

# Control de la transcripción y replicación del ARN del virus de la gripe

J. Ortín, J.A. López-Turiso, S. de la Luna, J. Valcárcel, C. Martínez y P. Suárez

Centro de Biología Molecular (CSIC-UAM). Madrid.

## Introducción

Los virus de la gripe tipo A son ortomixovirus, cuyo genoma consiste en ocho segmentos de ARN monocatenario y polaridad negativa<sup>1</sup>. En el virión, cada molécula de ARN está recubierta por nucleoproteína (NP; aproximadamente una molécula por cada 20 nucleótidos) y asociada a un complejo que contiene las tres subunidades de la polimerasa vírica (PB1, PB2 y PA)<sup>2</sup>. Estas ribonucleoproteínas (RNP) están envueltas en una capa constituida por proteína matriz (M1) que a su vez se asocia a la bicapa lipídica que forma la superficie del virus. En esta membrana externa se localizan las glicoproteínas hemaglutinina (HA), responsable de la unión virus-célula y de la fusión con la membrana endosómica<sup>3</sup> y neuraminidasa (NA), que libera el ácido siálico del receptor celular para el virus y permite su difusión<sup>4</sup>. Estas glicoproteí-

nas constituyen los antígenos más importantes del virus. Su flexibilidad estructural<sup>5,6</sup> y la variabilidad genética viral<sup>7,8</sup> determinan su enorme diversidad antigénica y la peculiar epidemiología del virus.

La transcripción y replicación de cada RNP es independiente y da lugar a tres tipos de ARN (fig. 1): a) ARNm; moléculas de polaridad positiva, copias incompletas del ARN genómico, que contienen estructuras *cap* en su extremo 5'<sup>9</sup> y poli-A en su extremo 3'<sup>10</sup>; b) ARNc, moléculas de polaridad positiva exactamente complementarias al ARN genómico, y c) ARNv; moléculas de polaridad negativa presentes en el virión. Todos los segmentos de ARNv contienen secuencias conservadas en sus extremos 5' y 3'<sup>11</sup>, parcialmente complementarias entre sí<sup>12</sup>, que podrían ser importantes en los procesos de transcripción y replicación.

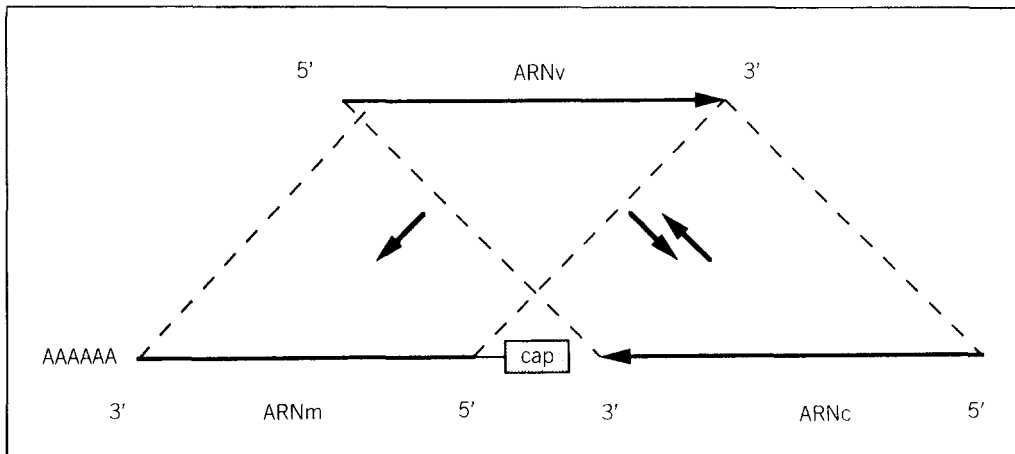


Fig. 1. Diagrama de la estructura y relaciones entre los tres tipos de ARNs víricos que se producen en células infectadas. El trazo delgado representa secuencias de ARN celulares próximas al *cap*, que la transcriptasa usa como iniciador.

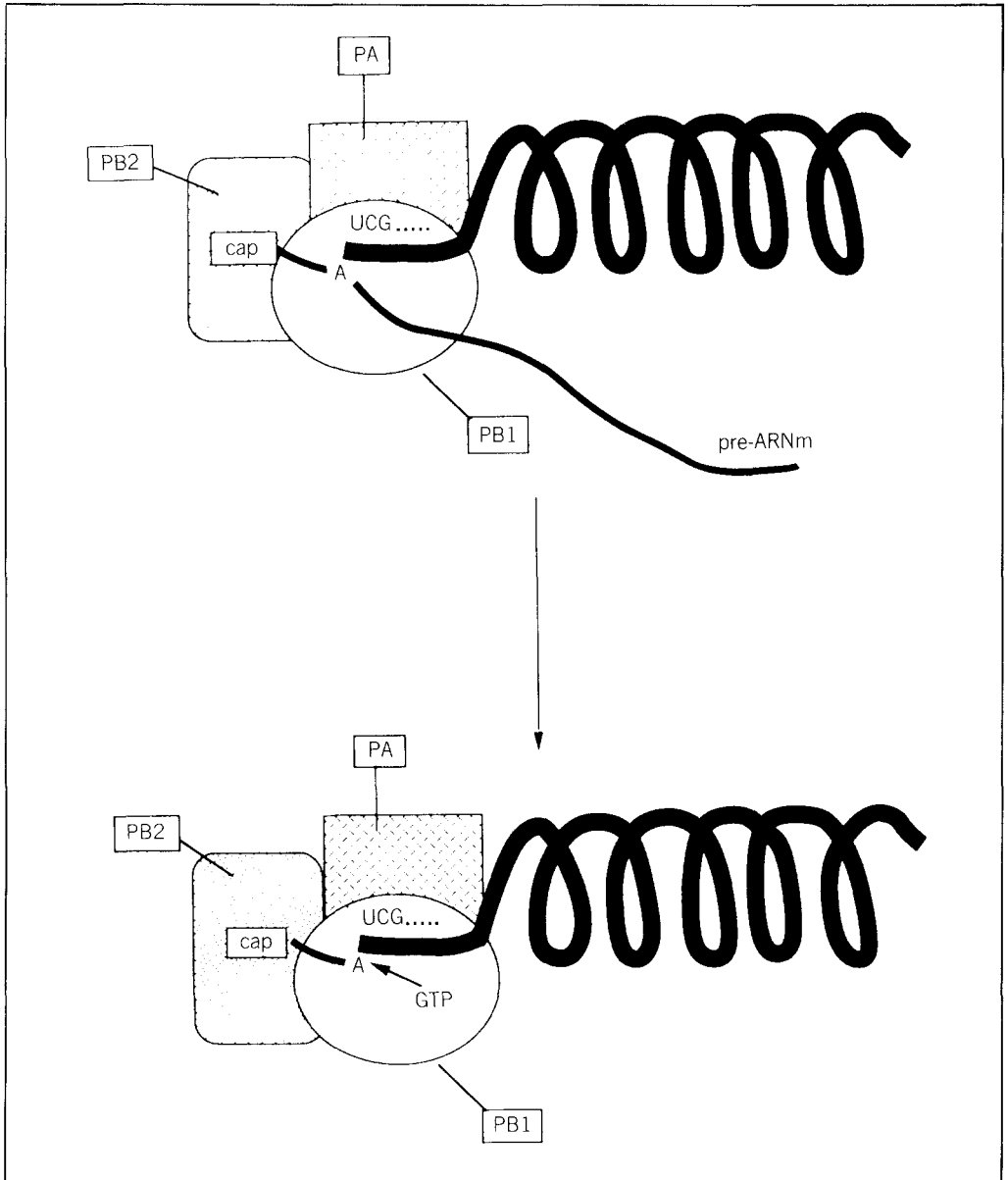


Fig. 2. Esquema de iniciación y alargamiento de transcripción. El trazo grueso representa una RNP que contiene ARNv. El trazo delgado indica un pre-ARNm que se asocia a PB2 y es cortado endonucleolíticamente dejando un residuo A en su extremo 3'. El primer nucleótido incorporado (G) es complementario al segundo residuo del molde (modificado de la referencia 34).

### Transcripción

Desde hace tiempo se sabe que la síntesis de ARNm vírica es inhibida por actinomicina D y al-

faamanitina, fármacos que afectan la transcripción sobre ADN y la actividad ARN polimerasa II, respectivamente<sup>13-15</sup>. El aparente contrasen-

tido que implica el hecho de que un ortomixovirus fuera inhibido por estos fármacos quedó explicado al establecerse que la polimerasa del virus utiliza los pre-ARNm celulares con *cap* tipo I (7mGpp Nm) para generar iniciadores de transcripción<sup>16,17</sup>. En línea con estas observaciones, la síntesis de ARNm viral tiene lugar en el núcleo de la célula infectada<sup>18,19</sup>.

En el ciclo infectivo se pueden distinguir dos tipos de transcripción: la transcripción *primaria* tiene lugar sobre RNPs parentales y no requiere síntesis de proteínas. Por el contrario, la transcripción *secundaria* se produce sobre RNPs *progenie* y requiere de síntesis previa de proteínas víricas. Dentro de la transcripción secundaria se aprecian dos fases: *temprana*, en la que la síntesis de ARNm y ARNv están acopladas y existen diferencias en las velocidades de síntesis de los distintos segmentos (los 5 y 7 se sintetizan antes que los 4,6 y 8) y *tardía*, en la que la síntesis de ARNm es muy reducida mientras que la síntesis de todos los segmentos de ARNv tiene lugar a velocidad máxima<sup>20</sup>.

La síntesis de ARNm puede llevarse a cabo *in vitro* a partir de RNPs procedentes de viriones<sup>21</sup> y se estimula por iniciadores específicos (ARNms) celulares que contienen estructuras *cap* tipo I<sup>22</sup> o dinucleótidos como ApG o GpG<sup>23</sup>. En el complejo de transcripción se encuentran, además del ARN y NP, las subunidades PB1, PB2 y PA<sup>24</sup> de la polimerasa vírica. Evidencias genéticas relacionan los genes codificantes de PB1 y PB2 con la síntesis de ARN vírico en su conjunto<sup>25-29</sup>, mientras que la subunidad PA no parece estar implicada directamente en la transcripción. Mediante experimentos de entrecruzamiento (*cross-linking*) se ha determinado que la subunidad PB2 tiene afinidad por la estructura *cap* y que la subunidad PB1 contiene el sitio activo para la polimerización<sup>30,31</sup>. De hecho, se han detectado homologías entre la secuencia de aminoácidos de PB2 y las de proteínas que unen *cap* en humanos y levaduras<sup>32</sup> y entre la secuencia de PB1 y las de la familia de ARN replicasas víricas y retrotransposones<sup>32,33</sup>. Con esta información, se ha propuesto un modelo para la transcripción del ARN del virus de la gripe (fig. 2)<sup>34</sup>.

En el núcleo de la célula infectada se ha detectado una población de complejos solubles que contienen PB1, PB2 y PA de nueva síntesis<sup>35</sup>, lo que sugiere que las funciones de la polimerasa vírica se realizan no tanto por sus subunidades sino por complejos de éstas, que se unirían al ARN vírico cubierto por NP. Sin embargo, se desconoce si los distintos cometidos

atribuibles a ARN polimerasa (unión al *cap*, corte endonucleolítico de pre-ARNms, transcripción, replicación, etc.) vienen mediados por distintos complejos o por modificaciones de uno solo. La expresión de la subunidades a partir de versiones génicas en forma de ADN<sup>36-38</sup> (S. de la Luna, datos no publicados) permitirá eventualmente el análisis estructural y funcional de estos complejos.

La transcripción de los segmentos víricos 7 y 8 da lugar, en cada caso, a dos ARNms distintos. Uno de ellos es colineal con el segmento correspondiente mientras que el otro se produce por maduración del primero<sup>39-41</sup>. Dado que las proteínas codificadas por ambos tipos de ARNms (NS1 y NS2 en el segmento 8; M1 y M2 en el segmento 7) son probablemente necesarias para la infectividad vírica, la maduración de los ARNms colineales ha de ser regulada, de modo que sólo una parte de la población esté procesada. Existe evidencia de que ciertos productos víricos pueden estar implicados en esta regulación<sup>42</sup> (J. Valcárcel, datos no publicados).

## Replicación

Dentro del proceso de replicación, se pueden distinguir dos etapas: síntesis de ARNc (intermedio replicativo) y síntesis de ARNv. Las moléculas de ARNc son copias completas del ARNv y su síntesis no requiere iniciador, ya que su extremo 5' contiene pppA<sup>43</sup>. En el ciclo infectivo vírico, la síntesis de ARNc es relativamente temprana, pues tiene lugar inmediatamente después de la transcripción primaria, y origina proporciones iguales de cada segmento de ARN vírico<sup>44</sup>. Una vez sintetizadas, las moléculas de ARNc quedan retenidas en el núcleo en forma de RNPs<sup>20</sup>, donde son usadas en los complejos replicativos que producen ARNv. Aunque no es posible la síntesis *in vitro* de ARNc con RNPs derivadas de viriones, se puede obtener usando extractos derivados de células infectadas<sup>45,46</sup>.

Los mecanismos responsables de la transición entre los procesos de transcripción (síntesis de ARNm) y replicación (síntesis de ARNc) no están completamente claros. Por los resultados obtenidos en experimentos de síntesis *in vitro*, se ha sugerido que NP es el factor antiterminador (que anularía la señal de terminación) y que la iniciación de síntesis con estructuras *cap* ARN es incompatible con el empaquetamiento por NP y, por tanto, con la antiterminación (fig. 3)<sup>47</sup>. Este modelo, aunque sugerente, no

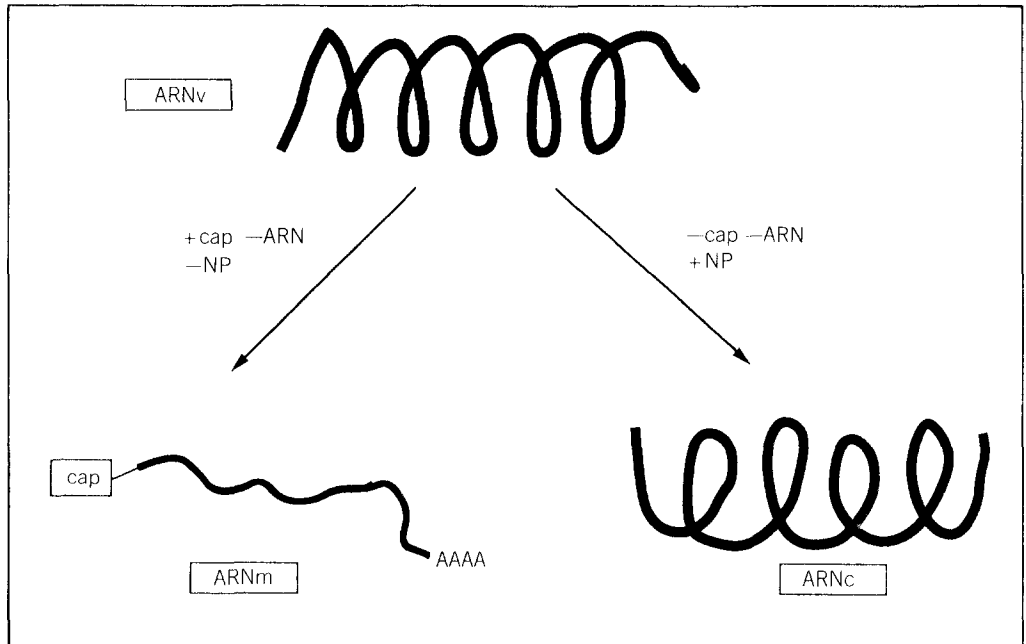


Fig. 3. Modelo de regulación de transcripción versus replicación. La iniciación con cap ARN evita la nucleación del nuevo ARN con NP y da lugar a la síntesis de ARNm. Por el contrario, la iniciación de novo permite la asociación del ARN con NP y la síntesis de una RNP que contiene ARNc.

explica por qué cambian los complejos de iniciación de manera concomitante con la síntesis de nueva proteína vírica. ¿Son distintos los complejos de polimerasa responsables de transcripción y de síntesis de ARNc? En caso afirmativo, ¿en qué se diferencian?

La cinética de acumulación de ARNv en la célula infectada muestra que su síntesis continúa a velocidad máxima hasta tiempos muy tardíos en el ciclo infectivo, cuando la producción de partículas víricas es ya máxima. Esta síntesis tiene lugar en el núcleo<sup>19</sup>, presumiblemente sobre RNPs con ARNc allí situados. Por el análisis del fenotipo de mutantes *ts*, se ha relacionado la función de los genes codificantes de PB1, PB2, PA y NP con la síntesis de ARNv, aunque es posible que sólo PA esté directamente implicada, mientras que los demás fenotipos podrían ser consecuencia indirecta de una inhibición de la transcripción<sup>25</sup>.

La posible implicación de proteínas NS1 y NS2 en el proceso<sup>48,49</sup> no ha sido confirmada.

La síntesis del ARNv *in vitro* no puede realizarse usando RNPs de viriones, sino que hay que utilizar fracciones de células infectadas. En un estudio reciente<sup>50</sup>, se ha descrito la síntesis

de ARNv *in vitro* con extractos salinos de núcleos de células infectadas y se ha sugerido el requerimiento de NP en el proceso. Sin embargo, no se ha caracterizado bioquímicamente el ARN producto de la síntesis. Por otra parte, se ha llevado a cabo un análisis exhaustivo de la capacidad que distintas fracciones subcelulares tienen para la síntesis de ARNv (J.A. López-Turiso et al, en prensa). Este estudio ha revelado que mientras es posible inducir la síntesis de ARNv en cualquier fracción subcelular por acción del oligonucleótido ApGpU, en ausencia de iniciador sólo las RNPs ancladas en la matriz nuclear pueden sintetizar ARNv *in vitro*. Además, este ARNv fue caracterizado como tal por su tamaño, ensayo de protección a ARNasas y mapeado de oligonucleótidos resistentes a T1. Este resultado es compatible con datos previos obtenidos *in vivo*<sup>19,20</sup> y relaciona la estructura del nucleosqueleto con el proceso de replicación del ARN vírico.

### Conclusiones y perspectivas

Aunque en los últimos años se han realizado considerables progresos en el estudio del pro-

ceso de transcripción del ARN del virus de la gripe, quedan muchas preguntas todavía por contestar, sobre todo en lo referente a la estructura detallada y sitios activos del complejo de transcripción. Nuestro conocimiento de la replicación del ARN vírico es todavía más escaso, pues no entendemos el mecanismo de iniciación ni los controles que permiten regular el cambio de transcripción a replicación. Tampoco entendemos cómo ciertos segmentos de ARN<sub>v</sub> se sintetizan antes y otros después. Por último, la implicación de factores celulares en el proceso es un campo nuevo sobre el que apenas existen datos experimentales.

Dado el bajo nivel de nuestro conocimiento de estos procesos, éste es un campo de investigación de gran interés. No olvidemos que se trata de procesos víricos que no tienen paralelo en la célula huésped y por tanto son puntos potenciales para interferir en el ciclo infectivo sin afectar los procesos celulares normales. En efecto, no conocemos paralelos celulares a ciertos pasos ya conocidos en la transcripción y replicación del ARN vírico: a) actividad endonucleasa dependiente de *cap* tipo I; b) actividad ARN polimerasa dependiente de ARN. Por otra parte, parece que estas funciones son dependientes de la formación de complejos PB1-PB2-PA ( $\zeta$ -NP?). Por tanto, la interferencia en la formación de éstos puede ser suficiente para afectar las funciones víricas antes descritas.

El conocimiento más profundo a nivel molecular de estos procesos abrirá las puertas al diseño de fármacos potencialmente útiles en el control de las infecciones por el virus de la gripe.

### Agradecimiento

El trabajo realizado en el laboratorio de los autores ha sido subvencionado por ayudantes de la CAICYT (n.º 438) y de la CICYT (n.º BIO88-0191-CO2-01) y por ayudas institucionales del FIS y de la Fundación Ramón Areces al Centro de Biología Molecular. J.A. López-Turiso y J. Valcárcel han recibido las becas del FIS y S. de la Luna y P. Suárez de becas del Plan Nacional de Formación de Personal Investigador.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Lamb, RA. The influenza virus RNA segments and their encoded proteins. En: Palese P, Kingsbury DW, eds. Genetics of influenza viruses. Viena, Springer Verlag, 1983; 19-69.
2. Gopal-Murti K, Webster RG, Jones IM. Localization of RNA polymerases on influenza virus ribo-

nucleoproteins by immunogold labeling. *Virology* 1988; 164: 562-566.

3. Doms RW, Helenius A, White J. Membrane fusion activity of the influenza virus hemagglutinin: low pH-induced conformational change. *J Biol Chem* 1985; 260: 2.973-2.931.
4. Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans RW. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* 1974; 61: 397-410.
5. Wiley DC, Wilson IA, Skehel JJ. Structural identification of the antibody binding sites of the Hong Kong influenza hemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* 1981; 298: 373-378.
6. Colman P, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* 1983; 303: 41-44.
7. Palese P, Young JF. Variation of influenza A, B and C viruses. *Science* 1982; 215: 1.468-1.474.
8. Ortín J, Nájera R, López C, Dávila M, Domingo E. Genetic variability of Hong Kong (H3N2) influenza viruses: Spontaneous mutations and their location in the viral genome. *Gene* 1980; 11: 319-331.
9. Krug RM, Morgan MM, Shatkin AJ. Influenza viral messenger RNA contains internal N6-methyladenosine and 5'-terminal 7-methylguanosine in cap structures. *J Virol* 1976; 20: 45-53.
10. Robertson JS, Schubert M, Lazzarini RA. Polyadenylation sites for influenza mRNA. *J Virol* 1981; 38: 157-163.
11. Skehel JJ, Hay AJ. Nucleotide sequences of the 5'-termini of influenza virus RNAs and their transcripts. *Nucleic Acids Res* 1978; 5: 1.207-1.219.
12. Desselberger U, Raccaniello VR, Zarza JJ, Palese P. The 3' and 5'-end terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene* 1980; 8: 315-328.
13. Rott R, Scholtissek C. Specific inhibition of influenza replication by alfa-amanitin. *Nature* 1970; 228: 56-58.
14. Mahy BWJ, Hastie ND, Armstrong SJ. Inhibition of influenza virus replication by alfa-amanitin: mode of action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69: 1.421-1.424.
15. Lamb RA, Choppin PW. Synthesis of influenza virus polypeptides in cells resistant to alfa-amanitin: evidence for the involvement of cellular RNA polymerase II in virus replication. *J Virol* 1977; 23: 816-819.
16. Krug RM, Broni BA, Bouloy M. Are the 5'-ends of influenza viral mRNAs synthesized *in vivo* donated by host mRNAs? *Cell* 1979; 18: 329-334.
17. Caton AJ, Robertson JS. Structure of the host-derived sequences present at the 5'-ends of influenza virus mRNA. *Nucleic Acids Res* 1980; 8: 2.595-2.603.
18. Herz C, Stavtzer E, Krug RM, Gurney T Jr. In-

- fluenza virus, an RNA virus, synthesizes its messenger RNA in the nucleus of infected cells. *Cell* 1981; 26: 391-400.
19. Jackson DA, Caton AJ, McCready SJ, Cook PR. Influenza virus RNA is synthesized at fixed sites in the nucleus. *Nature* 1981; 296: 366-368.
  20. Shapiro GI, Gurney T Jr, Krug RM. Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late time of infection and nuclear cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J Virol* 1987; 61: 764-773.
  21. Skehel JJ. RNA dependent RNA polymerase activity of the influenza virus. *Virology* 1971; 45: 793-796.
  22. Bouloy M, Plotch SJ, Krug RM. Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978; 75: 4.886-4.890.
  23. McGeoch D, Kitron N. Influenza virion RNA dependent RNA polymerase: stimulation by guanosine and related compounds. *J Virol* 1975; 15: 686-695.
  24. Horisberger MA. The large P proteins of influenza A viruses are composed of one acidic and two basic polypeptides. *Virology* 1980; 107: 302-305.
  25. Krug RM, Ueda M, Palese P. Temperature sensitive mutants of influenza WSN virus defective in virus-specific RNA synthesis. *J Virol* 1975; 16: 790-796.
  26. Scholitssek C, Bowles AL. Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of fowl plague virus. *Virology* 1975; 67: 576-587.
  27. Mahy BW J, Barret T, Nichol ST, Penn CR, Wolstenholme AJ. Analysis of the functions of influenza virus genome segments by use of temperature sensitive mutants of fowl plague virus. En: Bishop DHL, Compans RW, eds. *The replication of negative strand viruses*. Amsterdam, Elsevier North-Holland 1981; 379-387.
  28. Nichol ST, Penn CR, Mahy BWJ. Evidence for the involvement of influenza A (fowl plague Rostock) virus P2 in ApG and mRNA primed *in vitro* RNA synthesis. *J Gen Virol* 1981; 57: 407-413.
  29. Thierry F, Danos O. Use of specific single stranded DNA probes cloned in M13 to study the RNA synthesis of four temperature-sensitive mutants of HK/68 influenza viruses. *Nucleic Acids Res* 1982; 10: 2.925-2.937.
  30. Ulmanen I, Broni BA, Krug RM. Role of the of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7Gpp Nm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7.355-7.359.
  31. Romanos MA, Hay AJ. Identification of the influenza virus transcriptase by affinity labelling with pyridoxal-5-phosphate. *Virology* 1984; 132: 110-117.
  32. De la Luna S, Martinez C, Ortin J. Molecular cloning and sequencing of influenza virus A/Victoria/3/75 polymerase genes: sequence evolution and prediction of possible functional domains. *Virus Res* 1989; 13: 143-156.
  33. Poch O, Sauvaget I, Dalarue M, Tordo N. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *The EMBO J.* 1989; 8: 3.867-3.874.
  34. Braam J, Ulmanen I, Krug RM. Molecular model of a eukaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA primed transcription. *Cell* 1983; 34: 609-618.
  35. Detjen BM, St. Angelo C, Katze MG, Krug RM. The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cells are in form of a complex. *J Virol* 1987; 61: 16-22.
  36. St Angelo C, Smith GE, Summers MD, Krug RM. Two of the three influenza virus polymerase (P) proteins expressed using baculovirus vectors form a complex in insect cells. *J Virol* 1987; 61: 361-368.
  37. Digard P, Block VC, Inglis SC. Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology* 1989; 171: 162-169.
  38. Krystal M, Ruan Lyles D, Paulakis G, Palese P. Expression of the three influenza virus polymerase proteins in a single cells allows growth complementation of viral mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2.709-2.713.
  39. Lamb RA, Chopin PW. Segment 8 of influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4.908-4.912.
  40. Inglis SC, Barrett T, Brown CM, Almond JW. The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 3.790-3.794.
  41. Lamb RA, Lai CY. Conservation of the influenza virus membrane protein (M1) amino acid sequence and an open reading frame of RNA segment 7 encoding a second protein (M2) in H1N1 and H3N2 strains. *Virology* 1981; 112: 746-751.
  42. Smith DB, Inglis SC. Regulated production of an influenza virus spliced mRNA mediated by virus-specific products. *The EMBO J.* 1985; 4: 2.313-2.319.
  43. Hay AJ, Skehel JH, McCauley J. Characterization of influenza virus complete transcripts. *Virology* 1982; 116: 517-522.
  44. Hay AJ, Lomniczi B, Bellamy AR, and Skehel JJ. Transcription of the influenza virus genome. *Virology* 1977; 83: 337-355.
  45. Beaton AR, Krug RM. Synthesis of the templates for influenza virion RNA replication *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 4.682-4.686.
  46. del Rio L, Martinez C, Domingo E, Ortin J. *In vitro* synthesis of full-length influenza virus complementary RNA *The EMBO J.* 1985; 4: 243-47.
  47. Beaton AR, Krug RM. Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5'-capped end. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 6.282-6.286.

48. Koennecke I, Boscheck CB, Sholtissek C. Isolation and properties of a temperature-sensitive mutant (ts412) of an influenza A virus recombinant with a ts lesion in the gene coding for the non-structural protein. *Virology* 1981; 110: 16-25.
49. Wolstenholme AJ, Barrett T, Nichol ST, Mahy BWJ. Influenza virus specific RNA and protein synthesis in cells infected with temperature sensitive mutants defective in the genome segments encoding nonstructural proteins. *J Virol* 1980; 35: 1-7.
50. Shapiro GI, Krug RM. Influenza virus RNA replication *in vitro*: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J Virol* 1988; 62: 2.285-2.290.

## DISCUSIÓN

E. CERDÁ: Me ha llamado la atención el modelo de «árbol genealógico» expuesto por usted de una de las proteínas a lo largo de algunos años. Sorprende la heterogeneidad de la población de virus, y quisiera preguntarle hasta qué punto es posible detectar estas diferencias en infecciones clínicas. La segunda cuestión se refiere al aspecto de este árbol, que recuerda a una raspa de sardina: aparentemente no hay ninguna razón para que haya una línea evolutivamente predominante a lo largo del tiempo mientras que las ramas laterales se extinguen. ¿A qué se debe que las ramas laterales tengan éxitos sólo temporales, en una infección se supone, y luego se extinguen y vuelva a ser una especie de reservorio ancestral de virus menos exitosos los responsables de la siguiente infección?

J. ORTÍN: Contestando a la primera parte de su pregunta relativa a la heterogeneidad en la población quiero aclarar que esto son aislados de ARN clínico. Se aísla una cepa a partir de un enfermo y eventualmente este virus crece en un sistema *in vitro* y se analiza la secuencia promedio de ese aislado. Cuando se analiza la heterogeneidad del aislado o la heterogeneidad entre aislados obtenidos en un mismo brote epidémico localizado, por ejemplo en Sevilla, el resultado es que se observa heterogeneidad genética. Es posible detectar diversidad de secuencias entre distintos aislados de un mismo brote. También es posible detectar heterogeneidad entre distintas partículas de un mismo aislado, si bien esto es más difícil ya que el grado de heterogeneidad es menor.

En cuanto a la segunda cuestión ¿por qué esta línea vertical predominante? La respuesta es que no lo sé, aunque podría especularse que en todo caso la población humana susceptible es siempre parcialmente inmune, ya que estamos sometidos a reinfecciones continuas.

En mi opinión, la epidemiología de este virus está influida por la larga duración de nuestra vida, la infección temprana de la especie humana y la infección por distintas especies evolutivamente nuevas a lo largo del tiempo. En consecuencia, cualquier infección afecta esencialmente a individuos parcialmente inmunes. Por tanto, siempre hay una selección en contra de la secuencia predominante. Como ya he comentado, esto es simplemente especulación, y por tanto todos estos aspectos son cuestionables.

R. LLOPIS: No me ha quedado claro cómo se realiza la síntesis de ARN *in vitro*.

J. ORTÍN: Son ensayos de síntesis de ARN utilizando los ribonucleósidos trifosfatos adecuados, así como el tampón que ya habíamos optimizado previamente y proteína derivada de distintas fracciones de las células infectadas por el virus.

R. LLOPIS: Es decir, se supone que el complejo tiene ya las polimerasas sintetizadas *in vivo*.

J. ORTÍN: Efectivamente, nosotros no añadimos ARN exógeno al ensayo, sino que es el complejo de transcripción o replicación intracelular el que está proporcionando el molde y la enzima. De hecho, el molde en sí es una ribonucleoproteína, no es ARN aislado.

R. LLOPIS: Quisiera preguntarle también si utilizan detergentes en estos ensayos.

J. ORTÍN: Nosotros no utilizamos detergentes en los ensayos pero pueden emplearse detergentes no iónicos, sin que ello comporte inhibición enzimática.

R. LLOPIS: ¿Cuántos ribonucleótidos son capaces de alargar en condiciones de ensayo óptimas?

J. ORTÍN: Producimos ARNs completos, cuya longitud oscila entre 2541 y 890, según la especie que estamos considerando.

R. LLOPIS: Entiendo que éste es el tamaño que

- ustedes detectan. ¿Qué parte está ya presente *in vivo* y cuál añaden ustedes?
- J. ORTIN: Nosotros efectuamos una síntesis *in vitro* sin iniciador pero no puedo contestar a su pregunta, ya que no sabemos cuánto se había alargado ya en el complejo *in vivo*.
- I. FAUS: Según ha comentado, estas proteínas las expresan en bacterias, ¿son proteínas funcionales, están glicosiladas de manera correcta?
- J. ORTIN: En ningún caso están glicosiladas, de hecho no sabemos si los productos génicos están glicosilados o no. Esta es una de las cuestiones que queremos analizar en células de mamífero. Las proteínas de virus de mamífero generalmente no se glicosilan en *E. coli*, ya que los sistemas de glicosilación son distintos. En cuanto a si son funcionales o no, no lo hemos probado, pero lógicamente no cabe esperar que los fragmentos de la proteína sean funcionales. Nuestra intención no era obtener proteínas funcionales en *E. coli*, sino obtener antígeno abundante para poder inmunizar y preparar anticuerpos policlonales o monoclonales.
- I. FAUS: ¿Ha observado problemas de solubilidad de estas proteínas?
- J. ORTIN: La mayor parte del producto es insoluble, como ocurre casi siempre con estas expresiones altas en *E. coli*. Pero también en este caso si lo que pretendemos es obtener un anticuerpo, no nos preocupa demasiado la solubilidad.
- L. ENJUANES: ¿Es cierto que la estirpe de gripe B varía mucho más que la A? y, si es esto correcto, ¿se han obtenido recombinantes para ver los genes responsables de la mayor variabilidad de una en comparación con la otra?
- J. ORTIN: No es cierto. B varía menos que A y muestra una epidemiología, y un patrón de variación parcialmente distinto. Además, no se producen recombinantes intertípicos.
- R. GONZALEZ: ¿Conoce usted si alguien ha estudiado la interacción entre el ARN y la proteína para inhibir la asociación del ARN con la nucleoproteína y evitar así la replicación?
- J. ORTIN: Bien, hay dos tipos de estudios. Por una parte, hay grupos que han estudiado la interacción de la nucleoproteína con ARN. Los datos presentados hasta el momento sugieren, aunque yo creo que todavía no demuestran, que no hay especificidad, lo cual resulta chocante. En cuanto a la interacción de nucleoproteína con ARN específico vírico, se observa interacción con todo tipo de ARN. Lo que sí se sabe es que la interacción de la proteína matriz, M1, que rodea la nucleoproteína en la partícula, con la partícula ribonucleica, inhibe parcialmente la transcripción. Según mi información, no se han estudiado otras proteínas en este sentido.
- R. GONZALEZ: Teniendo en cuenta la enorme variabilidad de este virus y la inmunidad parcial de la población, ¿cuál es el efecto de las vacunas contra la gripe?
- J. ORTIN: Aunque yo no soy experto en esta cuestión, las vacunas que se comercializan son parcialmente efectivas a nivel personal, es decir, se dice que son efectivas aproximadamente en el 70 % de los vacunados. Lo que sí está claro es que no son efectivas para romper la onda epidemiológica en un brote.
- F. MURILLO: Queda que comentara el mecanismo por el cual el ARN se asocia al extremo *cap* de los mensajeros, ¿Se trata de una reacción de esterificación? ¿Tiene alguna especificidad?
- J. ORTIN: Se sabe muy poco sobre este mecanismo. La proteína PB2 tiene afinidad por un sitio *cap*; si se añade un análogo de *cap* y se hace un *cross-linking*, esta proteína queda enlazada. Pero eso se ha hecho con el complejo, o sea, realmente no se sabe si la proteína aislada es capaz de unirse al sitio *cap*. Al añadir un ARN con *cap* exógeno marcado el complejo da lugar a una reacción endonucleótica que produce un oligonucleótido de 10 a 15 nucleótidos de longitud. Para un ARN concreto es un oligonucleótido de una longitud determinada, pero evidentemente en la célula hay muchos ARNs que son cortados con resultados por tanto distintos.
- E. MÉNDEZ: Me parece muy acertado su comentario de que la estructura terciaria de una proteína probablemente tiene mucho que ver con la intergenicidad de las proteínas y de los virus. Se ha referido también a las posibilidades de producir anticuerpos con péptidos, aunque esto parece que no funciona muy bien en el caso de los virus. A mí me parece que la estructura terciaria, puede decir mucho en este sentido. ¿Usted sabe si se ha hecho algún tipo de estudio con los programas de ordenadores de diseño gráfico de proteínas disponibles actualmente? ¿Existe algún tipo de relación entre la antigenicidad de esos virus y la estructura tridimensional que se obtiene de ellos? Es decir, el cambio de determinados aminoácidos, ¿puede cambiar considerablemente la estructura globular? Esto se puede realizar actualmente con estos programas informáticos.



J. ORTIN: Efectivamente, la estructura terciaria tiene mucho que ver con la inmunogenicidad de estos virus, con la antigenicidad de esta proteína en concreto. En cuanto a las variaciones de la estructura tridimensional que pueden originar los cambios de aminoácidos pun-

tuales, son cambios muy locales. Eso se ha hecho no por programas informáticos, sino por cristalización de mutantes, y se ha observado que no alteran esencialmente la estructura de la proteína. Son cambios muy locales, que se limitan a la zona de la mutación.