



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTEQUIOMÉTRICA
IN VIVO ENTRE EL REGULADOR
TRADUCCIONAL NSP3 DE ROTAVIRUS Y EL
FACTOR DE INICIACIÓN 4G

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

EGAR REYNA ROSAS

Tutor: DR. LUIS PADILLA NORIEGA

MÉXICO, D. F.

JUNIO/2012



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.

FINANCIAMIENTO

La realización de este proyecto fue financiada parcialmente por los proyectos:

-51029-Z y 168046 del Fondo de Investigación Científica Básica de la Secretaría de Educación Pública y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACyT), México.

-IN224809 e IN201212 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los proyectos se denominan: “Regulación post-transcripcional de la expresión génica de rotavirus” (IN224809), y “Regulación traduccional de la expresión génica de rotavirus” (IN201212).

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada con el registro 347725, durante el periodo de Febrero de 2010 a Enero de 2012 (4 semestres del 2010-2 al 2012-1).

Agradezco a la Dirección General del Personal Académico (DGAPA-UNAM) la beca recibida durante el periodo de Febrero a julio de 2012 (semestre 2012-2).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Renato León Rodríguez, técnico académico adscrito al laboratorio, por el apoyo que me brindó tanto experimentalmente como teóricamente durante toda la realización de este proyecto.

Agradezco al Dr. Luis Padilla Noriega, asesor principal, por su incondicional tutoría en este proyecto, y que sirvió de forma muy importante en mi formación académica y experimental.

Agradezco a las doctores Tzvetanka Dimitrova Dinkova y Juan Miranda Ríos, miembros del Comité Tutoral, por su valiosa participación y sus comentarios sobre este proyecto, ayudando a que se realizará de la mejor forma.

Agradezco a los miembros del Jurado de Examen para la obtención del grado de Maestría, los doctores Estela Sánchez Quintanar, Blanca Lilia Barrón Romero, Alfredo Torres Larios, Enrique García Hernández y Luis Antonio Mendoza Sierra, por su atenta participación en la realización de esta tesis y sus comentarios sobre el proyecto.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, Laura Martínez Alvares, Maximino Santiago Méndez, Eloisa Hernández Lucero, Hugo Israel Contreras Treviño, por su apoyo aportado a este proyecto.

A mis Padres por seguir apoyándome y creyendo en mí, su confianza me ayudó enormemente para realizar este proyecto.

A mi hermana Laura y familiares por su apoyo y comentarios durante todo este tiempo.

A Queletzu por su valiosa compañía, comentarios, críticas y cariño. Hicieron que día a día realizara este proyecto con esperanza y confianza.

A mis amigos y compañeros, que estuvieron ahí en todo momento para apoyarme.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.	6
Resumen.	10
Introducción.	11
• Generalidades.	11
• Ciclo de replicación.	14
• NSP3.	15
• Dominios alternos de NSP3.	18
• Proteína RoXaN y su vínculo con NSP3.	19
• La chaperona HSP90 y su interacción con NSP3.	20
• Modelo de inhibición de la traducción por interferencia de NSP3 con la circularización de ARNm poliadenilados.	25
• Factor de iniciación 4G.	27
• Modelo alternativo de inhibición de la traducción celular por eIF4GI.	31
▪ Modelo de inhibición de la traducción por medio de RoXaN en presencia de NSP3.	31
• Estequiometría de la interacción entre NSP3 y eIF4GI.	32
• Antecedentes específicos.	34
Objetivo.	35
Hipótesis.	35

Metas.	35
Metodología.	36
Resultados.	45
Discusión.	67
Conclusión.	76
Pespectivas	77
Bibliografía.	78

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Adenina

Anti-: Anticuerpo

ARN: Ácido ribonucleico

ARNcd: Ácido ribonucleico de doble cadena

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia

ATP: Adenosín trifosfato

BSA: Albúmina de suero bovino

BSC1: Células epiteliales de riñón de mono verde africano

C: Citocina

C-terminal: Carboxilo terminal

CAP: Caperuza (modificación en 5' por un 7-metilguanosina)

Cist: Cisteína

D: Ácido. Aspártico

DAP5: Proteína asociada a muerte 5

DLP: Partícula de doble capa (Double-Layered Particle)

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

DNA: Ácido desoxirribonucleico

E: Ácido. Glutámico

eIF: Factor de iniciación eucarionte

G: Guanina

GAPDH: Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa

GDP: Guanisin difosfato

GTP: Guanosín trifosfato

H₂O: Agua

HBV: Virus de la hepatitis B

HCl: Ácido clorhídrico

HSC: proteína cognada de choque térmico (Heat Shock Cognate)

HSP: Proteína de choque térmico (Heat Shock Proteín)

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

INF: Interferón

IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

IRES: Segmento interno de entrada al ribosoma (internal ribosome entry segment)

kDa: kiloDalton

L: Leucina

MA-104: Línea celular de riñón de mono verde africano

MEM: Medio mínimo esencia de Eagle

Met: Metionina

MG132: Carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal

MOI: Multiplicidad de Infección

NaCl: Cloruro de Sodio

NaH₂PO₄: Fosfato de Sodio

Ni-agarosa: Níquel-agarosa

NSP: Proteína no estructural

Paip1: Proteína que interactúa con la proteína de unión a poliadenilados (Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1)

PABP-C1: Proteína de unión a la cola de poli-A citoplasmática

PABP-N1: Proteína de unión a la cola de poli-A nuclear

PBS: Amortiguador fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)

PKR: Proteína cinasa R

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (phenylmethylsulfonyl fluoride)

Poli-A: Cadena de adeninas

PVDF: Polivinildenedifloruro

RE: Retículo endoplásmico

RoXaN: Proteína-X asociada a NSP3 de rotavirus (Rotavirus X-protein Associated to NSP3)

RRV: Rhesus Rotavirus

S: Svedberg (coeficiente de sedimentación)

SA11: Rotavirus de simio

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

TA: Temperatura ambiente

TRP: Tetratricopéptidos repetidos

TTBS: Amortiguador de Tris salino con Tween (Tween-Tris- buffered saline)

U: Uracilo

V: Valina

VP: Proteína viral

WB: Western blot

WBND: Western blot no dissociativo

4E-BP: Proteína de unión a eIF4E (eIF4E-binding protein)

17DMAG: 17-N,N-dimethylethylenediamine-geldamycin

Resumen

La proteína no estructural 3 (NSP3) de rotavirus inhibe la traducción celular al unirse al factor de iniciación de la traducción eIF4GI, impidiendo la interacción entre eIF4GI y la proteína de unión a poli-A citoplásmica (PABP-C1), necesaria para la circularización de los ARNm celulares poliadenilados. Se sabe que NSP3 en su forma dimérica posee 2 sitios de unión a eIF4GI y se piensa que eIF4GI es monomérica, por lo que la estequiometría entre estas proteínas podría ser 2:1 o 1:1. Con el fin de poder elucidar aspectos moleculares de la inhibición de la traducción por NSP3 es necesario conocer la estequiometría entre este regulador traduccional y su blanco funcional eIF4GI.

En este estudio se cuantificó el máximo nivel de acumulación de NSP3 en un sistema de expresión inducible del virus vaccinia en células de mamífero, que se sabe es autoregulado por su efecto inhibitorio sobre la traducción celular. Se encontró que NSP3 se acumula hasta alcanzar los 4 millones de moléculas por célula a las 8 hr post-infección (hpi) y a partir de este tiempo permanece estable hasta las 16 hpi. Sorprendentemente a las 8 hpi no ocurre inhibición alguna en el nivel global la traducción celular, mientras que en forma tardía se alcanza el 60% de inhibición de la traducción celular a las 16 hpi. Se investigó la posible causa del retraso en la aparición del efecto inhibitorio de la traducción encontrando que correlaciona con la acumulación de formas diméricas de NSP3.

Al comparar el nivel de expresión de NSP3 con la cantidad reportada de eIF4GI en células de mamífero, que es de 2 millones por célula, encontramos que la posible estequiometría entre NSP3 y eIF4GI es de 2:1, además de que existe un retardo de 8 hr, para que NSP3 establezca su efecto inhibitorio sobre la traducción celular, posiblemente como consecuencia de un correspondiente retardo en su dimerización.

Introducción

GENERALIDADES

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae* y al género *Rotavirus*, y son los principales agentes etiológicos de diarrea severa en humanos y en diversos animales. Las células blanco de infección son los enterocitos del intestino delgado en el duodeno y yeyuno (Gray & Desselberger, 2000; Shaw, 1999) . Existen 7 grupos (A-G) en que se clasifica al género *Rotavirus* que son idénticos morfológicamente pero no presentan reacción cruzada por técnicas serológicas. Siendo los rotavirus del grupo A los más relevantes como agentes etiológicos de gastroenteritis y se encuentran distribuidos a lo largo de todo el planeta, con mayor incidencia durante invierno. (James *et al.*, 1999; Shaw, 1999). Esta enfermedad fue asociada a rotavirus en los años 50's en ratones, pero no fue hasta el año 1972 cuando se pudo relacionar a rotavirus con infecciones humanas causantes de diarrea (Shaw, 1999). Esta enfermedad puede presentar diversos grados de malestar e incluso puede provocar la muerte a causa de una deshidratación, siendo más gravemente afectados niños entre 0–2 años de edad. A nivel mundial se estima que ocurren anualmente más de 500, 000 muertes de personas a causa de rotavirus, particularmente en países en desarrollo. Sin embargo, en países desarrollados es de igual forma relevante la enfermedad por rotavirus debido a que implica gastos muy cuantiosos en vacunas y tratamientos médicos (Desselberger *et al.*, 2009; Gray & Desselberger, 2000; Parashar *et al.*, 2009). El rango de hospederos que comprende el rotavirus del grupo A va desde, caballos, puercos, felinos, ratones, conejos, aves, murciélagos, e inclusive un marsupial (falangérido del azúcar o sugar glider en inglés) (Matthijnsens *et al.*, 2011).

Las partículas virales de rotavirus presentan un diámetro de aproximadamente 102 nm, y tres capas proteicas, la interna que envuelve al genoma del virus compuesto por 11 segmentos de

ARN de cadena doble (ARNcd), la intermedia, y la externa. Los ARN poseen CAP (nucleótido 7-metilguanilato) en su extremo 5' como los ARN celulares, sin embargo en su extremo 3', a diferencia de los celulares, no poseen una cola de poli-A (Trask *et al.*, 2012). Ambos extremos de los ARN virales presentan secuencias de nucleótidos conservados de importancia durante la transcripción, traducción y empaquetamiento del genoma (Becker, 2009). Estos 11 segmentos de ARN codifican para las 12 proteínas de rotavirus, siendo 10 de los genes (1-10) monocistronicos, y sólo el gen 11 codifica para dos proteínas (Trask *et al.*, 2012). Las 12 proteínas virales se dividen en 6 estructurales (VPs) y 6 no estructurales (NSPs) (Fig. 1). Las proteínas estructurales se encuentran en la partícula viral de 3 capas, mientras que las proteínas no estructurales participan en la regulación de la expresión génica, traducción y ensamblaje del virus, y están sólo presentes durante la infección celular (Shaw, 1999; Trask *et al.*, 2012). La proteína VP1 es la polimerasa de los ARN virales, VP2 conforma la capa interna del virión, VP3 es una guanililtransferasa encargada de ponerle la estructura CAP a los ARN. VP4 es una de las dos proteínas que están estructurando la capa externa del virión, formando las espículas, VP6 conforma la capa intermedia y en relación a las otras proteínas estructurales es la más abundante del virión, y se agrega como trímeros formando canales por donde salen los ARN. Finalmente VP7, que también se une en forma de trímeros, formando una capa externa delgada sobre la partícula viral. Entre las proteínas no estructurales, NSP1 es la encargada de evadir la respuesta inmune innata de interferón (IFN) del hospedero, NSP2 junto con NSP5 se encargan de formar cuerpos de inclusión electrodensos llamados viroplasmos, localizados en el citoplasma de las células hospederas en donde se lleva a cabo el empaquetamiento de los ARN replicados, y el ensamblaje de las partículas de doble capa. NSP3 inhibe la traducción de los ARN celulares y se cree que se encarga de promover la traducción de los ARN virales. Por su parte NSP4 se asocia

al Retículo Endoplásmico (RE) para servir como receptor que reconozca a las partículas de doble capa en el proceso de maduración viral. NSP6 no ha sido estudiada a fondo y sus funciones son inciertas, posiblemente regulando la dimerización y por ende la función de NSP5 (Patton, 1995; Shaw, 1999; Torres-Vega *et al.*, 2000; Trask *et al.*, 2012).

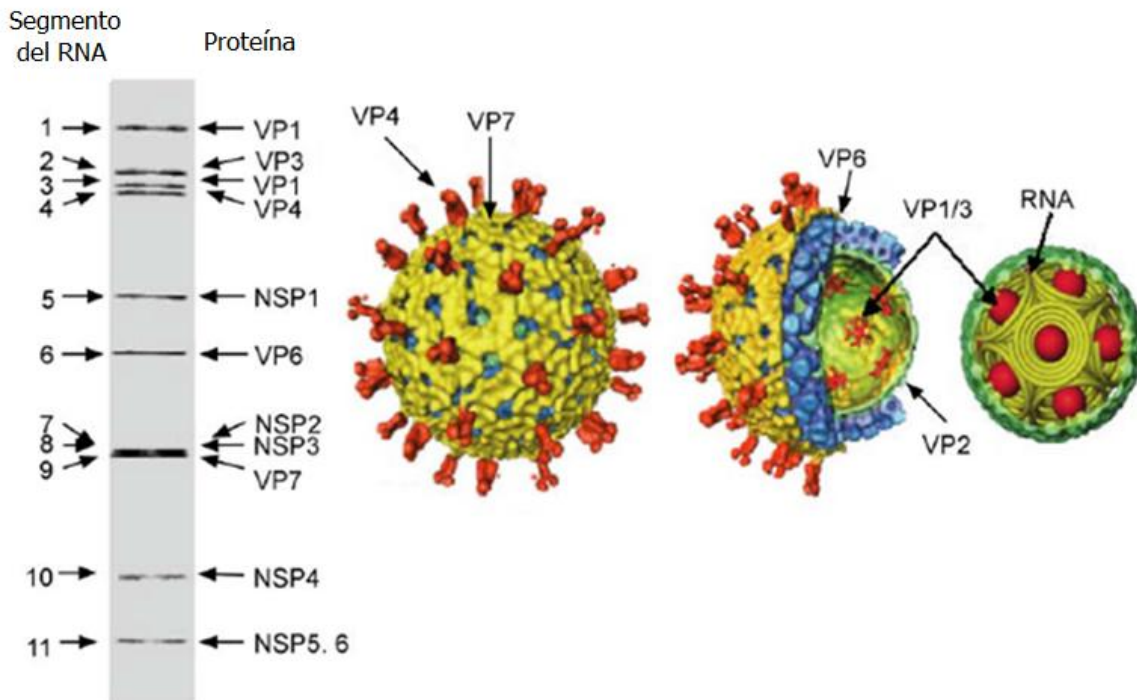


Fig 1. Esquema representativo de las secuencias de ARN y las proteínas codificadas, así como la composición proteica del virión.

CICLO DE REPLICACIÓN

Aunque las células blanco principales de los rotavirus del grupo A son los enterocitos del intestino delgado, el ciclo replicativo ha sido estudiado en células MA-104 de riñón de mono cultivadas *in vitro* (Gray & Desselberger, 2000). El ciclo replicativo de rotavirus comienza con la entrada por endocitosis mediada por receptores que reconocen a las proteínas VP7 y VP4 (Gray & Desselberger, 2000; Jayaram *et al.*, 2004; Lopez & Arias, 2004). Estos receptores incluyen a proteínas o lípidos glicosilados con ácido siálico terminal, diversas integrinas, y la proteína de choque térmico HSC70 (Gray & Desselberger, 2000; Guerrero *et al.*, 2002; Lopez & Arias, 2004). Posiblemente la internalización de la partícula viral depende de interacciones secuenciales con estos receptores (Lopez & Arias, 2004). En el proceso de internalización, la partícula viral pierde la capa externa, quedando como una partícula de doble capa (DLP) que es transcripcionalmente activa. Por lo tanto, la polimerasa endógena de rotavirus (VP1) que funciona como una transcriptasa, sintetiza cadenas de ARN de sentido positivo (+) a partir de cadenas molde de cada uno de los 11 segmentos de ARN de doble cadena (Jayaram *et al.*, 2004; Patton, 1995; Taraporewala & Patton, 2004). Los ARNm virales así producidos además de ser traducidos son utilizados como molde para replicar el material genético (produciendo de nuevo los segmentos de ARN de doble cadena). NSP2 y NSP5 forman los viroplasmos, donde ocurre el empaquetamiento y ensamblaje del genoma viral, localizándose ahí a las proteínas VP1, VP3, VP2 y VP6 que formarán la partícula de doble capa. Una vez terminada esta fase temprana de la replicación, las partículas virales de doble capa son transportadas al RE en donde NSP4 reconoce a la proteína VP6 y la transloca al lumen del RE, reclutando a VP7 que reside en el RE, y quizá también a VP4 desde el citosol. En el RE, las proteínas VP7 reclutadas en el proceso de gemación forman la tercera capa junto con VP4 y se termina la maduración de la partícula. Finalmente, las

partículas salen de la célula hospedera por lisis (Estes, 2007; Taraporewala & Patton, 2004) (Fig. 2).

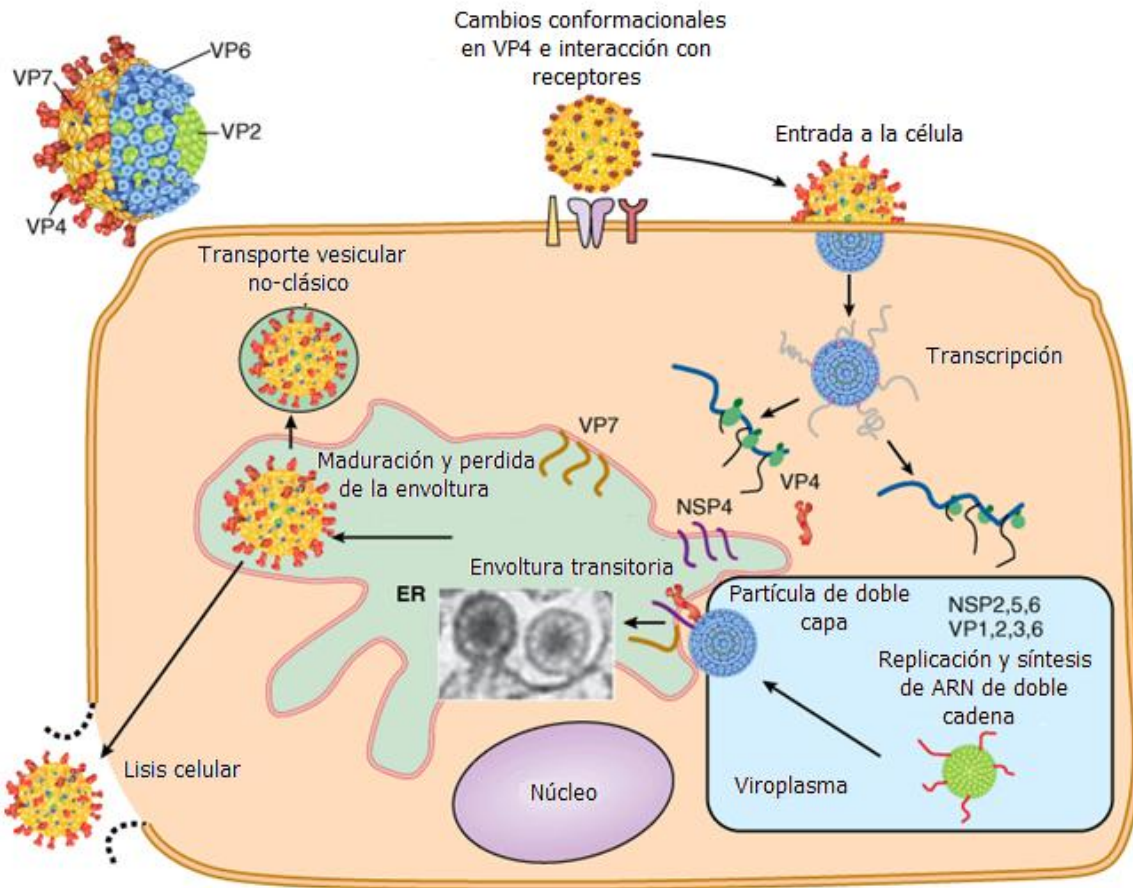


Fig 2. Ciclo replicativo de rotavirus presente en células de enterocitos del intestino delgado.

NSP3

Un aspecto de gran relevancia durante el ciclo replicativo de rotavirus es el que lleva a cabo la proteína NSP3, ya que inhibe la traducción celular y se piensa que también estimula la traducción de los ARNm virales (Becker, 2009; Padilla-Noriega *et al.*, 2002). NSP3 es una proteína que posee 315 aminoácidos y pesa 36 kDa, variando ligeramente dependiendo de la cepa viral (Becker, 2009; Deo *et al.*, 2002). Posee 3 dominios principales que son estructural y

bioquímicamente distintos, que sirven para caracterizar de manera general las funciones de NSP3. Hacia su extremo amino, que se compone de los aminoácidos 1-149, se encuentra un dominio que es capaz de reconocer y unir a los extremos 3' de los ARN de rotavirus, específicamente se une a una secuencia de 5 nucleótidos (UGACC) (Becker, 2009; Deo *et al.*, 2002; Vende *et al.*, 2000) (Fig. 3). Esta interacción entre NSP3 y el extremo 3' de los ARNm virales se piensa que sirve de forma análoga a la interacción entre la cola 3' poli-A de los ARNm celulares y la proteína PABP-C1 (cytoplasmic polyA-binding-protein) durante el proceso de traducción celular, resultando en estimulación de la traducción en ambos casos (Piron *et al.*, 1999; Piron *et al.*, 1998). De esta proteína se han descrito dos isoformas, PABP-N1 localizada en el núcleo principalmente, mientras que PABP-C1 se localiza en el citoplasma. La función de PABP-N1 aun no ha sido determinada a detalle, pero aparentemente está implicada en el proceso de poliadenilación post-transcripcional y estabilización de los ARNm, para que posteriormente suceda la translocación de los ARN poliadenilados del núcleo al citoplasma, proceso en el que se propone que ocurre un intercambio entre PABP-N1 y PABP-C1 y poder continuar con la traducción de los mensajeros en el citoplasma. Además se ha reportado que existe un intercambio de estas proteínas entre ambos compartimentos, encontrando a PABP-C1 en el núcleo y viceversa, como resultado de su continua translocación entre ambos compartimentos. Sobre esta base se propone que ambas proteínas están interaccionando durante todo el proceso con los ARNm y sirven para la estabilización, maduración y translocación de los ARNm (Lemay *et al.*, 2010). Por otro lado, el dominio de unión a ARN de NSP3 estructuralmente se forma de homodímeros que se acomodan de forma asimétrica formando una estructura parecida a un corazón, en la cual se encuentra un solo sitio de unión a los ARN (Deo *et al.*, 2002).

La porción intermedia de NSP3 se compone de los aminoácidos 150-206, y se ha caracterizado como el dominio que le permite a la proteína dimerizarse en el sistema de los dos híbridos en levadura (Piron *et al.*, 1999) (Fig. 3). De esta porción no se ha podido determinar la estructura tridimensional, sin embargo, contiene alfas hélices que posiblemente forman un “coiled-coil” (Becker, 2009). Y finalmente hacia su extremo carboxilo, del aminoácido 207-315, se encuentra un dominio de unión al factor de iniciación de la traducción eIF4GI, componente que funciona como andamio en el proceso de iniciación de la traducción celular (Groft & Burley, 2002; Vente *et al.*, 2000) (Fig. 3). Las funciones de NSP3 son análogas a las de PABP-C1, debido a que ambas son encargadas de unirse a los ARNm y a la proteína eIF4GI, y dichas uniones sirven como para circularizar los ARNm. Sin embargo, se ha podido determinar que aunque NSP3 y PABP-C1 se unen al mismo sitio de eIF4GI, la diferencia entre ellos dos radica en la afinidad que presentan por este sitio, teniendo una mayor afinidad NSP3 (10-50 nM NSP3/eIF4GI) que PABP-C1 (27 μ M de PABP/eIF4GI) (Becker, 2009). Por cristalografía, el dominio de unión a eIF4G presenta una estructura en forma de barra compuesto de 3 alfas hélices en forma de “coiled-coil” y hojas beta cortas hacia el extremo C-terminal (Groft & Burley, 2002). Los homodímeros del dominio de unión a eIF4GI se acoplan de forma simétrica, y presentan dos sitios idénticos de unión al factor de iniciación 4GI, uno por monómero, aunque de manera esquemática se describa a NSP3 como dímero que une solamente una molécula de eIF4GI (Becker, 2009; Groft & Burley, 2002).

DOMINIOS ALTERNOS DE NSP3

Nuevos estudios han podido determinar que dentro de la secuencia que compone a NSP3 existen otros dominios aparte de los descritos como principales y que le confieren a NSP3 la capacidad de poder interactuar con otras proteínas que posiblemente estén involucradas en su función para inhibir la traducción (Becker, 2009).

Una de estos dominios comprende una secuencia de aminoácidos que van del residuo 170 al 234, en donde interactúa con la proteína RoXaN (Rotavirus X-protein Associated to NSP3), una proteína celular que fue identificada a partir de su capacidad para interactuar con NSP3. Este dominio se traslapa con 36 aa del dominio de dimerización y 27 aa del dominio de unión a eIF4G (Becker, 2009). Aunado a este, se encuentra un segundo dominio localizado entre los aminoácidos 225-258 que están comprendidos dentro del dominio de unión a eIF4G y sirve para poder interactuar con la proteína HSP90, perteneciente a la familia de las chaperonas, implicada en diversos procesos celulares y requerida para la modificación conformacional de algunas proteínas (Dutta *et al.*, 2009) (Fig. 3).

No es totalmente claro cómo RoXaN y HSP90 interactúan con NSP3 durante la infección celular por rotavirus. Por un lado, los dominios de unión a estas proteínas se traslapan en un segmento de aproximadamente 9 aminoácidos, lo que supone que no ocurrirían interacciones simultáneas de RoXaN y HSP90 con un monómero de NSP3 debido a impedimento estérico. Alternativamente, podría haber cierto orden o temporalidad en relación a la interacción de NSP3 con las diversas proteínas en relación a las que se puede unir, como RoXaN y HSP90.

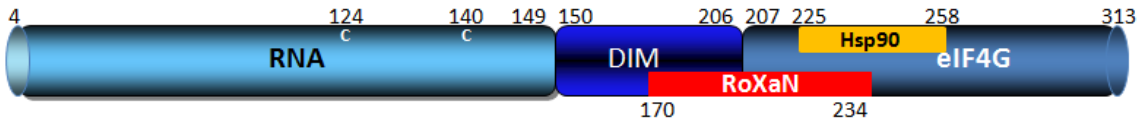


Fig. 3. Esquema representativo de la estructura de NSP3. Se ilustra la localización de los distintos dominios que presenta NSP3 (unión a RNAm de rotavirus (RNA), de dimerización (DIM), de unión a eIF4GI (eIF4G), de unión a RoXaN y de unión a HSP90).

PROTEÍNA RoXaN Y SU VÍNCULO CON NSP3

RoXaN como se mencionaba anteriormente, es una proteína celular que presenta tres dominios de interacción con proteínas o ácidos nucleicos. Hacia su extremo amino RoXaN presenta tres motivos de tetratricopéptido (TPR), los cuales pueden servir para interactuar con otras proteínas, y hacia su extremo carboxilo 5 motivos de dedos de zinc, que permitan la interacción con ácidos nucleicos, mientras que en su porción media presenta un dominio LD (LDxxLLxxL), a través del que interacciona con NSP3 en la porción correspondiente a la estructura coiled-coil (Vitour *et al.*, 2004). Considerando que NSP3 es dimérica, podría interactuar con dos moléculas de RoXaN. El dominio LD primero fue reportado en la proteína paxilina, el cual le permite a la proteína interactuar con componentes del citoesqueleto, además de que esta proteína es una de las pocas en las que se ha demostrado que es responsable de la localización de ARNs dentro de la célula (Woods *et al.*, 2002). Aunque la interacción de un dímero de NSP3 con dos moléculas de eIF4GI o RoXaN es posible, la demostración de que se pueda formar complejos tripartitos RoXaN-NSP3-eIF4GI favorece la hipótesis alternativa de que la naturaleza dimérica de NSP3 sirva para permitir la formación de complejos multiproteicos con una sola molécula tanto de RoXaN como de eIF4GI (Becker, 2009).

En células sin infectar no se ha podido determinar concretamente cual es el papel que juega RoXaN, sin embargo se ha podido observar su localización intracelular por inmunofluorescencia,

principalmente en el núcleo y minoritariamente en el citoplasma. En células infectadas por rotavirus la localización intracelular de RoXaN cambia, se transloca al citoplasma donde posiblemente es retenida por NSP3 (Harb *et al.*, 2008).

Otra propiedad que se ha asociado a RoXaN es su posible participación para localizar a PABP-C1 en el núcleo. En células no infectadas PABP-C1 se localiza principalmente en el citoplasma asociado a ARNm poliadenilados, participando en promover su traducción y estabilidad. Y aunque PABP-C1 no presenta secuencias de aminoácidos que le confieran la propiedad de poder ser transportado a través del núcleo hacia el citoplasma y viceversa, se sabe que es translocado del núcleo al citoplasma en asociación con ARNm poliadenilados junto con componentes celulares como paxilina (Becker, 2009; Harb *et al.*, 2008). El proceso por el que PABP-C1 es transportado de vuelta al núcleo no se conoce, aunque se piensa que podría ser en asociación con algún componente celular. Es en este punto en donde se ha propuesto la participación de RoXaN en la acumulación de PABP-C1 en el núcleo que ocurre en células infectadas por rotavirus, ya que RoXaN posee dominios de dedos de zinc que le permiten interactuar con PABP-C1, lo que propondría que la salida de PABP-C1 al citoplasma ocurre en asociación con RoXaN. Como además se piensa que RoXaN es retenida en el citoplasma por NSP3, la eliminación de un transportador nucleo-citoplasmático de PABP-C1 resultaría en acumulación de PABP-C1 en el núcleo (Harb *et al.*, 2008).

LA CHAPERONA HSP90 Y SU INTERACCIÓN CON NSP3

Las chaperonas son un grupo de proteínas que se inducen en condiciones de estrés celular, por lo que se denominaron como Heat Shock Protein (HSP) o proteínas de condiciones de estrés, algunas de las cuales facilitan la renaturalización de proteínas desnaturalizadas (Kéri, 2003; Liberek *et al.*, 2008). Este grupo de proteínas están ampliamente conservadas en la escala

filogenética, encontrándose incluso en arqueas, lo que hace evidente su importancia en procesos celulares (Kéri, 2003).

Algunas de las funciones generales que se les atribuyen a las chaperonas, son el poder unirse a otras proteínas y estabilizarlas para poder ayudar a que consigan su estructura conformacional correcta y funcional (Kéri, 2003; Liberek *et al.*, 2008). Ayudan a prevenir la agregación de complejos proteicos o intermediarios no funcionales, ayudan al transporte de proteínas a compartimentos celulares o hacia procesos de degradación, entre otros. Existen diversas familias de chaperonas que se clasifican por su función. Una de ellas son la familia de pequeñas HSP (ej. HSP27, HSP40) también llamadas co-chaperonas, y las principales familias HSP60, HSP70 o HSP90, las dos primeras encargadas de asistir el plegamiento de proteínas o el re-plegamiento, y la familia HSP90 se le ha atribuido funciones como estabilizadoras de proteínas sustrato, mantener estados activos o inactivos de proteínas, prevenir la agregación de proteínas al coleccionar proteínas “basura”, actuando así como un “barrendero” de la célula. Esta asistencia de proteínas involucra la utilización de energía, por lo que todas las chaperonas hidrolizan ATP para llevar a cabo sus funciones y este proceso modifica la estructura de las chaperonas. Sin embargo, la eficiencia de hidrolización de ATP es muy baja, por lo que la asistencia de plegamiento o re-plegamiento de las proteínas es un proceso que necesita suficiente tiempo para llevarse a cabo además de involucrar la participación de co-chaperonas (Kéri, 2003).

La chaperona de señalización más importante es HSP90. Es esencial para la viabilidad celular, además de que es una proteína muy abundante comprendiendo aproximadamente 1-2% del total de las proteínas celulares (Csermely *et al.*, 2007; Dutta *et al.*, 2009). Su función requiere necesariamente la participación de co-chaperonas y cofactores que regulan la participación de estas co-chaperonas. Se ha sugerido que algunas de estas uniones a proteínas son relevantes en la

modulación de rutas de señalización celular, aspectos por los cuales es considerada a HSP90 como un componente importante del control del ciclo celular, desarrollo del organismo y como respuesta a condiciones de estrés (Csermely *et al.*, 2007; Dutta *et al.*, 2009; Kéri, 2003). HSP90, a diferencia de otras chaperonas como HSP70, forma dímeros y posee tres dominios, uno hacia el N-terminal, responsable de la unión a ATP, otro en su porción intermedia el cual no ha sido bien descrito funcionalmente, y el tercero hacia el C-terminal, responsable de la homodimerización, además de presentar un motivo EEVD el cual le permite interactuar con proteínas que presenten α -hélices de dominios TRP (Csermely *et al.*, 2007; Kéri, 2003). Por otro lado, HSP90 una vez que está en su forma dimérica, puede cambiar su conformación al unirse a una proteína, lo que hace sugerir que al poder presentar varios sitios de unión a proteínas, su forma de interacción con sus sustratos es variable dependiendo de su estado estructural. El estudio de la importancia de esta proteína se ha podido abordar a través del uso de fármacos que suprimen su actividad, como es la Geldamicina que se une al sitio ubicado en el N-terminal lo que impide la unión de ATP, y por ende inactiva a la proteína, entre otros fármacos que se unen ya sea al extremo N-terminal como al C-terminal (Kéri, 2003).

Otra de las condiciones que inducen una respuesta de estrés y que por esto involucran la participación de chaperonas, es la infección por virus (Dutta *et al.*, 2009). Existen reportes de virus de las familias *Polyomaviridae* y *Closteroviridae* que codifican sus propias chaperonas (Dutta *et al.*, 2009). Mientras otros virus involucran la participación de HSP40 o HSP90 para su replicación. Se ha observado que HSP90 ayuda a la replicación viral a través de modular mecanismos de señalización celular, o al interactuar directamente con proteínas virales como en el caso de la transcriptasa reversa del virus de la hepatitis B (HBV), o el de la hepatitis C (Dutta *et al.*, 2009). Se ha observado que rotavirus necesita durante los estadios tempranos de

infección de la participación de HSP90 para su replicación. En células de riñón de mono transfectadas con el gen de NSP3 de rotavirus, HSP90 interactúa con los monómeros de NSP3 para que pueda formar dímeros y así madurar funcionalmente (Dutta *et al.*, 2009; Dutta *et al.*, 2011). Usando un derivado de la droga geldamicina (17DMAG), que es poco tóxico para las células, pero efectivo para inhabilitar la función de HSP90, se observó que NSP3 reduce considerablemente su expresión en presencia de la droga a diferencia de las otras proteínas virales analizadas. Se encontró también que la disminución de NSP3 en presencia de 17DMAG está asociada a una degradación por la vía del proteasoma, ya que un compuesto que inhibe el proteasoma (MG132), permite que se restablezca la expresión de NSP3 en células tratadas con 17DMAG (Dutta *et al.*, 2011). En cuanto a ensayos funcionales, al analizar la localización de PABP, proteína que es afectada en su localización por NSP3, se observó que en presencia de 17DMAG, PABP restablece la localización citoplasmática que presenta cuando no hay infección por rotavirus, indicando que HSP90 modula la función de NSP3. Para determinar si esta modulación ocurre de forma directa o indirecta, se coimmunoprecipitó a NSP3 con anticuerpos anti-HSP90 y se pudo observar la asociación directa entre estas proteínas. Posteriormente se determinó por medio de mutantes con diversas regiones truncadas de NSP3 y coimmunoprecipitación con HSP90, que la región mínima de interacción de NSP3 con HSP90 es entre los aminoácidos 225-258. Con el propósito de saber en qué estado estructural de NSP3 es que ocurre la unión con HSP90, la proteína viral que coimmunoprecipitó con la chaperona se analizó mediante un proceso no disociativo de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) que permite visualizar el estado oligomérico de NSP3. Este procedimiento se caracteriza por disminuir las concentraciones del detergente SDS presentes en el amortiguador de carga, además de que durante el procedimiento de tratamiento de la proteína no se somete a

calentamiento sino en su lugar se deja la muestra con buffer de carga durante 30 minutos a 4°C. Una vez cumplido el tiempo, la muestra se corre en geles de SDS-PAGE, de la manera habitual, excepto por realizarse a 4°C. Este procedimiento permite a proteínas diméricas con interacciones muy fuertes entre los monómeros permanecer en su estado dimérico ya que las condiciones de desnaturalización son lo suficientemente débiles para mantener dicho estado para poder ser analizado por el método mencionado. De los resultados obtenidos de este procedimiento, se observó que la forma monomérica es la que interactúa con la proteína HSP90, y que HSP90 participa para hacer madurar a la proteína y transformarla de forma monomérica a dimerica, ya que al incluir el inhibidor 17DMAG, revelando por medio de Western blot no disociativo se observa que la proteína es monomérica, mientras que en ausencia del inhibidor, se forma la proteína dimérica con un retraso de 30 minutos *in vitro* para su aparición. Este estudio muestra la relevancia que presenta HSP90 para promover la maduración de NSP3 necesaria para la relocalización de PAPB al núcleo, y que si dicho proceso de maduración no se lleva a cabo, la proteína es procesada a degradación por el proteasoma. Es de interés hacer énfasis en que al menos *in vitro*, la chaperona HSP90 “tarda” al menos 30 minutos para que comiencen a aparecer las formas diméricas de NSP3 (Dutta *et al.*, 2011).

MODELO DE INHIBICION DE LA TRADUCCION POR INTERFERENCIA DE NSP3 CON LA CIRCULARIZACION DE ARNm POLIADENILADOS

NSP3 ha sido descrita de manera general como la proteína encargada de inhibir la traducción de los RNAm poliadenilados, como consecuencia de su interacción con eIF4GI que resulta en el desplazamiento de la interacción entre eIF4GI con la proteína PABP-C1, que a su vez interacciona con la cola de poli-A de los ARN celulares. Se piensa que los ARNm poliadenilados se linearizan al perder el eslabón que permitía su circularización, afectando así su competencia para ser traducidos (Becker, 2009; Vente *et al.*, 2000) (Fig. 4).

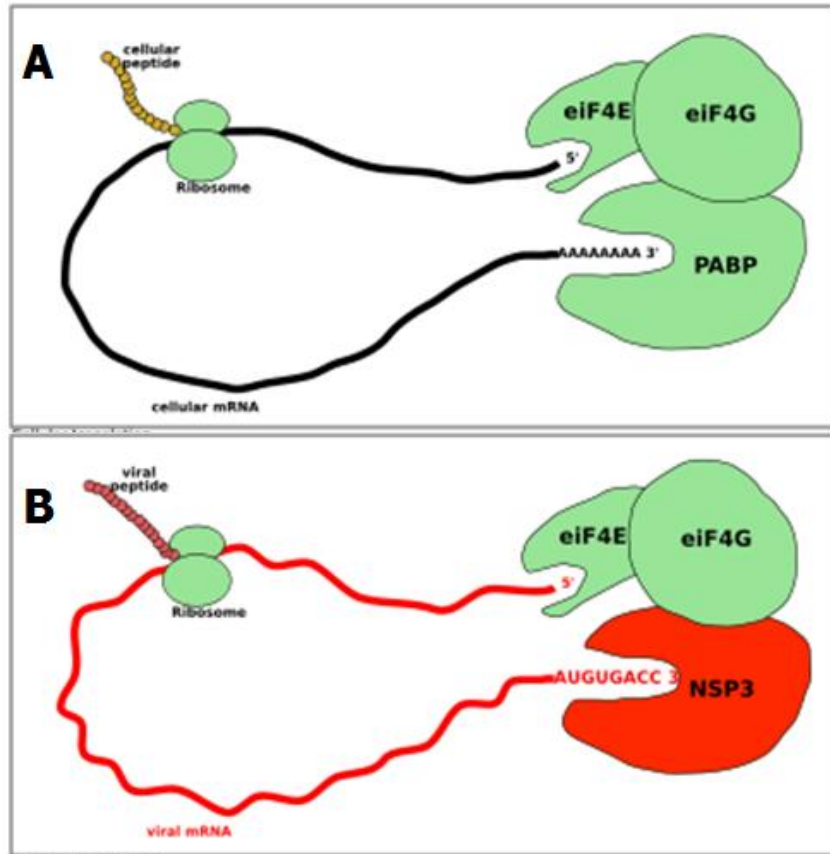


Fig. 4. Modelos de traducción celular y de rotavirus. A) Modelo por el cual se promueve la traducción de ARNm celulares al ser circularizados e interaccionar con los factores de iniciación 4E, 4GI y PABP. B) Modelo por el cual se propone que se inhibe la traducción celular al secuestrar a eIF4GI y circularizar los ARNm de rotavirus para traducirlos.

Esta hipótesis supone que la circularización de ARNm poliadenilados es esencial para formar el complejo de iniciación de la traducción conjuntamente con la subunidad ribosomal pequeña (40S), para posteriormente acoplarse a la subunidad mayor y formar el ribosoma competente en traducción (80S) (Becker, 2009). Se han descrito 13 factores principales de iniciación de traducción en células de mamífero, más algunos otros llamados factores auxiliares. El proceso comienza con los factores eIF3, eIF1A y eIF1 al unirse a las subunidad pequeña ribosomal 40S impidiendo su re-asociación con la subunidad 60S. Luego sigue la unión del complejo ternario a la subunidad 40S para formar el complejo ribosomal 43S junto con eIF5. El complejo ternario está formado por el factor eIF2, una molécula de GTP y un Metionil-ARNt de iniciación, siendo sólo funcional el factor eIF2 cuando haya podido intercambiar su molécula de GDP por una de GTP, proceso que lleva a cabo el factor eIF2B. Mientras tanto para poder llevar a cabo la circularización de los ARNm se necesita la intervención de 4 factores de iniciación y un factor auxiliar. Por un lado los ARNm que han sido procesados en el núcleo poseen en su extremo 5' una estructura llamada CAP la cual está compuesta de un nucleótido de guanina modificado (7-MetilGuanosina) unido a los ARNm por un enlace 5'-5' trifosfato. Y por el otro extremo 3' los mensajeros son poliadenilados (en promedio 200 nucleótidos de adenina). Ambas estructuras sirven para estabilizar a los ARNm y para que sean traducidos eficientemente. Esta cola de poli-A se une al factor auxiliar de la traducción PABP-C1, que previamente requiere ser translocado del núcleo al citoplasma. Una vez en el citoplasma el factor eIF4E se une al CAP del extremo 5' de los mensajeros, permitiendo que eIF4GI pueda circularizar los ARNm al unirse tanto al factor eIF4E por el extremo 5' y a PABP por el extremo 3'. Aunado a esto eIF4A es una helicasa encargada de relajar las estructuras secundarias de los ARNm, que también se une a eIF4GI para poder llevar a cabo su función. Este proceso es ayudado por los factores eIF4B y eIF4H que se

unen al complejo para que eIF4A pueda realizar su función más eficientemente. Los ARNm asociados con los diversos factores de iniciación se acoplan con la subunidad pequeña ribosomal, formando el complejo de iniciación 48S, mediante la interacción de eIF4GI con eIF3. Posteriormente se dará paso a la exploración del ARNm para reconocer la secuencia inicial de traducción (codón inicial), y una vez que se ha podido realizar eficientemente el reconocimiento, el factor eIF5 provoca la hidrólisis del GTP que está unido a eIF2 permitiendo la entrada de la subunidad 60S ribosomal que, con la ayuda del factor eIF5B permite la disociación de los demás factores del complejo 80S para que pueda empezar la traducción (Jackson *et al.*, 2010).

En cuanto a los ARNm de rotavirus, se ha propuesto que son circularizados y traducidos eficientemente en células infectadas. Como se había mencionado anteriormente, la proteína NSP3 es análoga del factor auxiliar PABP-C1. Ya que se une a la secuencia UGACC en el extremo 3' de los ARNm virales, además de unirse con una mayor afinidad que PABP-C1 a eIF4GI, impidiendo que PABP-C1 se una a eIF4GI dejando en forma linearizada o “abierta” a los mensajeros celulares, promoviendo la circularización y la traducción preferencial de los mensajeros virales, e inhibiendo por así la traducción celular (Becker, 2009) (Fig. 4).

FACTOR DE INICIACIÓN 4G.

Este proceso de circularización de los ARNm se ha propuesto que promueve la traducción sirviendo también para estabilizar y regular la expresión de los mensajeros, es por eso que los factores de iniciación (complejo eIF4F que comprende a los factores eIF4A, eIF4E y eIF4GI) involucrados en este proceso son considerados como blanco regulatorio del proceso de la traducción (Jackson *et al.*, 2010; von der Haar & McCarthy, 2002). Esta regulación puede suceder de tres formas, la primera a partir de una modificación covalente como es la fosforilación para los casos de eIF4E, en donde la cinasa Mnk1 puede regular su función de unirse al CAP de

los mensajeros, cuando es reclutada mediante eIF4GI. La segunda forma de regulación es por medio de los cambios en los niveles de proteína, en donde reportes de concentraciones elevadas tanto del factor eIF4GI como del factor eIF4E han revelado estar asociados con la formación de células cancerosas. La última forma de regulación es por medio de proteínas que funcionen de forma competitiva por la unión a estos factores de iniciación y secuestrarlos para regular su función como es el caso de las proteínas 4E-BP para unirse a eIF4E (von der Haar & McCarthy, 2002). Las 4E-BP son también blanco de regulación ya que sólo las formas hipofosforiladas se unen a eIF4E para inactivarla (von der Haar & McCarthy, 2002). Sin embargo, algunos aspectos cuantitativos de regulación no son generalmente abordados a fondo, como es el caso de los niveles de factores de iniciación durante la traducción. En la literatura existen muy pocos estudios acerca de la cuantificación de los factores de traducción, en relación a la cantidad de moléculas por célula. En un estudio en levadura, se cuantificaron por SDS-PAGE y Western blot, 10 de los factores de iniciación. Esta cuantificación reporta niveles de concentración muy variados, siendo dos de los que conforman el complejo eIF4F los que presentan los niveles de concentración más elevados (eIF4A con 700-900 mil moléculas y eIF4E con 320-360 mil moléculas) y la concentración más baja correspondiente a eIF4GI con 15-20 mil moléculas, además de mencionar que existe aproximadamente 200 mil ribosomas por célula (von der Haar & McCarthy, 2002). Un segundo estudio de cuantificación fue realizado en células de mamífero Hela por medio de Western blot, en donde sólo se analiza la cantidad de moléculas por célula de los factores que conforman el complejo eIF4F además de la de ribosomas, reportando valores muy distintos a los reportados en el estudio de levadura debido en parte a que las células de mamífero son más grandes. Para el caso de eIF4A se encontró por célula una concentración de 10 millones de moléculas, mientras que para el caso de eIF4E hubo 0.8 millones de moléculas y para

eIF4GI 2 millones de moléculas. Por otro lado la cantidad de ribosomas que se reporta es de 3.3 millones por célula (Duncan & Hershey, 1983; Duncan *et al.*, 1987). La diferencia más notable en estos estudios es que eIF4E es abundante en levadura y escaso en células de mamífero, siendo en levadura hasta 46 veces por arriba en relación al nivel de eIF4GI mientras que en células de mamífero su nivel es 2.5 veces inferior a eIF4GI. Aunque muchos de los aspectos de regulación no son del todo entendidos, cualquiera de estas dos relaciones debe ser abordada con mayor profundidad para determinar su relevancia funcional.

Tanto en levadura como en células de mamífero la concentración de eIF4GI es submolar en relación a la de ribosomas. Además, por su papel como proteína andamio y por ser la responsable de reclutar a la subunidad ribosomal menor a través de su interacción con eIF3, eIF4GI es uno de los blancos principales de regulación de la traducción. Y debido al papel central de eIF4GI en el inicio de la traducción, es que existe una regulación estricta de su concentración para poder mantener de forma equilibrada el estatus óptimo de la traducción celular (Prevot *et al.*, 2003; von der Haar & McCarthy, 2002).

eIF4GI pertenece a un grupo de proteínas de la familia de eIF4G, siendo algunas de ellas DAP5, eIF4GII y Paip1. Sin embargo eIF4GI es descrita como la proteína principal en el proceso de traducción dependiente de CAP (Prevot *et al.*, 2003). La síntesis de eIF4GI es prioritaria, ya que su ARNm posee una secuencia IRES (internal ribosome entry segment) que le permite ser traducida de manera preferencial, pudiendo acoplarse a la subunidad 43S sin la necesidad de si mismo y de otros factores de iniciación, a pesar de que la célula se encuentre bajo condiciones de estrés como puede ser durante una infección viral (Prevot *et al.*, 2003). Como se mencionó previamente, el nivel de expresión de eIF4GI en células de mamífero es de 2 millones de moléculas por célula, sin embargo la relevancia que puede tener cada una de las proteínas

pertenecientes a la familia eIF4G es aún incierta. Por un lado se ha visto que en ausencia de eIF4GI la participación de otras proteínas de la familia 4G es fundamental para la traducción y que los procesos por los cuales llevan a cabo dicha traducción pueden ser distintos al que comúnmente realiza eIF4GI (Prevot *et al.*, 2003; Ramirez-Valle *et al.*, 2008). eIF4GI presenta tres dominios funcionales en su estructura, hacia el extremo amino presenta el sitio de unión a la proteína eIF4E, mientras que en su porción media posee el dominio esencial para que la proteína sea funcional durante la traducción dependiente de CAP (Fan *et al.*, 2010). eIF4GI también presenta hacia el extremo carboxilo (sólo en los eucariontes superiores) el sitio descrito como modulador de la síntesis de proteínas además de unir a eIF4A y Mnk1 (Bellsollell *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2010). La importancia de eIF4GI en la traducción es también evidente por ser cortado en su extremo amino en infecciones con ciertos picornavirus, sin embargo el extremo carboxilo resultante es aun competente para la iniciación de la traducción de picornavirus, como con el virus de la poliomielitis que presenta un IRES en la región 5' de su ARNm (Prevot *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha observado que cuando se trata células inmortalizadas de linfocitos con IgM anti-Fas, para producir una señal de apoptosis, se proteolisa rápidamente a eIF4GI, afectándose considerablemente la traducción celular, siendo aproximadamente de un 65% la inhibición (Morley *et al.*, 1998). Los dominios funcionales pueden variar en las otras proteínas pertenecientes a la familia 4G, haciendo a cada una posiblemente diferente en el proceso de traducción (Fan *et al.*, 2010; Prevot *et al.*, 2003; Ramirez-Valle *et al.*, 2008). Uno de estos casos es el de la proteína DAP5 (Death-Associated Protein 5), la cual presenta una alta homología funcional con eIF4G aunque poseen una baja identidad (27%), siendo una de sus diferencias la carencia de la región amino terminal de eIF4GI la cual significa la ausencia de unión con las proteínas eIF4E y PABP, hecho por el cual se le asocia a DAP5 con una traducción independiente

de CAP (Fan *et al.*, 2010; Liberman *et al.*, 2009). En relación a Paip1, su función no se ha estudiado a fondo aunque se sabe que ayuda a realizar la traducción más eficientemente junto con eIF4GI y que en su ausencia la traducción celular no se ve afectada (Ramirez-Valle *et al.*, 2008). Por otro lado, eIF4GII, de la cual no se tiene bien descritas sus funciones, se sabe que posee los mismos dominios funcionales que eIF4GI y una identidad en secuencia de aminoácidos del 46%. Sin embargo, la abundancia de cada una de estas dos proteínas es muy distinta, siendo eIF4GI la que predomina en células de mamífero, reportándose concentraciones de >85% del total en conjunto con eIF4GII (Bovee *et al.*, 1998). Aunado a estos datos, a partir de estudios en donde se elimina la expresión tanto de eIF4GI como de eIF4GII, se observa la total inhibición de la traducción celular provocando posteriormente la muerte de las células (Prevot *et al.*, 2003).

MODELO ALTERNO DE INHIBICION DE LA TRADUCCIÓN CELULAR POR eIF4GI

Además de la regulación traduccional que NSP3 realiza mediante su interacción con eIF4GI existen modelos alternos de inhibición de la traducción celular y promoción de la traducción de proteínas virales en células infectadas con rotavirus.

- **Modelo de inhibición de la traducción por medio de RoXaN en presencia de NSP3**

De acuerdo a la evidencia que se mencionó anteriormente acerca de RoXaN, normalmente esta proteína tiene una relocalización que va del citoplasma al núcleo, pero en el balance es principalmente nuclear, y se sugiere que puede interaccionar con los ARN poliadenilados para llevarlos del núcleo al citoplasma una vez que estos han sido procesados y unidos en su extremo 3' a la proteína PABP. Sin embargo en presencia de NSP3 a causa de una infección por rotavirus, RoXaN se relocaliza ubicándose principalmente en el citoplasma, por lo que se sugiere que

RoXaN al unirse a NSP3 es secuestrado en el citoplasma, lo que impediría que se transloque al núcleo y que por consiguiente pueda interactuar con los ARNm y transportarlos del núcleo al citoplasma, resultando en la acumulación de PABP en el núcleo, este proceso redundaría en la inhibición de la traducción celular al no haber PABP en el citoplasma (Harb *et al.*, 2008).

ESTEQUIOMETRÍA DE LA INTERACCIÓN ENTRE NSP3 Y eIF4GI

A pesar del papel fundamental que tiene eIF4GI en la traducción, sólo se ha podido cristalizar la porción intermedia y carboxilo terminal, correspondientes a dominios de unión a factores como eIF4A, eIF3 o MNK1. Por otro lado, por medio de otras metodologías de dispersión de rayos X como es SAXS, la cual permite evaluar patrones de dispersión de rayos X para obtener información acerca de su estructura de nanopartículas, se ha podido modelar uno de los segmentos más largos hasta el momento de la proteína, que corresponde a los residuos 712 a 1451 siendo el total de residuos de la proteína de 1600, que corresponde del segmento intermedio hasta casi la totalidad del carboxilo terminal, y donde se encuentran los dominios de unión a eIF4A y eIF3. Estos análisis revelaron que eIF4GI se arregla espacialmente formando una estructura alargada en forma de “L” y que ocupa un área grande de interacción con el complejo ribosomal 40S en comparación con los demás factores de iniciación involucrados. Es importante señalar que por esta metodología, la masa del complejo formado hace proponer que eIF4GI se asocia de forma monomérica con la subunidad ribosomal 40S (Nielsen *et al.*, 2011) (Fig. 5).

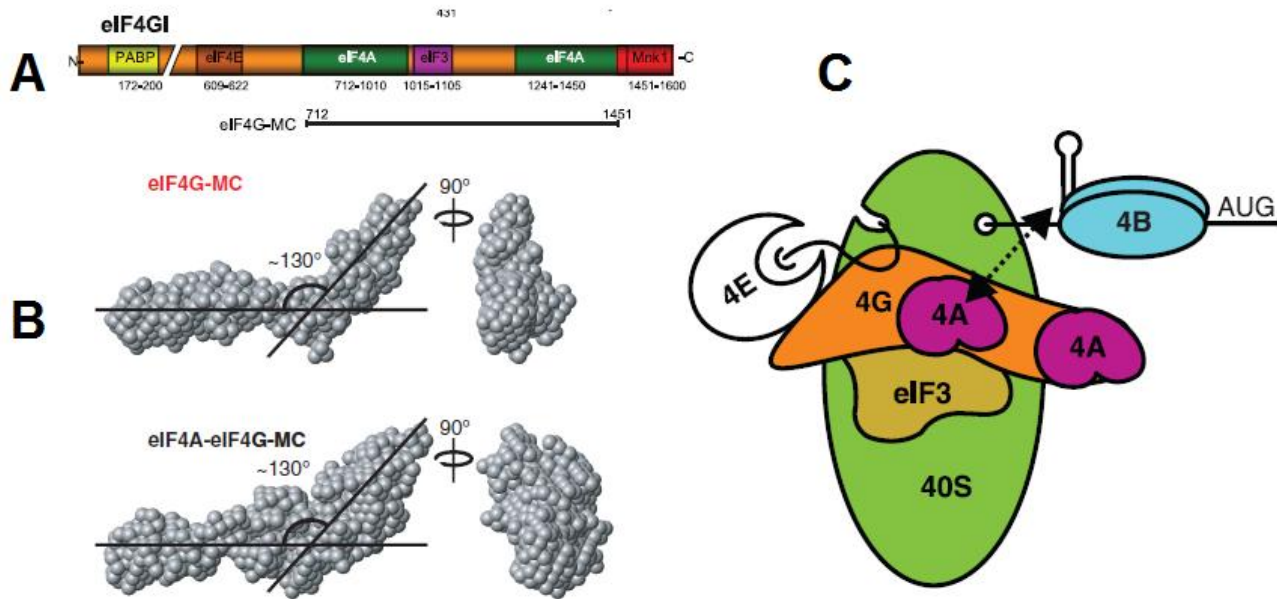


Fig 5. Modelos de la estructura de eIF4G propuestos por Nielsen *et al.* 2011. A) Esquema representativo de los dominios que presenta eIF4GI y entre que residuos se ubica cada uno, en la línea negra se muestra la secuencia que se utilizó durante ese estudio. B) Modelo obtenido por SAXS en donde se muestra la posible estructura en forma de “L” que presenta eIF4G-MC sola y en su unión con eIF4A. C) Modelo del complejo ribosomal 43S y su posible interacción transitoria de eIF4GI con dos moléculas de eIF4A.

Por otro lado por medio de ensayos de calorimetría (ITC) en donde se analizó la interacción y unión de eIF4GI en forma de complejos proteicos con algunos de los factores de iniciación con los que participa durante la traducción celular (eIF4E y eIF4A), se pudo determinar que la unión con cada uno de esos blancos, por separado, presenta una relación estequiométrica 1:1, (Marcotrigiano *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2011). En conjunto, los datos anteriores y los modelos de la función de eIF4GI en la traducción (Sonenberg *et al.*, 2001) coinciden en presentar a eIF4GI como una proteína que cumple su función en forma de monómero.

En contraste, los datos obtenidos de la estructura tridimensional del extremo carboxilo de NSP3 indican que existen dos sitios de unión a eIF4GI (Beckker, 2009), por lo que la estequiometría NSP3:eIF4GI podría ser 2:1 o 1:1. De manera esquemática, se ha propuesto que para poder circularizar rotavirus sus mensajeros, sólo necesitaría de unirse a una molécula de eIF4G, de

manera homóloga a la circularización de los mensajeros celulares, en cuyo caso la estequiometría NSP3:eIF4GI sería de 2:1. Esta propuesta permite considerar la posibilidad de que los complejos tripartitos eIF4GI-NSP3-RoXaN sean la forma en la que NSP3 pueda inhibir de la traducción, ya que al traslaparse el dominio de unión a eIF4GI con el de unión a RoXaN, es difícil de imaginar que un solo monómero de NSP3 pueda interaccionar simultáneamente con ambas proteínas celulares RoXaN y eIF4GI. Por estas consideraciones, proponemos que la estequiometría *in vivo* entre NSP3 y eIF4GI es 2:1.

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Padilla-Noriega (2002) usó un sistema de expresión vaccinia recombinante, para analizar el nivel de expresión de la proteína NSP3 al ser inducida con IPTG, y el nivel de inhibición de la traducción celular. Usando este sistema con mutantes de NSP3, con deleciones en los tres dominios principales de NSP3, se observó que tanto el dominio de unión a eIF4GI como el de dimerización son esenciales para la función inhibitoria de la traducción de NSP3.

Estos estudios ayudan a entender de mejor forma, la relevancia e importancia de los dominios funcionales de NSP3, aunque la nueva información de la participación de la proteína RoXaN en complejos ternarios con NSP3 y eIF4GI, así como la participación de HSP90 para poder dimerizar a NSP3, hacen necesario realizar estudios que permitan integrar de forma congruente todos los aspectos que influyen en la función de NSP3, uno de ellos es la relación estequiometrica NSP3:eIF4GI en estudios *in vivo*.

Objetivo

Determinar de forma cuantitativa, en un sistema autorregulado de expresión, la cantidad de NSP3 de rotavirus y su correlación estequiométrica con el factor constitutivo de iniciación de la traducción eIF4GI.

Hipótesis

- La concentración molecular de NSP3 presente en la célula corresponderá a una estequiometría 2:1 con el factor eIF4GI en la condición autorregulada de máxima inhibición de la traducción.

Metas

1. Montar un ensayo de Western blot cuantitativo para NSP3 de rotavirus expresada en un sistema del virus vaccinia recombinante.
2. Determinar la magnitud del efecto inhibitorio de la traducción celular y viral causada por NSP3, cuantificado por marcaje metabólico.
3. Determinar la estequiometría NSP3:eIF4GI en la condición de máxima inhibición de la traducción, correlacionando la cantidad absoluta de NSP3 con la cantidad absoluta de eIF4GI reportada en células de mamífero.
4. Determinar el estado oligomérico funcional de NSP3 para poder inhibir la traducción celular por medio de Western Blot No Disociativo.

Metodología

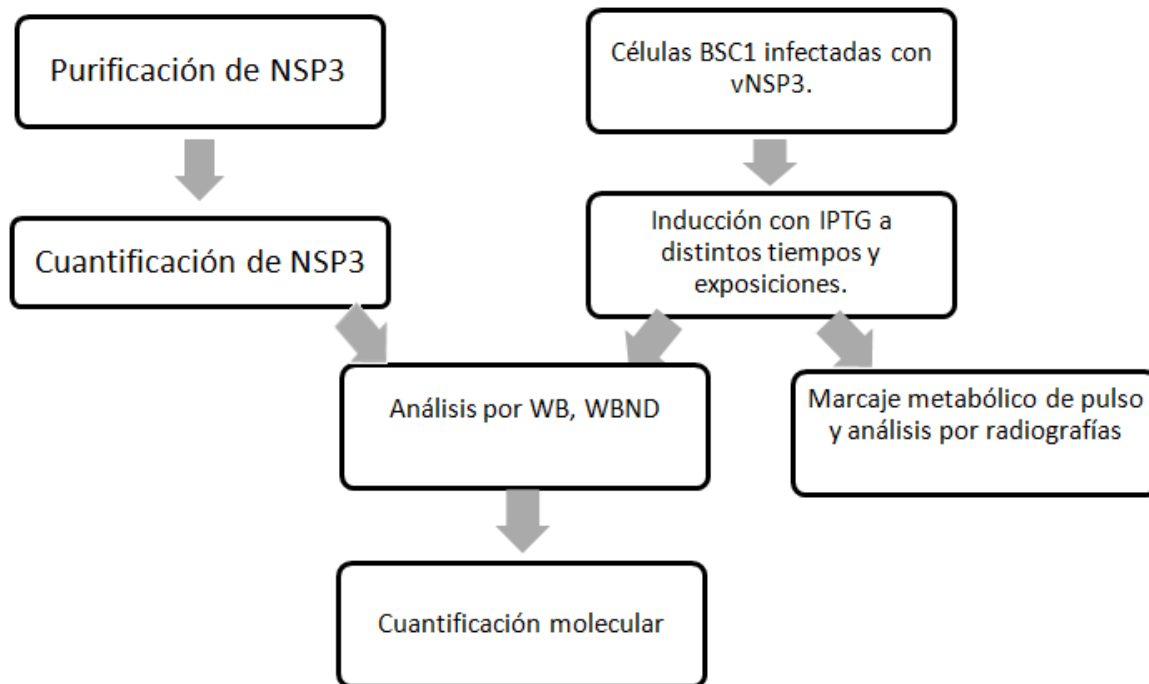


Fig. 6. Diagrama general de la metodología seguida durante la realización del proyecto. Wester blot (WB), Western blot no disociativo (WBND)

Producción de NSP3 pura

Se produjo NSP3 del rotavirus SA11 en *E.coli* BL21 (DE3) transfectadas con el plásmido pET28-NSP3. La proteína NSP3 recombinante contiene una cola de histidinas en su extremo carboxilo para poder ser purificada por una columna de afinidad de Ni-agarosa. Se indujo un cultivo de bacterias con isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) 1 mM durante 5 h. La pastilla de *E.coli* inducidas se congeló y se descongeló, resuspendiendo en amortiguador de sonicación (PBS A; Aprotinina 2 mg/ml; Leupeptina 1 mg/ml; PMSF 0.5M, la cual es una mezcla de inhibidores de proteasas para prevenir la degradación de la proteína de interés). Se sonicaron las células en copa 10 segundos a una amplitud de 60 y se centrifugaron a 10,000xg por 20 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las pastillas en 1 ml de amortiguador A (8 M urea, 0.1 M

NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl; pH 8) + imidazol 5 mM + inhibidores de proteasas (PMSF 2 µl/ml; Aprotinina 1 µl/ml; Leupeptina 0.46 µl/ml; Cocktail SIGMA 8340 10 µl/ml) a 4°C. Se incubaron las muestras durante 14 h con agitación a 4°C. Después de transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron las muestras a 10,000xg durante 20 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante (se agregaron inhibidores de proteasas (PMSF 2 µl/ml, Aprotinina 1 µl/ml, Leupeptina 0.46 µl/ml) al sobrenadante y se guardaron a -70°C) y se lavaron las pastillas con 50 µl de PBS A 1X. Por otro lado en este punto se puso a equilibrar la resina de Ni-agarosa con amortiguador B (8 M urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl; pH 6.5) + imidazol 20 mM en una relación 1:1 con la resina, durante 1 hora a TA. Una vez equilibrada la resina se agregó 1 ml de Ni-agarosa 50% a 4 ml del lisado celular y se incubó por 1 h a TA con agitación (200 rpm). Posteriormente se centrifugaron las muestras con la resina a 15,000xg por 1 minuto a TA. Se retiró el sobrenadante y se lavó la resina con 1 ml de amortiguador B + imidazol 5 mM. Se mezcló la suspensión por 5 minutos a TA y se volvió a centrifugar a 15,000xg por 1 minuto. Se volvió a retirar el sobrenadante y se lavó por segunda vez con amortiguador B + imidazol, centrifugando de la misma forma que la primera vez. Se retiró el sobrenadante y se eluyó la proteína 3 veces con 2000 µl de amortiguador C (8 M urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl, 400 mM imidazol; pH 8). Para llevar a cabo cada elusión, se mezcló la muestra con el amortiguador durante 5 minutos, se centrifugó a 15,000xg y se recuperó el sobrenadante que corresponde al eluato. Se dializó la proteína recuperada (6ml) con 1.2 L de amortiguador de diálisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl) durante toda la noche a 4°C. Se repitió este paso dos veces más con tiempos de 3 horas entre cada diálisis. Finalmente la proteína se concentró por tubos Amicon Ultra 4 (Millipore) filtrando el sobrenadante por centrifugación a 4,760 rpm a 4°C.

Determinación de la pureza de NSP3 por SDS-PAGE y tinción con Azul de Coomassie.

La determinación de la pureza de NSP3 se realizó por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida–SDS (SDS-PAGE) y se corrieron a 9 mA durante 20 horas. Se pusieron dos distintas concentraciones de la proteína pura, una de ellas saturada (100 µl) y la otra 5 veces menos (20 µl) con el fin de poder observar la presencia de otras posibles proteínas en la muestra saturada. Además se corrieron un grupo de muestras de Albumina bovina (BSA) a distintas concentraciones que sirvieran para poder hacer un primer acercamiento a la determinación de la concentración de NSP3 pura. El gel se tiñó con azul de Coomassie y se determinó por densitometría, la pureza de la proteína con el programa ImageJ, en comparación con el valor densitométrico de todo el carril analizado.

Cuantificación de NSP3 por medio SDS PAGE y tinción con Sypro Red.

Para la cuantificación de la proteína NSP3 se realizaron ensayos de electroforesis SDS-PAGE. Los geles de poliacrilamida se prepararon al 12% y se corrieron a 9 mA durante 20 horas. Para poder determinar la concentración de la proteína purificada de NSP3 se hicieron distintas diluciones de BSA ya sea 10 mg/ml, pesada en el laboratorio, a partir de la que se hicieron 5 diluciones (10,000-500 ng), o a partir de un “stock” de New England BioLabs con una concentración de 10 mg/ml, preparando tres diluciones a partir de este stock comercial (10,000-2500 ng). De la proteína NSP3 pura se corrieron 4 muestras con 15 µl en cada carril. Se tomaron 2 viales distintos, para la determinación de cada uno se preparó una muestra sin diluir y una segunda diluida 1:10. Las muestras concentradas de la proteína pura de NSP3 se ajustaron añadiéndoles SDS 0.1% (concentración final), 10% de inhibidores de proteasa (SIGMA 8340), y 0.2 mg/ml de albumina (concentración final) con el propósito de mantener a la proteína soluble y evitar su degradación.

El gel se tiñó durante una hora con el colorante Sypro Red (Molecular probes) el cual se preparó en ese mismo momento, diluyendo 100 µl del colorante en 500 ml de ácido acético al 7.5%, cubriendo de la luz durante la incubación del gel con el colorante. Pasada la hora de tinción se dio un lavado con ácido acético al 7.5% durante un minuto para remover el exceso del colorante. Las bandas de interés se monitorearon en un transiluminador de UV. La imagen obtenida se analizó con el programa ImageJ por comparando con los valores densitométricos de las bandas de la curva estándar de BSA, y a partir de la curva estándar se extrapoló la concentración de la proteína NSP3 pura.

Expresión de la proteína NSP3 en el sistema de vaccinia recombinante.

Para la expresión de NSP3 del rotavirus RRV se usó el virus vaccinia vRRV7, denominado en este trabajo como vNSP3, que permite la expresión inducible de la proteína en células de mamífero infectadas con el virus (Padilla-Noriega *et al.*, 2002). Este sistema de expresión ha sido denominado VOTE (virus Vaccinia Operón Lac, ARN polimerasa T7, IRES del virus de la Encefalomielitis) (Ward *et al.*, 1995). En este sistema el gen *lacI* de *E.coli* se transcribe a partir de un promotor temprano/tardío del virus vaccinia, que permite la síntesis continua del represor del operón de lactosa. Este represor se une a dos operadores, uno para regular la función del promotor de la polimerasa T7 y el segundo que se encuentra adosado al gen de NSP3 y también regula su expresión. En presencia del inductor IPTG el represor se inactiva al disociarse, impidiendo que se una a sus dos operadores. Esto permite que el promotor temprano/tardío de vaccinia transcriba el mensajero de la polimerasa T7 para que una vez traducido, pueda transcribir el gen de NSP3. Este gen contiene en este sistema por una secuencia IRES del virus de la Encefalomiocarditis que le permite al gen ser traducido preferentemente. Este sistema utiliza doble control de expresión para reducir el nivel de expresión basal en condiciones de no

inducción. Es de interés hacer notar que los ARNm del virus de vaccinia tienen CAP y son poliadenilados, por lo que al igual que los ARNm celulares, su traducción es inhibida por NSP3. Además, este sistema constituye un “loop” regulatorio ya que la expresión de NSP3 depende de la RNA polimerasa T7, cuyo ARNm tiene CAP y es poliadenilado, por lo que NSP3 deberá inhibir su traducción, y en segunda instancia inhibirá la expresión de NSP3, cuyo gene cesará de ser transcrito por la ARN polimerasa T7. Así NSP3 autoregula su expresión.

Cuantificación del nivel de expresión de NSP3 y su efecto inhibitorio sobre la traducción.

Se sembraron en placas de 6 pozos 5×10^5 células BSC1 de riñón de mono verde (*Chlorocebus sabaeus*) por pozo con medio MEM-7 (medio mínimo esencia de Eagle adicionado con 7% de suero fetal de bovino (SFB)), se incubaron 24 h. a 37°C, 5% de CO₂ hasta que llegaron a confluencia (9.5×10^5 cels).

Pasadas las 24 horas se activó el virus vNSP3 para lograr una MOI de 10. El virus se incubó 30 min a 37°C en presencia de tripsina, posteriormente se sonicó en copa durante 20 segundos/3 veces a una amplitud de 60. Una vez preparado el inóculo, se retiró el medio de las células y se añadió a cada pozo 400 µl de MEM-2.5 (MEM conteniendo 2.5% de SFB) más 100 µl del virus activado permitiéndose la adsorción durante dos horas y mezclando cada 10 minutos durante la primera hora. Luego se añadió 500 µl de MEM-2.5 por pozo. Pasada la segunda hora se retiró el medio con el virus y se añadió 1.5 ml de MEM-2.5.

Para cuantificar el nivel de expresión de NSP3 y su efecto inhibitorio sobre la traducción, las células BSC1 infectadas con vNSP3 se indujeron con IPTG 0.002-2 mM al tiempo indicado. Se incubó a 37°C en presencia de IPTG hasta el momento de la cosecha o se retiró el IPTG al tiempo indicado antes de la cosecha. Para retirar el IPTG se lavó 3 veces con MEM-2.5 asegurando así que no queden residuos de IPTG en el medio. Para realizar el marcaje metabólico

de proteínas, se sometió a las células a ayuno lavando dos veces con 1 ml de DMEM Met⁻ Cist⁻ y se añadió 300 µl de DMEM Met⁻ Cist⁻ por 20 minutos a 37°C. Posteriormente las células que se marcaron radioactivamente añadiendo 30 µCi de [³⁵S] Met y [³⁵S] Cist por pozo durante una hora, con mezclado cada 10 minutos. Al concluir el marcaje metabólico se cosecharon las células a 4°C, retirando el medio y añadiendo 1 ml de PBS frío, se desprendieron las células con gendarme y se hicieron dos alícuotas por pozo, se centrifugaron las células en frío para concentrarlas, y se congelaron en seco a -20°C.

Para el caso de las células que fueron analizadas por Western blot, las células se trataron de la misma forma que para el caso de las células con marca radioactiva, pero en lugar de poner marca radioactiva después del ayuno, se añadió 45 µl de MEM s/suero por pozo, incubándolas y cosechándolas de la misma forma que se mencionó anteriormente.

Las muestras congeladas se procesaron para ser analizadas por SDS-PAGE y autoradiografía en el caso del marcaje metabólico o por Western blot para el análisis cuantitativo de NSP3. Se procesaron células correspondientes a medio pozo (4.75×10^5 cels.) por carril de gel en el caso del análisis de células marcadas radioactivamente o 1/8 de pozo (1.18×10^3 cels.) para el análisis por Western blot. Las células se lisaron en presencia de inhibidores de proteasas y DNAsa (134 µl de Buffer TM (Tris 50 mM, MgCl₂ 5 mM, pH7.5), DNAsa 133 U/ml, RNAsa 100 u/ml, 5.38 µl de Inhibidores de proteasas Sigma 8340 y 363.7µl de H₂O), mezclando para solubilizar la pastilla de células. Posteriormente se sonicaron en copa durante 20 segundos/3 veces. Se añadió a cada uno buffer de carga Laemmli 1:1 y se hirvieron por 5 min a 90°C. Las muestras se corrieron por SDS-PAGE al 12% de poliacrilamida, grosor de 0.75 mm a 9 mA, durante 20 horas.

Los geles correspondientes al marcaje metabólico se fijaron con Metanol/Ac. Acético/H₂O 40:10:50 durante 30 minutos y luego se lavaron durante 30 minutos con H₂O. Se secaron y se

revelaron en el escaneador para detectar radioisótopos (también conocido como phosphorimager) Molecular, Imager FX System (Bio Rad). Las imágenes obtenidas se analizaron por densitometría con el programa ImageJ y se determinó el nivel de inhibición a causa de la infección por vNSP3, tomando como control el valor densitométrico obtenido por células infectadas sólo con el vector vaccinia vT7lacOI sin expresar a NSP3.

Los geles correspondientes para análisis por Western blot se transfirieron a membranas de Polivinildenedifloride (PVDF) durante 45 minutos a 150 mA en una cámara de electrotransferencia semiseca (Hoeffer). Posteriormente se bloquearon las membranas con 5% de leche baja en grasa en buffer TTBS por 4 h o durante toda la noche. Una vez bloqueadas se incubaron con el anticuerpo primario anti-NSP3 a una dilución 1:20,000 en TTBS durante 2 horas o toda la noche. Se lavaron 3 veces con TTBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de rata (conjugado a peroxidasa de rábano) 1:20,000 en TTBS durante 1 hora. Las membranas se revelaron en placas radiográficas para quimioluminiscencia (Kodak Film: KDK X-OMAT LS FLM 13 x 18).

Las membranas fueron tratadas por “striping” para la remoción de los anticuerpos y utilizarlas para la determinación de controles de carga de la proteína gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), la cual es una proteína codificada por un gene constitutivo. Estos genes son requeridos para mantener de manera óptima la funcionalidad de la célula, por lo que su expresión no varía en la célula, siendo un factor conveniente para controlar la cantidad de células corridas en un gel. La dilución utilizada para el WB de anti-GAPDH fue de 1:16,000.

Una vez obtenidas las radiografías, se analizaron por densitometría para la cuantificación de cantidad de moléculas por célula de NSP3. El valor densitométrico de NSP3 se comparó con los valores densitométricos de la proteína pura (de la cual sabemos la cantidad en fg corrida por gel),

obteniendo así fg de NSP3 por las 4.75×10^5 células, lo que permite conocer los fg/cel de NSP3. A partir de este valor se determina la cantidad absoluta de moléculas de NSP3, tomando el valor correspondiente al peso molecular de NSP3 que es equivalente a una mol (y tomando el peso molecular de NSP3 en unidades de fg, o sea de 3.6×10^{19} fg), lo que nos permite derivar en base al número de moléculas por mol ($6.02214179 \times 10^{23}$ descrito por Avogadro) la cantidad de moléculas de NSP3/célula.

Análisis de la aparición de dímeros de NSP3 por medio de Western Blot No Disociativo (WBND)

Una de las alícuotas de las muestras de células congeladas de células BSC1 infectadas con vNSP3, obtenidas para el análisis por WB cuantitativo, se analizaron para la determinación de dímeros a partir de la metodología descrita a continuación.

Los antecedentes acerca de la determinación del estado oligomérico de NSP3 son interesantes, en el sentido de que NSP3 parece ser una proteína dimérica no convencional con interacciones entre monómeros muy difíciles de disociar.

Por un lado en un estudio realizado por el grupo de la doctora Mattion (Aponte *et al.*, 1993), describe que en ausencia de β -Mercaptoetanol en el amortiguador de carga Laemmli las muestras de NSP3 corridas en geles de poliacrilamida-SDS y analizadas por WB indican que el peso molecular correspondiente a NSP3 de 34 kDa cambia a dos bandas de pesos moleculares de 70 y 100 kDa, lo que confirmaba reportes anteriores de que NSP3 podría oligomerizarse a través de puentes disulfuro a causa de cisteínas conservadas que posee en su secuencia aminoácidos.

Por otro lado, el grupo de Dutta en un estudio acerca de la participación de la chaperona HSP90 en la funcionalidad de NSP3 (Dutta *et al.*, 2011), montó una metodología que permite la

visualización de NSP3 dimérica por Western blot (denominada como Western blot No Disociativo). En esta técnica las muestras se procesan con una variación del amortiguador de carga Laemmli, disminuyendo la concentración de SDS, además las muestras se incuban a 4°C durante 30 minutos, en lugar de hervirse, justo antes de correrse por SDS-PAGE a 4°C. Estas condiciones permiten visualizar una banda de 70 kDa que corresponde a la forma dimérica de NSP3.

Tomando en cuenta estas dos únicas técnicas descritas para el análisis de la forma dimérica de NSP3, se implementó la metodología de Dutta et al. en el laboratorio para optimizar la visualización de la forma dimérica de NSP3 estudiada bajo nuestras condiciones experimentales. Por lo que las muestras de células BSC1 infectadas con vNSP3 expresada con IPTG en las distintas condiciones de estudio, se trataron con una concentración menor de SDS (0.5-2%) presente en el amortiguador de cargado Laemmli, además de no contener β -Mercaptoetanol. Posteriormente las muestras se dejaron incubando durante 30 minutos a 4°C y se corrieron por SDS-PAGE a 4°C para posteriormente realizar el Western blot rutinario descrito anteriormente.

Resultados

Se produjo en *E.coli* la proteína NSP3 del rotavirus SA11, con una cola de histidinas en el extremo carboxilo y se purificó por afinidad a una resina de Niquel-agarosa en condiciones desnaturalizantes (Máximo Santiago Méndez, 2010, tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México). Se determinó la pureza de NSP3 por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, que por análisis densitométrico es del 90% (Fig. 7). En experimentos de SDS-PAGE al 12% de NSP3 pura se notó que la cantidad de proteína parecía ser variable. Esta heterogeneidad aparentemente se debe a que parte de la proteína pura es parcialmente insoluble, ya que en el proceso de diálisis se observó un precipitado opalescente en mínima cantidad. Para resolver esto se añadió SDS [0.0034M] como agente solubilizante debido a que ya se ha reportado en la literatura que sirve para solubilizar proteínas (Man *et al.*, 2006) además de que NSP3 presenta puentes disulfuro que le impiden ser desnaturalizada facilmente (Aponte *et al.*, 1993) y se añadió albúmina bovina (BSA 0.2 mg/ml) como agente estabilizador.

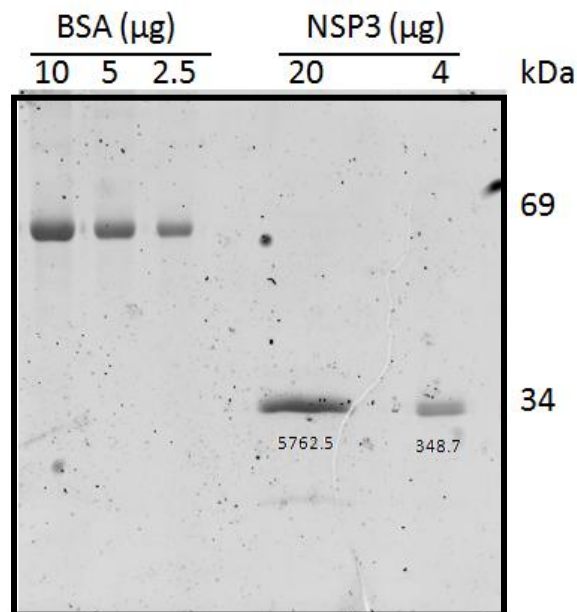


Fig. 7. Determinación de la pureza de NSP3 por medio de azul de Coomassie. Gel de poliacrilamida-SDS al 12% en el que se corrieron distintas cantidades de albumina (BSA que sirvió para hacer una primera determinación de la cantidad de proteína de NSP3), y dos muestra de concentración de NSP3 purificada. El gel se tiñó con azul de Coomassie y se determinó la pureza por de densitometría. En la imagen se muestra el valor densitométrico de las bandas de NSP3.

Cuantificación de NSP3 por medio de SDS-PAGE y tinción con SyproRed

La concentración de NSP3 pura se cuantificó por SDS-PAGE y tinción con Syprored (Fig. 8A).

Los resultados densitométricos de curvas estándar de BSA y las diluciones de NSP3 señalaron que la concentración de la proteína pura es 102 ng/μl (Fig.8B).

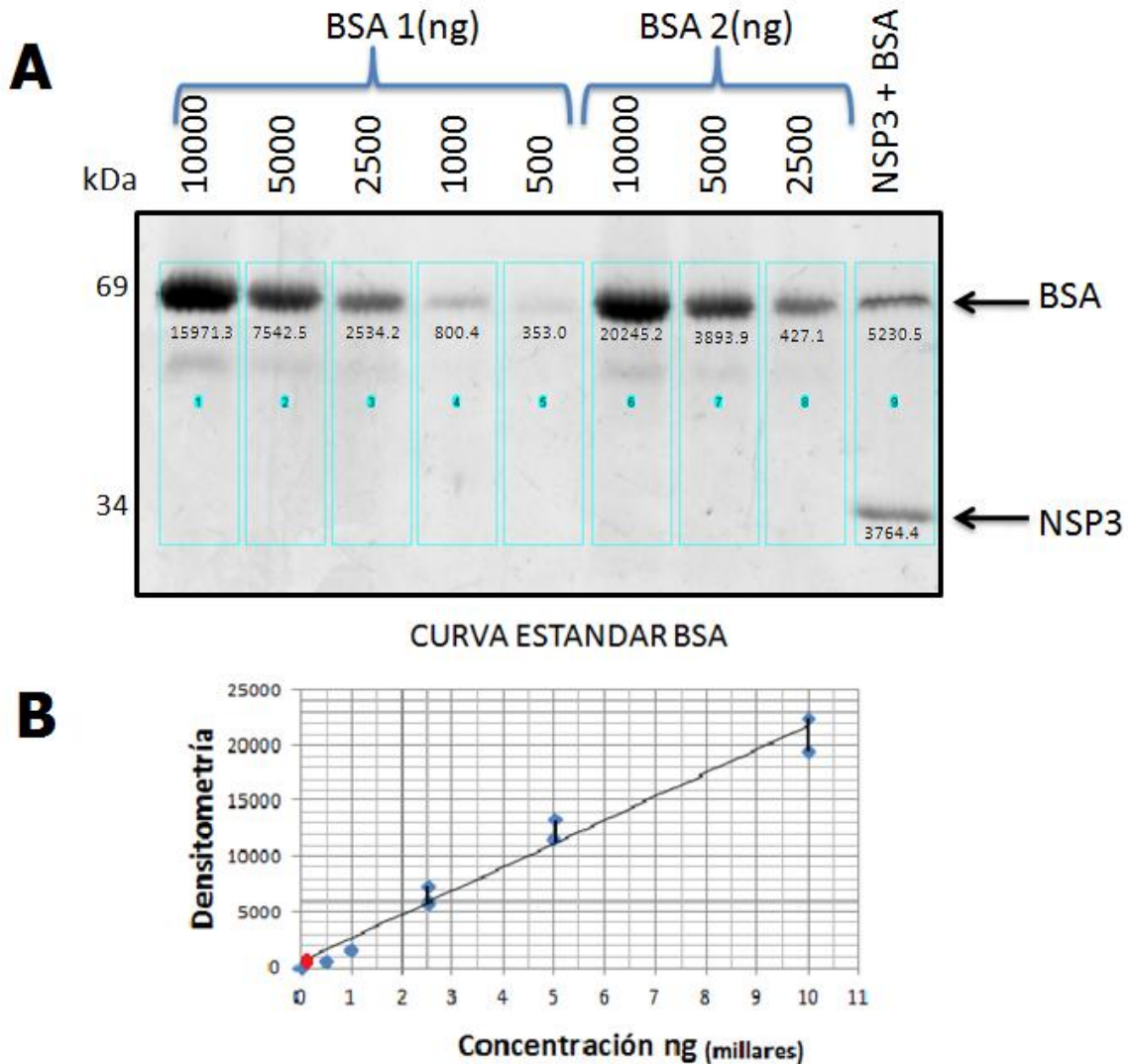


Fig.8. Cuantificación de NSP3 por medio del colorante SyproRed. A) Gel de poliacrilamida-SDS al 12% en el que se corrieron distintas cantidades de dos tipos de albumina (BSA), uno pesado en el laboratorio (BSA 1) y otro una solución comercial (BSA 2) y una muestra de concentración desconocida de NSP3 purificada, conteniendo BSA como estabilizador. El gel se tiñó con SyproRed (Molecular Probes). En la imagen se muestra el valor densitométrico de cada banda. B) Gráfica de la curva estándar de BSA realizada a partir de los datos obtenidos de ambas diluciones de BSA (BSA1 y BSA2) mostrando el valor encontrado para NSP3 pura.

Cinética de expresión de NSP3 e inhibición de la traducción determinado por marcaje metabólico extenso, de pulso y WB.

Una vez que se cuantificó la proteína NSP3 pura, se procedió a infectar células BSC1 con el virus vNSP3, se indujo su expresión con 2 mM IPTG a distintos intervalos de tiempo (0.5-20 hr) y se cosechó a las 24 horas. Se analizó por Western blot (WB) la cantidad de NSP3 que se produce al inducir durante distintos intervalos de tiempo, observándose una señal desde las 2 horas de inducción y una máxima señal visible desde las 12 horas (Fig. 9A). Al cuantificar la señal por densitometría del WB en comparación con la proteína pura se obtuvo que a las 2 h había cerca de medio millón de moléculas por célula, mientras que a las 8 horas se encontraba el máximo nivel de acumulación de NSP3 con una concentración de aproximadamente 4 millones de moléculas por célula, mientras que en todos los tiempos posteriores a las 8 horas la cantidad máxima de 4 millones de moléculas por célula permaneció estable (Fig. 9B). Aunado a esto, en el ensayo de Western blot se pudo detectar en los tiempos de 16 y 20 h de inducción, la presencia de dos bandas adicionales a la de NSP3, una de las cuales (mayor peso molecular aparente), podría sugerir un posible estado de agregación de la proteína y para la segunda (de menor peso molecular aparente) una posible forma degradada de la proteína (Fig. 9A).

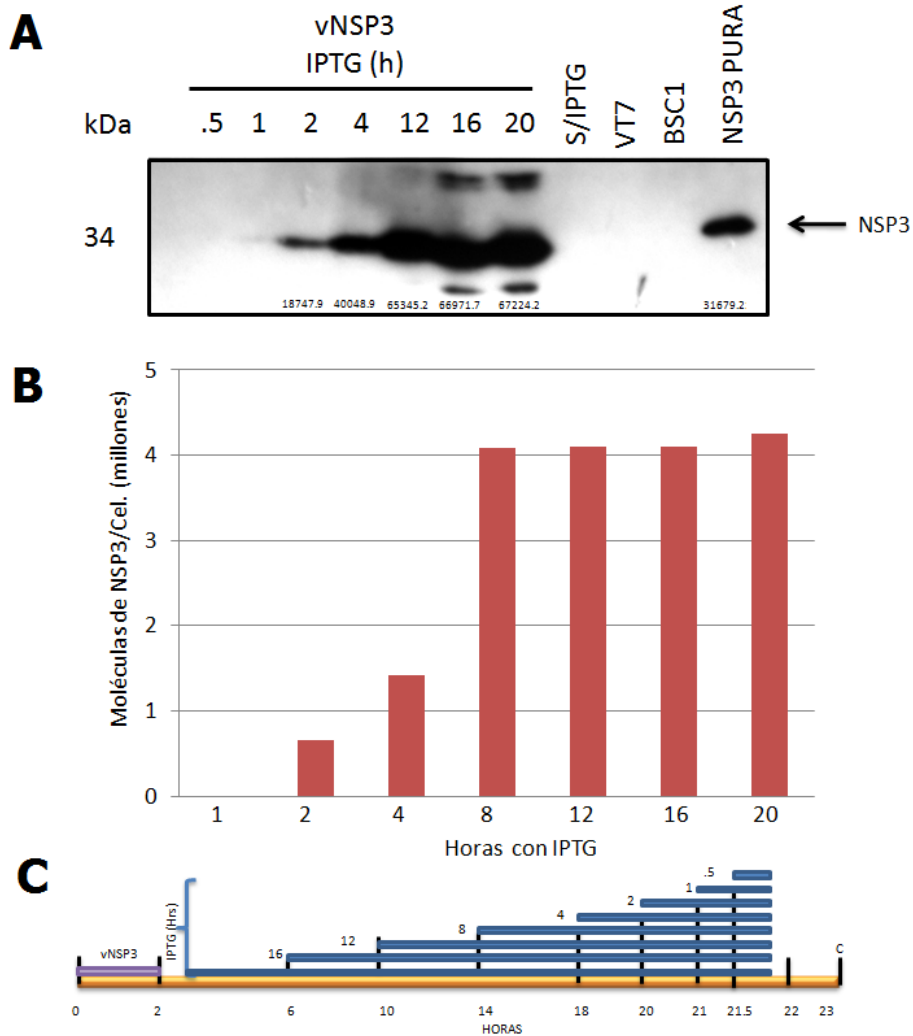


Fig.9. Cinética de acumulación de NSP3 determinado por WB induciendo la expresión con IPTG. A) WB de NSP3 de células BSC1 infectadas con vNSP3, induciendo la expresión durante distintos intervalos de tiempo. Como control se utilizaron células BSC1 infectadas con la cepa parental VT7 que no contiene el gen de NSP3 o sin infectar. Se incluyó un control de NSP3 pura para estimar la cantidad absoluta de la proteína. En la imagen se muestra el valor densitométrico de cada banda de NSP3. B) Cuantificación de la acumulación de NSP3 determinado por densitometría del WB mostrado en A. C) Esquema de los intervalos de tratamiento con IPTG 2mM en las células BSC1 infectadas con vNSP3.

Utilizando el mismo esquema de inducción con 2 mM IPTG durante 0.5-20 h del experimento anterior, se realizó marcaje metabólico de pulso con [³⁵S] metionina y [³⁵S] cisteína, para determinar el nivel de inhibición de la traducción y el nivel de síntesis de NSP3 durante el pulso de marca radioactiva por una hora. Se observó que el mayor nivel de síntesis de NSP3 se alcanza a partir de las 8 h de inducción con IPTG, mientras que a ese tiempo la inhibición de la

traducción no ha llegado a su máximo nivel con respecto al control de células infectadas con el vector vaccinia (VT7), siendo hasta las 16 h el punto analizado en donde se puede observar el mayor grado de inhibición de la traducción (Fig. 10A). Los resultados cuantitativos de este experimento, en base a densitometría de la Fig. 10A, se analizan más adelante en la Fig. 12A.

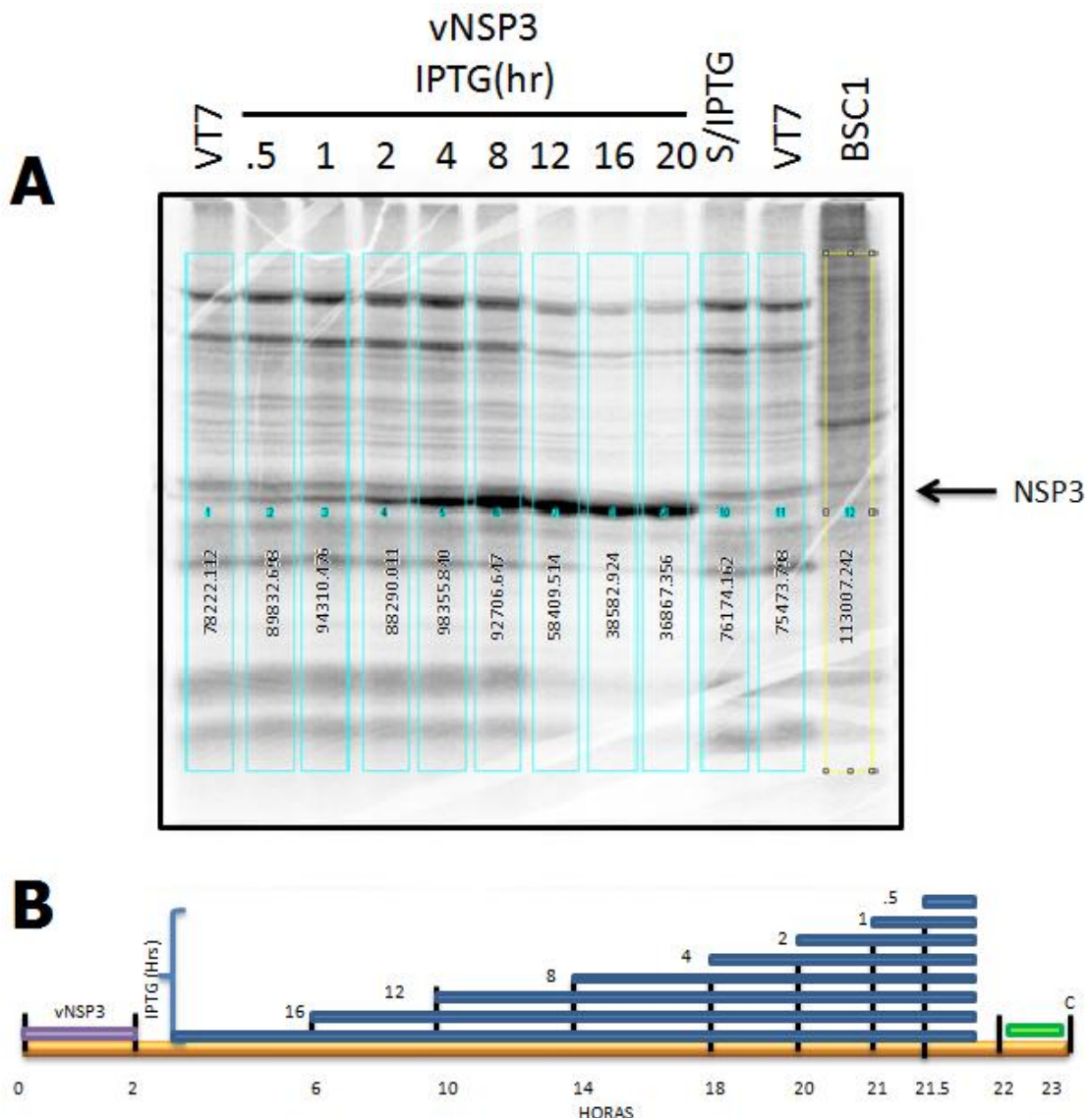


Fig.10. Cinética de expresión de NSP3 e inhibición de la traducción determinadas por marcaje metabólico de pulso. A) Autorradiografía del gel de poli-acrilamida-SDS de células BSC1 infectadas con vNSP3, induciendo la expresión durante distintos intervalos de tiempo, previos al marcaje de pulso con $[^{35}\text{S}]$ Cist y $[^{35}\text{S}]$ Met radioactivas. Como control se utilizaron células BSC1 infectadas con VT7 o sin infectar. La flecha señala la banda correspondiente a NSP3. En la imagen se muestra el valor densitométrico del carril. B) Esquema de los intervalos de tratamiento con IPTG 2 mM en las células BSC1 infectadas con vNSP3.

Utilizando el mismo esquema de inducción con IPTG 2 mM durante 0.5-20 h del experimento mostrado en la Fig. 9, se realizó el de marcaje metabólico extenso con [³⁵S] metionina y [³⁵S] cisteína en las células infectadas con vNSP3. Se observa, la cantidad de proteínas acumuladas al igual que por WB, con una señal visible desde las 4 h y a las 8 h una señal correspondiente aproximadamente al valor máximo de acumulación de la proteína (Fig. 11A). Al compararse estos resultados con los valores obtenidos por WB se observa que el marcaje metabólico extenso es una metodología menos sensible para la detección de la cantidad de proteínas, por lo que se decidió basar este estudio solamente en los resultados de WB.

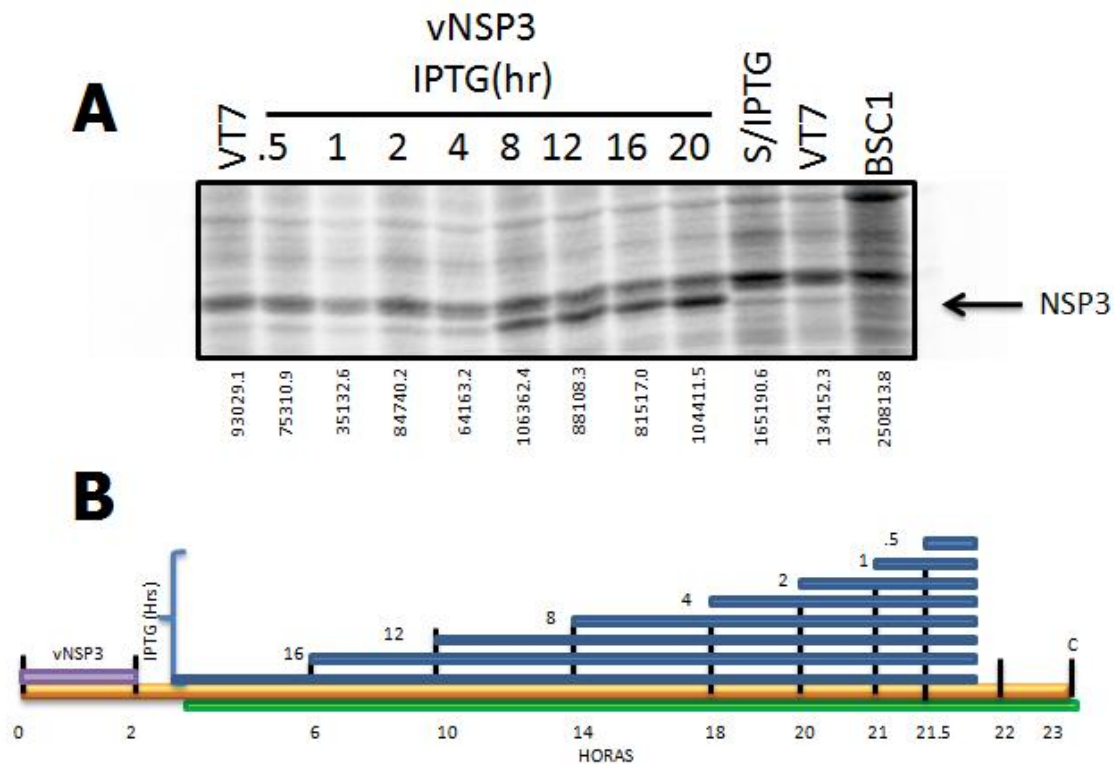


Fig.11. Cinética de acumulación de NSP3 determinada por marcaje metabólico extenso. A) Autorradiografía del gel de poliacrilamida-SDS de células BSC1 infectadas con vNSP3, induciendo la expresión durante distintos intervalos de tiempo. Como control se utilizaron células BSC1 infectadas con VT7 o sin infectar. El marcaje con [³⁵S] Cist] y [³⁵S] Met radioactivas, se realizó durante 20 horas a partir de 2 hpi. La flecha señala la banda correspondiente a NSP3. En la imagen se muestra el valor densitométrico del carril. B) Esquema de los intervalos de tratamiento con IPTG 2 mM en las células BSC1 infectadas con vNSP3, indicando en la barra inferior, el intervalo de tiempo de 20 hr durante el que se realizó el marcaje metabólico.

inhibitorio de la traducción y el nivel de síntesis de NSP3, como en conjunto se muestra en la Fig. 12, se puede observar por un lado que el máximo nivel de acumulación de NSP3, como se había comentado anteriormente, se alcanza hasta las 8 h de inducción con IPTG y se mantiene constante a partir de ese tiempo, mientras que a este tiempo la inhibición de la traducción es nula, siendo hasta las 16 h que se alcanza el nivel máximo de inhibición de la traducción de un 72%. Es decir que tienen que transcurrir 8 horas después del nivel máximo de síntesis de NSP3 para que se establezca el efecto inhibitorio de la traducción que causa NSP3 y alcance su nivel máximo. Más adelante se describen experimentos para tratar de discernir lo que tiene que ocurrir durante estas 8 h de “maduración” para que se establezca el efecto inhibitorio de la traducción de NSP3.

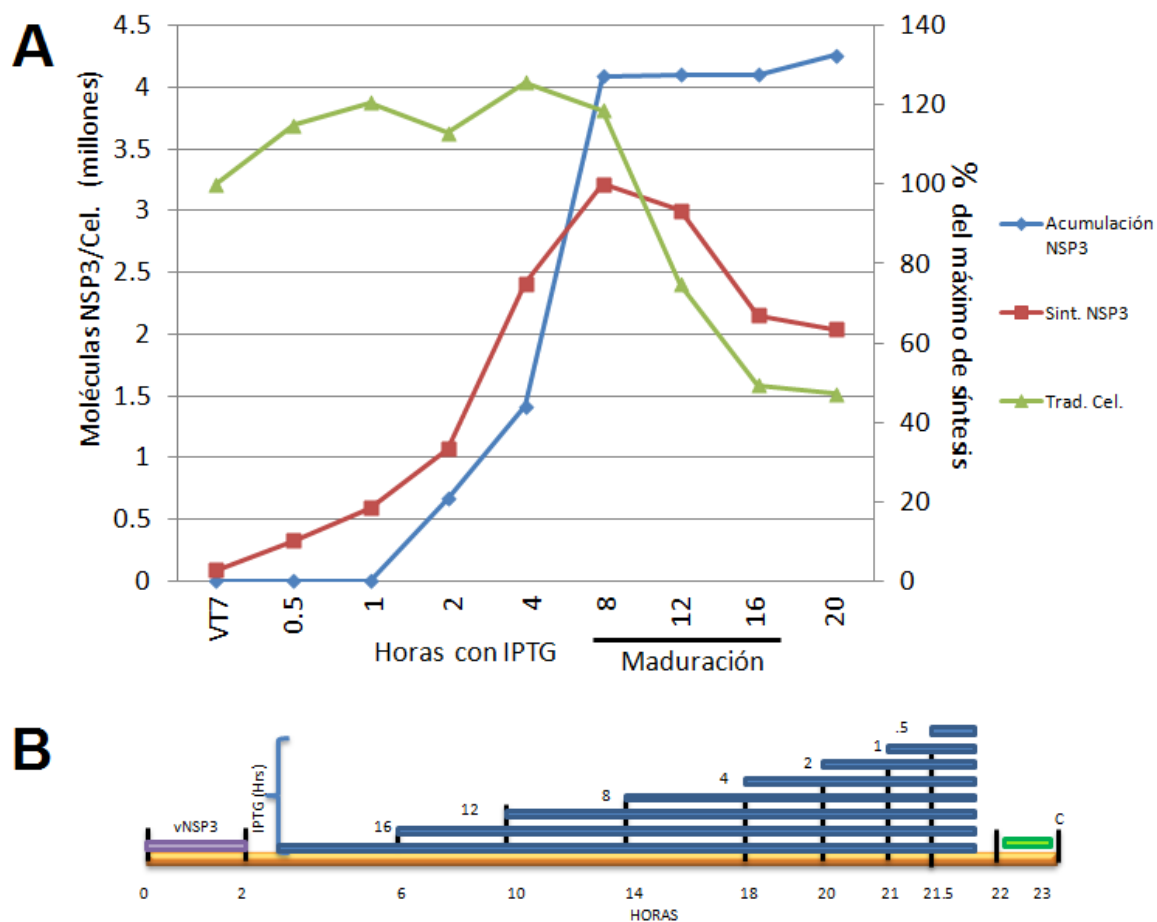


Fig.12. Cinética de síntesis y acumulación de NSP3 y su efecto inhibitorio en la traducción celular. A) Cuantificación de la síntesis de NSP3 y nivel de la traducción celular determinados por marcaje metabólico de pulso, y de la acumulación de NSP3 determinada por WB en células infectadas con vNSP3. Se indujo la expresión de NSP3 con IPTG durante distintos intervalos de tiempo. Como control se utilizaron células BSC1 infectadas con VT7. Se indica con una barra en el eje de las abscisas el intervalo de 8 hr que posiblemente requiere la proteína NSP3 para la “maduración” y establecimiento del efecto inhibitorio de la traducción. B) Esquema de los intervalos de tratamiento con IPTG 2mM en las células BSC1 infectadas con vNSP3. El valor densitométrico de la zona correspondiente a la banda de NSP3 se consideró indicativo de ausencia de expresión de esta proteína en células infectadas con VT7, mientras que el valor densitométrico longitudinal de células infectadas con VT7, se consideró indicativo de 100% de traducción celular.

Tomando en cuenta los valores reportados por el grupo de Hershey et al. (1987) de 2 millones de moléculas por célula (de la línea celular Hela) para el factor eIF4G y 3.3 millones de ribosomas por célula, es que podemos inferir la relación estequiométrica sugerida entre NSP3 y eIF4G, que resultó ser de 2:1, coincidiendo con la hipótesis propuesta, pero que hasta el momento no se había confirmado (Tabla. 1).

	Moléculas por Cel. Eucariote	Referencia
Ribosomas	3×10^6	Hershey <i>et al.</i> 1987
eIF4G	2×10^6	Hershey <i>et al.</i> 1987
NSP3 (máxima expresión)	4×10^6	Este estudio

Estequiometría sugerida entre NSP3-eIF4G
2:1

Tabla 1. Comparación estequiométrica entre los valores reportados en la literatura para eIF4G y los ribosomas en células de mamífero (células Hela) y los valores encontrados en nuestro estudio para NSP3 (células BSC1).

Determinación del efecto de retirar el inductor IPTG, después de un pulso de 4 horas de inducción, sobre el nivel de síntesis y acumulación de NSP3 determinados por marcaje de pulso y WB.

Debido al retardo de 8 horas en el establecimiento del efecto inhibitorio de la traducción de NSP3, decidimos investigar las diferencias entre la proteína NSP3 recién sintetizada contra la sintetizada en un intervalo de tiempo anterior a las 8 horas que aparentemente requiere la proteína para “madurar” funcionalmente.

Estudios previos indican que NSP3 requiere de la chaperona HSP90 para madurar funcionalmente (Dutta *et al.*, 2011), lo que requiere su dimerización, y este proceso demora *in vitro* al menos 30 minutos, por lo que nuestra hipótesis es que la proteína NSP3 recién sintetizada es monomérica no funcional, y requiere de cierto tiempo de maduración *in vivo* para adoptar su forma dimérica madura y funcional para inhibir la traducción.

Con el fin de empezar a discernir las condiciones experimentales óptimas para analizar la proteína NSP3 producida en un intervalo de tiempo anterior a las 8 horas de “maduración”, se decidió determinar en células BSC1 infectadas con vNSP3, si al retirar el inductor IPTG se logra disminuir o abatir la síntesis y acumulación de NSP3.

Por medio de marcaje metabólico de pulso se observa que tanto el nivel de síntesis de NSP3 como el de inhibición de la traducción no suele variar a gran escala cuando se induce durante 4 a 12 horas y se retira el inductor durante 3 a 12 horas (Fig. 13A). Por medio de densitometría se observa que desde las 4 horas de inducción y 12 horas sin el inductor hay un nivel del 70% de síntesis de NSP3 (Fig. 13B).

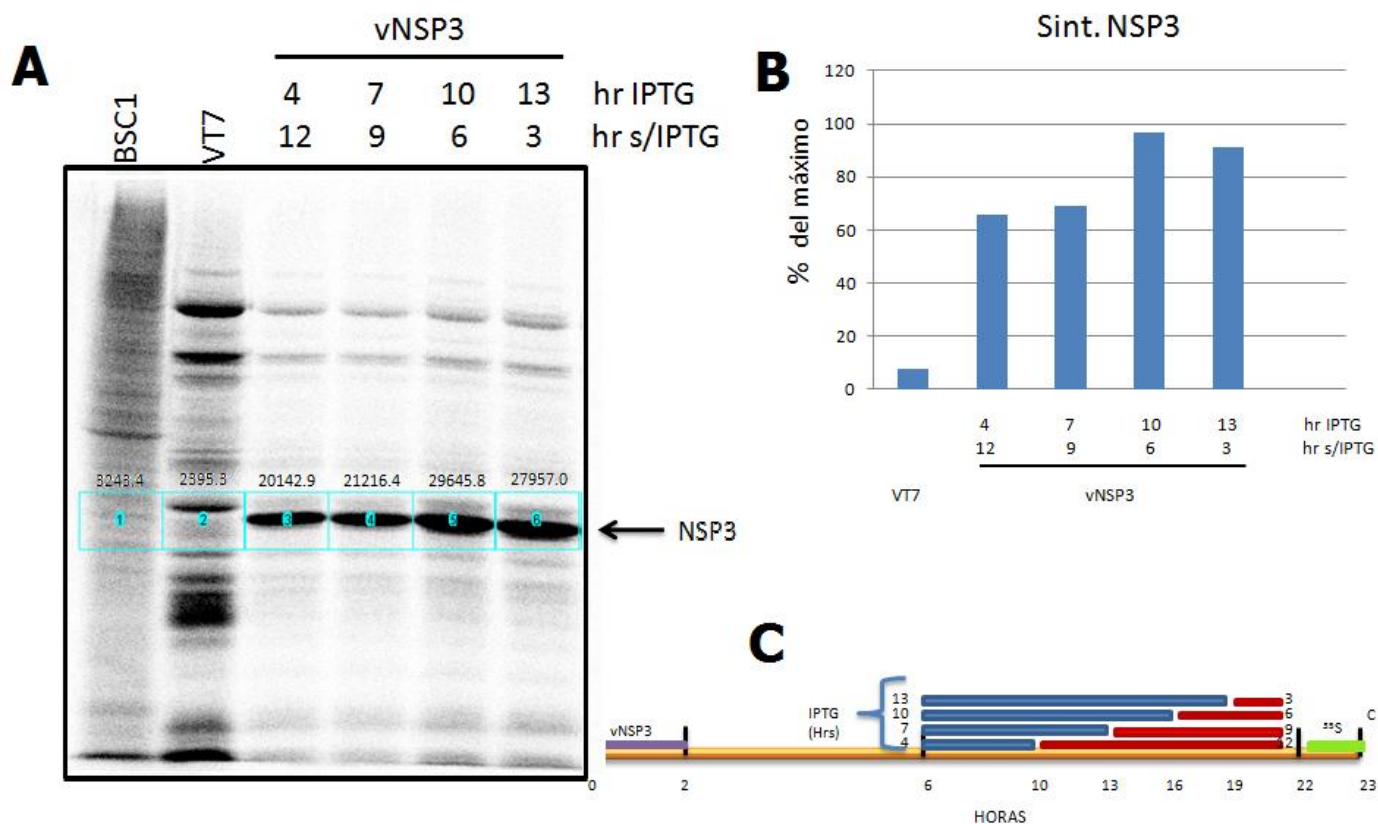


Fig.13. Efecto del intervalo de tiempo en ausencia de IPTG sobre la inhibición de la traducción celular por marcaje metabólico de pulso. A) Autoradiografía del gel de poliacrilamida-SDS de células BSC1 infectadas con vNSP3 induciendo con IPTG 2 mM a las 7 hpi y retirando el inductor durante distintos intervalos de tiempo, previos al marcaje de pulso con $[^{35}\text{S}]$ Cist y $[^{35}\text{S}]$ Met. En la imagen se muestra el valor densitométrico de cada banda de NSP3. B) Cuantificación por densitometría del nivel de síntesis de NSP3. C) Esquema de los intervalos de tratamiento con IPTG 2 mM en las células BSC1 infectadas con vNSP3.

Por otro lado al analizarse por Western blot se observa que de igual forma que en el análisis por marcaje metabólico, hay una señal de acumulación de NSP3 constante en todos los casos analizados, sin importar el tiempo de inducción ni tiempo de maduración (Fig. 14A). Mientras que por densitometría, los valores obtenidos para la señal por WB muestran que el nivel de acumulación a las 4 horas de inducción y 12 horas sin el inductor es de aproximadamente 2.5 millones de moléculas de NSP3, valores distintos a los encontrados en el experimento de la Fig. 8 con las mismas 4 horas de inducción pero sin tiempo de maduración, donde sólo se obtuvo una

concentración de 1.4 millones de moléculas. Mientras que la máxima concentración encontrada en este experimento fue de 3.5 millones a las 10 h de inducción y 6 h sin IPTG (Fig. 14B), cantidades que mantienen el mismo comportamiento del experimento anterior.

Basados en los resultados de los niveles de síntesis y de acumulación de NSP3 (Figs. 13 y 14) concluimos que al retirar el inductor IPTG 2 mM hay una inercia considerable que permite que se siga sintetizando NSP3, es decir, este esquema de tratamiento con inductor/sin inductor sólo reduce parcialmente el nivel de síntesis de NSP3.

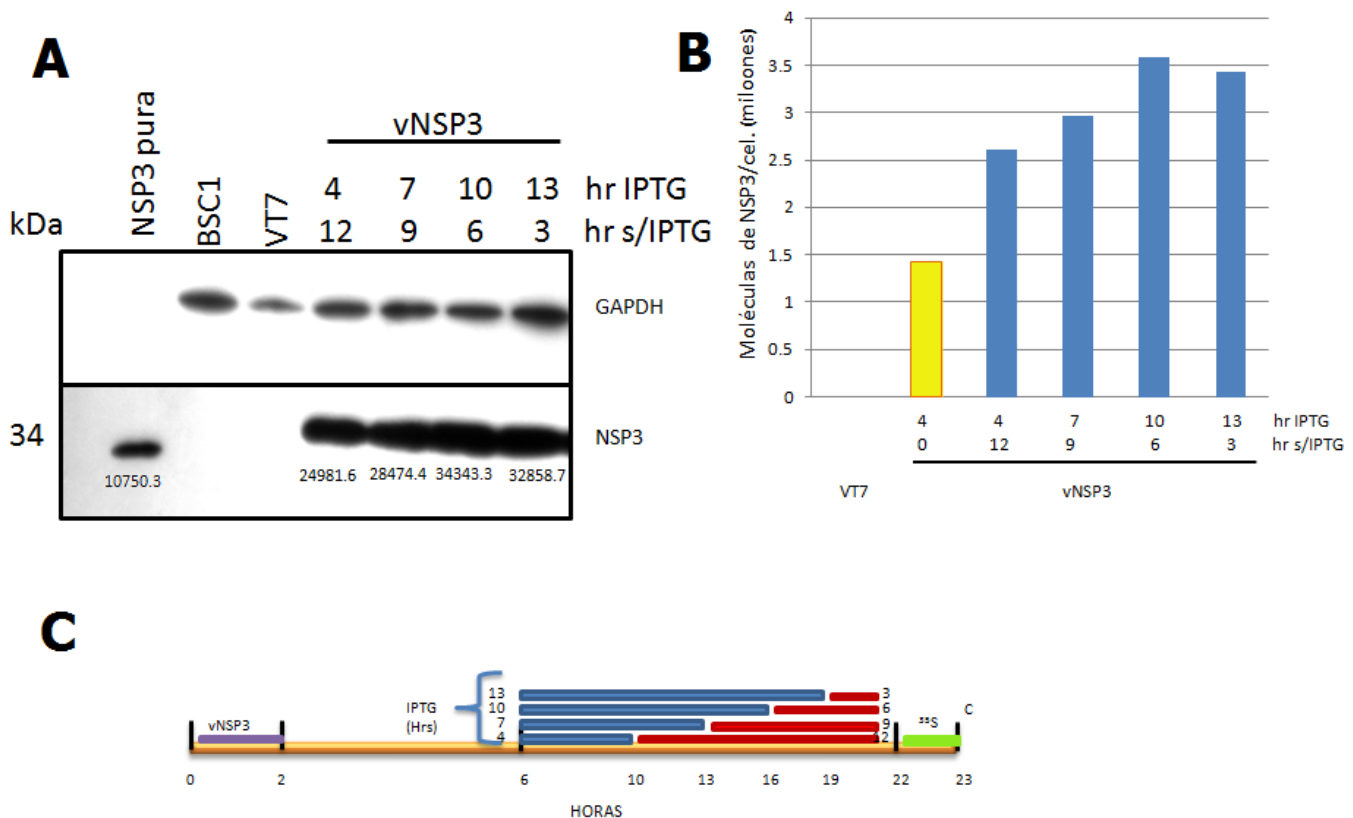


Fig. 14. Efecto del intervalo de tiempo en ausencia de IPTG sobre la acumulación de NSP3 determinada por WB. A) WB de células BSC1 infectadas con vNSP3 induciendo con IPTG 2 mM a las 7 hpi y retirando el inductor durante distintos intervalos de tiempo, previos a la cosecha. En el panel superior se muestra el WB de la proteína GAPDH como control de carga y en el panel inferior la banda correspondiente a NSP3 por WB. En la imagen se muestra el valor densitométrico de cada banda de NSP3. B) Cuantificación de la acumulación de NSP3 determinada por densitometría del WB mostrado en A. incorporando el valor correspondiente a 4 horas de inducción sin un tiempo con el inductor, correspondiente al experimento de la Fig. 3 (barra en color rojo). C) Esquema de los intervalos de tratamiento con IPTG 2 mM en las células BSC1 infectadas con vNSP3.

Establecimiento de un WB No Disociativo para la determinar la aparición de dímeros de NSP3

Para poder determinar la existencia de la forma dimérica de NSP3 y el momento de su aparición una vez inducida su expresión, se llevo a cabo un Western Blot No disociativo (WBND) en donde las muestras se trataron a concentraciones bajas de SDS, sin β -Mercaptoetanol y sin hervirse, además de correrse a 4°C en el gel de poliacrilamida, esto con el fin de evitar la desnaturalización de la proteína. Tomando el mismo esquema de trabajo que el experimento anterior, es decir un pulso de 4 horas de IPTG y 12 horas en ausencia de IPTG, se analizaron las mismas muestras por WBND y se observó que en la condición de 4 horas de inducción y 12 horas s/IPTG existe la presencia de dímeros de NSP3 (Fig 15A). Se observa la aparición de tres bandas adicionales de mayor y menor peso molecular aparente que NSP3 (60 76 36 kDa) que aparentemente corresponden a diferentes estados oligoméricos de la proteína, ya que NSP3 puede presentar diversos estados oligomericos (Aponte *et al.*, 1993) como posible causa de uniones inter e intra monómeros de NSP3 debido a la presencia de cisteínas conservadas que estén involucradas en la formación de puentes disulfuro. Estos resultados sugieren que en nuestras manos el Western blot no disociativo puede distinguir formas diméricas de NSP3.

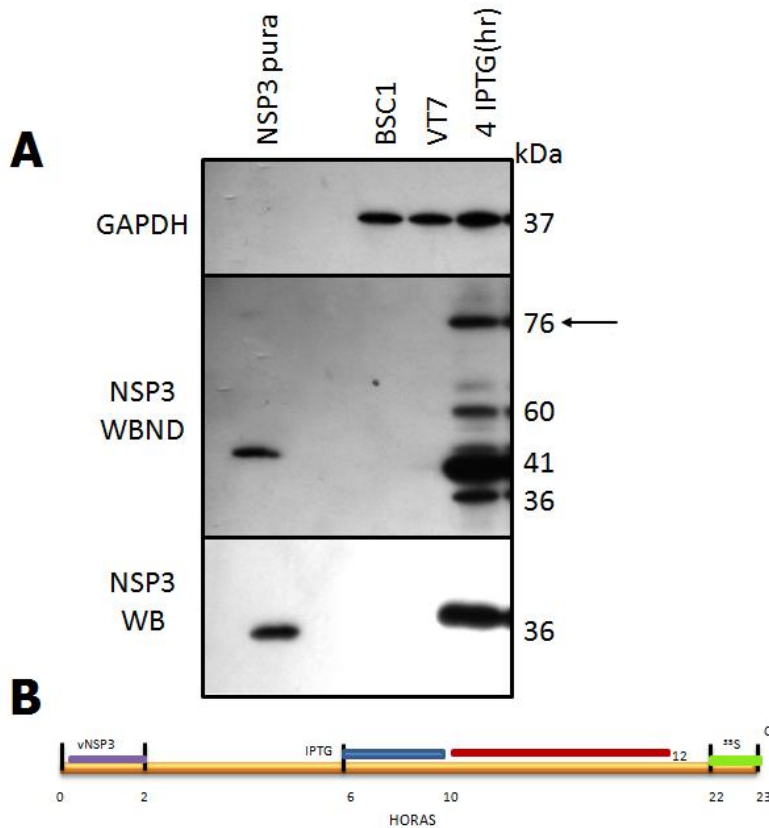


Fig.15. Determinación de dímeros de NSP3 por WBND. A) WB (disociativo) y WBND (no disociativo) de células BSC1 infectadas con vNSP3 e inducidas entre las 6 y 10 hpi con IPTG, retirando el inductor entre las 10 y 22 hpi (12 horas de maduración de la proteína). En el panel superior se muestra el WB de la proteína GAPDH como control de carga, en el panel intermedio el WBND, mostrando las distintas bandas correspondientes a NSP3 en condiciones no disociativas (dímeros y monómeros en base al peso molecular aparente), y en el panel inferior el WB de NSP3. B) Esquema de los intervalo de tratamiento con IPTG 2 mM en las células BSC1 infectadas con vNSP3. La flecha señala la ubicación de la posible forma dimérica de NSP3, de acuerdo al peso molecular aparente.

Efecto del tiempo de maduración de NSP3 determinado por marcaje metabólico de pulso y WBND.

De forma complementaria al experimento anterior, se formuló un esquema de trabajo que permitiera determinar cuál es el tiempo de maduración mínimo de NSP3 para poder apreciar su forma dimérica, tomando en cuenta que son suficientes para detectar un nivel considerable de síntesis de NSP3 4 hr de inducción. Se tomó este valor de 4 horas de inducción como constante durante el análisis para sólo tener como variable el tiempo de maduración. Igual que en el

experimento de la Fig. 13A, se observó que al retirar el inductor IPTG luego de un pulso de 4 hr de inducción no se logra revertir completamente la síntesis de NSP3, sino que esta va aumentando gradualmente (Fig. 16A).

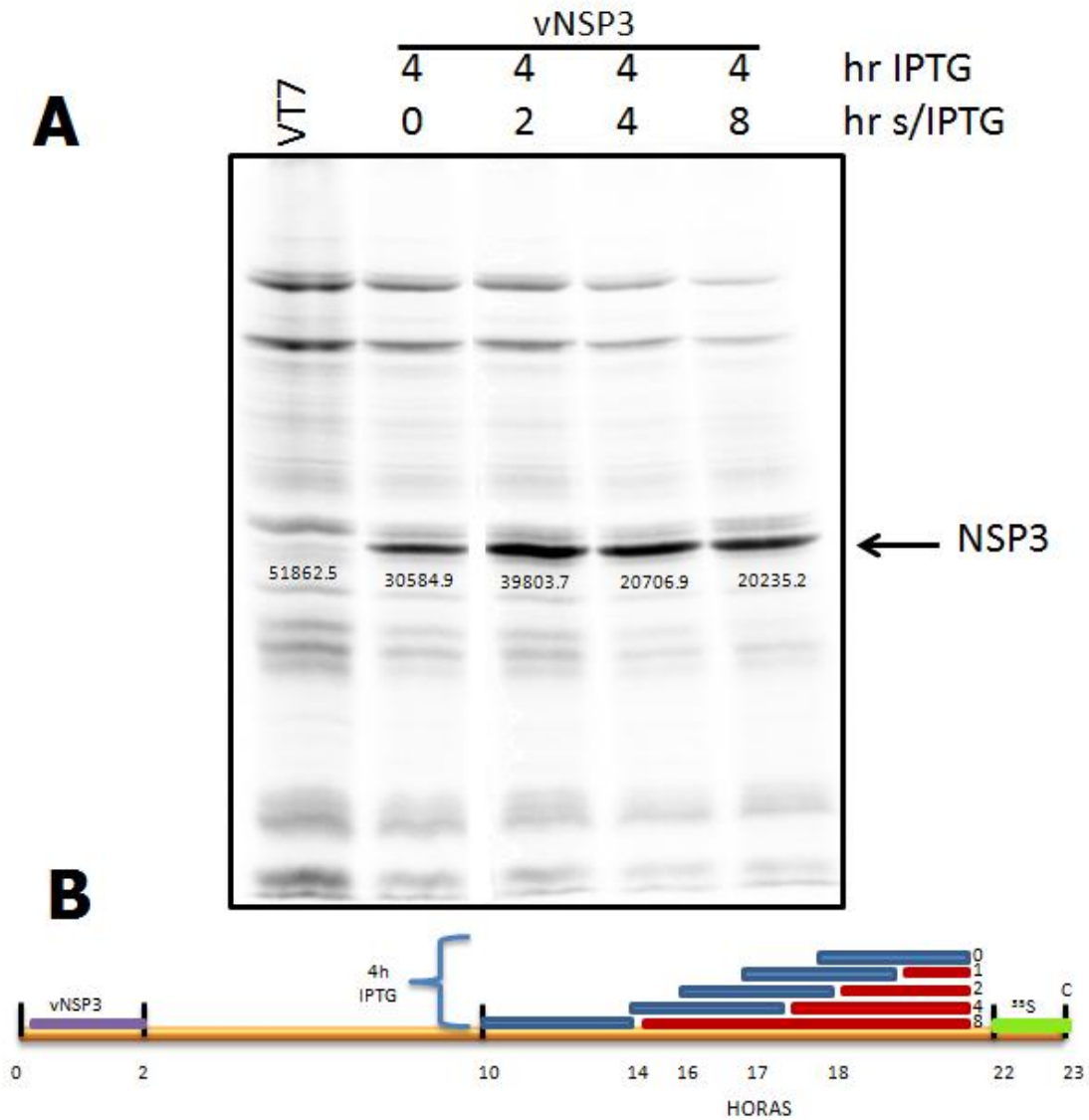


Fig.16. Efecto del tiempo de maduración sobre el nivel de expresión de NSP3 determinado por marcaje de pulso. A) Autoradiografía del gel de poli-acrilamida-SDS de células BSC1 infectadas con vNSP3 induciendo con IPTG 2 mM durante 4 horas, y retirando el inductor durante distintos intervalos de tiempo (de maduración de NSP3), previos al marcaje de pulso con [³⁵S] Cist y [³⁵S] Met. En la imagen se muestra el valor densitométrico del carril. B) Esquema de los intervalos de tratamiento con IPTG 2 mM en las células BSC1 infectadas con vNSP3.

Por otro lado, al analizar las muestras por medio de WBND, se observa que antes de 4 horas de maduración (es decir, sin IPTG) no se puede detectar por esta metodología la presencia de dímeros de NSP3 y siendo hasta las 8 horas el tiempo en donde podemos encontrar la mayor parte de la proteína en su forma aparentemente dimérica (Fig. 17A, panel superior), comparando estos datos con los obtenidos de las mismas muestras analizadas por un Western blot normal, en donde se observa la presencia de proteína en todos los tiempos y el nivel de acumulación en cada uno (Fig. 17A panel inferior).

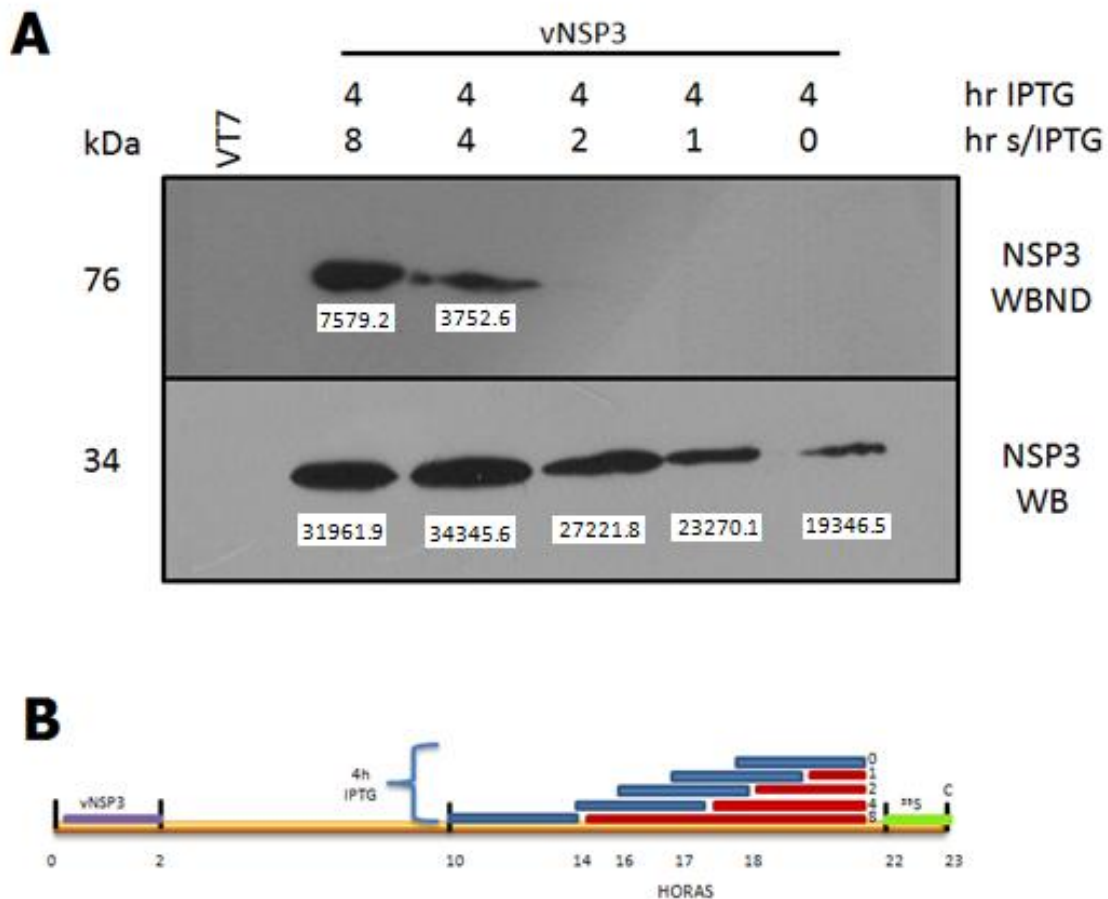


Fig.17. Efecto del tiempo de maduración sobre la aparición de dímeros de NSP3 por WBND. En el panel superior se muestra el WBND y en el panel inferior el WB de células BSC1 infectadas con vNSP3 induciendo con IPTG 2 mM durante 4 horas, y retirando el inductor durante distintos intervalos de tiempo (de maduración de NSP3), previos a la cosecha. En cada panel se muestra el valor densitométrico de cada banda. B) Esquema de los intervalos de tratamiento con IPTG 2 mM en las células BSC1 infectadas con vNSP3.

Al comparar los datos obtenidos por medio del Western blot normal y WBND (Fig. 12A) para la cantidad de moléculas de NSP3 así como su forma dimérica, se observó que existe un retardo de 8 hr en la aparición abundante de dímeros (determinados por esta metodología) (Fig. 18A).

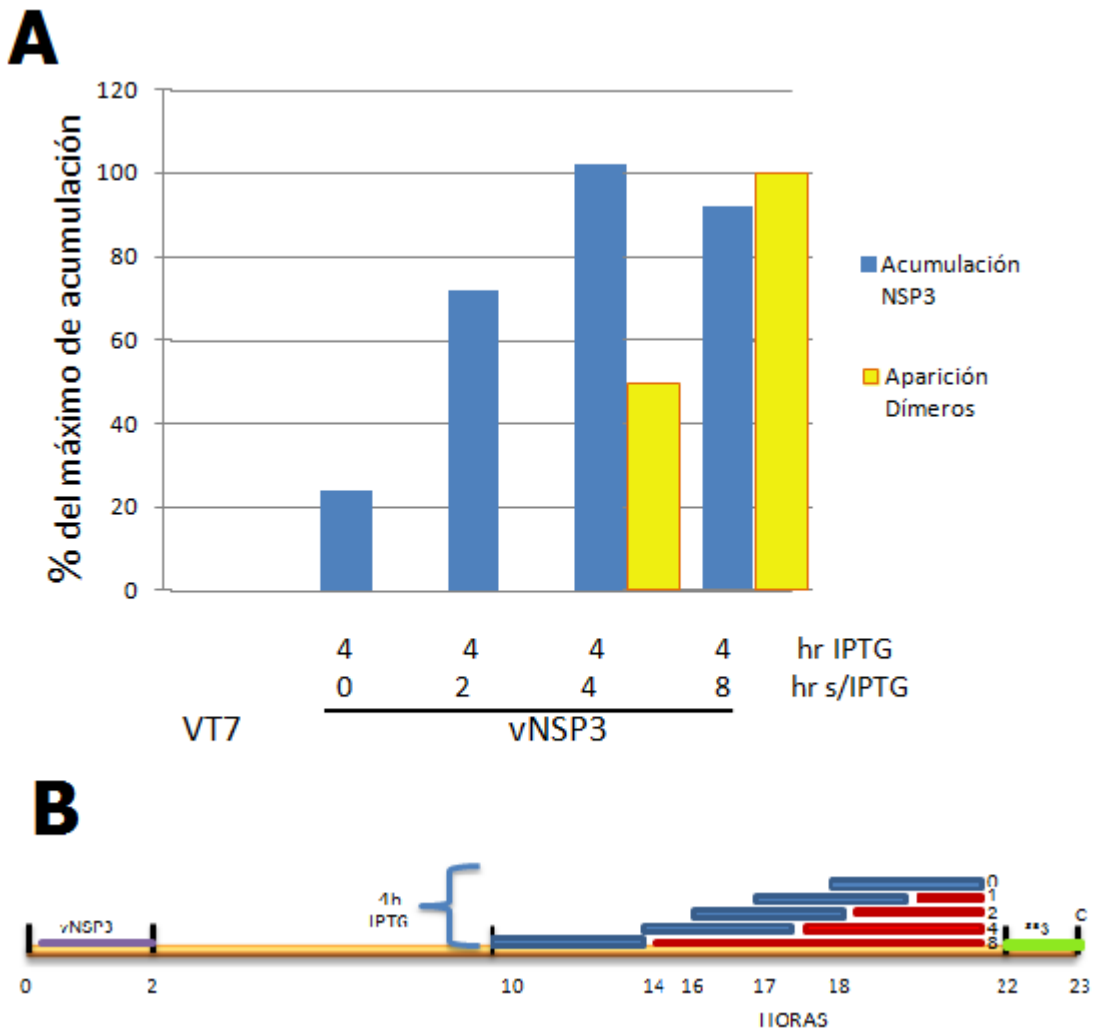


Fig.18. Comparación entre el efecto inhibitorio de la traducción y la aparición de dímeros. A) Cuantificación de la acumulación de monómeros de NSP3 por WB así como la aparición de dímeros por WBND y el nivel de la traducción celular por marcaje metabólico de pulso en células BSC1 infectadas con vNSP3. Se indujo la expresión de NSP3 durante 4 horas, y retirando el inductor durante distintos intervalos de tiempo (de maduración de NSP3). B) Esquema de los intervalos de tratamiento con IPTG 2 mM en las células BSC1 infectadas con vNSP3.

Con el propósito de explorar el papel que juega una concentración baja de NSP3 en la inhibición de la traducción celular y aprovechando la conveniencia de que el sistema de expresión de NSP3 que usamos es inducible, se indujo la expresión de la proteína a distintas concentraciones de IPTG (0.02-2 mM) permitiendo o no su maduración durante 8 horas. Por medio del marcaje metabólico se observó que el nivel de síntesis de NSP3 varía considerablemente en cada uno de los casos y que la inhibición de la traducción sólo es detectable con la dosis máxima de 2 mM y permitiendo su maduración (Fig. 19A). Confirmándose esta observación por densitometría, donde la inhibición en esta condición es cerca el 50% y no habiendo inhibición en otra condición, ya sea con o sin maduración (Fig. 19B).

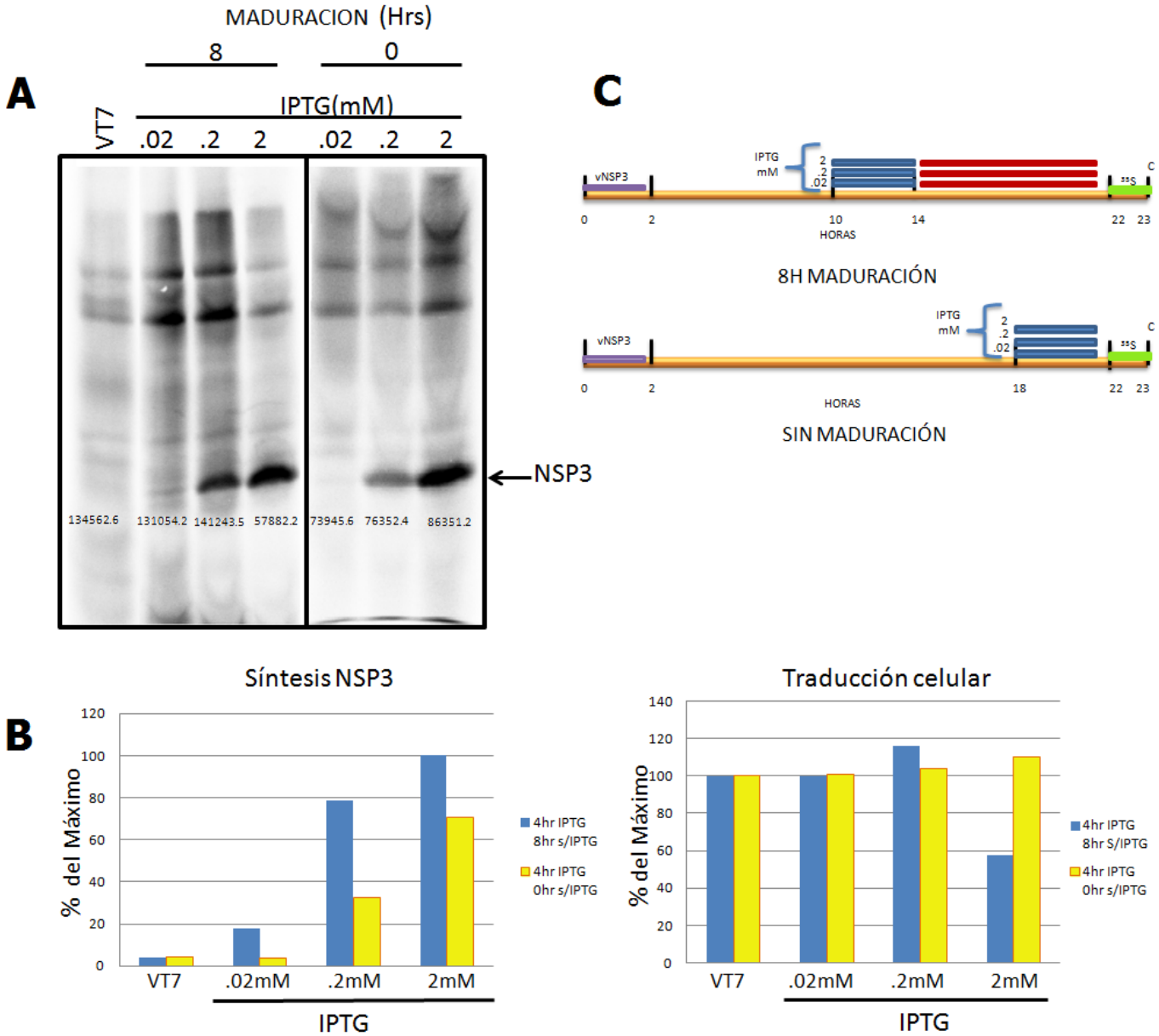


Fig.19. Efecto de la dosis del inductor IPTG sobre el efecto inhibitorio de la traducción de NSP3 con y sin maduración determinado por marcaje metabólico de pulso. A) Autoradiografía del gel de poliacrilamida-SDS de células BSC1 infectadas con vNSP3 induciendo con distintas concentraciones de IPTG durante 4 horas y dando un pulso de marca radioactivo con [³⁵S] Cist y [³⁵S] Met inmediatamente o retirando el inductor durante 8 horas y dando el marcaje metabólico de pulso. En la imagen se muestra el valor densitométrico del carril. B) Cuantificación por densitometría del nivel de síntesis de NSP3 con y sin maduración así como del nivel de la traducción celular. C) Esquemas de los intervalos de tratamiento con distintas concentraciones de IPTG (0.02-2 mM) en las células BSC1 infectadas con vNSP3.

Al analizarse el mismo experimento por medio de Western blot, se observó que solo había señal para las condiciones de 0.2 y 2 mM de IPTG tanto para la proteína madura como la que no presentaba maduración (Fig. 20). Al comparar estas dos condiciones se observó que la magnitud de NSP3 acumulada en cuatro horas de inducción no es muy diferente, ya que por densitometría corresponde a 1.5 y 2.5 millones de moléculas por célula a 0.2 y 2 mM de IPTG, respectivamente (Fig 20 A y B). Sin embargo, en la condición en la que se permitió la maduración de NSP3 durante 8 horas sin IPTG, en el caso de 2 mM la señal aumentó con respecto a la que no se dejó madurar a aproximadamente el doble, siendo su valor analizado por densitometría de 4 millones de moléculas. Sin embargo, para el caso de 0.2 mM, se observó que la señal se reduce considerablemente, a apenas 500 mil moléculas (Fig. 20 A y B). En base a estos resultados, la condición de 0.2 mM de inductor permite revertir la inercia de síntesis de NSP3 en forma mucho más efectiva que cuando el pulso del inductor es 10 veces mayor de 2 mM. La enorme disminución en la cantidad acumulada de NSP3 que se observa al incubar 8 horas en ausencia del IPTG, de aproximadamente tres veces, indica que la mayor parte de NSP3 fue degradada durante el intervalo de 8 horas sin inductor.

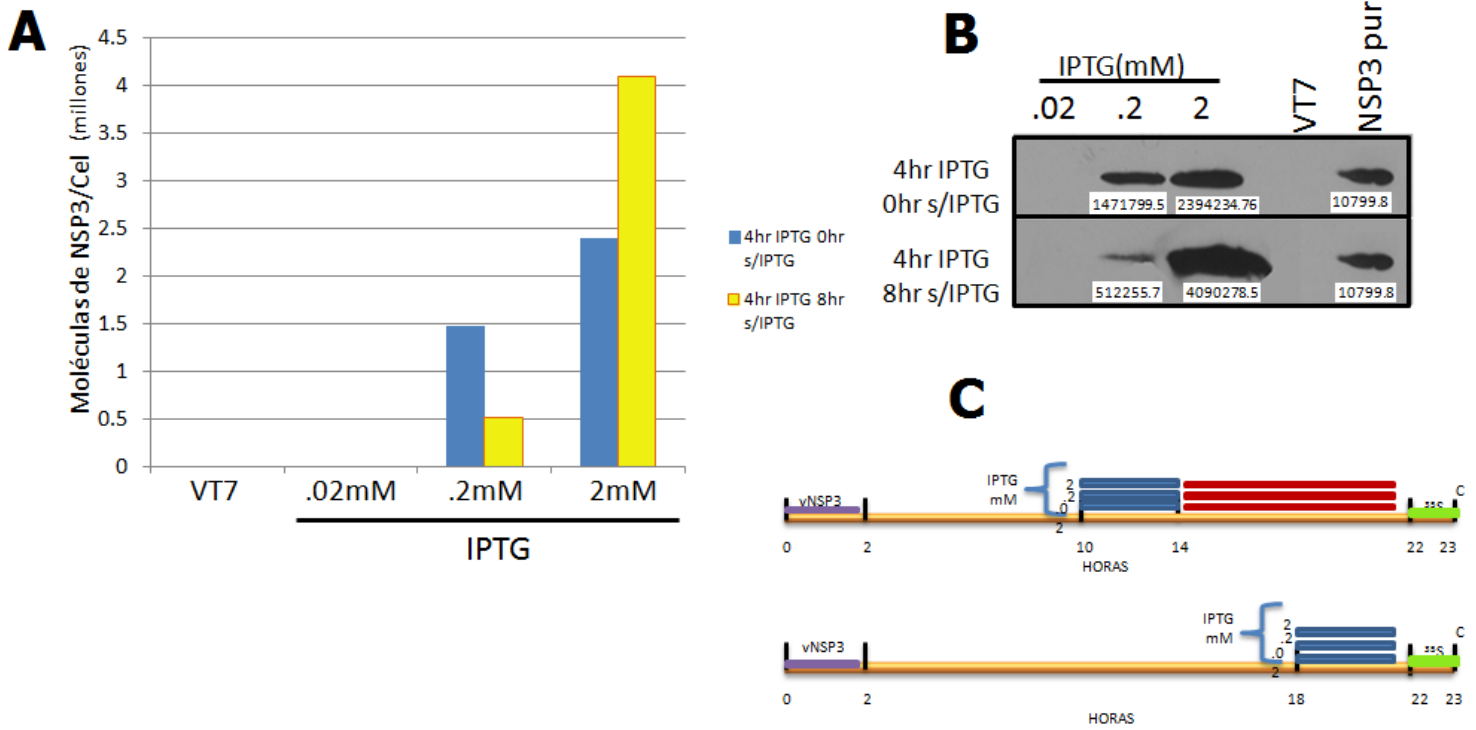


Fig.20. Efecto de la dosis del inductor IPTG sobre la acumulación de NSP3 con y sin maduración determinada por WB. A) Cuantificación de la acumulación de NSP3 determinada por densitometría del WB mostrado en B. B) WB de células BSC1 infectadas con vNSP3 induciendo con distintas concentraciones de IPTG durante 4 horas y cosechando inmediatamente o retirando el inductor durante 8 horas y cosechando. En la imagen se muestra el valor densitométrico de cada banda. C) Esquemas de los intervalos de tratamiento con distintas concentraciones de IPTG (0.02-2 mM) en las células BSC1 infectadas con vNSP3.

Al comparar los datos obtenidos por medio del Western blot para la cantidad de moléculas de NSP3 por célula y los valores obtenidos para el efecto inhibitorio de la traducción a causa de NSP3, se observó que en la condición sin maduración sin importar la concentración de NSP3, no se pudo establecer un efecto inhibitorio sobre la traducción celular. Mientras que en la condición con maduración hubo una concentración muy baja de NSP3 con 0.2 mM la cual no fue capaz de producir un efecto inhibitorio en la traducción, siendo sólo el caso de 2 mM donde se presentó inhibición de la traducción de manera similar a los datos obtenidos anteriormente (Fig. 21A).

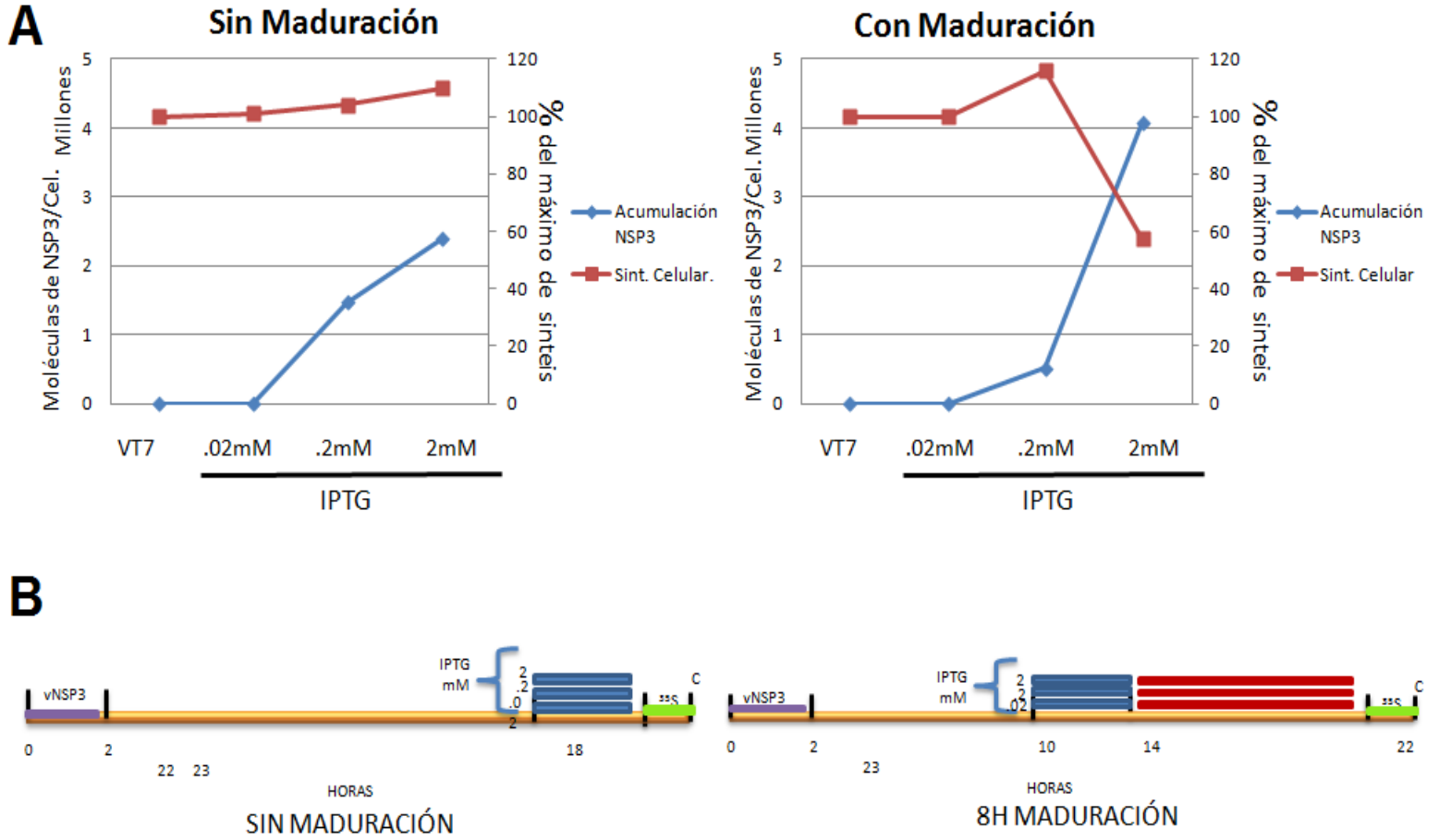


Fig.21. Comparación entre el nivel de acumulación de NSP3, con y sin maduración, y el nivel de inhibición de la traducción a distintas dosis de inducción con IPTG. A) Cuantificación de la acumulación de NSP3 por WB y el nivel de la traducción celular por marcaje metabólico con y sin tiempos de maduración en células BSC1 infectadas con vNSP3. Se indujo la expresión con distintas concentraciones de IPTG durante 4 horas y cosechando inmediatamente o retirando el inductor durante 8 horas y cosechando. B) Esquemas de los intervalos de tratamiento con distintas concentraciones de IPTG (0.02-2 mM) en las células BSC1 infectadas con vNSP3.

Relación estequiométrica entre eIF4G y el nivel de expresión de NSP3 con 8hr de maduración para establecer su función inhibitoria de la traducción.

Finalmente al comparar los múltiples experimentos donde se cuantificó la cantidad de NSP3 tomando en relación el tiempo de maduración necesario para poder establecer el máximo efecto inhibitorio de la traducción (4 h de inducción con IPTG y 8 h de maduración) se pudo determinar un valor promedio de NSP3 de 4 millones de moléculas/célula (Fig. 22).

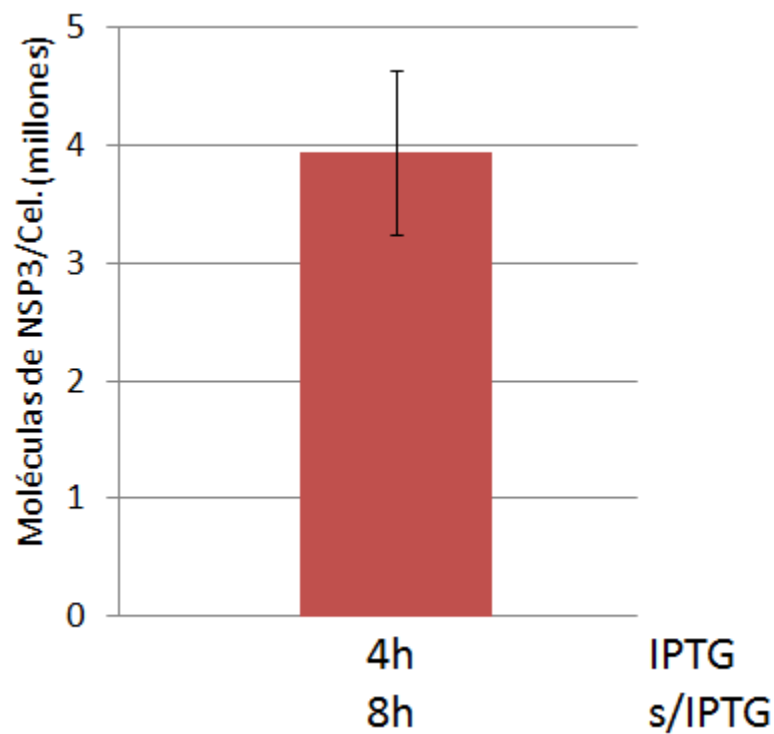


Fig.22. Determinación de la concentración molecular de NSP3 en las condiciones de máxima inhibición de la traducción y acumulación de NSP3. Cuantificación por densitometría del nivel de acumulación de NSP3 con 4 horas de inducción con IPTG 2 mM y 8 hr de maduración correspondiente a 5 repeticiones del experimento con su correspondiente desviación estándar.

Discusión

En un estudio previo en el laboratorio se determinó la magnitud del efecto inhibitorio de NSP3 sobre la traducción celular (y del virus vaccinia) usando el mismo sistema experimental que aquí usamos, es decir, en células BSC1 infectadas con el virus vaccinia vNSP3. Sin embargo, el estudio previo se realizó en condiciones hipertónicas (adicionando cloruro de sodio) durante el marcaje metabólico de proteínas, lo que favorece la traducción de ARNm con IRES, que es la condición recomendada por el grupo de B. Moss que desarrolló el sistema de expresión VOTE del virus vaccinia regulada por IPTG (Ward *et al.*, 1995). Debido al uso de condiciones hipertónicas, la magnitud del efecto inhibitorio de la traducción fue sobreestimada en el estudio anterior (Padilla-Noriega *et al.*, 2002).

En el presente estudio, por primera vez se determinó la magnitud máxima del efecto inhibitorio sobre la traducción celular que causa la expresión de la proteína NSP3 recombinante en el sistema inducible VOTE, ya que se usó la cantidad máxima del inductor durante todo el intervalo de tiempo que comúnmente se estudia en infecciones con el virus vaccinia, *i.e.* hasta las 22 h post-infección. Además de hacer notar que no se realizaron repeticiones de algunos experimentos debido a que el enfoque principal de este estudio era obtener la cantidad absoluta de NSP3 que era capaz de abatir la traducción celular, y no detallar los aspectos cinéticos que se presentan durante la infección con rotavirus, sin embargo resultó de gran importancia cada uno de los datos aportados por los experimentos exploratorios que se decidió hacer un análisis detallada de cada uno, aunque el valor prioritario de dichos experimentos se resume en el presentado en la Fig. 22. Es evidente que se llegó al nivel máximo de expresión por la súbita caída y estabilización del nivel de acumulación de NSP3, a pesar de seguir estando presente el inductor a dosis máxima. Así se demostró mediante Western blot cuantitativo que el nivel máximo de NSP3 alcanza 4

millones de moléculas por célula, y el nivel de inhibición de la traducción es de aproximadamente 60%.

El sistema de expresión VOTE de la proteína NSP3 autorregula su propia expresión en la medida en que inhibe la traducción celular y de vaccinia debido a que: *i*) eIF4GI es el blanco funcional de NSP3 y es esencial para la traducción de ARNm celulares y de vaccinia poliadenilados; *ii*) en el sistema VOTE de expresión, el ARNm de NSP3 tiene un IRES, que evita que su traducción se inhiba por su propio producto; *iii*) la transcripción del ARNm de NSP3 en el sistema VOTE depende en segunda instancia de la traducción del ARNm de la polimerasa T7, que por tener CAP y ser poliadenilado es blanco funcional de NSP3. Es esta particularidad autorregulatoria del sistema de expresión usado para autolimitarse en la medida que NSP3 alcanza su máximo efecto funcional, lo que nos permite determinar *in vivo* la relación estequiométrica entre NSP3 y su blanco funcional que es eIF4GI. También debido a que la expresión de eIF4GI tiene un IRES celular en su ARNm, su expresión no debe ser afectada por la sobreexpresión de NSP3 (Prevot *et al.*, 2003). Estas condiciones nos permitieron correlacionar el nivel conocido de eIF4GI con el nivel máximo de expresión de NSP3 necesario para inhibir su función, y que resultó ser de 4 millones de moléculas por célula de NSP3 por 2 millones de moléculas de eIF4GI, es decir una estequiometría sugerida en condiciones funcionales *in vivo* de 2:1 (Tabla 1 y Fig. 22). Este resultado apoya a que la forma funcional de NSP3 para interactuar con eIF4GI es dimérica, y sugiere que la forma funcional de eIF4GI es monomérica. Este resultado es novedoso porque no hay datos en la literatura sobre el estado oligomérico de eIF4GI, excepto evidencia negativa en el sentido de no haberse indentificado dominio alguno de dimerización. Cabe preguntar porque la proteína NSP3 funcional en su forma dimérica tiene dos dominios de unión a eIF4G, pero posiblemente sólo utiliza uno. En este sentido, proponemos que NSP3 forme complejos

multiproteicos con eIF4GI y con otras proteínas como RoXaN que son incompatibles por impedimento estérico con una estequiometría de 1:1 de un dímero de NSP3 con dos moléculas de eIF4GI.

Al estudiar la cinética de expresión de NSP3 durante un lapso de 20 horas, pudimos observar que la inhibición de la traducción a causa de NSP3 presenta un retardo en el tiempo, encontrando que en tiempos tempranos (0.5- 8 h) la inhibición de la traducción no ocurre, hecho que fue sorprendente porque a las 8 hr de inducción con IPTG, se alcanza el máximo nivel de acumulación de NSP3, pero no ocurre inhibición de la traducción sino hasta las 16 horas (8 horas después), en donde el nivel máximo de inhibición era del 60% del total (Fig. 11). Es decir que en este estudio se detectó un retardo de 8 hrs después de alcanzar el máximo nivel de acumulación de NSP3 para que se establezca el máximo nivel inhibitorio de la traducción.

El retardo en la aparición del efecto inhibitorio de la traducción de NSP3 coincide con hallazgos recientes, donde se menciona que existe una interacción de NSP3 con la chaperona HSP90, la cual es necesaria para poder dimerizar y hacer funcional a NSP3 (Dutta *et al* 2011.). Además de saberse que HSP90 para poder cumplir su función requiere de hidrolizar ATP, proceso que puede requerir un tiempo considerable para poder ayudar a la modificación estructural de sus proteínas blanco. En estudios de traducción *in vitro* fueron necesarios 30 minutos para que aparezca la forma dimerica de NSP3 en presencia de HSP90. Sin embargo, los estudios de expresión *in vitro*, no se encuentran limitados por la concentración de los componentes a analizar, por lo que no son directamente comparables con estudios *in vivo* para obtener el óptimo en su funcionalidad. En nuestro modelo de estudio *in vivo*, en donde los componentes a analizarse se encuentran compitiendo por la maquinaria de traducción sugiriendo una dinámica distinta a la que sucede *in vitro* (Chung & McCrae 2011). Aunado a que el mensajero correspondiente a HSP90 puede sufrir

las consecuencias de ser reprimida en su expresión a causa de la presencia de NSP3 en la célula, lo que complicaría aun más la disponibilidad de esta proteína para interactuar con los monómeros de NSP3 y dimerizarlos en un tiempo corto. Consistentemente con este retardo de 8 h para alcanzar funcionalidad plena de NSP3, en nuestro estudio no se encontraron formas diméricas de esta proteína en tiempos tempranos, sino que comienzan a aparecer hasta las 4 horas de inducción con IPTG y alcanzan su mayor acumulación a partir de las 8 horas (Fig. 13). Esta diferencia en el tiempo de aparición de la forma dimérica reportado por Dutta et al. 2011 y el que nosotros encontramos, se puede deber a que bajo condiciones de estrés y en competencia, la capacidad de HSP90 por dimerizar a NSP3 pueda tardar más que en lo ocurrido en *in vitro*.

El modelo propuesto actualmente por el cual NSP3 puede inhibir la traducción celular propone que NSP3 se une a eIF4GI en el mismo sitio que su homólogo PABP y lo desplaza por su mayor afinidad a eIF4GI, lo que previene la circularización de los ARNm celulares (Becker, 2009). Este modelo supone que sólo se requiere de una molécula de eIF4GI para poder llevar a cabo la circularización de los ARN, de tal forma que por dímero de NSP3 (dado que esta es su forma funcional) se inactiva funcionalmente una molécula del factor de iniciación. El retardo en la aparición del efecto funcional inhibitorio de la traducción de NSP3 que encontramos en este estudio junto con el hallazgo de Dutta et al. 2011, de que HSP90 es necesaria para la dimerización de NSP3, coinciden en el sentido de que en el establecimiento del efecto inhibitorio máximo de la traducción de NSP3 correlaciona con la aparición máxima de dímeros de NSP3, todo en conjunto sugiere que NSP3 requiere ser dimérica para inhibir la traducción celular. Por otro lado, aunque en nuestros resultados el máximo nivel de la inhibición de la traducción fue sólo del 60% del total de la traducción, esto muy probablemente se deba a la presencia de otros componentes de la familia del factor eIF4G, como son eIF4GII, DAP5 y Paip1 (Ramirez-Valle *et*

al., 2008). eIF4GII no ha sido estudiada a fondo, pero se sabe que aunque se encuentra en una menor proporción en relación de eIF4GI (<15%), presenta posiblemente las mismas funciones que eIF4GI, aunque sólo tengan una identidad del 46%. No se puede descartar que eIF4GII en condiciones de estrés a causa de la infección por rotavirus, suplante parcialmente a eIF4GI en su función. Aunado a esto, DAP5 se ha observado que es esencial para la sobrevivencia de la célula tanto en condiciones de estrés como sin ellas, y que la vía que regula su expresión es distinta que la que presenta eIF4GI. Además de que se ha descrito que DAP5 lleva a cabo el proceso de la traducción de una forma independiente de CAP, mediada por IRES y sólo en ciertos mensajeros celulares, entre los que pueden estar implicadas proteínas del ciclo celular, o sobre la regulación de la muerte celular. Sugiriendo que esta vía de traducción, distinta a la que presenta eIF4GI, esté jugando un papel importante durante una infección por rotavirus (Lieberman *et al.*, 2009; Ramirez-Valle *et al.*, 2008).

Los datos encontrados al expresar NSP3 con una menor dosis de IPTG en su función inhibitoria de la traducción fueron sorprendentes para nosotros, ya que esperábamos que a concentraciones menores a 2 mM, la inhibición de la traducción fuese aun considerable, hecho que no sucedió así ya que no hubo inhibición de la traducción con IPTG 0.2 mM. No obstante, los resultados más interesantes se obtuvieron a partir de permitir la maduración de la proteína, retirando el inductor durante 8 horas, ya que en la condición de inducción con IPTG 0.2 mM, la concentración encontrada de NSP3 durante el pulso de 4 horas con el inductor correspondía aproximadamente a 1.5 millones de moléculas, mientras que luego de transcurrido el tiempo de maduración de 8 h disminuyó a 500 mil moléculas (Fig.21), lo que posiblemente se pueda deber a una degradación de la proteína que no es evidente en la condición de 2 mM, ya que en esta la inducción está saturada.

En este estudio se exploró la posibilidad de revertir la inducción en el sistema de expresión VOTE, retirando el inductor IPTG. Usando una cantidad elevada del inductor (2 mM), no se logró revertir significativamente la síntesis de la proteína NSP3, ya que se alcanzaron niveles similares de síntesis y acumulación de NSP3 al inducir solo 4 h y retirar el IPTG durante 12 horas, en comparación con la condición sin retirar el inductor. En contraste, usando 10 veces menos inductor (0.2 mM) durante 4 h y retirándolo durante 8 horas se redujo el nivel de acumulación de NSP3 en dos tercios, de 1,500,000 moléculas por célula a 500,000 moléculas por célula. Considerando la vida media de NSP3 que previamente se determinó en el laboratorio usando el sistema VOTE (Pina-Vazquez *et al.*, 2007), que es de 200 minutos, en las 2.4 vidas medias que transcurrieron durante las 8 h de “maduración” sin IPTG se esperaba reducir el nivel de acumulación de NSP3 de 1,500,000 moléculas por célula a solamente 285,000 (un 19%). Es posible que el exceso de NSP3 detectado, de 215,000 moléculas por célula se deba a que aun con una dosis reducida de IPTG de 0.2 mM no se logra revertir la inercia de síntesis de NSP3 al retirarlo durante 8 h. Aun con esta limitación experimental, al menos el 66% de NSP3 se degradó en 8 horas y más probablemente hasta el 81% de esta proteína se degradó en este intervalo de tiempo. La aportación de este estudio, junto con el reciente hallazgo de que NSP3 monomérica es susceptible a degradación por el proteasoma, mientras que la forma dimérica es más resistente a degradación (Dutta *et al.*, 2011), es que la magnitud de la degradación por el proteasoma de la forma monomérica de NSP3 es muy elevada (Fig. 23). La inestabilidad intrínseca de NSP3 seguramente también es un factor durante el elevado tiempo que en este estudio se encontró que se requiere para que establezca su efecto inhibitorio de la traducción (Fig. 24).

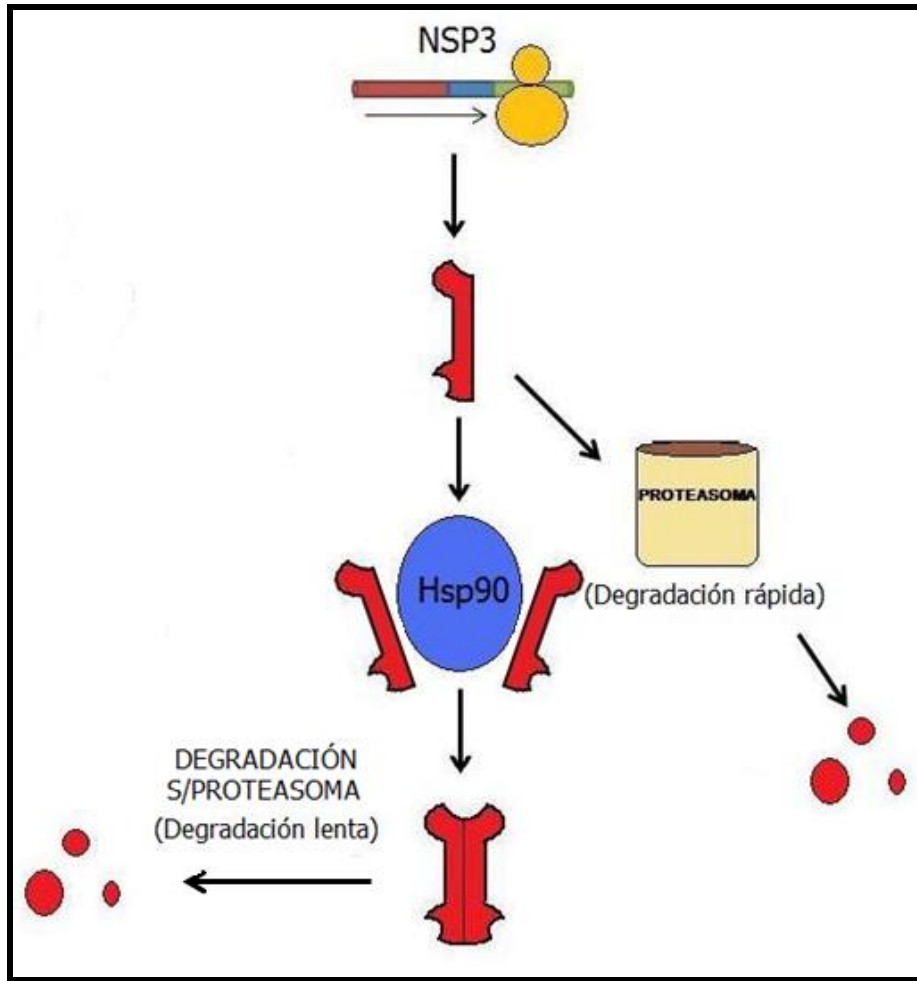


Fig.23. Dinámica de síntesis y degradación de NSP3. Modelo de la secuencia de eventos en el proceso de maduración de NSP3 en una infección por rotavirus.

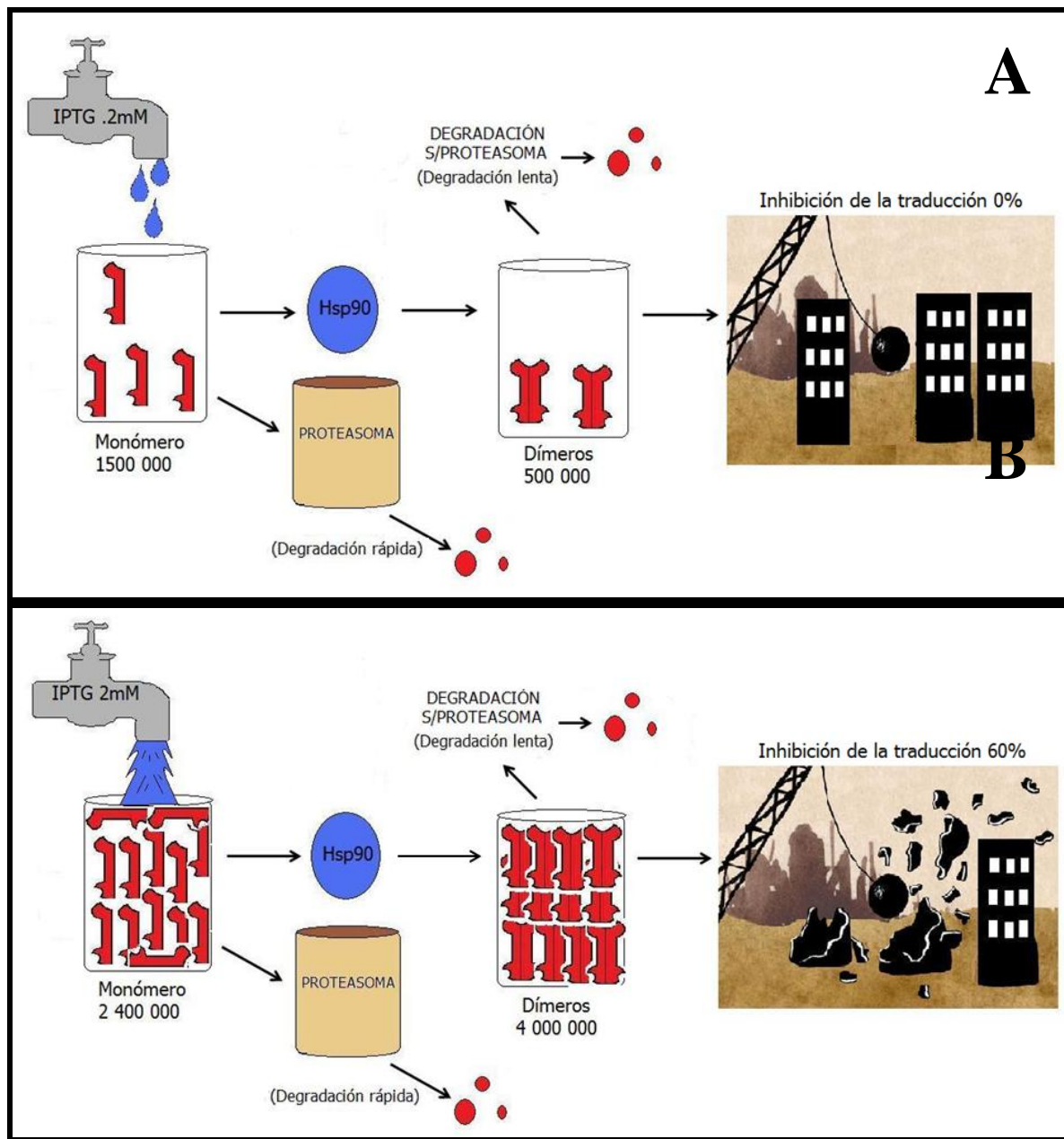


Fig.24. Modelo de la dinámica de la expresión y degradación de NSP3 a distintas dosis de IPTG. A) Modelo de la acumulación vs degradación de NSP3 a concentraciones bajas de IPTG, así como su efecto inhibitorio de la traducción. B) Modelo de la acumulación vs degradación de NSP3 a concentraciones altas de IPTG, así como su efecto inhibitorio de la traducción.

En el presente estudio se exploró la dinámica de síntesis y degradación de NSP3 expresada en un sistema inducible del virus vaccinia (sistema VOTE), sin embargo no se investigaron ampliamente los distintos parámetros del sistema: concentración de inductor, tiempo post-infección de adición del inductor, y tiempo post-infección de eliminación del inductor. Tampoco se hicieron repeticiones de las condiciones usadas que nos permitieran conocer las desviaciones estándar en cada condición, excepto para la condición 4 horas de inducción con máxima dosis de inductor seguidas de 8 horas de maduración, que fue la condición seleccionada para determinar el máximo efecto inhibitorio sobre la traducción por NSP3. Debido a estas limitaciones, es necesario un análisis detallado y no solamente exploratorio para conocer la dinámica de síntesis y degradación de NSP3

Todos estos resultados encontrados en el estudio sirven para poder entender desde un punto poco abordado en biología, como es la estequiometría, la función de NSP3 en su papel inhibitorio de la traducción celular así como contribuir al entendimiento en los paradigmas por los cuales rotavirus puede infectar y replicarse en una célula. Además de estas aportaciones también se puede asociar desde un nivel más general de la traducción celular como puede ser la importancia de las isoformas de eIF4G en la traducción, la forma oligomérica de eIF4GI, la cual hasta el momento no se ha podido determinar por otros métodos, la relevancia de la vía del proteasoma en el nivel de expresión de NSP3, y la cinética del plegamiento de NSP3 por la chaperona HSP90, entre otros posibles participantes celulares.

Conclusiones

La estequiometría sugerida entre NSP3-eIF4G de 2:1 que se obtuvo en este estudio al alcanzar el nivel máximo de expresión de NSP3 es consistente con la noción de que basta un dímero de NSP3 para inactivar la función de un monómero de eIF4GI. El estado oligomérico de eIF4GI muy probablemente es monomérico. El retardo entre el tiempo de inducción con IPTG para lograr el nivel máximo de acumulación de NSP3 y el nivel máximo de inhibición de la traducción es consistente con el retraso reportado para su dimerización *in vitro*, dependiente de Hsp90 (Dutta et. al. 2011) el cual en este estudio corresponde a 8 hr. Existe una importante dinámica de degradación de la proteína que puede ocurrir por dos vías, una dependiente del proteasoma y una independiente de ella, las cuales pueden estar afectando los niveles moleculares de NSP3 y por ende de su función inhibitoria de la traducción.

Perspectivas

- Realizar repeticiones de cada uno de los experimentos realizados en este estudio, para confirmar los resultados obtenidos hasta el momento.
- Cuantificar la cantidad absoluta de la proteína eIF4GI y NSP3 en células BSC1 infectadas con el virus vaccinia vNSP3 y rotavirus RRV por medio de WBC. Así como determinar el efecto inhibitorio de la traducción al infectar con rotavirus RRV para complementar y sustentar el enfoque estequiométrico entre NSP3 y eIF4GI.
- Determinar el papel que juega la chaperona HSP90 en el establecimiento del efecto inhibitorio de la traducción de NSP3, en células BSC1 infectadas con el virus vaccinia vNSP3, inhibiendo a HSP90 con la droga 17DMAG en presencia o ausencia del inhibidor del proteasoma MG132, ya que se sabe que 17DMAG desestabiliza a NSP3 y MG132 la estabiliza y analizar más afondo la dinámica de síntesis y degradación de NSP3.
- Realizar ensayos de coinmunoprecipitación con anticuerpos anti-NSP3 que reconozcan diferencialmente las formas diméricas y monoméricas de NSP3, así como coinmunoprecipitar con anticuerpo anti-eIF4GI con el fin de analizar la relación estequiométrica y funcional entre NSP3 y eIF4GI.

Bibliografia

- Aponte, C., Mattion, N. M., Estes, M. K., Charpilienne, A. & Cohen, J. (1993).** Expression of two bovine rotavirus non-structural proteins (NSP2, NSP3) in the baculovirus system and production of monoclonal antibodies directed against the expressed proteins. *Archives of virology* **133**, 85-95.
- Becker, M., Arold ST, Burley SK, Deo RC, Groft CM, Vitour D & Poncet D (2009).** Function and Structure of Rotavirus NSP3. *Plos Pathogens*
- Bellolell, L., Cho-Park, P. F., Poulin, F., Sonenberg, N. & Burley, S. K. (2006).** Two structurally atypical HEAT domains in the C-terminal portion of human eIF4G support binding to eIF4A and Mnk1. *Structure* **14**, 913-923.
- Bovee, M. L., Lamphear, B. J., Rhoads, R. E. & Lloyd, R. E. (1998).** Direct cleavage of eIF4G by poliovirus 2A protease is inefficient in vitro. *Virology* **245**, 241-249.
- Csermely, P., Vigh, L. & Vigh, L. (2007).** *Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks*: Springer Science + Business Media, LLC.
- Chung, K. T. & McCrae, M. A.** Regulation of gene expression by the NSP1 and NSP3 non-structural proteins of rotavirus. *Archives of virology* **156**, 2197-2203.
- Deo, R. C., Groft, C. M., Rajashankar, K. R. & Burley, S. K. (2002).** Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. *Cell* **108**, 71-81.
- Desselberger, U., Manktelow, E., Li, W., Cheung, W., Iturriza-Gomara, M. & Gray, J. (2009).** Rotaviruses and rotavirus vaccines. *British medical bulletin* **90**, 37-51.
- Duncan, R. & Hershey, J. W. (1983).** Identification and quantitation of levels of protein synthesis initiation factors in crude HeLa cell lysates by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of biological chemistry* **258**, 7228-7235.

- Duncan, R., Milburn, S. C. & Hershey, J. W. (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. *The Journal of biological chemistry* **262**, 380-388.
- Dutta, D., Bagchi, P., Chatterjee, A., Nayak, M. K., Mukherjee, A., Chattopadhyay, S., Nagashima, S., Kobayashi, N., Komoto, S., Taniguchi, K. & Chawla-Sarkar, M. (2009).** The molecular chaperone heat shock protein-90 positively regulates rotavirus infection. *Virology* **391**, 325-333.
- Dutta, D., Chattopadhyay, S., Bagchi, P., Halder, U. C., Nandi, S., Mukherjee, A., Kobayashi, N., Taniguchi, K. & Chawla-Sarkar, M. (2011).** Active participation of cellular chaperone Hsp90 in regulating the function of rotavirus nonstructural protein 3 (NSP3). *The Journal of biological chemistry* **286**, 20065-20077.
- Estes, M., Kapikian AZ (2007).** *Rotaviruses: Field's Virology*.
- Fan, S., Jia, M. Z. & Gong, W. (2010).** Crystal structure of the C-terminal region of human p97/DAP5. *Proteins* **78**, 2385-2390.
- Gray, J. & Desselberger, U. (2000).** *Rotavirus: Methods & Protocols*. Totowa: Humana Press.
- Groft, C. M. & Burley, S. K. (2002).** Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Molecular cell* **9**, 1273-1283.
- Guerrero, C. A., Bouyssounade, D., Zarate, S., Isa, P., Lopez, T., Espinosa, R., Romero, P., Mendez, E., Lopez, S. & Arias, C. F. (2002).** Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *Journal of virology* **76**, 4096-4102.
- Harb, M., Becker, M. M., Vitour, D., Baron, C. H., Vende, P., Brown, S. C., Bolte, S., Arold, S. T. & Poncet, D. (2008).** Nuclear localization of cytoplasmic poly(A)-binding protein

upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN.
Journal of virology **82**, 11283-11293.

Jackson, R. J., Hellen, C. U. & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews* **11**, 113-127.

James, V. L., Lambden, P. R., Deng, Y., Caul, E. O. & Clarke, I. N. (1999). Molecular characterization of human group C rotavirus genes 6, 7 and 9. *The Journal of general virology* **80** (Pt 12), 3181-3187.

Jayaram, H., Estes, M. K. & Prasad, B. V. (2004). Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus research* **101**, 67-81.

Kéri, G., Tóth, I. (2003). *Molecular pathomechanisms and new trends in drug research*: Taylor & Francis.

Lemay, J. F., Lemieux, C., St-Andre, O. & Bachand, F. (2010). Crossing the borders: poly(A)-binding proteins working on both sides of the fence. *RNA biology* **7**, 291-295.

Liberek, K., Lewandowska, A. & Zietkiewicz, S. (2008). Chaperones in control of protein disaggregation. *The EMBO journal* **27**, 328-335.

Liberman, N., Marash, L. & Kimchi, A. (2009). The translation initiation factor DAP5 is a regulator of cell survival during mitosis. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **8**, 204-209.

Lopez, S. & Arias, C. F. (2004). Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends in microbiology* **12**, 271-278.

Man, T. K., Li, Y., Dang, T. A., Shen, J., Perlaky, L., Lau, C. C. (2006). Optimising the use of TRIzol-extracted protein in surface enhanced laser desorption/ ionization (SELDI) analysis. *Proteome Science* **23**, 1-7.

- Marcotrigiano, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N., Burley, S. K. (1999).** Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Molecular Cell* **3**, 707-716.
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Banyai, K., Brister, J. R., Buesa, J., Esona, M. D., Estes, M. K., Gentsch, J. R., Iturriza-Gomara, M., Johne, R., Kirkwood, C. D., Martella, V., Mertens, P. P., Nakagomi, O., Parreno, V., Rahman, M., Ruggeri, F. M., Saif, L. J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J. T., Desselberger, U. & Van Ranst, M. (2011).** Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of virology* **156**, 1397-1413.
- Montero, H., Rojas, M., Arias, C. F. & Lopez, S. (2008).** Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *Journal of virology* **82**, 1496-1504.
- Morley, S. J., McKendrick, L. & Bushell, M. (1998).** Cleavage of translation initiation factor 4G (eIF4G) during anti-Fas IgM-induced apoptosis does not require signalling through the p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase. *FEBS letters* **438**, 41-48.
- Nielsen, K. H., Behrens, M. A., He, Y., Oliveira, C. L. P., Jensen, L. S., Hoffmann, S. V., Pedersen, J. S. (2011).** Synergistic activation of eIF4A by eIF4B and eIF4G. *Nucleic Acids Research* **39**, 2678-2689.
- Padilla-Noriega, L., Paniagua, O. & Guzman-Leon, S. (2002).** Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis. *Virology* **298**, 1-7.

- Parashar, U. D., Burton, A., Lanata, C., Boschi-Pinto, C., Shibuya, K., Steele, D., Birmingham, M. & Glass, R. I. (2009).** Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *The Journal of infectious diseases* **200 Suppl 1**, S9-S15.
- Patton, J. T. (1995).** Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *The Journal of general virology* **76 (Pt 11)**, 2633-2644.
- Pina-Vazquez, C., De Nova-Ocampo, M., Guzman-Leon, S. & Padilla-Noriega, L. (2007).** Post-translational regulation of rotavirus protein NSP1 expression in mammalian cells. *Archives of virology* **152**, 345-368.
- Piron, M., Delaunay, T., Grosclaude, J. & Poncet, D. (1999).** Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *Journal of virology* **73**, 5411-5421.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J. & Poncet, D. (1998).** Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *The EMBO journal* **17**, 5811-5821.
- Prevot, D., Darlix, J. L. & Ohlmann, T. (2003).** Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **95**, 141-156.
- Qin, Q., Carroll, K., Hastings, C. & Miller, C. L. (2011).** Mammalian orthoreovirus escape from host translational shutoff correlates with stress granule disruption and is independent of eIF2alpha phosphorylation and PKR. *Journal of virology* **85**, 8798-8810.
- Ramirez-Valle, F., Braunstein, S., Zavadil, J., Formenti, S. C. & Schneider, R. J. (2008).** eIF4GI links nutrient sensing by mTOR to cell proliferation and inhibition of autophagy. *The Journal of cell biology* **181**, 293-307.

- Shaw, R., Greenberg H (1999).** *Encyclopedia of Virology*. San Diego.
- Sonenberg, N., Hershey, J. W. B., Mathews, M.B. (2001).** *Translational control of gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 1020p.
- Taraporewala, Z. F. & Patton, J. T. (2004).** Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *Virus research* **101**, 57-66.
- Torres-Vega, M. A., Gonzalez, R. A., Duarte, M., Poncet, D., Lopez, S. & Arias, C. F. (2000).** The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *The Journal of general virology* **81**, 821-830.
- Trask, S. D., McDonald, S. M. & Patton, J. T. (2012).** Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol* **10**, 165-177.
- Vende, P., Piron, M., Castagne, N. & Poncet, D. (2000).** Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *Journal of virology* **74**, 7064-7071.
- Vitour, D., Lindenbaum, P., Vende, P., Becker, M. M. & Poncet, D. (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. *Journal of virology* **78**, 3851-3862.
- von der Haar, T. & McCarthy, J. E. (2002).** Intracellular translation initiation factor levels in *Saccharomyces cerevisiae* and their role in cap-complex function. *Molecular microbiology* **46**, 531-544.
- Ward, G. A., Stover, C. K., Moss, B. & Fuerst, T. R. (1995).** Stringent chemical and thermal regulation of recombinant gene expression by vaccinia virus vectors in mammalian cells.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**, 6773-6777.

Woods, A. J., Roberts, M. S., Choudhary, J., Barry, S. T., Mazaki, Y., Sabe, H., Morley, S. J., Critchley, D. R. & Norman, J. C. (2002). Paxillin associates with poly(A)-binding protein 1 at the dense endoplasmic reticulum and the leading edge of migrating cells. *The Journal of biological chemistry* **277**, 6428-6437.