, A., Elliott, R.M., 1996, Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15400-15404.
- Briggiler, A., Sinchi, A., Coronel, F., Sanchez, Z., Levis, S., Taylor, J., Enria, D., 2015, [New transmission scenarios of the Argentine hemorrhagic fever since the introduction of the live attenuated junin virus vaccine (Candid #1): an experience in migrant workers]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 32, 165-171.
- Brunotte, L., Kerber, R., Shang, W., Hauer, F., Hass, M., Gabriel, M., Lelke, M., Busch, C., Stark, H., Svergun, D.I., Betzel, C., Perbandt, M., Gunther, S., 2011, Structure of the Lassa virus nucleoprotein revealed by X-ray crystallography, small-angle X-ray scattering, and electron microscopy. *J Biol Chem* 286, 38748-38756.
- Bruns, M., Zeller, W., Rohdewohld, H., Lehmann-Grube, F., 1986, Lymphocytic choriomeningitis virus. IX. Properties of the nucleocapsid. *Virology* 151, 77-85.

- Buchholz, U.J., Finke, S., Conzelmann, K.K., 1999, Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* 73, 251-259.
- Buchmeier, M.J., Gee, S.R., Rawls, W.E., 1977, Antigens of Pichinde virus I. Relationship of soluble antigens derived from infected BHK-21 cells to the structural components of the virion. *J Virol* 22, 175-186.
- Buchmeier, M.J., Lewicki, H.A., Tomori, O., Oldstone, M.B., 1981, Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis and pichinde viruses: generation, characterization, and cross-reactivity with other arenaviruses. *Virology* 113, 73-85.
- Buchmeier, M.J., Oldstone, M.B., 1978, Virus-induced immune complex disease: identification of specific viral antigens and antibodies deposited in complexes during chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* 120, 1297-1304.
- Buchmeier, M.J., Parekh, B.S., 1987, Protein structure and expression among arenaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 133, 41-57.
- Burgui, I., Yanguéz, E., Sonenberg, N., Nieto, A., 2007, Influenza virus mRNA translation revisited: is the eIF4E cap-binding factor required for viral mRNA translation? *J Virol* 81, 12427-12438.
- Burns, J., Buchmeier, M.J., 1993, Glycoproteins of the arenaviruses, In: Press, M.S.S.P. (Ed.) *The Arenaviridae*. New York, pp. 17-31.
- Burns, J.W., Buchmeier, M.J., 1991, Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 183, 620-629.
- Burri, D.J., da Palma, J.R., Kunz, S., Pasquato, A., 2012, Envelope glycoprotein of arenaviruses. *Viruses* 4, 2162-2181.
- Campbell Dwyer, E.J., Lai, H., MacDonald, R.C., Salvato, M.S., Borden, K.L., 2000, The lymphocytic choriomeningitis virus RING protein Z associates with eukaryotic initiation factor 4E and selectively represses translation in a RING-dependent manner. *J Virol* 74, 3293-3300.
- Candurra, N.A., Damonte, E.B., 1997, Effect of inhibitors of the intracellular exocytic pathway on glycoprotein processing and maturation of Junin virus. *Arch Virol* 142, 2179-2193.

- Cao, W., Henry, M.D., Borrow, P., Yamada, H., Elder, J.H., Ravkov, E.V., Nichol, S.T., Compans, R.W., Campbell, K.P., Oldstone, M.B., 1998, Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* 282, 2079-2081.
- Capul, A.A., Perez, M., Burke, E., Kunz, S., Buchmeier, M.J., de la Torre, J.C., 2007, Arenavirus Z-glycoprotein association requires Z myristoylation but not functional RING or late domains. *J Virol* 81, 9451-9460.
- Casabona, J.C., Levingston Macleod, J.M., Loureiro, M.E., Gomez, G.A., Lopez, N., 2009, The RING domain and the L79 residue of Z protein are involved in both the rescue of nucleocapsids and the incorporation of glycoproteins into infectious chimeric arenavirus-like particles. *J Virol* 83, 7029-7039.
- Casals, J., Buckley, S.M., Cedeno, R., 1975, Antigenic properties of the arenaviruses. *Bull World Health Organ* 52, 421-427.
- Castilla, V., Enria, D., 2013, Arenaviridae, In: *Atlante (Ed.) Microbiología Médica*. Basualdo JA, Coto CE y de Torres RA. , Buenos Aires.
- Clegg, J.C., Oram, J.D., 1985, Molecular cloning of Lassa virus RNA: nucleotide sequence and expression of the nucleocapsid protein gene. *Virology* 144, 363-372.
- Clegg, J.C., Wilson, S.M., Oram, J.D., 1991, Nucleotide sequence of the S RNA of Lassa virus (Nigerian strain) and comparative analysis of arenavirus gene products. *Virus Res* 18, 151-164.
- Collins, P.L., Hill, M.G., Camargo, E., Grosfeld, H., Chanock, R.M., Murphy, B.R., 1995, Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11563-11567.
- Compans, R.W. 1993. *Arenavirus Ultrastructure and Morphogenesis*, Press, P., ed. (New York).
- Cornu, T.I., de la Torre, J.C., 2001, RING finger Z protein of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) inhibits transcription and RNA replication of an LCMV S-segment minigenome. *J Virol* 75, 9415-9426.
- Charrel, R.N., de Lamballerie, X., Emonet, S., 2008, Phylogeny of the genus *Arenavirus*. *Curr Opin Microbiol* 11, 362-368.

- Cheng, B.Y., Ortiz-Riano, E., de la Torre, J.C., Martinez-Sobrido, L., 2015, Arenavirus Genome Rearrangement for the Development of Live Attenuated Vaccines. *J Virol* 89, 7373-7384.
- D'Antuono, A., Loureiro, M.E., Foscaldi, S., Marino-Buslje, C., Lopez, N., 2014, Differential contributions of tacaribe arenavirus nucleoprotein N-terminal and C-terminal residues to nucleocapsid functional activity. *J Virol* 88, 6492-6505.
- Dalton, A.J., Rowe, W.P., Smith, G.H., Wilsnack, R.E., Pugh, W.E., 1968, Morphological and cytochemical studies on lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 2, 1465-1478.
- Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D., Argos, P., 1990, An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng* 3, 461-467.
- Delgado, S., Erickson, B.R., Agudo, R., Blair, P.J., Vallejo, E., Albarino, C.G., Vargas, J., Comer, J.A., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Olson, J.G., Nichol, S.T., 2008, Chapare virus, a newly discovered arenavirus isolated from a fatal hemorrhagic fever case in Bolivia. *PLoS Pathog* 4, e1000047.
- Di Simone, C., Zandonatti, M.A., Buchmeier, M.J., 1994a, Acidic pH triggers LCMV membrane fusion activity and conformational change in the glycoprotein spike. *Virology* 198, 455-465.
- Djavani, M., Lukashevich, I.S., Sanchez, A., Nichol, S.T., Salvato, M.S., 1997, Completion of the Lassa fever virus sequence and identification of a RING finger open reading frame at the L RNA 5' End. *Virology* 235, 414-418.
- Downs, W.G., Anderson, C.R., Spence, L., Aitken, T.H., Greenhall, A.H., 1963, Tacaribe virus, a new agent isolated from Artibeus bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies. *Am J Trop Med Hyg* 12, 640-646.
- Edgil, D., Harris, E., 2006, End-to-end communication in the modulation of translation by mammalian RNA viruses. *Virus Res* 119, 43-51.
- Eichler, R., Strecker, T., Kolesnikova, L., ter Meulen, J., Weissenhorn, W., Becker, S., Klenk, H.D., Garten, W., Lenz, O., 2004, Characterization of the Lassa virus matrix protein Z: electron microscopic study of virus-like particles and interaction with the nucleoprotein (NP). *Virus Res* 100, 249-255.
- Elroy-Stein, O., Fuerst, T.R., Moss, B., 1989, Cap-independent translation of mRNA conferred by encephalomyocarditis virus 5' sequence improves the performance of the vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6126-6130.

- Emonet, S.E., Urata, S., de la Torre, J.C., 2011, Arenavirus reverse genetics: new approaches for the investigation of arenavirus biology and development of antiviral strategies. *Virology* 411, 416-425.
- Enami, M., Luytjes, W., Krystal, M., Palese, P., 1990, Introduction of site-specific mutations into the genome of influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3802-3805.
- Enjuanes, L., Sola, I., Alonso, S., Escors, D., Zuniga, S., 2005, Coronavirus reverse genetics and development of vectors for gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 287, 161-197.
- Enria, D., Briggiler, A., M., F., 1998, An overview of the epidemiological, and preventive hallmarks of Argentine haemorrhagic fever (Junin virus). *Bull Inst Pasteur* 96, 103-114.
- Enria, D.A., Briggiler, A.M., Sanchez, Z., 2008, Treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 78, 132-139.
- Fan, L., Briese, T., Lipkin, W.I., 2010, Z proteins of New World arenaviruses bind RIG-I and interfere with type I interferon induction. *J Virol* 84, 1785-1791.
- Filomatori, C.V., Lodeiro, M.F., Alvarez, D.E., Samsa, M.M., Pietrasanta, L., Gamarnik, A.V., 2006, A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev* 20, 2238-2249.
- Flatz, L., Hegazy, A.N., Bergthaler, A., Verschoor, A., Claus, C., Fernandez, M., Gattinoni, L., Johnson, S., Kreppel, F., Kochanek, S., Broek, M., Radbruch, A., Levy, F., Lambert, P.H., Siegrist, C.A., Restifo, N.P., Lohning, M., Ochsenbein, A.F., Nabel, G.J., Pinschewer, D.D., 2010, Development of replication-defective lymphocytic choriomeningitis virus vectors for the induction of potent CD8+ T cell immunity. *Nat Med* 16, 339-345.
- Flick, R., Pettersson, R.F., 2001, Reverse genetics system for Uukuniemi virus (Bunyaviridae): RNA polymerase I-catalyzed expression of chimeric viral RNAs. *J Virol* 75, 1643-1655.
- Franze-Fernández, M.T., Iapalucci, S., López, N., Rossi, C., 1993, Subgenomic RNAs of Tacaribe virus, In: M. S. Salvato, P.P. (Ed.) *The Arenaviridae*. New York, pp. 113-132.
- Franze-Fernandez, M.T., Zetina, C., Iapalucci, S., Lucero, M.A., Bouissou, C., Lopez, R., Rey, O., Daheli, M., Cohen, G.N., Zakin, M.M., 1987, Molecular structure and early events in the replication of Tacaribe arenavirus S RNA. *Virus Res* 7, 309-324.

- Freemont, P.S., 1993, The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. *Ann N Y Acad Sci* 684, 174-192.
- Gale, M., Jr., Tan, S.L., Katze, M.G., 2000, Translational control of viral gene expression in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 239-280.
- Garcia-Sastre, A., Palese, P., 1993, Genetic manipulation of negative-strand RNA virus genomes. *Annu Rev Microbiol* 47, 765-790.
- Garcin, D., Kolakofsky, D., 1990, A novel mechanism for the initiation of Tacaribe arenavirus genome replication. *J Virol* 64, 6196-6203.
- Garcin, D., Kolakofsky, D., 1992, Tacaribe arenavirus RNA synthesis in vitro is primer dependent and suggests an unusual model for the initiation of genome replication. *J Virol* 66, 1370-1376.
- Garcin, D., Pelet, T., Calain, P., Roux, L., Curran, J., Kolakofsky, D., 1995, A highly recombinogenic system for the recovery of infectious Sendai paramyxovirus from cDNA: generation of a novel copy-back nondefective interfering virus. *EMBO J* 14, 6087-6094.
- Gard, G.P., D. H.; Compans R. W., 1977, Structural proteins of Tacaribe and Tamiami virions. *Virology* 83, 84-95.
- Geerts-Dimitriadou, C., Lu, Y.Y., Geertsema, C., Goldbach, R., Kormelink, R., 2012, Analysis of the Tomato spotted wilt virus ambisense S RNA-encoded hairpin structure in translation. *PLoS One* 7, e31013.
- Gerrard, S.R., Bird, B.H., Albarino, C.G., Nichol, S.T., 2007, The NSm proteins of Rift Valley fever virus are dispensable for maturation, replication and infection. *Virology* 359, 459-465.
- Ghiringhelli, P.D., Rivera-Pomar, R.V., Lozano, M.E., Grau, O., Romanowski, V., 1991, Molecular organization of Junin virus S RNA: complete nucleotide sequence, relationship with other members of the Arenaviridae and unusual secondary structures. *J Gen Virol* 72 (Pt 9), 2129-2141.
- Ghiringhelli, P.D., Rivera Pomar, R.V., Baro, N.I., Rosas, M.F., Grau, O., Romanowski, V., 1989, Nucleocapsid protein gene of Junin arenavirus (cDNA sequence). *Nucleic Acids Res* 17, 8001.
- Gil, J., Alcami, J., Esteban, M., 1999, Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 19, 4653-4663.
- Gimenez, H.B., Boersma, D.P., Compans, R.W., 1983, Analysis of polypeptides in Tacaribe virus-infected cells. *Virology* 128, 469-473.

- Gimenez, H.B., Compans, R.W., 1980, Defective interfering Tacaribe virus and persistently infected cells. *Virology* 107, 229-239.
- Gonzalez, J.P., Bowen, M.D., Nichol, S.T., Rico-Hesse, R., 1996, Genetic characterization and phylogeny of Sabia virus, an emergent pathogen in Brazil. *Virology* 221, 318-324.
- Gradi, A., Svitkin, Y.V., Imataka, H., Sonenberg, N., 1998, Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11089-11094.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R., 1977, Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Graham, F.L., van der Eb, A.J., 1973, A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.
- Griffiths, C.M., Wilson, S.M., Clegg, J.C., 1992, Sequence of the nucleocapsid protein gene of Machupo virus: close relationship with another South American pathogenic arenavirus, Junin. *Arch Virol* 124, 371-377.
- Grolleau, A., Sonenberg, N., Wietzerbin, J., Beretta, L., 1999, Differential regulation of 4E-BP1 and 4E-BP2, two repressors of translation initiation, during human myeloid cell differentiation. *J Immunol* 162, 3491-3497.
- Groppo, R., Richter, J.D., 2009, Translational control from head to tail. *Curr Opin Cell Biol* 21, 444-451.
- Groseth, A., Wolff, S., Strecker, T., Hoenen, T., Becker, S., 2010, Efficient budding of the tacaribe virus matrix protein z requires the nucleoprotein. *J Virol* 84, 3603-3611.
- Guerrero, S., Batisse, J., Libre, C., Bernacchi, S., Marquet, R., Paillart, J.C., 2015, HIV-1 replication and the cellular eukaryotic translation apparatus. *Viruses* 7, 199-218.
- Habjan, M., Penski, N., Spiegel, M., Weber, F., 2008, T7 RNA polymerase-dependent and -independent systems for cDNA-based rescue of Rift Valley fever virus. *J Gen Virol* 89, 2157-2166.
- Hanahan, D., 1983, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hass, M., Golnitz, U., Muller, S., Becker-Ziaja, B., Gunther, S., 2004, Replicon system for Lassa virus. *J Virol* 78, 13793-13803.

- Hass, M., Westerkofsky, M., Muller, S., Becker-Ziaja, B., Busch, C., Gunther, S., 2006, Mutational analysis of the lassa virus promoter. *J Virol* 80, 12414-12419.
- Hastie, K.M., Kimberlin, C.R., Zandonatti, M.A., MacRae, I.J., Saphire, E.O., 2011, Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsRNA-specific 3' to 5' exonuclease activity essential for immune suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2396-2401.
- Holmes, D.E., Moyer, S.A., 2002, The phosphoprotein (P) binding site resides in the N terminus of the L polymerase subunit of sendai virus. *J Virol* 76, 3078-3083.
- Iapalucci, S., Lopez, N., Franze-Fernandez, M.T., 1991, The 3' end termini of the Tacaribe arenavirus subgenomic RNAs. *Virology* 182, 269-278.
- Iapalucci, S., Lopez, N., Rey, O., Zakin, M.M., Cohen, G.N., Franze-Fernandez, M.T., 1989a, The 5' region of Tacaribe virus L RNA encodes a protein with a potential metal binding domain. *Virology* 173, 357-361.
- Iapalucci, S., Lopez, R., Rey, O., Lopez, N., Franze-Fernandez, M.T., Cohen, G.N., Lucero, M., Ochoa, A., Zakin, M.M., 1989b, Tacaribe virus L gene encodes a protein of 2210 amino acid residues. *Virology* 170, 40-47.
- Ikegami, T., Won, S., Peters, C.J., Makino, S., 2006, Rescue of infectious rift valley fever virus entirely from cDNA, analysis of virus lacking the NSs gene, and expression of a foreign gene. *J Virol* 80, 2933-2940.
- Ito, N., Takayama-Ito, M., Yamada, K., Hosokawa, J., Sugiyama, M., Minamoto, N., 2003, Improved recovery of rabies virus from cloned cDNA using a vaccinia virus-free reverse genetics system. *Microbiol Immunol* 47, 613-617.
- Iwasaki, M., Ngo, N., Cubitt, B., Teijaro, J.R., de la Torre, J.C., 2015, General Molecular Strategy for Development of Arenavirus Live-Attenuated Vaccines. *J Virol* 89, 12166-12177.
- Jacamo, R., Lopez, N., Wilda, M., Franze-Fernandez, M.T., 2003, Tacaribe virus Z protein interacts with the L polymerase protein to inhibit viral RNA synthesis. *J Virol* 77, 10383-10393.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U., Pestova, T.V., 2010, The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 113-127.

- Jackson, R.J., Hellen, C.U., Pestova, T.V., 2012, Termination and post-termination events in eukaryotic translation. *Adv Protein Chem Struct Biol* 86, 45-93.
- Jin, H., Elliott, R.M., 1993, Characterization of Bunyamwera virus S RNA that is transcribed and replicated by the L protein expressed from recombinant vaccinia virus. *J Virol* 67, 1396-1404.
- Kafasla, P., Mickleburgh, I., Llorian, M., Coelho, M., Gooding, C., Cherny, D., Joshi, A., Kotik-Kogan, O., Curry, S., Eperon, I.C., Jackson, R.J., Smith, C.W., 2012, Defining the roles and interactions of PTB. *Biochem Soc Trans* 40, 815-820.
- Kapp, L.D., Lorsch, J.R., 2004, The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem* 73, 657-704.
- Kentsis, A., Dwyer, E.C., Perez, J.M., Sharma, M., Chen, A., Pan, Z.Q., Borden, K.L., 2001, The RING domains of the promyelocytic leukemia protein PML and the arenaviral protein Z repress translation by directly inhibiting translation initiation factor eIF4E. *J Mol Biol* 312, 609-623.
- Kentsis, A., Gordon, R.E., Borden, K.L., 2002, Control of biochemical reactions through supramolecular RING domain self-assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15404-15409.
- Keppetipola, N., Sharma, S., Li, Q., Black, D.L., 2012, Neuronal regulation of pre-mRNA splicing by polypyrimidine tract binding proteins, PTBP1 and PTBP2. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 47, 360-378.
- Kerber, R., Rieger, T., Busch, C., Flatz, L., Pinschewer, D.D., Kummerer, B.M., Gunther, S., 2011, Cross-species analysis of the replication complex of Old World arenaviruses reveals two nucleoprotein sites involved in L protein function. *J Virol* 85, 12518-12528.
- Knopp, K.A., Ngo, T., Gershon, P.D., Buchmeier, M.J., 2015, Single nucleoprotein residue modulates arenavirus replication complex formation. *MBio* 6, e00524-00515.
- Kolakofsky, D., Garcin, D., 1993, The unusual mechanism of arenavirus RNA synthesis, In: Press, M.S.S.P. (Ed.) *The Arenaviridae*. New York, pp. 103-112.
- Kolakofsky, D., Hacker, D., 1991, Bunyavirus RNA synthesis: genome transcription and replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 169, 143-159.
- Kozak, M., 1991, A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes. *Gene Expr* 1, 111-115.

- Kranzusch, P.J., Schenk, A.D., Rahmeh, A.A., Radoshitzky, S.R., Bavari, S., Walz, T., Whelan, S.P., 2010, Assembly of a functional Machupo virus polymerase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20069-20074.
- Krichevsky, A.M., Metzger, E., Rosen, H., 1999, Translational control of specific genes during differentiation of HL-60 cells. *J Biol Chem* 274, 14295-14305.
- Kummerer, B.M., Grywna, K., Glasker, S., Wieseler, J., Drosten, C., 2012, Construction of an infectious Chikungunya virus cDNA clone and stable insertion of mCherry reporter genes at two different sites. *J Gen Virol* 93, 1991-1995.
- Kunz, S., Edelmann, K.H., de la Torre, J.C., Gorney, R., Oldstone, M.B., 2003, Mechanisms for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein cleavage, transport, and incorporation into virions. *Virology* 314, 168-178.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lan, S., McLay, L., Aronson, J., Ly, H., Liang, Y., 2008, Genome comparison of virulent and avirulent strains of the Pichinde arenavirus. *Arch Virol* 153, 1241-1250.
- Lan, S., McLay Schelde, L., Wang, J., Kumar, N., Ly, H., Liang, Y., 2009, Development of infectious clones for virulent and avirulent pichinde viruses: a model virus to study arenavirus-induced hemorrhagic fevers. *J Virol* 83, 6357-6362.
- Lawson, N.D., Stillman, E.A., Whitt, M.A., Rose, J.K., 1995, Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4477-4481.
- Lee, K.J., Novella, I.S., Teng, M.N., Oldstone, M.B., de La Torre, J.C., 2000, NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. *J Virol* 74, 3470-3477.
- Lehmann, M., Pahlmann, M., Jerome, H., Busch, C., Lelke, M., Gunther, S., 2014, Role of the C terminus of Lassa virus L protein in viral mRNA synthesis. *J Virol* 88, 8713-8717.
- Lenz, O., ter Meulen, J., Klenk, H.D., Seidah, N.G., Garten, W., 2001, The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12701-12705.

- Leung, W.C., Rawls, W.E., 1977, Virion-associated ribosomes are not required for the replication of Pichinde virus. *Virology* 81, 174-176.
- Levingston Macleod, J.M., D'Antuono, A., Loureiro, M.E., Casabona, J.C., Gomez, G.A., Lopez, N., 2011, Identification of two functional domains within the arenavirus nucleoprotein. *J Virol* 85, 2012-2023.
- Linero, F., Welnowska, E., Carrasco, L., Scolaro, L., 2013, Participation of eIF4F complex in Junin virus infection: blockage of eIF4E does not impair virus replication. *Cell Microbiol* 15, 1766-1782.
- Linero, F.N., Thomas, M.G., Boccaccio, G.L., Scolaro, L.A., 2011, Junin virus infection impairs stress-granule formation in Vero cells treated with arsenite via inhibition of eIF2alpha phosphorylation. *J Gen Virol* 92, 2889-2899.
- Ling, J., Morley, S.J., Pain, V.M., Marzluff, W.F., Gallie, D.R., 2002, The histone 3'-terminal stem-loop-binding protein enhances translation through a functional and physical interaction with eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) and eIF3. *Mol Cell Biol* 22, 7853-7867.
- Lopez, N., Franze-Fernandez, M.T., 2007, A single stem-loop structure in Tacaribe arenavirus intergenic region is essential for transcription termination but is not required for a correct initiation of transcription and replication. *Virus Res* 124, 237-244.
- Lopez, N., Jacamo, R., Franze-Fernandez, M.T., 2001, Transcription and RNA replication of tacaribe virus genome and antigenome analogs require N and L proteins: Z protein is an inhibitor of these processes. *J Virol* 75, 12241-12251.
- Lopez, N., Scolaro, L., Rossi, C., Jacamo, R., Candurra, N., Pujol, C., Damonte, E.B., Franze-Fernandez, M.T., 2000, Homologous and heterologous glycoproteins induce protection against Junin virus challenge in guinea pigs. *J Gen Virol* 81, 1273-1281.
- Lopez, R., Franze-Fernandez, M.T., 1985, Effect of tacaribe virus infection on host cell protein and nucleic acid synthesis. *J Gen Virol* 66 (Pt 8), 1753-1761.
- Lovering, R., Hanson, I.M., Borden, K.L., Martin, S., O'Reilly, N.J., Evan, G.I., Rahman, D., Pappin, D.J., Trowsdale, J., Freemont, P.S., 1993, Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2112-2116.
- Lowen, A.C., Noonan, C., McLees, A., Elliott, R.M., 2004, Efficient bunyavirus rescue from cloned cDNA. *Virology* 330, 493-500.

- Luytjes, W., Krystal, M., Enami, M., Parvin, J.D., Palese, P., 1989, Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell* 59, 1107-1113.
- Macpherson, I., Stoker, M., 1962, Polyoma transformation of hamster cell clones--an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16, 147-151.
- Martinez-Sobrido, L., Giannakas, P., Cubitt, B., Garcia-Sastre, A., de la Torre, J.C., 2007, Differential inhibition of type I interferon induction by arenavirus nucleoproteins. *J Virol* 81, 12696-12703.
- Martinez-Sobrido, L., Zuniga, E.I., Rosario, D., Garcia-Sastre, A., de la Torre, J.C., 2006, Inhibition of the type I interferon response by the nucleoprotein of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 80, 9192-9199.
- Martinez, M.G., Bialecki, M.A., Belouzard, S., Cordo, S.M., Candurra, N.A., Whittaker, G.R., 2013, Utilization of human DC-SIGN and L-SIGN for entry and infection of host cells by the New World arenavirus, Junin virus. *Biochem Biophys Res Commun* 441, 612-617.
- Martinez, M.G., Cordo, S.M., Candurra, N.A., 2007, Characterization of Junin arenavirus cell entry. *J Gen Virol* 88, 1776-1784.
- Martinez, M.G., Cordo, S.M., Candurra, N.A., 2008, Involvement of cytoskeleton in Junin virus entry. *Virus Res* 138, 17-25.
- Martinez Peralta, L., Coto, C., Weissenbacher, M., 1993, The Tacaribe complex: The Close Relationship between a Pathogenic (Junin) and Nonpathogenic Arenavirus, In: M. S. Salvato, P.P. (Ed.) *The Arenaviridae*. New York, pp. 281-296.
- Marzluff, W.F., 2005, Metazoan replication-dependent histone mRNAs: a distinct set of RNA polymerase II transcripts. *Curr Opin Cell Biol* 17, 274-280.
- Marzluff, W.F., Wagner, E.J., Duronio, R.J., 2008, Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat Rev Genet* 9, 843-854.
- Meyer, B.J., Southern, P.J., 1993, Concurrent sequence analysis of 5' and 3' RNA termini by intramolecular circularization reveals 5' nontemplated bases and 3' terminal heterogeneity for lymphocytic choriomeningitis virus mRNAs. *J Virol* 67, 2621-2627.
- Mifune, K., Carter, M., Rawls, W., 1971, Characterization studies of the Pichinde virus-a member of the arenavirus group. *Proc Soc Exp Biol Med* 136, 637-644.

- Miller, J., McLachlan, A.D., Klug, A., 1985, Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 4, 1609-1614.
- Mir, M.A., Panganiban, A.T., 2008, A protein that replaces the entire cellular eIF4F complex. *EMBO J* 27, 3129-3139.
- Mir, M.A., Panganiban, A.T., 2010, The triplet repeats of the Sin Nombre hantavirus 5' untranslated region are sufficient in cis for nucleocapsid-mediated translation initiation. *J Virol* 84, 8937-8944.
- Mohr, I., Sonenberg, N., 2012, Host translation at the nexus of infection and immunity. *Cell Host Microbe* 12, 470-483.
- Morin, B., Coutard, B., Lelke, M., Ferron, F., Kerber, R., Jamal, S., Frangeul, A., Baronti, C., Charrel, R., de Lamballerie, X., Vonrhein, C., Lescar, J., Bricogne, G., Gunther, S., Canard, B., 2010, The N-terminal domain of the arenavirus L protein is an RNA endonuclease essential in mRNA transcription. *PLoS Pathog* 6, e1001038.
- Moss, B., Elroy-Stein, O., Mizukami, T., Alexander, W.A., Fuerst, T.R., 1990, Product review. New mammalian expression vectors. *Nature* 348, 91-92.
- Neuman, B.W., Adair, B.D., Burns, J.W., Milligan, R.A., Buchmeier, M.J., Yeager, M., 2005, Complementarity in the supramolecular design of arenaviruses and retroviruses revealed by electron cryomicroscopy and image analysis. *J Virol* 79, 3822-3830.
- Neumann, G., Kawaoka, Y., 2004, Reverse genetics systems for the generation of segmented negative-sense RNA viruses entirely from cloned cDNA. *Curr Top Microbiol Immunol* 283, 43-60.
- Niwa, H., Yamamura, K., Miyazaki, J., 1991, Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193-199.
- Nunberg, J.H., York, J., 2012, The curious case of arenavirus entry, and its inhibition. *Viruses* 4, 83-101.
- Ogawa, Y., Sugiura, K., Kato, K., Tohya, Y., Akashi, H., 2007, Rescue of Akabane virus (family Bunyaviridae) entirely from cloned cDNAs by using RNA polymerase I. *J Gen Virol* 88, 3385-3390.
- Palmer, E.L., Obijeski, J.F., Webb, P.A., Johnson, K.M., 1977, The circular, segmented nucleocapsid of an arenavirus-Tacaribe virus. *J Gen Virol* 36, 541-545.

- Parekh, B.S., Buchmeier, M.J., 1986, Proteins of lymphocytic choriomeningitis virus: antigenic topography of the viral glycoproteins. *Virology* 153, 168-178.
- Parisi, G., Echave, J., Ghiringhelli, D., Romanowski, V., 1996, Computational characterisation of potential RNA-binding sites in arenavirus nucleocapsid proteins. *Virus Genes* 13, 247-254.
- Pasqual, G., Rojek, J.M., Masin, M., Chatton, J.Y., Kunz, S., 2011, Old world arenaviruses enter the host cell via the multivesicular body and depend on the endosomal sorting complex required for transport. *PLoS Pathog* 7, e1002232.
- Patterson, J.L., Kolakofsky, D., 1984, Characterization of La Crosse virus small-genome transcripts. *J Virol* 49, 680-685.
- Pattnaik, A.K., Ball, L.A., LeGrone, A.W., Wertz, G.W., 1992, Infectious defective interfering particles of VSV from transcripts of a cDNA clone. *Cell* 69, 1011-1020.
- Pedersen, I.R., 1979, Structural components and replication of arenaviruses. *Adv Virus Res* 24, 277-330.
- Perez, M., Craven, R.C., de la Torre, J.C., 2003, The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12978-12983.
- Perez, M., de la Torre, J.C., 2003, Characterization of the genomic promoter of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 77, 1184-1194.
- Perrotta, A.T., Been, M.D., 1991, A pseudoknot-like structure required for efficient self-cleavage of hepatitis delta virus RNA. *Nature* 350, 434-436.
- Pinschewer, D.D., Perez, M., de la Torre, J.C., 2003, Role of the virus nucleoprotein in the regulation of lymphocytic choriomeningitis virus transcription and RNA replication. *J Virol* 77, 3882-3887.
- Pinschewer, D.D., Perez, M., de la Torre, J.C., 2005, Dual role of the lymphocytic choriomeningitis virus intergenic region in transcription termination and virus propagation. *J Virol* 79, 4519-4526.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J., Poncet, D., 1998, Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J* 17, 5811-5821.

- Poch, O., Blumberg, B.M., Bougueleret, L., Tordo, N., 1990, Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol* 71 (Pt 5), 1153-1162.
- Pythoud, C., Rodrigo, W.W., Pasqual, G., Rothenberger, S., Martinez-Sobrido, L., de la Torre, J.C., Kunz, S., 2012, Arenavirus nucleoprotein targets interferon regulatory factor-activating kinase IKKepsilon. *J Virol* 86, 7728-7738.
- Qanungo, K.R., Shaji, D., Mathur, M., Banerjee, A.K., 2004, Two RNA polymerase complexes from vesicular stomatitis virus-infected cells that carry out transcription and replication of genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5952-5957.
- Qi, X., Lan, S., Wang, W., Schelde, L.M., Dong, H., Wallat, G.D., Ly, H., Liang, Y., Dong, C., 2010, Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure. *Nature* 468, 779-783.
- Racaniello, V.R., Baltimore, D., 1981, Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* 214, 916-919.
- Radecke, F., Spielhofer, P., Schneider, H., Kaelin, K., Huber, M., Dotsch, C., Christiansen, G., Billeter, M.A., 1995, Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J* 14, 5773-5784.
- Radoshitzky, S.R., Abraham, J., Spiropoulou, C.F., Kuhn, J.H., Nguyen, D., Li, W., Nagel, J., Schmidt, P.J., Nunberg, J.H., Andrews, N.C., Farzan, M., Choe, H., 2007, Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature* 446, 92-96.
- Radoshitzky, S.R., Bao, Y., Buchmeier, M.J., Charrel, R.N., Clawson, A.N., Clegg, C.S., DeRisi, J.L., Emonet, S., Gonzalez, J.P., Kuhn, J.H., Lukashevich, I.S., Peters, C.J., Romanowski, V., Salvato, M.S., Stenglein, M.D., de la Torre, J.C., 2015, Past, present, and future of arenavirus taxonomy. *Arch Virol* 160, 1851-1874.
- Raju, R., Raju, L., Hacker, D., Garcin, D., Compans, R., Kolakofsky, D., 1990, Nontemplated bases at the 5' ends of Tacaribe virus mRNAs. *Virology* 174, 53-59.
- Rawls, W.E., Chan, M.A., Gee, S.R., 1981, Mechanisms of persistence in arenavirus infections: a brief review. *Can J Microbiol* 27, 568-574.

- Ray, D., Kazan, H., Cook, K.B., Weirauch, M.T., Najafabadi, H.S., Li, X., Gueroussov, S., Albu, M., Zheng, H., Yang, A., Na, H., Irimia, M., Matzat, L.H., Dale, R.K., Smith, S.A., Yarosh, C.A., Kelly, S.M., Nabet, B., Mecnas, D., Li, W., Laishram, R.S., Qiao, M., Lipshitz, H.D., Piano, F., Corbett, A.H., Carstens, R.P., Frey, B.J., Anderson, R.A., Lynch, K.W., Penalva, L.O., Lei, E.P., Fraser, A.G., Blencowe, B.J., Morris, Q.D., Hughes, T.R., 2013, A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation. *Nature* 499, 172-177.
- Rieder, E., Henry, T., Duque, H., Baxt, B., 2005, Analysis of a foot-and-mouth disease virus type A24 isolate containing an SGD receptor recognition site in vitro and its pathogenesis in cattle. *J Virol* 79, 12989-12998.
- Rojek, J.M., Lee, A.M., Nguyen, N., Spiropoulou, C.F., Kunz, S., 2008, Site 1 protease is required for proteolytic processing of the glycoproteins of the South American hemorrhagic fever viruses Junin, Machupo, and Guanarito. *J Virol* 82, 6045-6051.
- Romanowski, V., Bishop, D.H., 1985, Conserved sequences and coding of two strains of lymphocytic choriomeningitis virus (WE and ARM) and Pichinde arenavirus. *Virus Res* 2, 35-51.
- Romanowski, V., Matsuura, Y., Bishop, D.H., 1985, Complete sequence of the S RNA of lymphocytic choriomeningitis virus (WE strain) compared to that of Pichinde arenavirus. *Virus Res* 3, 101-114.
- Rossi, C., Rey, O., Jenik, P., Franze-Fernandez, M.T., 1996, Immunological identification of Tacaribe virus proteins. *Res Virol* 147, 203-211.
- Rowe, W.P., Murphy, F.A., Bergold, G.H., Casals, J., Hotchin, J., Johnson, K.M., Lehmann-Grube, F., Mims, C.A., Traub, E., Webb, P.A., 1970a, Arenoviruses: proposed name for a newly defined virus group. *J Virol* 5, 651-652.
- Rowe, W.P., Pugh, W.E., Webb, P.A., Peters, C.J., 1970b, Serological relationship of the Tacaribe complex of viruses to lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 5, 289-292.
- Salvato, M., Shimomaye, E., Oldstone, M.B., 1989, The primary structure of the lymphocytic choriomeningitis virus L gene encodes a putative RNA polymerase. *Virology* 169, 377-384.
- Salvato, M.S., Schweighofer, K.J., Burns, J., Shimomaye, E.M., 1992, Biochemical and immunological evidence that the 11 kDa zinc-binding protein of lymphocytic choriomeningitis virus is a structural component of the virus. *Virus Res* 22, 185-198.

- Salvato, M.S., Shimomaye, E.M., 1989, The completed sequence of lymphocytic choriomeningitis virus reveals a unique RNA structure and a gene for a zinc finger protein. *Virology* 173, 1-10.
- Sambrook, Joseph and Russell, David William. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ra. Edición. CSHL Press, New York.
- Saurin, A.J., Borden, K.L., Boddy, M.N., Freemont, P.S., 1996, Does this have a familiar RING? *Trends Biochem Sci* 21, 208-214.
- Sawicka, K., Bushell, M., Spriggs, K.A., Willis, A.E., 2008, Polypyrimidine-tract-binding protein: a multifunctional RNA-binding protein. *Biochem Soc Trans* 36, 641-647.
- Sayler, K.A., Barbet, A.F., Chamberlain, C., Clapp, W.L., Alleman, R., Loeb, J.C., Lednicky, J.A., 2014, Isolation of Tacaribe virus, a Caribbean arenavirus, from host-seeking *Amblyomma americanum* ticks in Florida. *PLoS One* 9, e115769.
- Schickli, J.H., Flandorfer, A., Nakaya, T., Martinez-Sobrido, L., Garcia-Sastre, A., Palese, P., 2001, Plasmid-only rescue of influenza A virus vaccine candidates. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 1965-1973.
- Schnell, M.J., Mebatsion, T., Conzelmann, K.K., 1994, Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J* 13, 4195-4203.
- Shtanko, O., Imai, M., Goto, H., Lukashevich, I.S., Neumann, G., Watanabe, T., Kawaoka, Y., 2010, A role for the C terminus of Mopeia virus nucleoprotein in its incorporation into Z protein-induced virus-like particles. *J Virol* 84, 5415-5422.
- Shtanko, O., Watanabe, S., Jasenosky, L.D., Watanabe, T., Kawaoka, Y., 2011, ALIX/AIP1 is required for NP incorporation into Mopeia virus Z-induced virus-like particles. *J Virol* 85, 3631-3641.
- Sonenberg, N., Hinnebusch, A.G., 2009, Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731-745.
- Soto-Rifo, R., Rubilar, P.S., Limousin, T., de Breyne, S., Decimo, D., Ohlmann, T., 2012, DEAD-box protein DDX3 associates with eIF4F to promote translation of selected mRNAs. *EMBO J* 31, 3745-3756.
- Soto-Rifo, R., Rubilar, P.S., Ohlmann, T., 2013, The DEAD-box helicase DDX3 substitutes for the cap-binding protein eIF4E to promote compartmentalized translation initiation of the HIV-1 genomic RNA. *Nucleic Acids Res* 41, 6286-6299.

- Southern, P.J., Singh, M.K., Riviere, Y., Jacoby, D.R., Buchmeier, M.J., Oldstone, M.B., 1987, Molecular characterization of the genomic S RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 157, 145-155.
- Spiropoulou, C.F., Kunz, S., Rollin, P.E., Campbell, K.P., Oldstone, M.B., 2002, New World arenavirus clade C, but not clade A and B viruses, utilizes alpha-dystroglycan as its major receptor. *J Virol* 76, 5140-5146.
- Strecker, T., Eichler, R., Meulen, J., Weissenhorn, W., Dieter Klenk, H., Garten, W., Lenz, O., 2003, Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]. *J Virol* 77, 10700-10705.
- Takeda, M., Takeuchi, K., Miyajima, N., Kobune, F., Ami, Y., Nagata, N., Suzaki, Y., Nagai, Y., Tashiro, M., 2000, Recovery of pathogenic measles virus from cloned cDNA. *J Virol* 74, 6643-6647.
- Taniguchi, T., Palmieri, M., Weissmann, C., 1978, A Qbeta DNA-containing hybrid plasmid giving rise to Qbeta phage formation in the bacterial host [proceedings]. *Ann Microbiol (Paris)* 129 B, 535-536.
- Tortorici, M.A., Albarino, C.G., Posik, D.M., Ghiringhelli, P.D., Lozano, M.E., Rivera Pomar, R., Romanowski, V., 2001a, Arenavirus nucleocapsid protein displays a transcriptional antitermination activity in vivo. *Virus Res* 73, 41-55.
- Tortorici, M.A., Ghiringhelli, P.D., Lozano, M.E., Albarino, C.G., Romanowski, V., 2001b, Zinc-binding properties of Junin virus nucleocapsid protein. *J Gen Virol* 82, 121-128.
- Vende, P., Piron, M., Castagne, N., Poncet, D., 2000, Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J Virol* 74, 7064-7071.
- Veza, A.C., Clewley, J.P., Gard, G.P., Abraham, N.Z., Compans, R.W., Bishop, D.H., 1978, Virion RNA species of the arenaviruses Pichinde, Tacaribe, and Tamiami. *J Virol* 26, 485-497.
- Veza, A.C., Gard, G.P., Compans, R.W., Bishop, D.H., 1977, Structural components of the arenavirus Pichinde. *J Virol* 23, 776-786.
- Vieth, S., Torda, A.E., Asper, M., Schmitz, H., Gunther, S., 2004, Sequence analysis of L RNA of Lassa virus. *Virology* 318, 153-168.

- Volpon, L., Osborne, M.J., Capul, A.A., de la Torre, J.C., Borden, K.L., 2010, Structural characterization of the Z RING-eIF4E complex reveals a distinct mode of control for eIF4E. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 5441-5446.**
- Walsh, D., Mohr, I., 2011, Viral subversion of the host protein synthesis machinery. Nat Rev Microbiol 9, 860-875.**
- Whelan, S.P., Ball, L.A., Barr, J.N., Wertz, G.T., 1995, Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 8388-8392.**
- Wilda, M., Lopez, N., Casabona, J.C., Franze-Fernandez, M.T., 2008, Mapping of the tacaribe arenavirus Z-protein binding sites on the L protein identified both amino acids within the putative polymerase domain and a region at the N terminus of L that are critically involved in binding. J Virol 82, 11454-11460.**
- Wilson, S.M., Clegg, J.C., 1991, Sequence analysis of the S RNA of the African arenavirus Mopeia: an unusual secondary structure feature in the intergenic region. Virology 180, 543-552.**
- Will, S., Joshi, T., Hofacker, I.L., Stadler, P.F., Backofen, R., 2012, LocARNA-P: accurate boundary prediction and improved detection of structural RNAs. RNA 18, 900-914.**
- Wolff, S., Becker, S., Groseth, A., 2013, Cleavage of the Junin virus nucleoprotein serves a decoy function to inhibit the induction of apoptosis during infection. J Virol 87, 224-233.**
- Wright, K.E., Spiro, R.C., Burns, J.W., Buchmeier, M.J., 1990, Post-translational processing of the glycoproteins of lymphocytic choriomeningitis virus. Virology 177, 175-183.**
- Wulff, H., Lange, J., P., W., 1978 Interrelationships among arenaviruses measured by indirect immunofluorescence. Intervirology 9, 344-350.**
- Xing, J., Chai, Z., Ly, H., Liang, Y., 2015a, Differential Inhibition of Macrophage Activation by Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Pichinde Virus Is Mediated by the Z Protein N-Terminal Domain. J Virol 89, 12513-12517.**
- Xing, J., Ly, H., Liang, Y., 2015b, The Z proteins of pathogenic but not nonpathogenic arenaviruses inhibit RIG-I-like receptor-dependent interferon production. J Virol 89, 2944-2955.**
- Yanguéz, E., Nieto, A., 2011, So similar, yet so different: selective translation of capped and polyadenylated viral mRNAs in the influenza virus infected cell. Virus Res 156, 1-12.**

- Yanguéz, E., Rodríguez, P., Goodfellow, I., Nieto, A., 2012, Influenza virus polymerase confers independence of the cellular cap-binding factor eIF4E for viral mRNA translation. *Virology* 422, 297-307.**
- Yasumura, Y., Kawakita, Y., 1963, Studies on SV40 in tissue culture - preliminary step for cancer research in vitro. *Nihon Rinsho* 21, 1201-1215.**
- York, J., Agnihothram, S.S., Romanowski, V., Nunberg, J.H., 2005, Genetic analysis of heptad-repeat regions in the G2 fusion subunit of the Junin arenavirus envelope glycoprotein. *Virology* 343, 267-274.**
- York, J., Nunberg, J.H., 2006, Role of the stable signal peptide of Junin arenavirus envelope glycoprotein in pH-dependent membrane fusion. *J Virol* 80, 7775-7780.**
- Young, P.R., Howard, C.R., 1983, Fine structure analysis of Pichinde virus nucleocapsids. *J Gen Virol* 64 (Pt 4), 833-842.**
- Zhang, L., Marriott, K.A., Harnish, D.G., Aronson, J.F., 2001, Reassortant analysis of guinea pig virulence of pichinde virus variants. *Virology* 290, 30-38.**
- Zhang, Y., Li, L., Liu, X., Dong, S., Wang, W., Huo, T., Guo, Y., Rao, Z., Yang, C., 2013, Crystal structure of Junin virus nucleoprotein. *J Gen Virol* 94, 2175-2183.**
- Zuker, M., 2003, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31, 3406-3415.**