

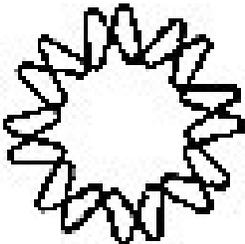


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL
DE LAS PROTEÍNAS
eIF4E, eIF4GI Y eIF4GII
EN LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A
ROSA MARÍA RUBIO ROBLES



DIRECTOR DE TESIS: DRA. SUSANA LÓPEZ CHARRETÓN

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la asesoría de la Dra. Susana López. Durante la realización de este trabajo se contó con una beca otorgada por CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia porque a pesar de la distancia siempre me han hecho sentir que están a mi lado y han creído en mí. Especialmente a mi mamá, por todo su amor.

A Susana, por todo lo que me ha enseñado, por su enorme paciencia en el proceso y por la gran persona que es.

Al Dr. Carlos Arias por todas las sugerencias y por su contribución a mi formación.

Gracias a mis tutores y sinodales Xavier Soberón, José Luis Reyes, Alejandra Covarrubias, José Luis Puente y Lourdes Gutiérrez por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

A Tomás, Ernesto y Pavel por siempre estar dispuestos a ayudar y compartir sus conocimientos.

A Don Pedrito, por darle alegría al laboratorio y a mí con sus piropos.

A Rafitinguis por sus enseñanzas y sobre todo por los apapachos que siempre me reaniman.

A Hilda, por toda su ayuda y conocimientos compartidos. A Margarito, por todo el apoyo que me brindó y por su disposición para ayudarme a crecer.

Gracias a todos y cada uno de los miembros del laboratorio, presentes y que ya no están, porque contribuyen a que el trabajo sea mucho más ameno cada día.

A los carnicautes, por ese jueves tan esperado. A Sele por ser tan linda y especial y sobre todo por ser mi amiga. A mis amigas Clau y Ro, por todos sus consejos (regaños), pero ante todo por siempre estar ahí, aún en los peores momentos, no hay palabras que agradezcan eso.

Y a todos mis demás amigos que logran que la vida valga la pena.

ÍNDICE

Abreviaturas	v
Resumen	1
Introducción	2
Generalidades de Rotavirus	3
Genoma viral	3
Ciclo Replicativo	5
Traducción	7
Antecedentes	12
Hipótesis	15
Objetivos	15
Materiales y métodos	16
Resultados	21
Discusión	35
Conclusiones	40
Perspectivas	41
Referencias	42

ABREVIATURAS

4E-BPs	Proteínas de unión a eIF4E
ATP	Adenín trifosfato
CBC20/80	Complejo de unión al cap 20/80
DLP	Partícula de doble capa
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dsRNA	RNA de doble cadena
eIFs	Factores de inicio eucarióticos
GTP	Guanidín trifosfato
hpi	Horas postinfección
IRES	Sitio interno de entrada del ribosoma
Met	Metionina
MOI	Multiplicidad de infección
mRNA	RNA mensajero
NMD	Degradación de mRNAs inducida por un codón de término temprano
NSPs	Proteínas virales no estructurales
PABP	Proteína de unión al poli(A)
P bodies	Cuerpos de procesamiento
Poli(A)	Poli adenina
RI	Intermediario de replicación
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
rRNA	RNA ribosomal

siRNA	RNA pequeño interferente
SFB	Suero fetal bovino
SGs	Gránulos de estrés
TLP	Partícula de triple capa
tRNA	RNA de transferencia
tRNA_i	tRNA iniciador
VPs	Proteínas virales estructurales
UTR	Región no traducida

RESUMEN

Los rotavirus representan la principal causa de gastroenteritis en niños menores de 2 años. Se ha observado que durante la infección con estos virus hay una severa reducción en la síntesis de proteína celular, fenotipo causado al menos parcialmente por la proteína viral NSP3, a través de su interacción con la proteína eIF4GI y al mismo tiempo desplazando a PABP de complejos de traducción.

Durante el inicio de la traducción el complejo eIF4F se une al cap de los mRNAs. Este complejo está formado por la helicasa eIF4A, la proteína de unión al cap eIF4E y el factor eIF4G. Este último existe en la célula como dos formas funcionalmente homólogas, eIF4GI y eIF4GII. eIF4A y eIF4E se unen a eIF4G, el cual por medio de interacciones con otras proteínas recluta a la subunidad pequeña ribosomal 40S en el extremo 5' de los mRNAs. Otra interacción muy importante es la que se da entre eIF4G y la proteína de unión a poli(A) (PABP), ya que debido a esto se ponen en proximidad los extremos 5' y 3' de los mRNAs, lo que provoca la circularización de los mismos y esto, a su vez, estimula su traducción. Recientemente, en nuestro laboratorio se encontró que los mRNAs de rotavirus no requieren para su traducción de la proteína NSP3, ni de la proteína celular, eIF4GI. En este trabajo se estudió el papel de los factores de inicio de la traducción eIF4GI y eIF4GII y de la proteína de unión al cap, eIF4E, en la infección del virus. Para esto, se silenció la expresión de estas proteínas celulares mediante RNA de interferencia y se analizó la síntesis de proteínas, la infectividad y el rendimiento viral. Los resultados nos confirman que el factor eIF4GI no juega un papel en el ciclo replicativo del virus, sin embargo, el factor eIF4GII parece estar participando en la producción de proteínas virales. eIF4E, una proteína cuyo papel principal ha sido descrito en traducción, no es requerida para la traducción de los mRNAs virales, sin embargo, se encontró que en su ausencia se afectó la producción de partículas infecciosas, hecho relacionado con una disminución en la cantidad de RNA mensajero y de doble cadena del virus.

INTRODUCCIÓN

Los Rotavirus son la causa principal de gastroenteritis en niños menores de dos años y están involucrados en la muerte de aproximadamente 500 000 niños cada año en todo el mundo (50).

La sintomatología típica de la infección por rotavirus es diarrea severa (más de 8 evacuaciones al día) acompañada de vómito y puede, o no, cursar con fiebre. Ésta es una enfermedad autolimitada, con una duración promedio de aproximadamente cinco días. La gran mortalidad asociada a esta enfermedad es debida a la severa deshidratación que provoca la infección (34).

El tropismo de los rotavirus está limitado a los enterocitos maduros localizados en las puntas de las vellosidades del intestino delgado, causando descamación y muerte celular. Se ha propuesto que, al menos en parte, la diarrea es causada por la proteína viral no estructural NSP4 que estimula la secreción transepitelial de cloro, por una vía dependiente de calcio, lo que desequilibra el balance iónico de la célula y provoca la salida de agua. Aparentemente, todo esto sucede previo a la destrucción del epitelio intestinal por la replicación viral (50).

Los rotavirus comprenden un género dentro de la familia *Reoviridae*. Existen varios grupos de rotavirus, dependiendo de sus características antigénicas; hasta ahora se han descrito seis grupos (A–F), que difieren también en sus características epidemiológicas, la especie animal donde más frecuentemente se encuentran y el grupo de edad en la que son más prevalentes. Los grupos A, B, y C se han encontrado tanto en animales como en humanos, y los rotavirus de los grupos D, E y F sólo se han aislado de especies animales (14). Los rotavirus del grupo A son los responsables de la gran mayoría de las gastroenteritis tanto en animales como en el hombre y es por eso que son los más caracterizados. En este trabajo nos referimos solamente a los rotavirus del grupo A.

Generalidades de Rotavirus

La partícula viral madura tiene un diámetro aproximado de 100 nm y está compuesta de tres capas concéntricas de proteínas: nucleocápside, capa intermedia y capa externa, juntas forman una estructura icosaédrica y carecen de envoltura lipídica (14).

Existen tres tipos de partículas virales con diferentes características estructurales y funcionales: la partícula completa, que contiene las tres capas proteicas, es también llamada TLP (Triple-Layered Particle) y es la partícula infecciosa ya que las proteínas de la capa externa VP4 y VP7 que son las responsables de la unión y la penetración a la célula huésped; la partícula que contiene dos capas proteicas o DLP (Double-Layered Particle) no es infecciosa, pero es transcripcionalmente activa; por último, las partículas que contienen una sola capa de proteínas, o nucleocápsides, poseen la actividad de replicar al genoma viral (Figura 1) (34). Durante la infección, en el citoplasma celular se forman estructuras llamadas viroplasmos, las cuales son acumulaciones de las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3, VP6 y las proteínas no estructurales NSP2, NSP5 y NSP6, así como de RNA viral; en estas estructuras se lleva a cabo la replicación, el empaquetamiento del genoma y el inicio de la morfogénesis del virus (13, 22).

Organización del genoma viral

El genoma viral está constituido por 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) que se transcriben dentro de las DLPs. El RNA mensajero (mRNA) sale de estas estructuras hacia el citoplasma celular por medio de poros formados por la proteína VP2 (31). Los mRNAs virales tienen regiones no traducidas de longitud variable tanto en su extremo 5' como en el 3' flanqueadas por dos secuencias consenso diferentes entre sí y comunes a todos los genes. Por ejemplo, en los rotavirus del grupo A, la secuencia consenso del extremo 3' terminal es UGACC3' y está conservada entre los 11 genes de los virus de este grupo. Los mRNAs virales tienen un cap con la secuencia m⁷GpppG^(m)GPy en el extremo 5', pero a diferencia de la mayoría de los mRNAs celulares, no tienen un fragmento de poli(A) en su extremo 3'. Cada segmento de RNA codifica para una proteína viral, excepto el gen 11, el cual contiene dos marcos abiertos de lectura y codifica para dos proteínas (14, 34). Los mRNAs virales pueden cumplir dos funciones: ser traducidos a

proteínas o bien, transportados a viroplasmos donde sirven de plantillas para la síntesis del dsRNA genómico.

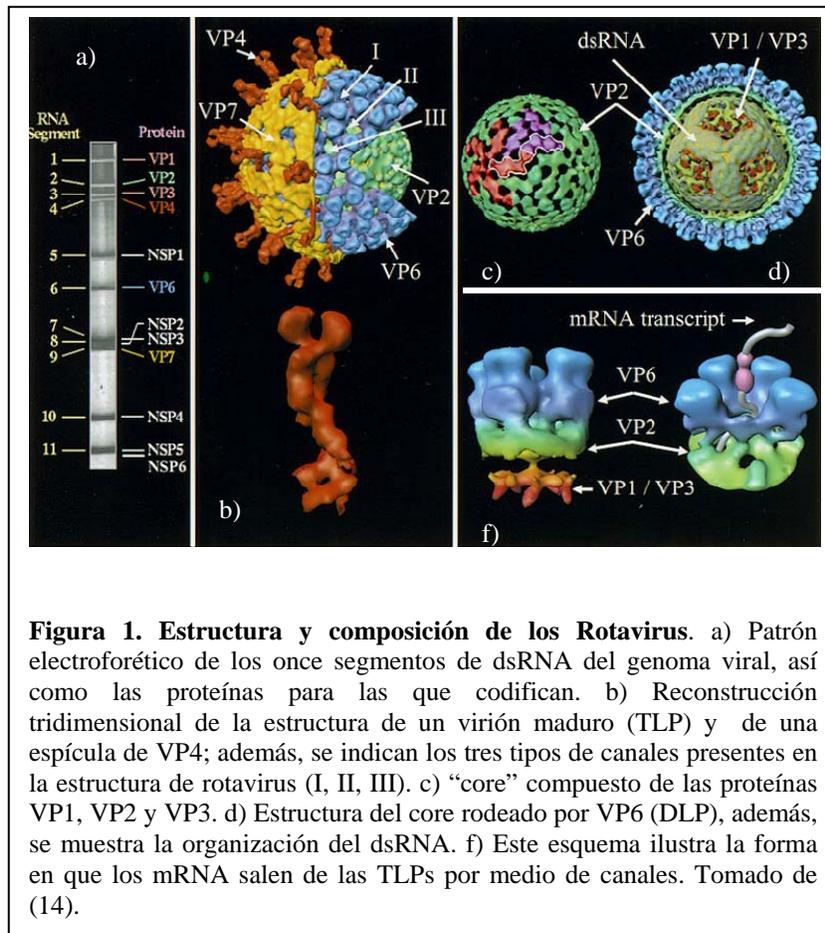


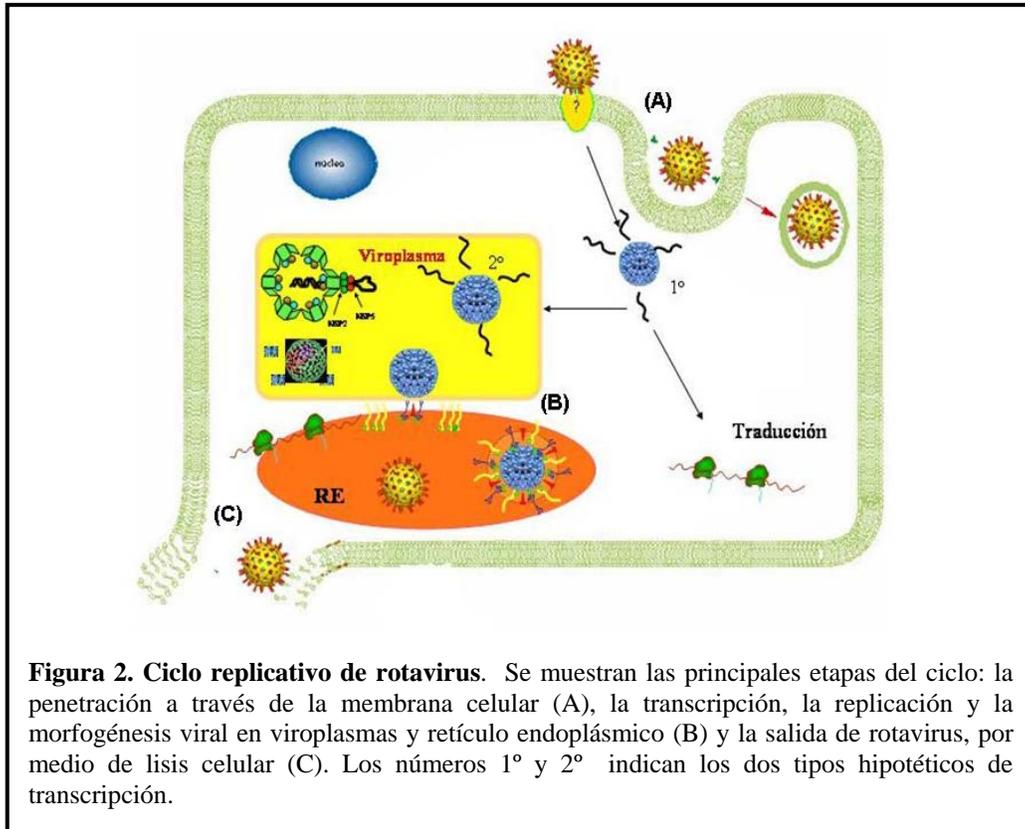
Figura 1. Estructura y composición de los Rotavirus. a) Patrón electroforético de los once segmentos de dsRNA del genoma viral, así como las proteínas para las que codifican. b) Reconstrucción tridimensional de la estructura de un virión maduro (TLP) y de una espícula de VP4; además, se indican los tres tipos de canales presentes en la estructura de rotavirus (I, II, III). c) “core” compuesto de las proteínas VP1, VP2 y VP3. d) Estructura del core rodeado por VP6 (DLP), además, se muestra la organización del dsRNA. e) Este esquema ilustra la forma en que los mRNA salen de las TLPs por medio de canales. Tomado de (14).

Seis de los genes virales, los genes 1, 2, 3, 4, 6 y 9 codifican para las proteínas estructurales que conforman la partícula viral y que se denominan con el prefijo VP (Viral Protein) VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7, respectivamente. Los 5 genes restantes (segmentos 5, 7, 8, 10 y 11) codifican para seis proteínas no estructurales, las que se denominan con el prefijo NSP (Non Structural Protein) NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6. Estas proteínas, que no forman parte de la estructura del virión, son sintetizadas en el citoplasma de la célula durante la infección y tienen funciones relacionadas con el control de la síntesis de proteínas celulares y virales, con la replicación del genoma, con el empaquetamiento de los genes virales y con la maduración de la partícula viral en el interior de la célula (14).

Ciclo Replicativo

El ciclo replicativo de rotavirus comienza con la unión de las TLPs a receptores de la superficie celular. Una vez unidas estas partículas, penetran en las células perdiendo la capa más externa, formada por VP7 y VP4, lo cual promueve que se active la transcriptasa viral y se inicie la síntesis de los mRNAs virales (33, 34). Los transcritos salen a través de canales formados por VP2 y son utilizados ya sea para la síntesis de proteínas virales o sirven como moldes para la síntesis del dsRNA que formará el genoma de la progenie viral (31, 34). Los mRNAs, a su vez, se traducen en ribosomas libres en el citoplasma (para la mayoría de las proteínas) o asociadas al retículo endoplásmico para las glicoproteínas NSP4 y VP7 (34).

En el interior de la célula, las proteínas virales sintetizadas y el mRNA viral interactúan para formar intermediarios de replicación (RI), llamados así por contar con la actividad replicasa. Los RIs llevan a cabo la síntesis del dsRNA tomando como molde los mRNAs virales, su formación y la síntesis de dsRNA genómico tienen lugar en los viroplasmos. Los intermediarios de replicación se forman a partir de un complejo inicial denominado pre-core RI, el cual carece de actividad de replicación e incluye las proteínas VP1 y VP3. El pre-core RI, es el precursor del core RI que incluye además de las proteínas del núcleo viral VP1 y VP3 a VP2, este complejo sí tiene actividad de replicación y además puede tener asociadas las proteínas NSP2 y NSP5 (40). La adición de VP6 da lugar a las DLPs, partículas que poseen actividad de replicación y transcripción. Las DLPs maduran a TLPs gemando de los viroplasmos al retículo endoplásmico adyacente, cuya membrana está modificada con las glicoproteínas virales NSP4 (que funciona como receptor de las DLPs) y VP7. Como resultado de la gemación, las partículas adquieren una membrana lipídica transitoria que incluye las proteínas virales NSP4, VP4 y VP7 formando partículas intermediarias. Después, por un mecanismo desconocido, las DLPs pierden la envoltura transitoria de lípidos junto con la proteína NSP4 y selectivamente retienen las proteínas VP4 y VP7 que se ensamblan formando la tercera capa proteica, dando lugar a los virus maduros. Finalmente los viriones se acumulan en el lumen del retículo endoplásmico hasta ser liberados por lisis celular (Figura 2) (39).



Durante la infección con rotavirus se ha observado que la síntesis de proteínas celulares disminuye considerablemente, mientras que la síntesis de proteínas virales es muy eficiente. Se ha propuesto que NSP3 es la responsable de este fenotipo, ya que se ha visto que conforme avanza la infección, NSP3 interacciona con el factor de inicio de la traducción eIF4G mientras la proteína de unión al poli(A) (PABP, por sus siglas en inglés) es desplazada de la maquinaria de traducción y se cree que junto con ella los mRNAs celulares, lo que provoca que sean los mRNAs virales los que se traduzcan preferencialmente sobre los celulares (44).

NSP3 es una proteína viral no estructural de 36 kDa, formada por tres dominios funcionalmente distintos. El dominio amino terminal se une a la secuencia consenso 3' de los mRNAs de rotavirus de manera específica, con alta afinidad ($K_d = 79 \text{ nM}$) y una baja velocidad de disociación ($t_{1/2} = 8 \text{ hr}$) (10, 44). El dominio central, que comprende los residuos 150 al 206, es necesario para la dimerización de la proteína y es responsable de la interacción con la proteína celular RoXaN (rotavirus X protein associated with NSP3, de función desconocida) la cual, a su vez, se ha propuesto que interacciona con el

citoesqueleto (44, 46, 57). Por último, se encuentra el dominio carboxilo terminal, el cual interactúa con eIF4GI y compite con PABP, por el mismo sitio de unión a este factor. Por cristalografía se ha observado que a pesar de que NSP3 y PABP tienen estructuras terciarias muy diferentes, ambas presentan un patrón similar de residuos hidrofóbicos los cuales son determinantes en su interacción con eIF4GI (24, 44, 45).

Rotavirus, como todos los virus, depende completamente de la célula huésped para la síntesis de sus proteínas, ya que su genoma no codifica para ningún componente de la maquinaria de traducción. Durante la infección, se modifican algunas proteínas que participan en el inicio de la traducción, para lograr que los mRNAs virales sean traducidos preferencialmente y antes de ver como rotavirus logra esto, revisaremos generalidades de este proceso.

Traducción

La traducción de los mRNAs celulares se lleva a cabo en tres fases: la iniciación, elongación y terminación. La primera de éstas es la más regulada y por tanto es el blanco de acción de muchos virus para inhibir la síntesis de proteína celular (5). En esencia, la fase de iniciación consiste en formar un complejo multiproteico junto con los mRNAs con la finalidad de reclutar al ribosoma al codón de inicio del mRNA.

Uno de los primeros pasos en el inicio de la traducción y también uno de los más regulados, se da cuando el complejo eIF4F se ensambla en el cap en el extremo 5' del mRNA (19, 43). El papel propuesto para el complejo eIF4F es el de unirse al extremo 5' del mRNA, desdoblar cualquier estructura secundaria que se encuentre ahí, y después facilitar la unión del complejo 43S, compuesto por la subunidad pequeña (40S) y el complejo ternario eIF2-GTP-Met-tRNA_i, en la región 5' no traducida. El complejo eIF4F está compuesto por los factores eIF4A, eIF4E y eIF4G. eIF4A es una ATPasa dependiente de RNA que puede desenrollar dúplex de RNA *in vitro* por lo que se ha propuesto que es una helicasa de RNA dependiente de ATP cuya función, junto con eIF4B, es desaparecer regiones con estructuras secundarias y terciarias en el extremo 5' de los mRNAs. eIF4E es una fosfoproteína que se une específicamente al cap de los mRNAs, el cual generalmente es de alguno de los tipos m⁷GpppNp, m⁷GpppN^mp o m⁷GpppN^mpN^mp (donde m es un grupo metilo, unido al nucleótido respectivo) y de esta manera localiza el extremo 5' de los

mRNAs (19). Se ha propuesto que eIF4E es el factor limitante del complejo eIF4F, ya que es la proteína menos abundante de este complejo en células como la línea celular HeLa, además, su actividad es muy regulada, desde el nivel de transcripción, por fosforilación y a través de su unión a proteínas inhibitorias (12, 19). En mamíferos eIF4E es fosforilada por la cinasa Mnk1 en la serina 209 (17, 27). Hasta ahora no se sabe con certeza el papel que juega la fosforilación de eIF4E, sin embargo, se ha visto que el estado de fosforilación de eIF4E cambia cuando la célula es sometida a diversos estímulos extracelulares; en la mayoría de los casos, un incremento en la fosforilación, coincide con un incremento en la traducción. Por otro parte, en casos donde la traducción de mRNAs es baja, como sucede en mitosis o cuando la célula se encuentra bajo estrés como en choque térmico o infecciones virales, esto correlaciona con una reducción en el estado de fosforilación de eIF4E (51). La fosforilación de eIF4E es determinante para el crecimiento en *Drosophila melanogaster* (30) y se ha visto que durante el inicio de la diferenciación celular, eIF4E se encuentra mayoritariamente en su estado fosforilado (6). eIF4E también tiene un papel muy importante en la regulación del crecimiento celular, su sobreexpresión en células de roedor genera transformación. Este efecto se ha asociado con su participación en el transporte núcleo-citoplasma del mRNA de ciclina D1, la cual está implicada en el control del ciclo celular (58). Además de lo anterior, eIF4E también tiene un papel en la degradación de los mRNAs (58). Tanto eIF4E como eIF4A se unen a eIF4G, la cual es una proteína que funciona como un enlace entre el mRNA y la subunidad ribosomal 40S, a través de sus interacciones simultáneas con eIF4E, PABP y eIF3.

Por otro lado, el factor eIF4G está compuesto por tres dominios: i) el dominio amino terminal por medio del cual interactúa con eIF4E y PABP; ii) el dominio de la región central, que participa en el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S mediante su unión a eIF3; y iii) el dominio carboxilo terminal, el cual une a Mnk1, una cinasa que fosforila eIF4E. eIF4G contiene dos sitios de interacción con eIF4A, que se localizan en el dominio central y en el carboxilo terminal. En mamíferos, eIF4G existe en dos formas funcionalmente homólogas: eIF4GI que representa aproximadamente el 85% de este factor en la célula, y la forma menos abundante, eIF4GII. A nivel de aminoácidos, ambas proteínas tienen 46% de identidad y presentan actividades bioquímicas similares (23). Inicialmente se propuso que eIF4GI y eIF4GII eran funcionalmente intercambiables entre

sí: se ha visto que en condiciones donde eIF4GI no se encuentra funcional pero eIF4GII sí, la síntesis de proteínas no se inhibe, lo que nos indica que eIF4GII puede facilitar el inicio de la traducción eficientemente. Sin embargo, en el caso contrario, cuando eIF4GII no es funcional, la síntesis de proteínas se ve afectada, aún cuando eIF4GI está intacto (7). Además, se ha demostrado que durante el inicio de la diferenciación celular, se recluta preferencialmente a eIF4GII en el complejo eIF4F (6), lo cual sugiere que cumple un papel distinto al de eIF4GI.

Además del cap en el extremo 5', los mRNAs eucarióticos contienen en su extremo 3' una extensión formada por nucleótidos del ácido adenílico (poli(A), cuya longitud varía de 50 a 300 nucleótidos), a la cual se une a PABP. Ésta es una proteína que participa en múltiples eventos celulares que van desde biogénesis de mRNA hasta estabilización y traducción de los mRNAs (35). Su localización es principalmente citoplásmica, sin embargo, se ha visto que cuando se inhibe la transcripción o en condiciones de sobreexpresión de la proteína, ésta es capaz de translocarse al núcleo (1). PABP interactúa con eIF4G y esta interacción lleva a la circularización de los mRNAs, lo que a su vez estimula la traducción. Se ha propuesto que la circularización del mRNA vía eIF4E–eIF4G–PABP, incrementa la traducción del mRNA al permitir una rápida reiniciación de nuevos ciclos de traducción; además, la circularización del mRNA parece ser particularmente importante para una traducción eficiente y precisa cuando existe competencia entre diversos mRNAs o cuando la cantidad de ribosomas o factores de iniciación es limitante (Figura 3) (43).

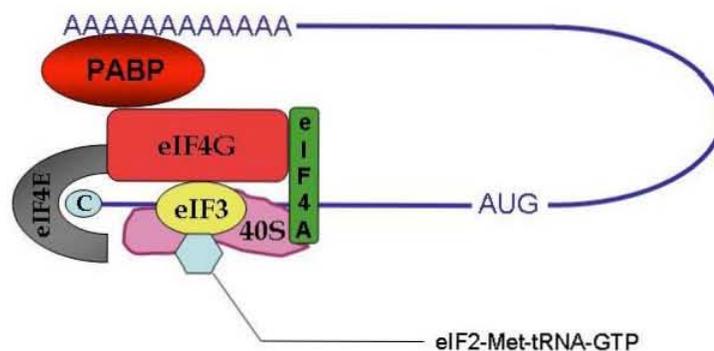


Figura 3. Modelo que muestra los factores principales que intervienen en la iniciación de la traducción en los mRNAs de eucariotes que tienen cap y poli(A).

Hay dos mecanismos por los cuales los ribosomas se unen al mRNA en eucariotes. En la traducción cap-dependiente (por medio de la cual la mayoría de los mRNAs son traducidos), el primer paso es el reconocimiento del cap por parte del factor de unión al cap eIF4E; el factor de inicio eIF4G sirve como enlace entre el mRNA que contiene el cap y la subunidad ribosomal 40S, esto es debido a que interacciona tanto con eIF4E como con la proteína eIF3 la cual a su vez se une a la subunidad ribosomal 40S (16, 19, 43, 49) (Figura 3).

La otra vía para reclutar los ribosomas al mRNA es mediante la unión directa de la subunidad 40S a estructuras secundarias en la región 5' no traducida (5' UTR) conocidas como IRES (de sus siglas en inglés: Internal Ribosome Entry Site). Este mecanismo conocido como cap-independiente, se descubrió inicialmente en picornavirus (42). Los mRNAs de picornavirus carecen de cap y en su lugar tienen regiones 5' no traducidas altamente estructuradas por medio de las cuales se unen a la subunidad ribosomal 40S promoviendo así su traducción, aun en condiciones donde la traducción cap-dependiente está inhibida (16).

Se ha encontrado que los IRES no sólo se encuentran en los mRNAs de picornavirus, sino también en mRNAs de otros virus y en algunos mensajeros celulares. Todos los IRES se unen a la subunidad 40S de forma interna, sobrepasando la necesidad del cap, sin embargo, no todos requieren los mismos factores para hacerlo. Los requerimientos son muy variados, por ejemplo, los mRNAs del virus de hepatitis A aun a pesar de que contienen un IRES, requieren de todos los factores de inicio, incluyendo eIF4E; por otra parte, los mRNAs del virus de parálisis del grillo, poseen un IRES mediante el cual pueden iniciar la traducción sin necesidad de ningún factor de inicio ya que su IRES mimetiza a un tRNA y sobrepasa la necesidad del tRNA iniciador (16).

Como mencionamos anteriormente, eIF4E es el factor de inicio menos abundante en la mayoría de las células. Esto lo hace un blanco fácil para la regulación de la traducción. Se han descrito diferentes mecanismos para regular la actividad de eIF4E, entre ellos se encuentra su unión a proteínas inhibitoras. Estas proteínas llamadas 4E-BPs (de sus siglas en inglés: eIF4E-Binding Proteins), inhiben la actividad de eIF4E al prevenir su asociación con el factor eIF4G, impidiendo así la formación del complejo eIF4F (19). Las 4E-BPs inhiben la traducción cap-dependiente, mientras que la cap independiente no se ve afectada

(41, 48). La actividad de estas proteínas está regulada por su fosforilación. Las 4E-BPs hipofosforiladas se unen eficientemente a eIF4E en el mismo sitio donde se une eIF4G, mientras que la forma hiperfosforilada tiene poca afinidad por dicho factor. Varios estímulos extracelulares (hormonas, factores de crecimiento, mitógenos, citocinas) inducen la fosforilación de las 4E-BPs. Esto es mediado por la vía de señalización que involucra a PI3K, una cinasa que, en respuesta a estímulos extracelulares, fosforila fosfoinosítidos. Los productos de PI3K, los 3 fosfoinosítidos (3-PIs), reclutan a la membrana a Akt, una cinasa de serinas y treoninas, lo que provoca su activación. Akt es la responsable de fosforilar a mTOR, la cinasa que se encarga de la fosforilación de las 4E-BPs, y por tanto, la que regula directamente su actividad (18-20).

La cinasa mTOR fue identificada como el blanco de rapamicina. La rapamicina es una droga que inhibe la proliferación de linfocitos y otros tipos de células, este efecto es debido a su interacción con la inmunofilina FKBP12; juntas forman un complejo que bloquea la actividad de la cinasa mTOR y de esta manera se inhibe la síntesis de proteínas, arrojando el ciclo celular en la fase G1. Rapamicina inhibe la traducción cap dependiente dado que al inactivar a mTOR, ésta ya no es capaz de fosforilar a las 4E-BPs quienes, a su vez, al encontrarse en su forma hipofosforilada se unen a eIF4E en el mismo sitio que el factor eIF4G, provocando que la formación del complejo eIF4F no se pueda llevar a cabo (4, 26). Sin embargo, el grado de inhibición varía de acuerdo al mRNA, siendo los mRNAs con una región rica en pirimidinas en su extremo 5' los más afectados (26, 53). Además, el grado de inhibición de la síntesis de proteínas global es dependiente de la línea celular (19).

Como se mencionó anteriormente, los virus utilizan varias estrategias para manejar la maquinaria de síntesis de proteínas a su favor. A continuación se revisarán algunos mecanismos empleados por los virus para manipular la maquinaria de traducción.

ANTECEDENTES

Los virus son parásitos intracelulares obligados ya que su genoma no codifica los componentes necesarios para la traducción de sus proteínas, y dependen en gran medida de la maquinaria de síntesis de proteína celular para la producción de sus proteínas, por lo que han desarrollado mecanismos sofisticados para garantizar la traducción de sus mRNAs y, en algunos casos, inhibir la síntesis de proteína celular durante la infección (5, 52).

En general, la regulación de la traducción celular se lleva a cabo principalmente en la fase de inicio, más que en la fase de elongación y es en este punto donde los virus han desarrollado varias estrategias para controlar la síntesis de proteína celular.

Algunos virus emplean mecanismos de inicio de traducción en los cuales no utilizan o disminuyen su dependencia de algunos factores del complejo eIF4F y en la mayoría de los casos, estos virus inactivan uno o más componentes de este complejo proteico donde eIF4E y eIF4G son los principales blancos.

Un ejemplo de regulación de la traducción celular vía eIF4E se observa durante la infección por adenovirus. Este virus inhibe la traducción cap-dependiente de los mRNAs celulares y promueve eficientemente la traducción de los mRNAs virales en la fase tardía de la infección al provocar la desfosforilación de eIF4E (21). Se ha visto que cuando este factor no está fosforilado, se inhibe la traducción cap-dependiente de la célula (9, 11, 19). Por otra parte, los mRNAs de adenovirus se traducen eficientemente debido a que contienen una secuencia en la región 5' no traducida (UTR) de sus mRNAs que es capaz de reclutar al complejo 43S mediante el apareamiento de bases entre el mRNA viral y el rRNA de la subunidad ribosomal 40S (59).

La regulación traduccional a través del factor eIF4G se ha observado durante la infección por virus de la familia de los picornavirus, tales como poliovirus, rinovirus y coxsackievirus, donde se inhibe la síntesis de proteína celular y se traducen los mRNAs virales de una manera muy eficiente (52). Estos virus codifican para una proteasa conocida como 2Apro que corta específicamente a los factores eIF4GI, eIF4GII y PABP inhibiendo la traducción cap-dependiente de los mRNAs celulares. Los mRNAs virales se traducen de manera cap-independiente, debido a que poseen un IRES en el extremo 5' el cual dirige la unión del mRNA al ribosoma de manera independiente al complejo eIF4F (52, 56).

Como se mencionó anteriormente los mRNAs de rotavirus se caracterizan por tener cap en el extremo 5' y carecer de poli(A) en su extremo 3'. Durante la infección por rotavirus se observa una reducción en la síntesis de proteína celular y se ha propuesto que la proteína viral NSP3 es la responsable de tal fenotipo. Se ha demostrado que el extremo amino terminal de NSP3 se une a la secuencia consenso del extremo 3' terminal de los mRNAs virales con muy alta afinidad y requiere sólo cuatro nucleótidos del extremo 3' terminal (GACC) para el reconocimiento específico del RNA (10, 44, 46, 47); además, en su extremo carboxilo terminal se encuentra un dominio que une a la proteína eIF4G, esta interacción se lleva a cabo en la misma región en donde PABP se une a dicho factor. En estudios *in vitro*, se ha observado que NSP3 es capaz de desplazar a PABP de su sitio de unión a eIF4GI, por lo que se cree que el desplazamiento de PABP por NSP3 es el mecanismo por el cual rotavirus inhibe la síntesis de proteína celular. Además, se ha propuesto que NSP3 al tener interacciones similares a las de PABP, tales como la unión a eIF4GI y al extremo 3' de los mensajeros virales, podría tener la misma función que dicha proteína celular, es decir, promover la circularización de los mRNAs virales y estimular la síntesis de sus proteínas (Figura 4) (24, 44-46, 54, 55).

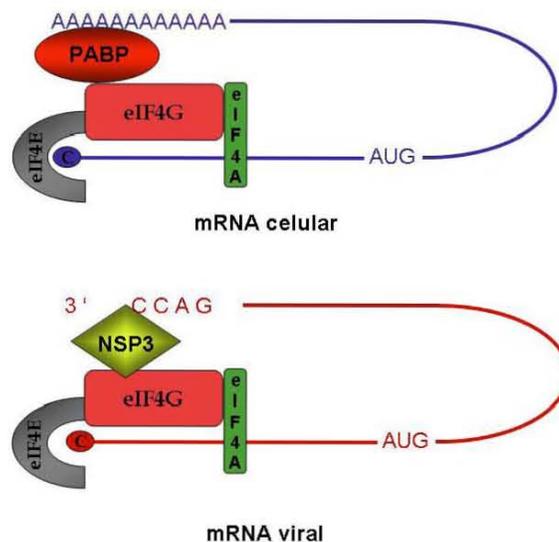


Figura 4. Modelo propuesto para el desplazamiento de PABP del complejo eIF4F por NSP3

En nuestro laboratorio se ha utilizado la técnica de RNA de interferencia (RNAi), para estudiar la función de varias proteínas durante la infección de rotavirus. Esta técnica consiste en el silenciamiento de la expresión de un gen a nivel post-transcripcional por

medio de RNAs pequeños (21–23 pb) de doble cadena (siRNAs), donde la secuencia de una de las dos cadenas es complementaria a un segmento del gen blanco. Recientemente en el laboratorio se silenció la expresión de la proteína viral NSP3 y se observó que la síntesis de proteínas virales no se vio afectada en ausencia de dicha proteína; por otro lado, también se observó que en estas condiciones, la síntesis de proteínas celulares no disminuyó por la infección. Otro efecto que se encontró al silenciar la expresión de NSP3 fue un incremento de dos a tres veces en la progenie viral, comparando con una infección control, esto debido a un aumento en la replicación del genoma viral. En resumen, estos resultados sugieren que NSP3 no es esencial para la traducción eficiente de los mRNAs virales, sin embargo, al parecer NSP3 juega un papel importante en la inhibición de la síntesis de proteína celular durante la infección y tiene implicaciones en la replicación del genoma viral. El mecanismo que se había propuesto para la traducción de los mRNAs virales implica la interacción de NSP3 con el factor de inicio de la traducción eIF4GI, sin embargo, cuando la expresión de este factor fue silenciada, la síntesis de proteína viral tampoco se vio afectada, dejando en claro que este factor no es necesario para la traducción de los mRNAs de rotavirus (36).

HIPÓTESIS

La traducción de los mRNAs de rotavirus se lleva a cabo de manera distinta al sistema general dependiente del cap empleado por la célula para traducir sus mRNAs; el mecanismo de traducción adoptado por el virus podría utilizar diferencialmente los factores de inicio de traducción, particularmente los que forman el complejo eIF4F.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el papel de las proteínas del complejo eIF4F: eIF4E, eIF4GI y eIF4GII en la infección de rotavirus.

Objetivos particulares

Estudiar el efecto de drogas que inhiben la formación del complejo eIF4F en la replicación de rotavirus.

Analizar la traducción de los mRNAs virales en condiciones donde está inhibida la expresión de factores del complejo eIF4F.

Evaluar el efecto del silenciamiento de la expresión de las proteínas eIF4E, eIF4GI y eIF4GII en la capacidad del virus para infectar las células.

Estudiar si la replicación de rotavirus es afectada por la baja expresión de los factores eIF4E, eIF4GI y eIF4GII.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células y virus

La línea celular empleada fue MA104 derivada de células epiteliales de riñón del mono *Rhesus*, crecidas en medio mínimo esencial de Eagle (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 3% de suero fetal bovino (SFB). La cepa de rotavirus del mono *Rhesus* RRV, fue proporcionada por H.B. Greenberg, Universidad de Stanford, Palo Alto, CA.

Anticuerpos

El anticuerpo policlonal que reconoce a las TLPs de RRV y el dirigido contra la proteína viral NSP2, fueron producidos en el laboratorio. Los anticuerpos para eIF4GI, eIF4E y PABP fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); el anticuerpo dirigido contra la región amino terminal de eIF4GII fue un regalo del Dr. N. Sonenberg, Universidad McGill, Montreal, Canadá; el anti-ratón acoplado a peroxidasa fueron obtenidos de Zymed (San Francisco, CA); el suero anti-conejo acoplado a peroxidasa se obtuvo de Sigma (St. Louis, MO). Los anticuerpos anti-conejo acoplado a Alexa 568 y anti-ratón acoplado a Alexa 488 se obtuvieron de Molecular Probes (Eugene, OR).

siRNAs

El siRNA^{eIF4GI} tiene la secuencia AAUUGGCUGAGGACAUGGAAA (sentido), UUUCAUGUCCUCAGCCAAUU (antisentido) correspondiente a los nucleótidos 4245 a 4265 del gen de eIF4GI humano (Número de acceso del GenBank: NM_182917). El siRNA^{eIF4E} tiene la secuencia GGAGGUUGC UAACCCAGAA (sentido), UUCUGGGUAGCAACCUCC (antisentido) correspondiente a los nucleótidos 933 a 951 del gen de eIF4E humano (GenBank: NM_001968). El siRNA^{eIF4GII} tiene la secuencia GGUCCUUUUUAUCCUGGAC (sentido), GUCCAGGAUAAAAAGGACC (antisentido) (GenBank: NM_003760). Como control irrelevante se utilizó el siRNA para luciferasa, que tiene la secuencia GUGCGUUGC UAGUACCAAC (sentido),

GUUCCUACUAGCAACGCAC (antisentido). Los siRNAs fueron obtenidos de Dharmacon Research (Lafayette, CO).

Transfección de siRNAs

La transfección de los siRNAs se llevó a cabo en monocapas de células MA104 confluentes, utilizando lipofectamina (Invitrogen) en MEM (Invitrogen) sin antibióticos. Después de adicionar la mezcla de transfección se incubó por 8 h a 37°C, al cabo de este tiempo las células se lavaron con DMEM con 3% de SFB y se dejaron incubando por 72h antes de la infección con rotavirus. Antes de utilizar un siRNA por primera vez, se prueban varias concentraciones y tiempos de transfección para encontrar la condición donde se obtiene un mayor silenciamiento de la expresión de la proteína blanco.

Infección de células y titulación de la progenie viral

Las células transfectadas se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI) de 3 virus por célula y se incubaron a 37°C por distintos tiempos. Para medir rendimiento viral las células se lisaron a las 14 h postinfección (hpi), congelando dos veces, y los lisados fueron activados con tripsina (10 µg/ml) durante 30 minutos a 37°C. A partir de estos lisados se realizaron diluciones seriadas y se utilizaron para infectar monocapas de células crecidas en placas de 96 pozos dejando adsorber 1 h a 37°C. Los pozos se lavaron una vez con MEM sin SFB y se incubaron de 14 a 16 h a 37°C. Después de la incubación se retiró el medio de cultivo a las células y se fijaron con acetona al 80% en PBS durante 30 min, transcurrido este tiempo, las células se lavaron dos veces con PBS. Las células fijadas se incubaron con suero policlonal anti-TLPs a una dilución de 1:5000 (v/v) en PBS por 1 h a 37°C. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron a 37°C 1 h con proteína A-peroxidasa (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) a una dilución 1:3000 (v/v) en PBS. Para revelar las células infectadas se usó 3-amino-9-etil-carbazole (Sigma) como sustrato para la peroxidasa. La determinación del título viral se llevó a cabo contando las células teñidas (focos infecciosos) en cada dilución.

Western blot

Los extractos celulares fueron preparados lisando las células con buffer de lisis Laemmli (50mM Tris pH 6.8, 2% de SDS, 0.1% de azul de bromofenol, 10% de glicerol y 0.5% de 2β mercapto-etanol). Las proteínas separadas por SDS–PAGE fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, MA). Las membranas fueron bloqueadas con una solución al 5% de leche descremada (Carnation) en PBS–0.1% Tween. Al finalizar el tiempo de bloqueo se incubó la membrana con el anticuerpo correspondiente. Luego de transcurrido el tiempo de incubación se realizaron tres lavados con PBS–0.1% Tween, y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa. Al finalizar la incubación se lavó tres veces con PBS–0.1% Tween y las proteínas se detectaron con el sustrato para peroxidasa Western Ligthning™, siguiendo las instrucciones del proveedor (Perkin–Elmer Life Sciences, Boston, MA) y exponiendo la membrana a placas fotográficas X–Omat (Kodak, Rochester, NY) durante diferentes tiempos.

Marcaje metabólico

Las células transfectadas con el siRNA correspondiente fueron marcadas con [³⁵S] a diferentes tiempos, para esto, el medio fue reemplazado por MEM sin metionina suplementado con la mezcla de marcaje Express [³⁵S] a una concentración de 25 μCi/ml (Dupont NEN, Wilmington, DE) y se incubó por distintos periodos de tiempo según el ensayo. Posteriormente, las células fueron lisadas como se describió anteriormente y las muestras se analizaron por SDS–PAGE. La concentración de proteínas se ajustó por tinción con azul de Coomassie y, finalmente, los geles se secaron y se expusieron para autorradiografía.

Choque hipertónico

Después de infectar las células, el medio se reemplazó por MEM 2% SFB; a 4 hpi la concentración de NaCl se incrementó a 300mM y el porcentaje de SFB a 4% y se mantuvo por 2h. A 6 hpi las células fueron lavadas 2 veces con MEM para finalmente incubarlas con MEM 4% SFB. Las células fueron cosechadas a 8hpi para después ser analizadas.

Inmunofluorescencia

Las células fueron crecidas sobre cubreobjetos de vidrio, se transfectaron con el siRNA correspondiente como se describe arriba y, 48 h postransfección las células fueron infectadas a una multiplicidad de 3. A 6hpi, las células se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS por 20 min. Después de este tiempo, las células se lavaron tres veces con una solución de NH₄Cl 50mM en PBS (PBS/NH₄Cl), la cual fue utilizada posteriormente en todos los lavados. Se permeabilizaron con PBS – 0.5% Tritón X-100 – 50 mM NH₄Cl por 15 min y después fueron lavadas tres veces. Las células se dejaron bloqueando toda la noche en una solución de bloqueo (BSA al 1% en PBS/NH₄Cl) a 4°C. Posteriormente, los cubreobjetos fueron incubados por una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo. Las células se lavaron con 1 ml de PBS/NH₄Cl de manera continua y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a un fluoróforo (Alexa), por una hora a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas por un minuto con DAPI, para la tinción de núcleos y se lavaron con 1 ml de PBS/NH₄Cl; posteriormente, los cubreobjetos, fueron montados en portaobjetos de vidrio con Fluoprep (BioMérieux, Inc., Durham, NC). Se analizaron con un microscopio de fluorescencia Nikon E600 acoplado a una cámara digital DM1200 (Nikon).

RT-PCR en tiempo real

Las células fueron trasfectadas con siRNAs e infectadas con rotavirus RRV, como se describió anteriormente. A los tiempos indicados, las células fueron lisadas con Trizol (Invitrogen), y el RNA total fue purificado, de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El cDNA se sintetizó usando el primer TCCTGGAATGGCGTATTTTC, que corresponde a los nucleótidos 122 al 141 del gen 10 de RRV. Después el DNA fue amplificado usando el primer antisentido GAGCAATCTTCATGGTTGGAA que corresponde a los nucleótidos 173 al 193 del gen 10 de RRV, esto en presencia de la mezcla master mix SYBRGREEN (Applied Biosystems, Foster City, CA) y usando un sistema de detección ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Los resultados se normalizaron con los niveles detectados del mRNA de GAPDH. La cantidad de la cadena negativa del gen 10 se determinó usando inicialmente el primer antisentido en la reacción de transcripción reversa.

RESULTADOS

Tratamiento con rapamicina

Una forma de estudiar el papel de la proteína eIF4E en la traducción de determinados mRNAs, es mediante el uso de la droga rapamicina. Se ha reportado que el tratamiento de células con rapamicina induce la defosforilación de la proteína 4E-BP1, lo que provoca que ésta se una a eIF4E, en el mismo sitio que eIF4G, inactivándolo de esta manera (4, 19). Para determinar si es necesario que el factor eIF4E se encuentre activo en la infección de rotavirus, células MA104 fueron sometidas a distintos tratamientos con rapamicina y se analizó la traducción de los mRNAs virales (Figura 5b), así como la capacidad del virus para infectar estas células (Figura 5d), y de la producción de progenie viral (Figura 5c) bajo estas condiciones. Como control de que la droga funcionaba, se analizó el estado de fosforilación de la proteína 4E-BP1 (dato no mostrado). En la figura 5 podemos ver que el tratamiento con rapamicina a tiempos cortos (de, 1h, 6h) no tiene efecto en la producción de proteínas virales, en contraste con la síntesis de proteínas celulares, la cual en estas mismas condiciones se ve afectada (comparar figura 5a y 5b, líneas 1h, ai y de con se, respectivamente), sin embargo, cuando se incubaba la droga por tiempos prolongados, observamos que la síntesis de proteínas, tanto celular como viral, disminuye en comparación a células no tratadas (24h, 18h, 12h y 6h en figura 5a y b). Este efecto, en el caso de la producción de proteínas virales, podría deberse más que a un efecto directo por la inactivación de eIF4E, a un efecto secundario provocado por la inhibición de la cinasa mTOR, la cual está implicada en otros procesos celulares. Al analizar la producción de partículas infecciosas no se observó efecto por el tratamiento, solo a tiempos muy largos de incubación de la droga (figura 5c, 24h). Finalmente, cuando se estudió la capacidad del virus de infectar células que fueron incubadas con rapamicina, observamos que la infectividad aumenta proporcionalmente al tiempo de incubación de la droga (Figura 5d). En conjunto, los resultados nos sugieren que la producción de proteínas virales no requiere que el factor eIF4E se encuentre disponible para formar parte del complejo eIF4F. Por otra parte, los datos obtenidos en relación a infectividad y producción de partículas infecciosas en células incubadas con rapamicina no arrojaron datos concluyentes.

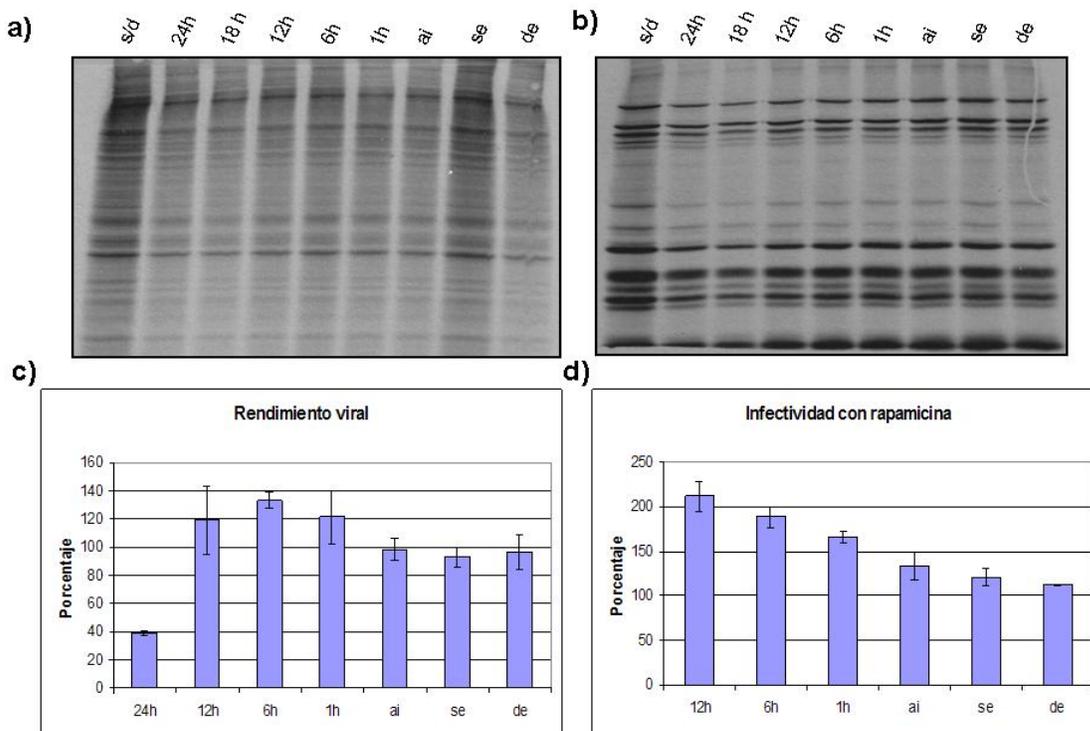


Figura 5. Efecto del tratamiento de las células con rapamicina en la síntesis de proteínas. Células MA104 fueron tratadas con rapamicina a una concentración de 100 ng/ml, por distintos tiempos antes de ser infectadas. Se dio un pulso a las células de 30 min con [³⁵S] para luego ser cosechadas a las 6hpi. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y detectadas por autorradiografía. a) Células control sin infectar; b) Células infectadas con una MOI de 3. c) Células tratadas con rapamicina fueron infectadas con rotavirus RRV con una MOI de 3 y el rendimiento viral fue medido como se describió en materiales y métodos. El 100% es el rendimiento viral obtenido en células que no recibieron tratamiento con rapamicina. d) Las células fueron infectadas con rotavirus RRV y 14 hpi se fijaron para después contar las células infectadas, como se describe en materiales y métodos. El 100% se refiere al número de focos infecciosos obtenidos en células que no fueron tratadas con la droga. s/d, células control que no fueron tratadas con rapamicina; las células fueron incubadas con la droga por 24, 18, 12, 6 y 1h antes de la infección, al momento de infectar (ai), sólo durante la hora de adsorción del virus (se) o después de la incubación del virus (de). A excepción del caso donde la droga sólo se incubaba durante la hora de adsorción del virus, después de la cual es lavada, en todos los demás puntos, una vez que la droga se agrega, ésta permanece durante todo el experimento hasta el momento en que las células son cosechadas. Las gráficas muestran el promedio de tres experimentos independientes.

Interferencia de la expresión de proteínas del complejo eIF4F y su efecto en la infección de rotavirus

Para determinar el papel de la proteína de unión al cap, eIF4E, y de las proteínas eIF4GI y eIF4GII sobre la síntesis de proteínas virales, se utilizó el método de RNA de interferencia (RNAi) Células MA104 transfectadas con un siRNA dirigido contra eIF4E (siRNA^{eIF4E}) o contra una secuencia irrelevante (siRNA^{Irr}) como control, fueron infectadas con RRV y marcadas metabólicamente con [³⁵S]. De manera sorprendente, dado el papel tan importante que se ha propuesto para el factor eIF4E en el inicio de la traducción cap-

dependiente, la síntesis de proteína celular, que sabemos se lleva a cabo mayoritariamente por este mecanismo, no se ve afectada por la disminución de eIF4E (Figura 6A). También podemos observar que la síntesis de proteínas virales es similar en células transfectadas con siRNA^{eIF4E} a células transfectadas con un siRNA irrelevante. Se hizo además un marcaje de 30 minutos antes de cosechar las células a 6 hpi, sin embargo, el resultado fue el mismo (dato no mostrado). Esto nos indica que la traducción de los mRNAs virales y celulares se puede llevar a cabo de manera eficiente aún cuando la cantidad del factor eIF4E es reducida.

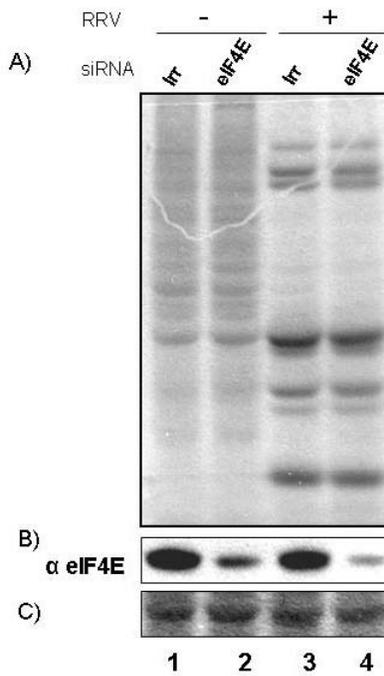


Figura 6. La disminución de la cantidad de eIF4E en la célula no tiene efecto en la traducción de mRNAs celulares ni de rotavirus. A) Células MA104 fueron transfectadas con el siRNA indicado, para eIF4E o para una secuencia irrelevante (Irr). Las células fueron infectadas (+) o no (-), como se indica en materiales y métodos. A las 6 hpi, las células fueron marcadas metabólicamente con [³⁵S] por 2h para después ser cosechadas. Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE 10% y se detectaron por autorradiografía. B) Inmunodetección de eIF4E. C) Se muestra una proteína indistinta como control de carga.

En un trabajo previo en nuestro laboratorio, se analizó la síntesis de proteínas virales en células donde se interfirió la expresión del factor eIF4GI, y se observó que aun a pesar de la disminución en la cantidad de esta proteína, los mRNAs de rotavirus se pueden traducir de manera eficiente (36). Esto podría deberse a tres razones, una es que los mRNAs virales pudieran reclutar al ribosoma sin la función que cumple eIF4GI o bien, que la función de esta proteína puede ser llevada por su homólogo eIF4GII o que una cantidad

reducida de eIF4GI sea suficiente. Para evaluar esta posibilidad decidimos silenciar la expresión de eIF4GII, para esto células transfectadas con un siRNA dirigido contra eIF4GI (siRNA^{eIF4GI}), contra eIF4GII (siRNA^{eIF4GII}) o contra una secuencia irrelevante (siRNA^{Irr}) como control, fueron infectadas con RRV y marcadas metabólicamente con [³⁵S], para detectar la síntesis de proteínas. Como ya se había observado anteriormente, la baja expresión de la proteína eIF4GI no afecta la traducción de los mRNAs tanto virales como celulares, sin embargo, de manera interesante, cuando se silencia la expresión de su homólogo, eIF4GII, la síntesis de proteínas virales se ve afectada, aunque las proteínas celulares se siguen produciendo de manera similar que en el control (Figura 7A). Esto nos sugiere que las proteínas virales utilizan diferencialmente a eIF4GII y que su función en la traducción de los mRNAs virales no puede ser suplida por eIF4GI.

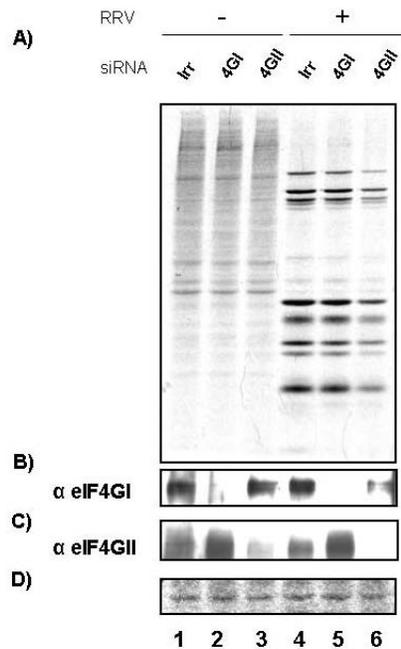


Figura 7. La disminución de la cantidad de eIF4GI y eIF4GII en la célula afectan diferencialmente la traducción de mRNAs de rotavirus. A) Células MA104 fueron transfectadas con el siRNA indicado, para eIF4GI (4GI), eIF4GII (4GII) o para una secuencia irrelevante (Irr). Las células fueron infectadas (+) o no (-), como se indica en materiales y métodos. A las 7.5 hpi, las células fueron marcadas metabólicamente con [³⁵S] por 30 minutos para después ser cosechadas. Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE 10% y se detectaron por autorradiografía. B) Immunodetección de eIF4GI y C) eIF4GII. D) Se muestra una proteína como control de carga.

Se ha visto anteriormente, que en condiciones donde las proteínas eIF4GI y eIF4GII no se encuentran funcionales debido a un corte proteolítico, la traducción de mRNAs celulares se ve afectada, sin embargo, no al grado esperado dado la importancia que ambos

factores tienen en el inicio de la traducción (38). Se ha propuesto que esto es debido a que en el momento en que estas proteínas son procesadas, en la célula existen mRNAs en los cuales se encuentra ya ensamblada la maquinaria de traducción y están reiniciando sin la necesidad de volver a reclutar todos los factores de inicio de la traducción (38). Esto podría explicar el hecho de que aun cuando la cantidad del eIF4E, eIF4GI y eIF4GII disminuye considerablemente, la síntesis de proteínas celulares no se ve afectada.

Para ver si este era el motivo por el cual no la síntesis de proteínas celulares no se veía afectada cuando se inhibía la producción de los factores eIF4E, eIF4GI y eIF4GII, se decidió tratar las células con un choque hipertónico, después de haber interferido la expresión de tales proteínas. Se ha observado que cuando las células son incubadas en un medio hipertónico los polisomas se desensamblan, esto es debido a que el exceso de sal bloquea el inicio de la traducción mientras que la elongación no se ve afectada, provocando que los mRNAs queden libres de ribosomas. Este efecto es completamente reversible al retirar el exceso de sal, e incubar las células en medio normal (38). Esto provocará que los mRNAs que se vuelvan a traducir, tendrán que reclutar nuevamente todos los factores del inicio de la traducción. En la figura 8 podemos ver un experimento de este tipo en el que cuando se incrementa la concentración de NaCl de 116 a 300 mM en el medio, la síntesis de proteínas celulares es prácticamente bloqueada, bajando a menos del 4% del control; sin embargo, en células infectadas se observa que aun en estas condiciones, se siguen sintetizando proteínas virales aunque a un nivel bajo (menos del 10% del control). Al restaurar la isotonicidad del medio, y dejando que las células se recuperen por un tiempo de dos horas, la síntesis de proteínas celulares se reestablece en un 37.8% (Figura 8C, línea 8), mientras que la de proteínas virales alcanza un 75%, esto con respecto a células que no estuvieron expuestas a un exceso de NaCl (56 y 41.7%, respectivamente). Con lo anterior podemos decir que el exponer células MA104 a un choque hipertónico, provoca que la síntesis tanto de proteínas celulares como virales sea inhibida, aunque también podemos ver que hay mRNAs virales que pueden ser traducidos aun en estas condiciones, aunque a un nivel mucho menor.

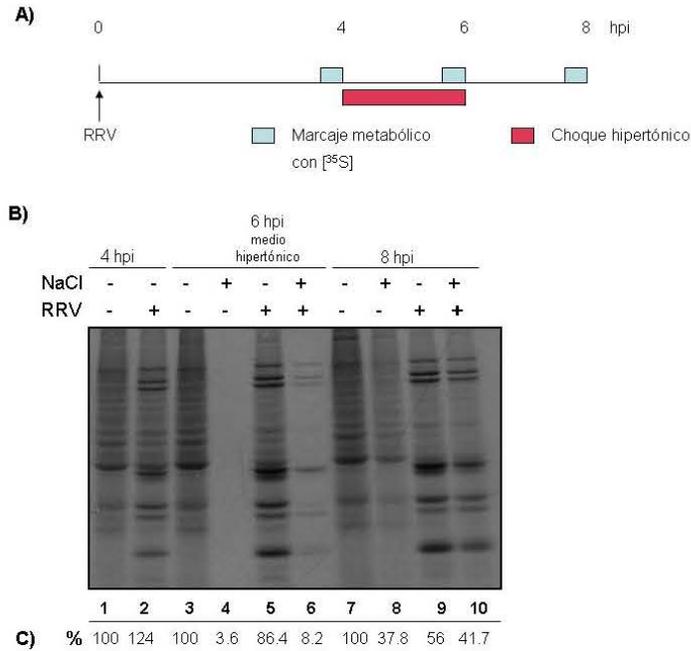


Figura 8. Síntesis de proteínas después de tratar las células con un medio hipertónico. Células MA104 fueron infectadas (+) o no (-) con rotavirus RRV. De 4 a 6 hpi, la concentración de NaCl en el medio fue incrementada a 300 mM (+) o no (-). A las 6 hpi, la isotonicidad fue restaurada. De 3.5 a 4hpi, 5.5 a 6hpi y 7.5 a 8hpi, se marcaron las células metabólicamente con [³⁵S]. A) Representación esquemática del protocolo. B) Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas por autorradiografía. C) Porcentaje de incorporación de [³⁵S], cuantificado por TCA precipitable. El 100% es el control donde no se infectó, ni se incubó con medio hipertónico para cada tiempo, líneas 1, 3 y 7 respectivamente.

Para estudiar si la interferencia de la síntesis de varias proteínas del complejo eIF4F (eIF4E, eIF4GI y eIF4GII) tiene un efecto en el inicio de la traducción de los mRNAs celulares y virales, se inhibió la expresión de estos factores en células que fueron infectadas o no, las cuales posteriormente fueron sometidas a un choque hipertónico temporal para provocar nuevos inicios de traducción y después la síntesis de proteínas se analizó mediante marcaje metabólico a 8h post-infección (Figura 9). En la figura 9A podemos advertir que la síntesis de proteínas en células transfectadas con siRNA^{eIF4E} o siRNA^{eIF4GI}, no se afectó, a pesar de una disminución en la cantidad de estas proteínas, observado por western blot en Fig. 9B y 9D, respectivamente. En células transfectadas con siRNA^{eIF4GII}, la síntesis de proteína disminuye aproximadamente 55% en células no infectadas y 40% en células infectadas, esto fue cuantificado por incorporación de marca radioactiva (TCA precipitable, Figura 9G). Estos datos nos indican que el factor eIF4GII juega un papel muy importante

en el inicio de la traducción de los mRNAs tanto celulares como virales, el cual no puede ser reemplazado por eIF4GI, al menos bajo estas condiciones y en esta línea celular.

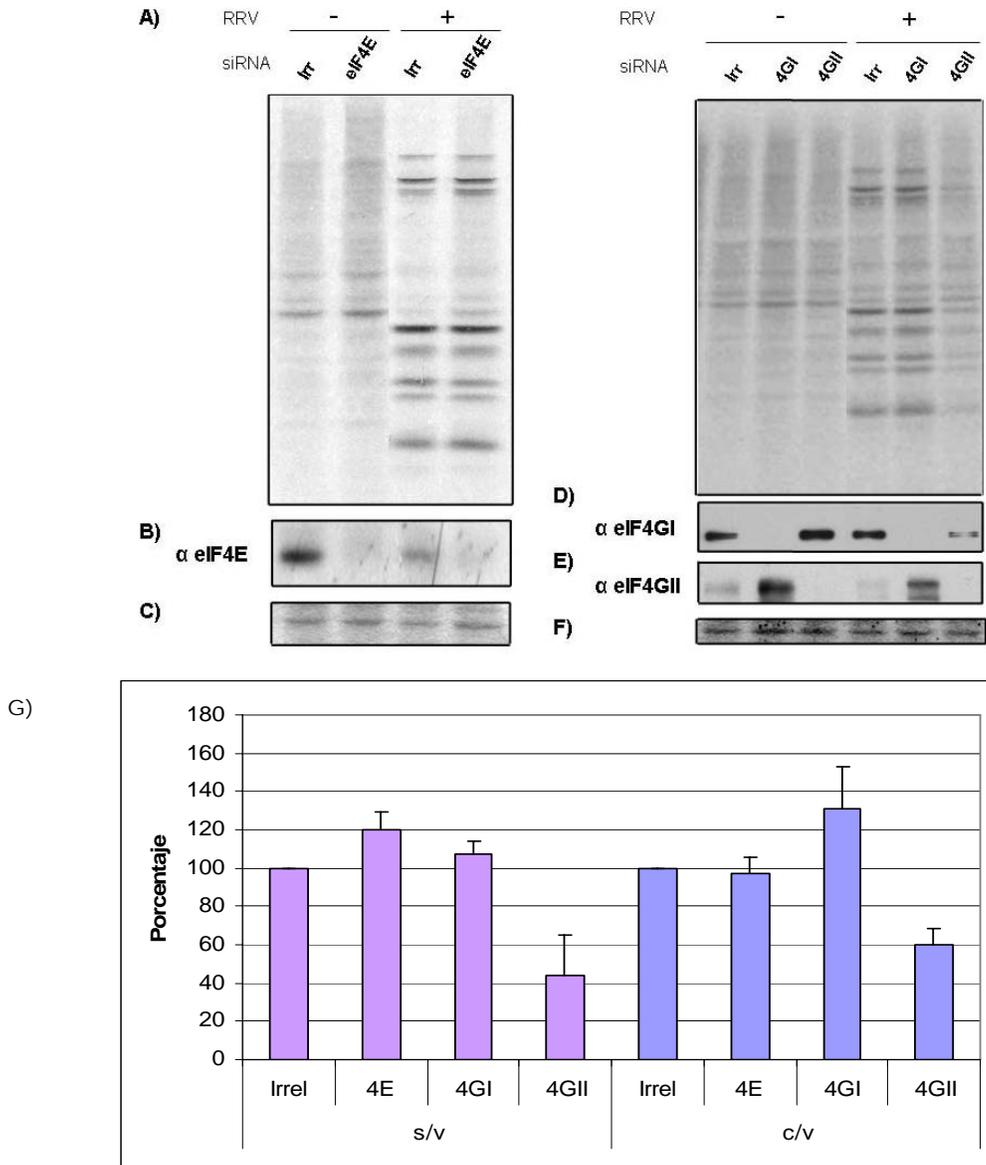


Figura 9. Síntesis de proteínas después de tratar las células con un medio hipertónico. A) Células MA104 fueron transfectadas con siRNA^{eIF4E} (4E), siRNA^{eIF4GI} (4GI), siRNA^{eIF4GII} (4GII) o un siRNA irrelevante (Irrel) y 48h postransfección fueron infectadas con RRV (+) o no (-). De 4 a 6 hpi, la concentración de NaCl en el medio fue incrementada a 300mM. A las 6 hpi, la isotonicidad fue restaurada. De 7.5 a 8 hpi, se marcaron las células metabólicamente con [³⁵S]. Las proteínas fueron separadas y analizadas por autorradiografía. Inmunodetección de B) eIF4E, D) eIF4GI y E) eIF4GII. C) y F) muestran proteínas como control de carga. E) Cuantificación de la incorporación de ³⁵S cuando se transfectó cada uno de los siRNAs. El 100% es la incorporación obtenida en células trasfectadas con siRNA irrelevante. La gráfica muestra el promedio de tres experimentos y la desviación estándar entre ellos.

Con el fin de analizar el efecto de la inhibición de la síntesis de los factores eIF4E, eIF4GI, eIF4GII, sobre la infectividad viral, la expresión de estas proteínas fue interferida, para después cuantificar el número de células infectadas en cada caso y comparando este número con la cantidad de células infectadas cuando se transfectó un siRNA irrelevante como control. En células transfectadas con el siRNA^{eIF4E}, la cantidad de células infectadas disminuyó en un 45% aproximadamente con respecto al control y con el siRNA^{eIF4GII} la disminución fue de 30%. Sin embargo, cuando se transfectó el siRNA^{eIF4GI}, el número de células infectadas, comparado con el control, no cambió de manera significativa (Figura 10). Esto nos sugiere que la disminución de las proteínas eIF4E y eIF4GII provoca un cambio en las células que hace que el virus no pueda infectarlas con la misma eficiencia y, en cambio, la disminución de eIF4GI no tiene efecto.

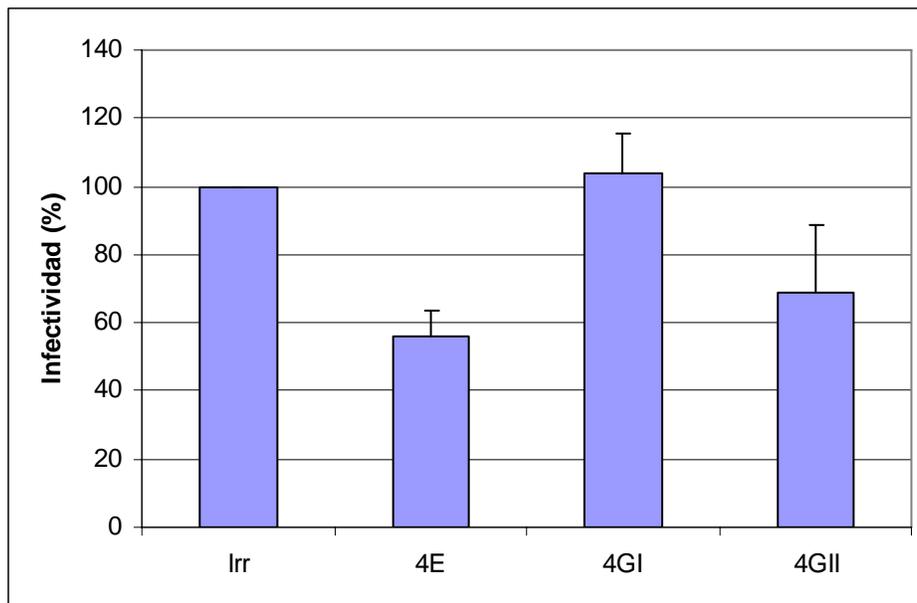


Figura 10. La inhibición de la expresión de cada uno de los factores del complejo eIF4F afecta de manera diferencial la infectividad de rotavirus. Células MA104 fueron transfectadas con siRNAeIF4E (4E), siRNAeIF4GI (4GI), siRNAeIF4GII (4GII) o un siRNA irrelevante (Irr) y 48h postransfección fueron infectadas con RRV. 14 hpi las células se fijaron y tiñeron para después contar las células infectadas, como se describe en materiales y métodos. El 100% de infectividad se refiere al número de focos infecciosos obtenidos en células transfectadas con el siRNA irrelevante. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes y la desviación estándar entre ellos.

Para examinar la importancia de algunas de las proteínas del complejo eIF4F sobre la producción de progenie viral, se inhibió la expresión de los factores eIF4E, eIF4GI y eIF4GII, las células transfectadas se infectaron a 14 hpi se cosecharon y se midió la cantidad de virus producido en cada condición. Se observó una reducción de

aproximadamente el 50% en el título viral relacionada con la disminución de la síntesis de eIF4E y del 40% con eIF4GII. Por otra parte, con la inhibición de la síntesis del factor eIF4GI, el rendimiento viral se incrementa una vez con respecto al control (Figura 11). En el caso de la interferencia de la expresión de eIF4GII la disminución en el rendimiento viral es consistente con la disminución de la síntesis de proteína viral observada bajo estas condiciones, sin embargo, los resultados obtenidos con eIF4E y eIF4GI no muestran una relación directa entre la síntesis de proteína viral y la producción de virus infeccioso.

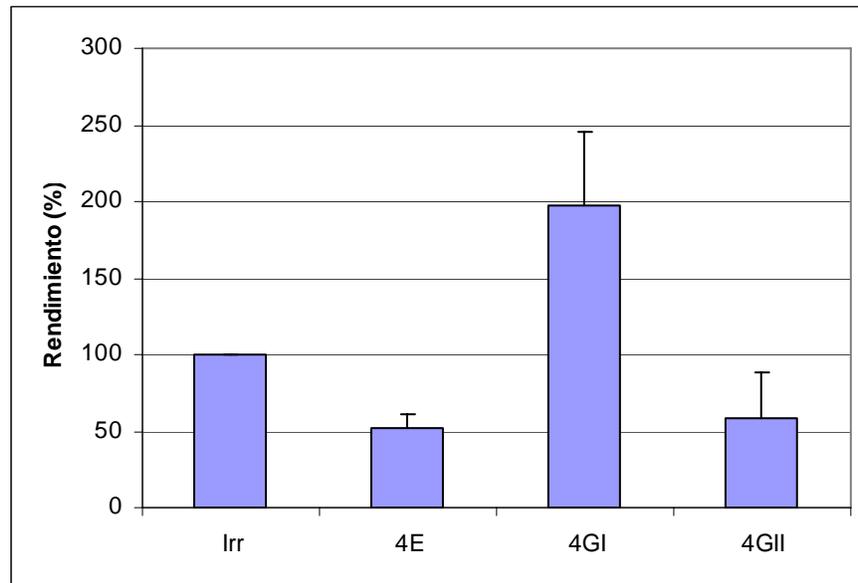
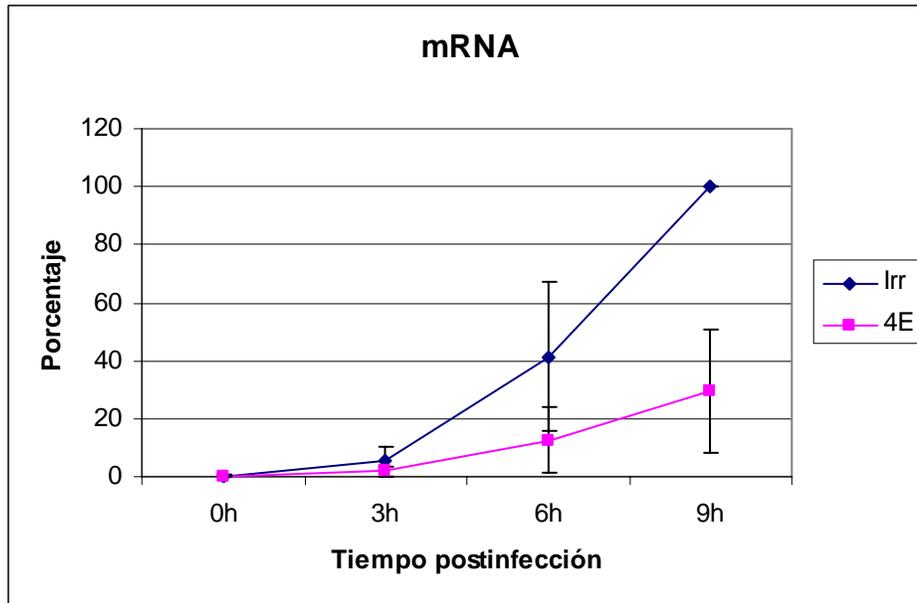


Figura 11. La inhibición de la expresión de cada uno de los factores del complejo eIF4F afecta de manera diferencial el rendimiento viral. Células MA104 fueron transfectadas con siRNAeIF4E (4E), siRNAeIF4GI (4GI), siRNAeIF4GII (4GII) o un siRNA irrelevante (Irr) y 48h posttransfección fueron infectadas con RRV. El rendimiento viral fue determinado como se describe en materiales y métodos. El 100% está referido al rendimiento viral obtenido en células que fueron transfectadas con el siRNA irrelevante. Se muestra el promedio de tres experimentos y la desviación estándar entre ellos.

Dado que en condiciones donde se silenció la expresión de la proteína de unión al cap, eIF4E, el rendimiento de la progenie viral disminuye, hecho que no coincide con una disminución en la síntesis de proteína del virus, se decidió examinar si la síntesis del mRNA y del dsRNA viral se ve afectada en ausencia o en bajas cantidades de eIF4E. Para esto se determinó la cantidad de mRNA y dsRNA viral producida en células transfectadas con siRNA^{eIF4E} o con un siRNA irrelevante, a distintos tiempos mediante un ensayo de RT-PCR cuantitativo (Figura 12).

A)



B)

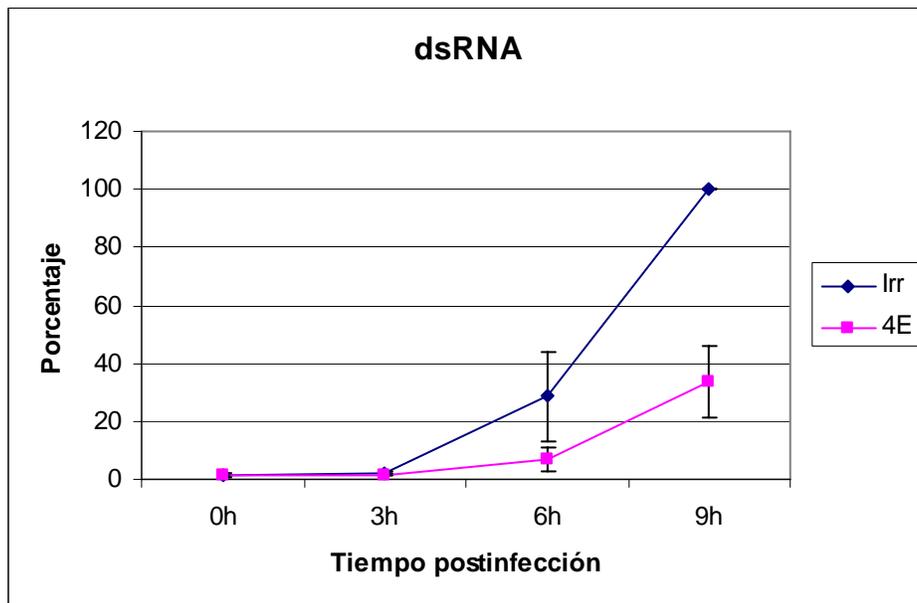


Figura 12. La síntesis de dsRNA y mRNA viral disminuye en células donde se inhibe la expresión de eIF4E. Células transfectadas con un siRNA irrelevante (Irr) o con siRNAeIF4E (4E) fueron infectadas con RRV y a los tiempos indicados las células fueron cosechadas y el RNA fue extraído con Trizol. La cantidad de RNA de polaridad positiva y negativa, fue cuantificada por RT-PCR en tiempo real. Se determinó la cantidad relativa de A) mRNA viral y B) dsRNA viral. Los valores se muestran como porcentaje con respecto a la cantidad determinada a nueve horas postinfección del control. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes.

Encontramos que tanto la cantidad relativa de mRNA, como de dsRNA viral es menor en células que fueron transfectadas con siRNA^{eIF4E} con respecto a células donde se transfectó un siRNA irrelevante (Figura 12). A 9h postinfección podemos observar que tanto la cantidad de mRNA como de dsRNA viral se reduce un 70% aproximadamente, en células que fueron transfectadas con siRNA^{eIF4E}, lo que nos sugiere que en condiciones donde la cantidad de eIF4E es menor, o bien la replicación/transcripción del genoma viral disminuye o la estabilidad del RNA viral decrece, lo que da como resultado una menor cantidad tanto de mRNA como de dsRNA viral. Aún no se ha analizado la síntesis de mRNA y dsRNA viral en células donde está inhibida la síntesis de los factores eIF4GI y eIF4GII, lo cual sería muy interesante para ver el efecto de la inhibición de la expresión de otros factores del complejo eIF4F.

Otra estrategia que se utilizó para ver la disminución de la expresión del factor eIF4E fue por medio de inmunofluorescencia. Para esto, células que fueron transfectadas con siRNA^{eIF4E} o con siRNA irrelevante, e infectadas se cotiñeron con un anticuerpo dirigido contra eIF4E y con un anticuerpo que reconoce una proteína viral que se localiza en viroplasma, NSP2. En la figura 13 podemos observar que, en células infectadas, la distribución de la proteína eIF4E es visiblemente distinta que en células no infectadas (Comparar primer imagen s/v y 9hpi). En células sin infectar, eIF4E, además de estar distribuido en el citoplasma, se acumula en puntos que son resistentes a la interferencia de la expresión de esta proteína. En cambio, al infectar la célula, la concentración de eIF4E en estos sitios desaparece y se observa una distribución homogénea de ésta en todo el citoplasma, lo que nos indica que la infección provoca una relocalización de eIF4E en la célula. Interesantemente, en células infectadas, donde la expresión de eIF4E está disminuida, el número de viroplasma por célula es menor y se observa un aumento en su tamaño, con respecto al control (Figura 13). Se hizo el mismo análisis en células donde se interfirió la expresión de eIF4GI sin embargo, no se observaron diferencias con respecto a células control (datos no mostrados).

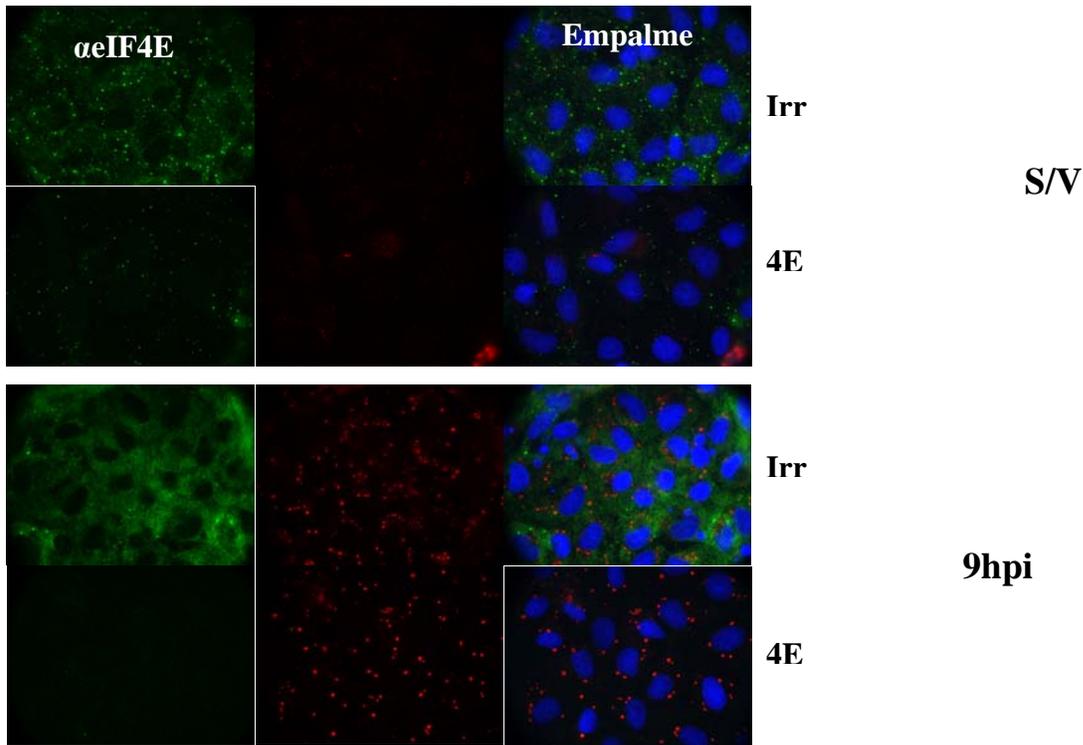


Figura 13. Efecto de la disminución de la síntesis del factor eIF4E en la formación de viroplasmas por rotavirus. Células MA104 fueron transfectadas con siRNA irrelevante (Irr) o con siRNA^{eIF4E} (4E). 48h postransfección las células se infectaron o no con RRV y 9h postinfección fueron fijadas y preparadas para inmunofluorescencia como se describe en materiales y métodos. La expresión de eIF4E fue detectada utilizando un anticuerpo monoclonal anti-eIF4E (α eIF4E), mientras que la infección por rotavirus se detectó con un anticuerpo policlonal anti-NSP2 (α RRV), seguidos de una incubación con anti-ratón Alexa 488 y anti-conejo Alexa 568, respectivamente. El tercer panel muestra el empalme más la tinción con DAPI para ver núcleos.

PABP es una proteína que por medio de su interacción con eIF4G, estimula la traducción de los mRNAs a través de su circularización. Esta interacción es perturbada por la proteína viral NSP3, lo que provoca la inhibición de la síntesis de proteínas celulares durante la infección de rotavirus. En el laboratorio se ha visto que cuando las células son infectadas, la proteína PABP se transloca al núcleo conforme avanza la infección. También se observó que cuando se interfiere la expresión de la proteína viral NSP3, esta translocación no se lleva a cabo, lo que nos sugiere que NSP3 participa de alguna manera en este proceso (Montero, H., datos no publicados). Se sabe que NSP3 se une a eIF4GI en el mismo sitio que la proteína PABP pero con mayor afinidad, lo que provoca que esta

última sea desplazada del complejo eIF4F, por lo que PABP ya no formaría parte de complejos proteicos en citoplasma, lo que posiblemente induzca su translocación al núcleo.

Con el objetivo de ver si el desplazamiento de PABP por NSP3 de los complejos de traducción durante la infección, está relacionado con su relocalización intracelular, se decidió analizar si eIF4GI o su homólogo eIF4GII juegan algún papel en este proceso. Para esto, células transfectadas con siRNA^{eIF4GI}, siRNA^{eIF4GII} o un siRNA irrelevante como control, fueron infectadas o no y, a distintos tiempos postinfección (3, 6 o 9 hrs), se fijaron y se cotiñeron con un anticuerpo dirigido contra PABP y con un anticuerpo que reconoce una proteína viral presente en viroplasma, NSP2.

En células transfectadas con siRNA^{eIF4GI}, no se ve diferencia con respecto a células transfectadas con un siRNA irrelevante, en la localización intracelular de PABP (datos no mostrados), lo que nos sugiere que la interacción entre PABP y eIF4GI no es necesaria para mantener a la primera en el citoplasma durante la infección. Por otro lado, cuando se transfecta siRNA^{eIF4GII} tanto en células no infectadas, como a tiempos tempranos de infección (3hpi), no se observa diferencia con el control. Sin embargo, a 6 hpi, en células transfectadas con el siRNA irrelevante ya se puede ver la translocación de PABP al núcleo, mientras que en células transfectadas con siRNA^{eIF4GII}, PABP se encuentra en su mayoría en citoplasma, con sólo una pequeña fracción en núcleo. Finalmente, a 9hpi, PABP ya se ha relocalizado a núcleo en células donde se inhibe la expresión de eIF4GII, aunque aún se observa proteína en citoplasma, mientras que a este tiempo, en células control, podemos ver casi la totalidad de PABP en núcleo (Figura 14). También podemos observar que cuando interferimos la expresión de eIF4GII, se reduce la cantidad de viroplasma a 6 y 9hpi. Esto podría ser debido a que al producirse menos proteína viral, de alguna manera la cinética de la infección fuera más lenta y por este mismo motivo, la translocación de PABP al núcleo se ve retrasada.

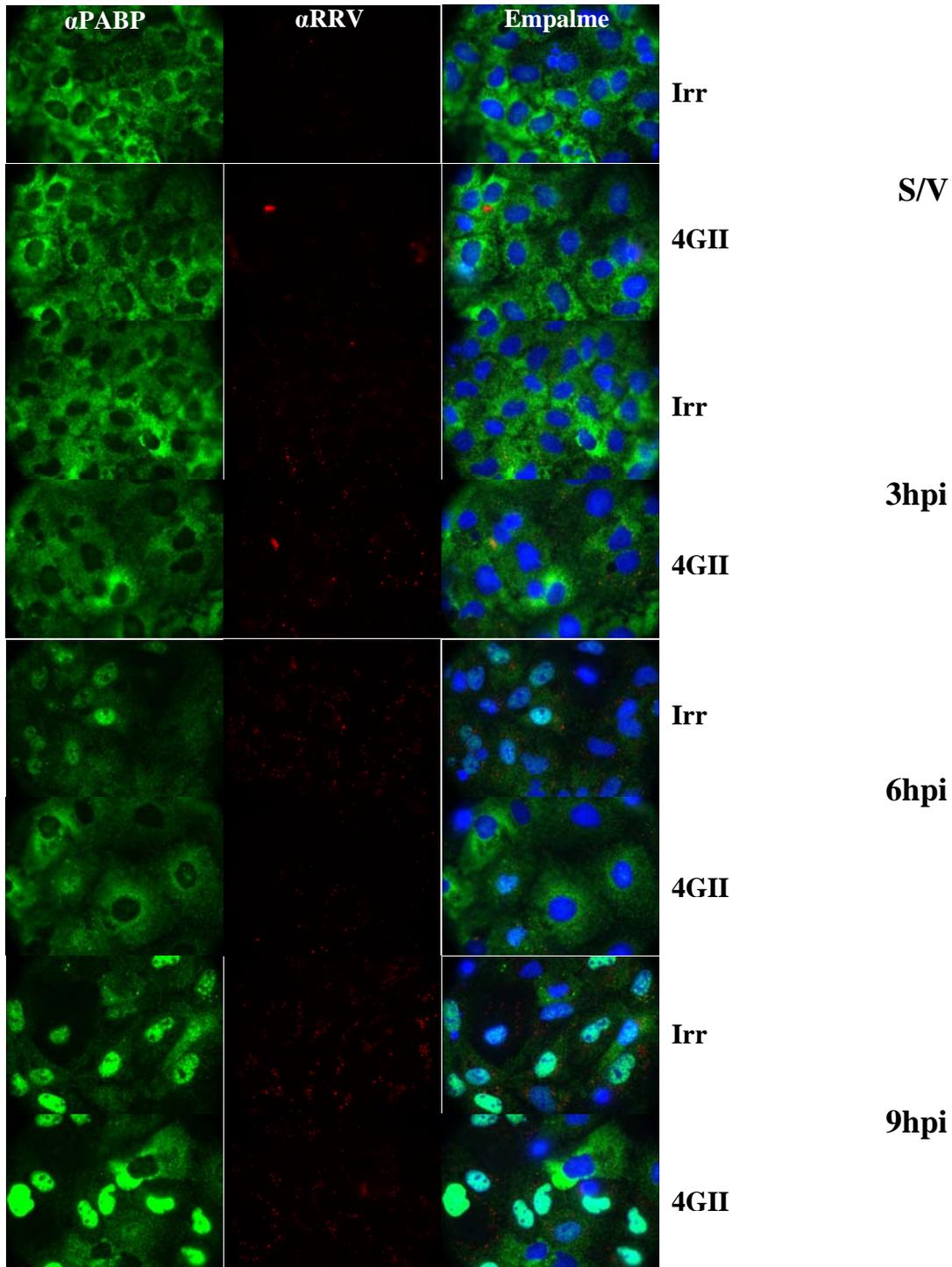


Figura 14. Translocación de PABP al núcleo en células donde se interfiere la expresión del factor eIF4GII. Células MA104 fueron transfectadas con siRNA irrelevante (Irrrel) o con siRNA^{eIF4GII} (4GII). 48h postransfección las células se infectaron o no (s/v) con RRV y a distintas horas postinfección (3, 6 o 9hpi) fueron fijadas y preparadas para inmunofluorescencia como se describe en materiales y métodos. PABP fue detectada utilizando un anticuerpo monoclonal anti-PABP (α PABP), mientras que la infección por rotavirus se detectó con un anticuerpo policlonal anti-NSP2 (α RRV), seguidos de una incubación con anti-ratón Alexa 488 y anti-conejo Alexa 568, respectivamente. El tercer panel muestra el empalme más la tinción con DAPI para ver núcleos.

DISCUSIÓN

Uno de nuestros objetivos es determinar si la traducción de los mRNAs de rotavirus se lleva a cabo por la vía cap-dependiente o cap independiente. Para esto decidimos inhibir la traducción cap-dependiente inactivando la proteína de unión al cap eIF4E y ver si el virus era capaz de sintetizar sus proteínas bajo estas condiciones.

Un método que se utilizó fue la inactivación de eIF4E de manera indirecta, al inhibir la fosforilación de las proteínas 4E-BPs para provocar su unión a eIF4E, mediante el uso de la droga rapamicina y, por otro lado, se silenció la expresión de la proteína de unión al cap, eIF4E por medio de RNAi. Hasta ahora, a esta proteína se le ha atribuido un papel esencial en el inicio de la traducción cap dependiente (19, 43), por lo que se esperaba que cualquier inhibición de la actividad, o disminución en la cantidad de este factor, tuviera un efecto drástico, o por lo menos notable en la síntesis de proteínas celulares, dado que se ha descrito que la mayoría de los mRNAs se traducen por la vía cap dependiente (19). En nuestro caso, aun a pesar de que se observó una disminución evidente en la cantidad de esta proteína, la traducción de mRNAs tanto celulares como virales no se vio afectada. Esto podría deberse a dos razones, por una parte lo que podría estar pasando es que aun cuando la cantidad del factor eIF4E es menor, éste no sea tan necesario debido a que en la célula existen mRNAs que están traduccionalmente activos y reiniciando rondas de la traducción, sin la necesidad de volver a reclutar toda la maquinaria de traducción desde el inicio, por lo que sobrepasan la necesidad del complejo eIF4F para traducirse. De esta forma lo que vemos son mRNAs que están siendo traducidos, pero que para ello no necesariamente tuvieron que pasar por la etapa de inicio de la traducción en su totalidad. La otra posibilidad, es que exista otra proteína que en ausencia de eIF4E cumpla su función o una función muy similar. Se ha descrito un complejo nuclear de unión al cap, CBC20/80, el cual participa en el splicing y en la degradación tipo NMD (Non sense Mediated Decay) (3) y en el citoplasma puede cumplir la función de factor de inicio de traducción mediante su interacción con eIF4G, pero finalmente es reemplazado por eIF4E (8, 25, 32, 37). Se desconoce el mecanismo por el cual el complejo CBC20/80 es desplazado por eIF4E del cap de los mRNAs, pero se ha propuesto que esto podría ser debido a la gran diferencia de concentración que hay en el citoplasma entre el complejo nuclear CBC20/80 y eIF4E (37).

Cuando se inhibe la expresión de eIF4E, su concentración en el citoplasma disminuye, esta nueva condición provocaría que la diferencia de concentraciones entre eIF4E y el complejo nuclear de unión al cap, ya no fuera lo suficientemente significativa como para desplazar a CBC20/80 de los mRNAs, quedando éste unido a ellos supliendo el papel de eIF4E como factor de inicio de la traducción. En principio, esto sería válido para los mRNAs celulares dado que los mRNAs virales no se transcriben en el núcleo, sin embargo, de la misma manera en que se apoderarían de la maquinaria de traducción en la cual estaría eIF4E, lo podrían hacer con un complejo que contenga a CBC20/80 en el citoplasma.

Anteriormente se había visto que el factor eIF4GI no es necesario para el inicio de la traducción de los mRNAs celulares en la línea MA104, ni para los mRNAs de rotavirus y se sugirió que podría deberse a que el homólogo de eIF4GI, eIF4GII, cumpliera su función en su ausencia (36). En este trabajo analizamos esta posibilidad y observamos que cuando interferimos la expresión de eIF4GII, la síntesis de proteína viral disminuyó, aunque no así la celular. El hecho de que sólo la traducción de los mRNAs virales se vea afectada en esta situación, puede deberse a que los mRNAs de la célula pudieran utilizar indistintamente eIF4GI o eIF4GII para iniciar su traducción y que los mRNAs virales necesiten específicamente a eIF4GII. Cuando infectamos las células, se ha dejado transcurrir un tiempo de 48 a 72 horas después de la transfección del siRNA para garantizar que la cantidad del factor que estamos silenciando sea mínima y así los mRNAs virales deben de iniciar su traducción en estas condiciones. Sin embargo, cuando se da la inhibición de la expresión de eIF4GI y eIF4GII, en la célula ya hay mRNAs celulares que se están traduciendo, todos estos mensajeros se encuentran en complejos de traducción que podrían estar reiniciando constantemente sin la necesidad de todos los factores de inicio necesarios para reclutar al ribosoma. Para estudiar si este es el caso, se interfirió la expresión de varios factores del complejo eIF4F y se forzó a que se dieran nuevos inicios de traducción por medio de un choque hipertónico. Aun en este caso, tanto las proteínas celulares como virales se sintetizaron de manera eficiente, a excepción de los casos donde la expresión del factor eIF4GII se inhibió. Esto nos sugiere que a pesar de que eIF4GI y eIF4GII son funcionalmente homólogos, el inicio de la traducción de ciertos mRNAs se podría llevar a cabo reclutando diferencialmente a uno de estos dos factores en el complejo eIF4F. Esto ya

se ha visto al inicio de la diferenciación en células humanas UT7-mpl, en donde se observó que eIF4GII era reclutado preferencialmente al complejo eIF4F (6).

Por otra parte, se analizó la producción de virus en condiciones donde la expresión de varias proteínas del complejo eIF4F fueron inhibidas y se encontró que la disminución en la cantidad de eIF4E y eIF4GII provocó una reducción en la producción de partículas virales infecciosas. En el caso de eIF4GII, esto coincidió con la reducción en la síntesis de proteínas virales. Sin embargo, al inhibir la síntesis de eIF4E, la traducción de los mRNAs virales no se ve afectada significativamente, pero el rendimiento viral disminuyó. Al examinar la cantidad de dsRNA y mRNA viral que se sintetiza en células infectadas, encontramos sorprendentemente que la cantidad de ambos disminuyó en las células tratadas con siRNA^{eIF4E}. Estos datos nos indican que la replicación viral se está viendo afectada por la disminución de eIF4E, ya sea porque esta proteína esté implicada directa o indirectamente en este proceso o quizá al ser una proteína de unión al cap, ésta se una al cap de los transcritos virales ayudando a aumentar su estabilidad y al encontrarse en menor cantidad, el RNA viral podría ser más susceptible a degradación. Sin embargo, en el laboratorio se ha observado que durante una infección, la vida media de mRNAs virales es similar con o sin cap (Ayala, C., datos no publicados), lo que nos indica que si eIF4E estuviera afectando la vida media de los mensajeros virales, esto no sería a través de su interacción con el cap, queda entonces averiguar cuál podría ser la función de esta proteína en la transcripción o replicación de los mRNAs virales.

También se examinó por inmunofluorescencia la formación de viroplasmos en células transfectadas con siRNA^{eIF4E}. Se encontró que en células donde la cantidad del factor eIF4E es menor, los viroplasmos presentan un aumento en su tamaño. Una posible explicación del aumento en el tamaño de los viroplasmos es que se puede estar interrumpiendo un paso en el proceso de morfogénesis, posiblemente por la disminución en la replicación, lo que provocaría que no haya suficiente genoma viral para la formación de nuevas partículas virales y la proteína del virus se estaría acumulando en estas estructuras. Interesantemente, también observamos que, en células infectadas, la distribución de eIF4E cambia. Se sabe que esta proteína está presente en gránulos de estrés (SGs) y cuerpos de procesamiento (P bodies), los cuales se observan al microscopio como puntos en el citoplasma (2, 28). Los P bodies son gránulos citoplásmicos que contienen componentes de

la maquinaria de degradación, también contienen proteínas que participan en la vía de degradación de mRNAs que es inducida por un codón de término muy temprano (NMD por sus siglas en inglés), además de estar presente el complejo de silenciamiento inducido por RNA. En estos sitios se acumulan mRNAs que no están siendo traducidos y se encuentran normalmente en la célula (2, 15). Los SGs también son gránulos citoplásmicos, pero a diferencia de los P bodies, no se encuentran normalmente en la célula en condiciones favorables de crecimiento, sin embargo su formación se induce rápidamente en respuesta a un estrés ambiental. El puntilleo que observamos en células no infectadas, al teñir contra eIF4E podría corresponder a P bodies, interesantemente, este puntilleo se desvanece cuando la célula es infectada. En el laboratorio se ha observado que durante la infección, la formación de gránulos de estrés es inhibida, posiblemente, esta inhibición también pudiera ser efectiva para los P bodies.

PABP es una proteína que se localiza principalmente en citoplasma. Una parte de esta proteína está asociada a ribosomas, otra se encuentra en complejos con factores de inicio de la traducción y existe también una cantidad de PABP que no está asociada ni con ribosomas, ni con factores de traducción (29). Cuando PABP es sobreexpresada o en condiciones donde se inhibe la transcripción, ésta se transloca al núcleo, por un mecanismo desconocido (1). Otra condición donde se ha visto que PABP se transloca al núcleo, es durante la infección de rotavirus. Sin embargo, cuando se inhibe la expresión de la proteína viral NSP3, PABP se queda en citoplasma. Se sabe que durante la infección, NSP3 desplaza a PABP del complejo eIF4F, al interactuar con eIF4GI en el mismo sitio que lo hace PABP, pero con mayor afinidad. Este desplazamiento podría provocar que la cantidad de PABP que no está asociada a factores de traducción o ribosomas aumente, lo que podría mimetizar una sobreexpresión de la proteína, condición que se ha visto provoca su translocación al núcleo. Por esto, cuando no se expresa NSP3, la interacción entre eIF4G y PABP se mantiene y así PABP permanecería asociada a complejos de traducción por lo que ya no se relocalizaría al núcleo. Cuando interferimos la expresión de eIF4GI, PABP se sigue translocando al núcleo, lo que concuerda con una menor presencia de PABP en complejos de traducción. Sin embargo, cuando se inhibe la expresión de eIF4GII, la relocalización de PABP al núcleo durante la infección parece estar retrasada, hecho que aún no podemos explicar. Sería muy interesante estudiar la localización de PABP en células

donde se interfiriera simultáneamente la expresión de eIF4GI y eIF4GII, lo que simularía la presencia de NSP3 desde el punto de vista de que ahora PABP no podría interactuar con estas proteínas, no por un desplazamiento provocado por NSP3, sino por la ausencia de ellas. Esto nos ayudaría a ver si en efecto estas proteínas están relacionadas con la permanencia de PABP en citoplasma, en condiciones normales.

CONCLUSIONES

1. Los factores eIF4E y eIF4GI son prescindibles para el inicio de la traducción de los mRNAs celulares y virales.
2. Cuando se inhibe la expresión del factor eIF4GII, la síntesis de proteína viral y celular se ve disminuida.
3. La ausencia de eIF4E afecta la producción de partículas virales infecciosas, hecho relacionado con una disminución en la cantidad de RNA mensajero y de doble cadena del virus.
4. eIF4E cambia su patrón de distribución en células infectadas.
5. La translocación de PABP al núcleo durante la infección se ve retrasada cuando se inhibe la expresión del factor eIF4GII.

PERSPECTIVAS

1. Caracterizar el papel de eIF4A y PABP en la infección de rotavirus.
2. Definir si eIF4E estabiliza los mRNAs virales o si está implicado en la replicación o transcripción del genoma viral.
3. Determinar si hay una proteína que sustituya la función del factor eIF4E en el inicio de la traducción, cuando se inhibe la expresión de éste.
4. Analizar la redistribución de eIF4E en células infectadas. Determinar si esto correlaciona con una disolución de P bodies.
5. Estudiar el mecanismo por el cual PABP se transloca al núcleo durante la infección.

REFERENCIAS

1. Afonina, E., R. Stauber, and G. N. Pavlakis. 1998. The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* 273:13015-21.
2. Anderson, P., and N. Kedersha. 2006. RNA granules. *J Cell Biol* 172:803-8.
3. Baker, K. E., and R. Parker. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr Opin Cell Biol* 16:293-9.
4. Beretta, L., A. C. Gingras, Y. V. Svitkin, M. N. Hall, and N. Sonenberg. 1996. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J* 15:658-64.
5. Bushell, M., and P. Sarnow. 2002. Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. *J Cell Biol* 158:395-9.
6. Caron, S., M. Charon, E. Cramer, N. Sonenberg, and I. Dusanter-Fourt. 2004. Selective modification of eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F) at the onset of cell differentiation: recruitment of eIF4GII and long-lasting phosphorylation of eIF4E. *Mol Cell Biol* 24:4920-8.
7. Castello, A., E. Alvarez, and L. Carrasco. 2006. Differential cleavage of eIF4GI and eIF4GII in mammalian cells. Effects on translation. *J Biol Chem* 281:33206-16.
8. Chiu, S. Y., F. Lejeune, A. C. Ranganathan, and L. E. Maquat. 2004. The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex. *Genes Dev* 18:745-54.
9. Cuesta, R., Q. Xi, and R. J. Schneider. 2000. Adenovirus-specific translation by displacement of kinase Mnk1 from cap-initiation complex eIF4F. *EMBO J* 19:3465-74.
10. Deo, R. C., C. M. Groft, K. R. Rajashankar, and S. K. Burley. 2002. Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. *Cell* 108:71-81.
11. Dever, T. E. 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 108:545-56.
12. Duncan, R., S. C. Milburn, and J. W. Hershey. 1987. Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. *J Biol Chem* 262:380-8.
13. Eichwald, C., J. F. Rodriguez, and O. R. Burrone. 2004. Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *J Gen Virol* 85:625-34.
14. Estes, M. K. 2001. Rotaviruses and Their Replication, p. 1747-1785. *In* D. Knipe, and P. Howley (ed.), *Fields Virology*, vol. II. Lippincott Williams & Wilkins.
15. Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, and E. Izaurralde. 2007. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:9-22.

16. Flint, S. J., L.W. Enquist, V.R. Racaniello, and A.M. Skalka. 2004. Control of Translation, p. 379-419. *In* A. S. f. Microbiology (ed.), Principles of Virology, Second ed.
17. Flynn, A., and C. G. Proud. 1995. Serine 209, not serine 53, is the major site of phosphorylation in initiation factor eIF-4E in serum-treated Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 270:21684-8.
18. Gingras, A. C., B. Raught, S. P. Gygi, A. Niedzwiecka, M. Miron, S. K. Burley, R. D. Polakiewicz, A. Wyslouch-Cieszynska, R. Aebersold, and N. Sonenberg. 2001. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev* 15:2852-64.
19. Gingras, A. C., B. Raught, and N. Sonenberg. 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68:913-63.
20. Gingras, A. C., B. Raught, and N. Sonenberg. 2001. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* 15:807-26.
21. Gingras, A. C., and N. Sonenberg. 1997. Adenovirus infection inactivates the translational inhibitors 4E-BP1 and 4E-BP2. *Virology* 237:182-6.
22. Gonzalez, R. A., M. A. Torres-Vega, S. Lopez, and C. F. Arias. 1998. In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Arch Virol* 143:981-96.
23. Gradi, A., H. Imataka, Y. V. Svitkin, E. Rom, B. Raught, S. Morino, and N. Sonenberg. 1998. A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol Cell Biol* 18:334-42.
24. Groft, C. M., and S. K. Burley. 2002. Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol Cell* 9:1273-83.
25. Ishigaki, Y., X. Li, G. Serin, and L. E. Maquat. 2001. Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 106:607-17.
26. Jefferies, H. B., C. Reinhard, S. C. Kozma, and G. Thomas. 1994. Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4441-5.
27. Joshi, B., A. L. Cai, B. D. Keiper, W. B. Minich, R. Mendez, C. M. Beach, J. Stepinski, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz, and R. E. Rhoads. 1995. Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at Ser-209. *J Biol Chem* 270:14597-603.
28. Kedersha, N., G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. Lykke-Andersen, M. J. Fritzler, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. E. Golan, and P. Anderson. 2005. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 169:871-84.
29. Kuyumcu-Martinez, N. M., M. Joachims, and R. E. Lloyd. 2002. Efficient cleavage of ribosome-associated poly(A)-binding protein by enterovirus 3C protease. *J Virol* 76:2062-74.
30. Lachance, P. E., M. Miron, B. Raught, N. Sonenberg, and P. Lasko. 2002. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E is critical for growth. *Mol Cell Biol* 22:1656-63.

31. Lawton, J. A., M. K. Estes, and B. V. Prasad. 1997. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat Struct Biol* 4:118-21.
32. Lejeune, F., A. C. Ranganathan, and L. E. Maquat. 2004. eIF4G is required for the pioneer round of translation in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 11:992-1000.
33. Lopez, S., and C. F. Arias. 2003. Attachment and post-attachment receptors for rotavirus, p. 143-169. *In* U. D. a. J. Gray (ed.), *Viral Gastroenteritis*, First ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
34. Lopez, S., and C. F. Arias. Los rotavirus. *In* E. M. Romero, and J.C. Martinez (ed.), *Microbios*.
35. Mangus, D. A., M. C. Evans, and A. Jacobson. 2003. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol* 4:223.
36. Montero, H., C. F. Arias, and S. Lopez. 2006. Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J Virol* 80:9031-8.
37. Moore, M. J. 2005. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 309:1514-8.
38. Novoa, I., and L. Carrasco. 1999. Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4G by exogenously added hybrid proteins containing poliovirus 2Apro in HeLa cells: effects on gene expression. *Mol Cell Biol* 19:2445-54.
39. Patton, J. T. 1994. Rotavirus replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 185:107-27.
40. Patton, J. T. 1995. Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *J Gen Virol* 76 (Pt 11):2633-44.
41. Pause, A., G. J. Belsham, A. C. Gingras, O. Donze, T. A. Lin, J. C. Lawrence, Jr., and N. Sonenberg. 1994. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371:762-7.
42. Pelletier, J., and N. Sonenberg. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334:320-5.
43. Pestova, T. V., V. G. Kolupaeva, I. B. Lomakin, E. V. Pilipenko, I. N. Shatsky, V. I. Agol, and C. U. Hellen. 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7029-36.
44. Piron, M., T. Delaunay, J. Grosclaude, and D. Poncet. 1999. Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *J Virol* 73:5411-21.
45. Piron, M., P. Vende, J. Cohen, and D. Poncet. 1998. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J* 17:5811-21.
46. Poncet, D. 2003. Translation of rotavirus mRNAs in the infected cell, p. 185-205. *In* U. D. a. J. Gray (ed.), *Viral Gastroenteritis*, First ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

47. Poncet, D., C. Aponte, and J. Cohen. 1993. Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *J Virol* 67:3159-65.
48. Poulin, F., A. C. Gingras, H. Olsen, S. Chevalier, and N. Sonenberg. 1998. 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J Biol Chem* 273:14002-7.
49. Prevot, D., J. L. Darlix, and T. Ohlmann. 2003. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell* 95:141-56.
50. Ramig, R. F. 2004. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* 78:10213-20.
51. Scheper, G. C., and C. G. Proud. 2002. Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur J Biochem* 269:5350-9.
52. Schneider, R. J., and I. Mohr. 2003. Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem Sci* 28:130-6.
53. Terada, N., H. R. Patel, K. Takase, K. Kohno, A. C. Nairn, and E. W. Gelfand. 1994. Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11477-81.
54. Varani, G., and F. H. Allain. 2002. How a rotavirus hijacks the human protein synthesis machinery. *Nat Struct Biol* 9:158-60.
55. Vende, P., M. Piron, N. Castagne, and D. Poncet. 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* 74:7064-71.
56. Ventoso, I., S. E. MacMillan, J. W. Hershey, and L. Carrasco. 1998. Poliovirus 2A proteinase cleaves directly the eIF-4G subunit of eIF-4F complex. *FEBS Lett* 435:79-83.
57. Vitour, D., P. Lindenbaum, P. Vende, M. M. Becker, and D. Poncet. 2004. RoXaN, a novel cellular protein containing TPR, LD, and zinc finger motifs, forms a ternary complex with eukaryotic initiation factor 4G and rotavirus NSP3. *J Virol* 78:3851-62.
58. von der Haar, T., J. D. Gross, G. Wagner, and J. E. McCarthy. 2004. The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat Struct Mol Biol* 11:503-11.
59. Yueh, A., and R. J. Schneider. 2000. Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA. *Genes Dev* 14:414-21.