



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Papel de las proteínas ribosomales RPL11, RPS9 y el factor de inicio de la traducción eIF3 en la infección por rotavirus

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

QFB. Marco Antonio Olguín Nava

TUTOR PRINCIPAL

[Dra. Susana López Charretón](#)
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

[Dr. Ramón González García Conde](#)
[Instituto de Biotecnología](#)

[Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva](#)
[Universidad Autónoma del Estado de Morelos](#)

Ciudad de México. Septiembre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Virología Molecular del Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la supervisión de la Dra. Susana López Charretón. El proyecto contó con el apoyo del donativo IG200317 de DGAPA-UNAM. El alumno contó con la beca 432471 otorgada por CONACyT.

“If you can't fly then run, if you can't run then walk, if you can't walk then crawl, but whatever you do you have to keep moving forward.”

Martin Luther King Jr.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Virología Molecular de la Dra. Susana López Charretón y el Dr. Carlos Arias Ortiz del departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la supervisión de la Dra. Susana López Charretón.

El diseño experimental contó con la tutoría del Dr. Ramón González García Conde de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, la Dra. Susana López Charretón y el Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva ambos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Carlos Sandoval Jaime, Dr. Pavel Isa y el Dr. Tomas López por todo el apoyo y sugerencias realizadas a lo largo de este trabajo.

Al M. en C. Marco Antonio Espinoza y Q.B.P. Rafaela Espinoza por la ayuda y soporte técnico en los diferentes ensayos aquí mostrados.

Al grupo Arias-López por hacer de esta estancia una experiencia inolvidable de crecimiento profesional e interpersonal.

A Nayeli Aguilar, Alfonso Ocegüera, José Luis Martínez, Anaid Candido, Carlos Baez, Liliana Sánchez, Joaquín Moreno, Noé Arroyo y Oscar Trejo por su apoyo y amistad, gracias totales.

DEDICATORIA

A mis padres y hermano, por el apoyo incondicional. Sin ustedes nada.

A ti, que desde siempre estarás a mi lado y jamás dejaras de formar parte de mi. Me sigues haciendo tanta falta.

Dicen que no somos nada sin alguien con quien compartir. Contigo soy todo.

No habría llegado hasta acá sin todos esos amigos que me dieron una palmada, motivo, regaño y sonrisa. Llevo conmigo todo lo que me brindaron.

INDICE

Abreviaturas	6
Resumen	10
Introducción	11
1. Rotavirus: Genómica y clasificación.	11
2. Estructura y características de la partícula viral	12
3. Ciclo replicativo de Rotavirus	13
4. Una breve mirada al inicio de la traducción canónica y no canónica.	15
4.1. Traducción canónica cap dependiente con escaneo	16
4.2. Regulación del inicio canónico de la traducción	17
4.3. Traducción cap independiente mediada por IRES	18
4.4. Traducción cap independiente mediada por CITEs	21
4.5. Traducción cap independiente mediada por metilaciones (MIREs)	22
5. El factor de inicio de traducción eIF3	23
6. Control del inicio canónico de la traducción por virus	26
6.1. Regulación viral de PKR	26
6.2. Regulación viral de eIF4F	27
6.3. Regulación de proteínas de unión a cola PoliA	29
6.4. Regulación viral de eIF3	29
7. El proceso de traducción durante la infección por rotavirus	30
8. Proteínas ribosomales y sus funciones extraribosomales	31
8.1. Regulación de proliferación y crecimiento celular	32
8.2. Regulación de la respuesta inmune innata	33
8.3. Control de la transcripción por proteínas ribosomales	33
8.4. Heterogeneidad de ribosomas y traducción especializada	34
8.5. Proteínas ribosomales y sus funciones en la traducción de proteínas virales	35
Antecedentes	36
Hipótesis	36
Objetivos	36
1. Objetivo general	36
2. Objetivos particulares	36
Materiales	38
Métodos	38
Resultados	42
1. El silenciamiento de eIF3b, eIF3d, RPL11 y RPS9 no compromete la viabilidad celular.	42
2. El silenciamiento de eIF3d, RPL11 y RPS9 disminuye la producción de progenie viral de rotavirus	44
3. La ausencia de eIF3a, eIF3b, RPL11 y RPS9 no tiene un efecto en la síntesis de proteínas virales de rotavirus.	45
4. La infección por rotavirus RRV no altera la localización de las proteínas RPL11 y RPS9.	49
5. La replicación del genoma de rotavirus requiere de la presencia de las proteínas eIF3d y RPL11	50
6. El silenciamiento de RPL11 inhibe la entrada de rotavirus a la célula huésped	52
Discusión	54
Conclusiones	60
Perspectivas	61
Agradecimientos técnicos	62
Bibliografía	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la partícula rotaviral	12
Figura 2. Ciclo replicativo de rotavirus	13
Figura 3. Inicio de la traducción celular canónica	17
Figura 4. Traducción no-canónica cap independiente con escaneo mediada por IRES	19
Figura 5. Traducción cap independiente mediante CITEs.	22
Figura 6. Estructura del factor eIF3 en humanos	24
Figura 7. Control del inicio de la traducción canónica por diferentes proteínas virales	27
Figura 8. Representación de los dominios de la proteína NSP3.	31
Figura 9. Funciones extraribosomales de las proteínas ribosomales y heterogeneidad ribosomal.	32
Figura 10. Tamizaje de genoma completo mediante siRNA.	36
Figura 11. Estandarización de las condiciones de 48h post-trasfección y concentración de 2.5µM siRNA para el silenciamiento de las proteínas eIF3b, eIF3a, eIF3d, RPL11 y RPS9.	43
Figura 12. Estandarización de las condiciones de 72h post-trasfección y concentración de 2.5µM siRNA para el silenciamiento de las proteínas eIF3b, eIF3a, eIF3d, RPL11 y RPS9.	44
Figura 13. Progenie viral de rotavirus durante el silenciamiento de distintas proteínas.	45
Figura 14. Marcaje metabólico con azufre ³⁵ S durante la infección de rotavirus en células silenciadas.	46
Figura 15. Marcaje metabólico con azufre ³⁵ S durante la infección de rotavirus en células silenciadas.	47
Figura 16. Análisis de la cantidad de proteína viral durante el silenciamiento de distintas proteínas.	48
Figura 17. Cuantificación de la incorporación de marca radiactiva en síntesis proteica.	49
Figura 18. Localización subcelular de las proteínas RPL11 y RPS9 en células infectadas con rotavirus RRV.	50
Figura 19. Cambio en la cantidad de RNA viral durante el silenciamiento de eIF3d, RPL11 y RPS9.	51
Figura 20. Cinética de la cantidad de RNA viral durante el silenciamiento de eIF3d y RPL11.	52
Figura 21. Infectividad de rotavirus y lipofección de partículas DLPs durante el silenciamiento de eIF3d y RPL11.	53
Figura 22. Modelo del efecto del silenciamiento de las proteínas eIF3d, RPL11 y RPS9 durante el ciclo replicativo de rotavirus.	58

ABREVIATURAS

4E-BP	Proteína de unión al factor de inicio de traducción eIF4E
BSA	Albumina sérica bovina
CaMV	Virus del mosaico de la coliflor
CITEs	Elemento potenciador de traducción cap independiente
cJUN	Proteína celular que al combinarse con la proteína c-Fos, conforma el factor de transcripción AP-1
CrPV	Virus de parálisis del grillo
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol (sonda que forma complejos fluorescentes con regiones de DNA ricas en A-T)
DBA	Anemia de de Diamond-Blackfan
DLP	Partícula de doble capa
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dsRNA	RNA de doble cadena
EBV	Virus de Epstein-Barr
eIFs	Factores eucariontes de inicio de la traducción
EMCV	Picornavirus de encefalomiocarditis
ETS1	Factor regulador de la transcripción ETS1
FCV	Calicivirus felino
Fli-1	Factor regulador de la transcripción Fli-1
GAIT	Complejo inhibidor de traducción activado por IFN- γ
GDP	Guanosín difosfato
GNC2	Proteína de control general no reproducible 2
GTP	Guanosín trifosfato
HA	Hemaglutinina
HMCV	Citomegalovirus humano
HNV	Norovirus humano
HPV	Virus de papiloma humano
HRI	Inhibidor mediado por hemo
HVC	Virus de la hepatitis C
IkB	Proteína Inhibidora de kB
IkkB	Proteína Cinasa kB
IFN	Interferon
IRES	Sitio interno de entrada del ribosoma
IRF	Factor de regulación de interferón
ISG	Gen estimulado por interferon
ITAF	Factores de activación <i>trans</i> de IRES
LDH	Lactato deshidrogenasa
MEM	Minimum Essential Medium
MFC	Complejo multifactorial
MIREs	Sitio de unión ribosomal inducido por metilación m ⁶ A
MOI	Multiplicidad de infección
mRNA	RNA mensajero
NES	Señal de exportación nuclear
NF-kB	Factor Nuclear kappa de Células B activas
NSP_n	Proteína no estructural de rotavirus

NS5	Proteína no estructural 5 de flavivirus.
NPC	Complejo del poro nuclear
ORF	Marco de lectura abierto
PABP	Proteína de unión a cola poliA
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PERK	Proteína cinasa similar a PKR
PIC	Complejo de pre-inicio de la traducción
PKR	Proteína cinasa R
PTB	Proteína de unión al tracto de polipirimidina
RE	Reticulo endoplásmico
RISP	Proteína de apoyo al reinicio de la traducción
RP	Proteína ribosomal
RPL	Proteínas ribosomales de la subunidad grande
RPS	Proteínas ribosomales de la subunidad pequeña
rRNA	RNA ribosomal
RRV	Rotavirus cepa <i>Simian rhesus</i>
RV	Rotavirus
SARS	Síndrome respiratorio agudo severo
SFB	Suero fetal bovino
siRNA	RNA de interferencia pequeño
SLP	Partícula de una capa
snoRNA	RNA pequeños nucleonares
TAV	Transactivador viroplasma
TC	Complejo ternario
TCA	Ácido tricloro-acético
TLP	Partícula de tres capas
tRNA	RNA de transferencia
UI	Unidades internacionales
UTR	Región no traducida de mRNA
VSV	Virus de estomatitis vesicular
VSV	Virus de estomatitis vesicular
YFV	Virus de fiebre amarilla
YLC	Núcleo tipo levadura

RESUMEN

La síntesis de proteínas es uno de los procesos celulares más relevantes debido a que permite traducir la información genética almacenada en el DNA en forma de polipéptidos funcionales que desempeña papeles importantes en todos los aspectos del ciclo celular. El inicio de la traducción es el principal paso de regulación de la síntesis proteica e involucra al menos 12 factores de inicio (eIFs), tRNAs, mRNAs y las dos subunidades ribosomales compuestas por cerca de 80 proteínas ribosomales. Durante mucho tiempo, el inicio de la traducción cap-dependiente fue el único mecanismo reconocido por el cual podía llevarse a cabo la síntesis de proteínas, sin embargo, en la actualidad se conocen al menos tres mecanismos diferentes de inicio de la traducción los cuales pueden ser utilizados y regulados de manera dependiente de la disponibilidad de factores de inicio, proteínas accesorias, estructuras presentes en los mRNAs y las condiciones celulares, a su vez nuevas teorías apuntan a un proceso de regulación de la traducción mediado por las proteínas ribosomales.

Los virus son estrictamente dependientes del aparato de traducción celular para producir las proteínas virales esenciales para su ciclo replicativo y la producción de progenie viral; por tal, alteraciones en el aparato y mecanismo de la traducción son eventos comunes durante la infección por diferentes agentes virales

Los rotavirus (RV) son la principal causa de gastroenteritis severa en niños pequeños, causando cerca de 200,000 muertes anuales en todo el mundo. Como todos los virus, RV es completamente dependiente de la maquinaria de traducción de la célula para producir las 12 proteínas virales codificadas en su genoma de dsRNA. Durante la infección viral, los rotavirus secuestran la maquinaria de síntesis de proteínas del huésped, causando una reducción importante de la síntesis de proteínas celulares; la proteína no estructural NSP3 desempeña un papel importante en este fenómeno. Esta proteína viral desplaza la interacción entre la proteína eIF4G y la proteína poli-A-binding (PABP), además induce la reubicación de PABP al núcleo donde los mRNAs celulares se hiperpoliadenilan y la salida de estos desde el núcleo se bloquea.

Mediante un tamizaje con una biblioteca de siRNAs realizado en nuestro grupo se identificaron una serie de genes necesarios para la replicación de rotavirus en cultivo celular, estos genes fueron clasificados de acuerdo a su función en diferentes grupos tales como: transporte iónico, adhesión celular, señalización célula-célula, síntesis de proteínas, etc. En el conjunto de genes relacionados con el proceso de traducción destacan una serie de proteínas ribosomales, así como subunidades de los factores de inicio de traducción eIF2, eIF3 y eIF4

En el presente trabajo evaluamos el papel de las proteínas eIF3a, eIF3b, eIF3d, RPL11 y RPS9 durante la infección por rotavirus. Los resultados encontrados permiten concluir que las proteínas eIF3d, RPL11 y RPS9 son importantes en el ciclo de replicación de rotavirus mediante diversos mecanismos: La proteína eIF3d tiene su efecto más significativo en la disminución de los niveles de RNA viral durante la infección donde su ausencia podría relacionarse con el decaimiento de los mensajeros virales o estar implicado en la síntesis de RNA viral, sin embargo, el mecanismo aún está por ser dilucidado. Para la proteína RPS9 su importancia en la replicación de rotavirus permanece siendo una incógnita, si bien observamos una disminución en la progenie viral producida no encontramos diferencia en la síntesis de proteínas virales. En el caso de la proteína RPL11, su principal efecto ocurre en las etapas tempranas de la infección donde niveles reducidos de RPL11 afectan los primeros pasos del ciclo viral causando una menor infectividad que se refleja en la disminución de la cantidad de RNA viral, pero sin alterar la cantidad de proteína viral sintetizada y permitiendo un aumento en la traducción de proteínas celulares. Aunado a la entrada deficiente de partículas virales, el silenciamiento de RPL11 podría involucrar otros procesos en el ciclo de rotavirus: por ejemplo, la síntesis de RNA viral, o la síntesis de algún factor necesario para la unión o entrada del virus a su célula huésped. Este trabajo nos permitió aprender acerca de factores traduccionales que son importantes en la infección viral. Sin embargo, queda aún por dilucidar cual es el mecanismo preciso y los factores indispensables para la traducción de las proteínas de los rotavirus.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por rotavirus (RV) ocurren repetidamente en humanos desde su nacimiento hasta la edad adulta, ocasionando desde un proceso asintomático hasta infección con diarrea severa que puede ocasionar la muerte, su propagación ocurre por vía oral-fecal. En niños menores a 5 años, rotavirus es el principal agente causal de diarrea severa y deshidratación ocasionando un estimado de 200,000 muertes alrededor del mundo en el año 2013, localizadas principalmente en países en vías de desarrollo^{1,2}.

1. Rotavirus: Genómica y clasificación.

Los rotavirus son virus no envueltos que presentan una cápside icosaédrica de tres capas dentro de la cual se encuentra el genoma viral, formado por 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) que codifica para 12 proteínas³. De los 11 segmentos de dsRNA, 10 son genes monocistrónicos es decir que son traducidos en una sola proteína, mientras que la excepción es el segmento 11 que codifica para 2 proteínas⁴.

Los mensajeros (mRNAs) virales son transcritos dentro de las partículas de doble capa (DLPs) para posteriormente ser liberados al citoplasma celular mediante un sistema de poros, en donde ocurre su traducción. Los mRNAs virales al igual que los mRNAs celulares poseen una estructura cap con la secuencia m⁷GpppG^(m)GP en el extremo 5' sin embargo, a diferencia de los mRNAs celulares no poseen una cola de poliA en su extremo 3' y en su lugar tienen la secuencia consenso GACC-3', que se encuentra presente en los 11 mensajeros.

Las proteínas virales se dividen en dos grupos: 6 proteínas estructurales (VP), las cuales forman parte de la partícula viral y 6 proteínas no-estructurales (NSP) que si bien no están presentes en el virus maduro se sintetizan en la célula hospedera durante la infección (Tabla 1)⁴⁻⁷:

Segmento codificante	Proteína	Localización	Funciones
1	VP1	Núcleo	RNA polimerasa dependiente de RNA
2	VP2	Capa Interna	Forma capa interna, interacción con VP1/VP3
3	VP3	Núcleo	Metilguaniltransferasa y 2'-5' fosfodiesterasa
4	VP4	Capa externa (espículas)	Fijación y reconocimiento celular. Se compone de VP5' y VP8'
5	NSP1	No estructural	Antagonista de INF
6	VP6	Capa intermedia	Protección, requerida para Transcripción
7	NSP3	No estructural	Regulación de la traducción celular y viral
8	NSP2	No estructural	NTPasa, forma parte del viroplasma
9	VP7	Capa externa	Protección
10	NSP4	No estructural	Viroporina, morfogénesis de TLP
11	NSP5	No estructural	Forma parte del viroplasma
	NSP6	No estructural	Forma parte del viroplasma

Tabla 1. Proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus y sus funciones principales

Los rotavirus se encuentran clasificados dentro del Grupo III (Virus de RNA bicatenario) de acuerdo a la clasificación de Baltimore y pertenecen a la familia *Reoviridae*. La clasificación serológica de Rotavirus se hace con base en la proteína VP6 y permite su división en 7 grupos nombrados desde A hasta G. Los rotavirus del grupo A, B y C son los que infectan a seres humanos, teniendo una mayor prevalencia los pertenecientes al grupo A⁸.

A su vez también existe una clasificación binaria como ocurre con el virus de la influenza, donde se toma como referencia a las proteínas VP7 (G) y VP4 (P); de acuerdo a esta clasificación existen cerca de 27 serotipos G y 35 serotipos P, siendo los más comunes en infecciones en humanos los serotipos: G1, G2, G3, G4 y G6, así como P4 y P8^{3,8}.

2. Estructura y características de la partícula viral

La partícula viral de rotavirus posee una cápside icosaédrica con 60 espículas o spikes, que está formada por tres capas concéntricas de proteínas: la capa interna o núcleo viral formada por VP2, la capa intermedia por VP6 y la capa externa por VP7 y VP4.

Existen tres tipos de partículas virales dependiendo del número de capas proteicas que posea la partícula (Figura 1):

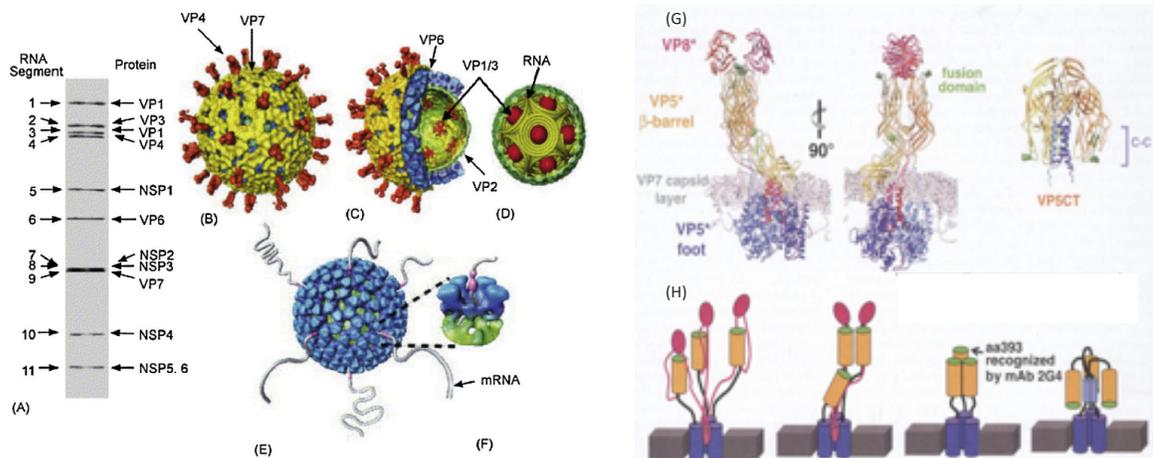


Figura 1. Estructura de la partícula rotaviral. (A) Gel PAGE donde se muestra el patrón electroforético de las proteínas virales. (B) Reconstitución de la partícula viral TLP, la proteína VP4 de las espículas se ilustra de color naranja mientras que la partícula VP7 en amarillo. (C) Corte de la capa externa permitiendo observar en azul la proteína VP6 que forma la partícula DLP, así mismo se muestran las proteínas VP2 en verde y el complejo de transcripción VP1/VP3 que forman la partícula SLP. (D) Representación de los segmentos de rotavirus dentro de VP2, los segmentos se enrollan alrededor de las proteínas VP1/VP3 como esferas rojas. (E y F) Modelo de la partícula DLP transcripcionalmente activa. (G) La imagen de la izquierda muestra una ilustración de alta resolución de los diferentes dominios y conformaciones de VP4, la imagen de la derecha muestra los dominios de VP5 procesados por tripsina, estas subunidades se asocian formando un trímero estable en forma de sombrilla, dicha forma se cree es la conformación estable posterior a la penetración membranar. (H) Diagrama representativo de los cambios mencionados en (G) en la primera imagen se observa las espículas de VP4 desordenadas en la ausencia de tripsina, a continuación la presencia de tripsina ordena las espículas, la tercera imagen muestra la VP5* que penetra la membrana (VP8* posiblemente se retenga durante la interacción del receptor en la membrana) y finalmente la última imagen representa la conformación en forma de sombrilla post-penetración membranar (Incisos (A-F) tomados de Desselberger, U. Rotaviruses. Elsevier. Incisos G-H tomados de Estes, M. K. & Greenberg, H. B. Rotaviruses. in Fields Virology. Elsevier.)

- Partícula viral de una capa o SLP (Single Layered Particle):** También es llamado *núcleo viral* o *core*, tiene forma de esfera y se compone de 60 dímeros de la proteína VP2.
Dentro de esta partícula e interaccionando de manera directa con la proteína VP2 se encuentra el *Complejo Enzimático de la Transcripción*, el cual se conforma del genoma viral en forma de RNA de doble cadena (dsRNA, del inglés double stranded RNA), de la proteína VP1 que presenta una *actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA* y de la proteína VP3 con función de *guanililmetiltransferasa*. Se ha reportado que el complejo de transcripción requiere interactuar con la proteína VP2 para poder realizar la función de replicación y transcripción del genoma viral^{5,7,9}.
- Partícula viral de doble capa o DLP (Double Layered Particle):** Es la partícula formada por dos capas de proteínas: la capa interna es el núcleo viral o SLP, mientras que la capa *intermedia* se compone de 120 trímeros de la proteína VP6 ensamblados directamente sobre VP2; la unión entre las dos capas se logra mediante la presencia de un agregado de 8 α hélices presentes en la proteína VP6 que interacciona con la proteína VP2.
La partícula DLP no es infectiva, pero durante el ciclo viral y posterior a la pérdida de la capa más externa (formada por VP7 y VP4) permite la transcripción del genoma viral, por lo que es denominada como *partícula transcripcionalmente activa*

- Partícula viral de tres capas o TLP (Triple Layered Particle):** es la partícula viral completa con un diámetro entre 75 y 100 nm, se forma por tres capas de proteínas. Esta es la partícula madura y por lo tanto es infectiva. La capa más externa de la partícula viral está formada de dos proteínas: **VP7** y **VP4**.

La proteína **VP7** es una glicoproteína que forma la capa lisa de la partícula y se encuentra en forma de 120 trímeros cuya formación es dependiente de calcio. Las TLPs poseen una serie de 132 poros o canales de tres tipos diferentes, los cuales atraviesan tanto a la proteína VP7 como a VP6. Los trímeros de VP7 se ensamblan directamente sobre la DLP interaccionando con un dominio de Barril *Beta* presente en VP6.

La proteína **VP4** que es procesada por tripsina en dos proteínas virales, VP8 y VP5, forma las 60 espículas que rodean al virus, y son las encargadas de la unión con los receptores de la célula huésped. El fragmento VP5 corresponde al “tallo” de la espícula e interacciona con las proteínas VP6 y VP7, mientras que el fragmento VP8 es la parte más distal de la espícula y se encarga de la unión con los receptores celulares. El tratamiento de las TLP con tripsina ocasiona un cambio conformacional en la proteína VP4 favoreciendo la unión y entrada de la partícula viral a la célula huésped^{3,5}.

3. Ciclo replicativo de Rotavirus

Los rotavirus, como todo parásito intracelular requieren de una célula hospedera para su replicación, por lo cual el ciclo viral o ciclo replicativo comienza con la interacción entre estas dos entidades (Figura 2). El ciclo viral se divide en varias etapas:

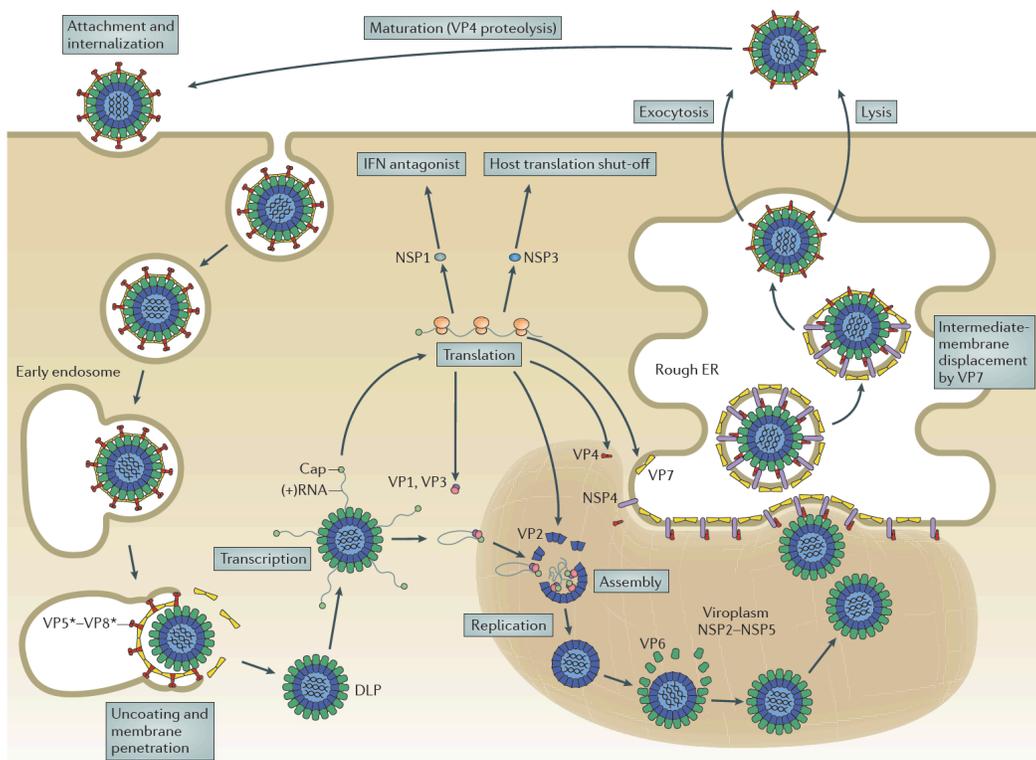


Figura 2. Ciclo replicativo de rotavirus. La replicación de rotavirus es un proceso de múltiples pasos, donde tanto proteínas estructurales como no estructurales son vitales. En la figura se observa el tránsito de las partículas de rotavirus, en los recuadros azules se marca el nombre del paso; también se representan las proteínas necesarias en cada situación. (Tomado de Trask, S. D., McDonald, S. M. & Patton, J. T. Structural insights into the coupling of virus assembly and rotavirus replication, Nat. Rev. Microbiol)

- A. Unión a la célula huésped:** El ciclo replicativo comienza con la interacción entre la partícula viral y la célula huésped, el proceso es mediado por las proteínas virales más externas: VP7 y VP4. La principal proteína de interacción es VP4, que requiere de un pretratamiento con tripsina para “activarse”, ocasionando un cambio conformacional en la proteína lo que se ve reflejado en aumento de rigidez y una mayor exposición de VP8.
- Los receptores o proteínas celulares de membrana con las cuales interaccionan las proteínas virales aún permanecen por ser descubiertos en su totalidad; sin embargo, se ha logrado identificar algunos, entre los que destacan:
- Receptores que contienen ácido siálico: interaccionan con VP8 estableciendo el principal mecanismo de unión conocido;
 - Integrinas de la familia $\alpha 2B1$: son receptores empleados en una etapa posterior a la unión con ácido siálico, la proteína viral que interacciona con ellas es VP5. Por su parte la proteína VP7 interacciona con Hsc70 y con la integrina $\alpha vB3$, sirviendo como contactos posteriores (co-receptores) entre el virus y la célula huésped^{3,4,10}.
- B. Entrada y descapsidación:** Una vez que la partícula viral se ha unido a la célula blanco ocurre el proceso de entrada mediante endocitosis, este evento es dependiente de la cepa de rotavirus que se estudie. El proceso de endocitosis es dependiente de clatrina e involucra nuevamente a la proteína viral VP4, también requiere de bajos niveles de calcio y en algunas ocasiones de la presencia de colesterol.
- Una vez dentro del endosoma, la partícula viral se encuentra a merced del proceso de maduración de endosomas, que se refiere al paso de endosomas tempranos a endosomas tardíos debido a cambios en el pH y a la disminución de los niveles de calcio. Es precisamente la reducción del calcio y la acidificación del medio dentro del endosoma lo que permite sobrevengan dos eventos importantes para rotavirus:
- La proteína VP7 se libera de la partícula viral (su estructura trimérica es dependiente de calcio) generando así la DLP,
 - La proteína VP8 sufre un rearrreglo estructural en sus tres dominios hidrófobos generando una estructura “en forma de sombrilla” que permite la salida de la DLP del endosoma hacia el citoplasma de la célula (Figura 1g y 1h)^{3,10}.
- C. Síntesis de RNA:** la generación de las DLPs conlleva a la activación de la transcripción del genoma viral, a través de cambios estructurales de las proteínas VP6 y VP2 como consecuencia de la pérdida de la proteína VP7 dependiente de calcio. Este evento permite que los mRNAs virales recién transcritos salgan de la partícula por los canales tipo I presentes en la DLP hacia el citoplasma, para cumplir dos objetivos:
- Un subconjunto será traducido en proteínas virales (etapa temprana de replicación)
 - Otra población serán utilizados como moldes para generar dsRNA genómico (etapa tardía de replicación)^{3-5,11}
- D. Traducción de proteínas virales:** La síntesis de proteínas virales es un proceso dependiente de la maquinaria celular, para lo cual rotavirus necesita secuestrar y hacer uso de dicha maquinaria con el fin de producir sus propias proteínas. Los rotavirus emplean a la proteína NSP3 para favorecer la síntesis de proteínas virales mediante la supresión de la traducción de las proteínas celulares por al menos 3 mecanismos diferentes, los cuales serán discutidos con detalle más adelante^{12,13}.
- E. Formación del viroplasma:** el proceso de traducción de los mRNA virales permite la síntesis de las proteínas NSP2 y NSP5, que interactúan con diversas proteínas celulares para dar lugar a las estructuras denominadas *viroplasma*s. Los *viroplasma*s son cuerpos de inclusión sin membrana donde se lleva a cabo la replicación, empaquetado y ensamblado de nuevas DLPs¹⁴. Las principales funciones de los viroplasma consisten en proveer un sitio ideal para la formación de DLPs y a su vez aislar a los genomas virales evitando su reconocimiento por la respuesta inmune celular^{12,13,15}.

F. Replicación y encapsidación: Una vez dentro del viroplasma, se da lugar a la formación de un complejo integrado por ssRNAs, VP1, VP2, VP3 y VP6, el cual es activo en replicación por lo que comenzará la síntesis de la cadena complementaria de RNA para dar lugar a dsRNA genómico. El mecanismo por el cual los 11 segmentos que forman el genoma del virus son encapsidados en una misma partícula viral es aún desconocido aunque se ha propuesto que el complejo VP1/VP3/VP2 pudiese estar relacionado así como secuencias no traducidas en cada segmento de RNA, similar a lo que ocurre en los virus de Influenza^{3,14}.

G. Maduración y salida: Las DLPs formadas en el viroplasma son liberadas de esta estructura y sufren un proceso de maduración en el retículo endoplásmico (RE) donde geman hacia su lumen, mediante la interacción de VP6 con la proteína no estructural NSP4 que se encuentra insertada en la membrana del RE; durante este trayecto la partícula viral adquiere una *envoltura lipídica transitoria*.

Una vez en el lumen del RE, se ensamblan las proteínas VP4 y VP7, y se pierde la envoltura lipídica para dar lugar a las TLPs. Finalmente, las partículas virales maduras son liberadas de la célula mediante lisis o por un proceso de que no ocasiona muerte celular, el mecanismo de liberación es dependiente de la línea celular y cepa viral^{3,4}.

4. Una breve mirada al inicio de la traducción canónica y no canónica.

La traducción, es el proceso mediante el cual una proteína es sintetizada empleando un mRNA como templado, se compone de 4 fases: *inicio, elongación, terminación y reciclado*¹⁶⁻¹⁹.

La síntesis proteica es el proceso metabólico que más energía consume en una célula y tiene un papel fundamental en cualquier etapa de la vida de un organismo. Para llevar a cabo la traducción de una proteína se requiere una maquinaria con alta fidelidad de síntesis, gran cantidad de insumos y energía, así como de una distribución espacial y temporal adecuada de cientos de proteínas a la vez²⁰.

Es por lo anterior que la traducción proteica requiere una regulación altamente orquestada en sus múltiples etapas, siendo el inicio de la traducción el principal punto de regulación¹⁷.

El inicio de la traducción es el proceso en el cual un mRNA se une a una serie de *Factores eucariontes de inicio de la traducción* (eIFs), que le permiten interactuar con la subunidad 40S y el tRNA-Metionina, para dar lugar a la formación de un ribosoma completo que continúe con el proceso de elongación del polipéptido^{19,21}.

La mayoría de los mRNA en eucariontes son traducidos por un mecanismo denominado "*escaneo cap-dependiente*" o "*traducción canónica*", que como se indica es dependiente de la estructura cap y requiere de al menos 11 eIFs y otras proteínas accesorias.

En condiciones de estrés, como ocurre durante las infecciones virales, la traducción celular se reduce drásticamente sin abatirse por completo; dando paso a un proceso de traducción selectiva que permite la síntesis de proteínas cruciales para la supervivencia de la célula y la recuperación post-estrés.

Lo anterior, sugiere la existencia de mecanismos alternos de traducción, los cuales difieren de manera fundamental en el proceso de inicio de la traducción, involucran la presencia de ciertas estructuras en el mRNA y necesitan diferentes factores para operar (*Tabla 2*). Algunos de estos procedimientos de inicio de traducción no canónicos son:

* "*Traducción cap-independiente*"

i) *Traducción mediada por IRES (del inglés Internal Ribosome Entry Site)*

ii) *Traducción mediada por CITEs (del inglés Cap Independent Translation Enhancer Site)*

i) *Traducción mediada por MIREs (del inglés m⁶A-induced ribosome engagement sites)*^{19,21,22}.

Inicio de traducción	Cap	Scanning	eIFs requeridos	Otras proteínas y complejos	Ejemplo de mRNA
Canónica	+	+	eIF1, eIF1A, <u>eIF3</u> , eIF5, eIF2, eIF4E, eIF4A, eIF4G	PABP, 40S, 60S	Mayoría de mRNA eucariotas
IRES 1	- *	+	eIF1, eIF1A, <u>eIF3</u> , eIF5, eIF2, eIF4F	40S, 60S e ITAFs	<ul style="list-style-type: none"> • Virus de Hepatitis A • mRNA celulares (F. transcripción, F. crecimiento, apoptosis, transducción de señales, etc)
IRES 2	-	-	eIF1, eIF1A, <u>eIF3</u> , eIF5, eIF2	40S, 60S e ITAFs	Picornavirus
IRES 3	-	-	<u>eIF3</u> y eIF2	40S, 60S e ITAFs	Virus de hepatitis C
IRES 4	-	-	Ninguno	40S y 60S	Virus de parálisis del grillo
CITE	-*	+	eIF2, <u>eIF3</u> y eIF4G	40S y 60S	APAF-1 = apoptosis
MIREs	-*	+	eIF1, eIF1A, <u>eIF3</u> , eIF5, eIF2, eIF4E, eIF4A, eIF4G	40S y 60S	HSP70

*= Presente, pero no se emplea

4.1. Traducción canónica cap-dependiente con escaneo

El inicio de la traducción cap-dependiente con escaneo (*Figura 3*) comienza con la formación del *Complejo Ternario* (TC) que se compone del factor eIF2, de GTP y del tRNA-metionina; este complejo es el encargado de la interacción codón/anticodón y su ensamblaje es regulado por el factor eIF2B que se encarga del recambio entre GDP/GTP cuando ocurre la unión entre codón/anticodón^{17,23,24}.

De manera simultánea, el factor eIF3 junto con eIF5, eIF1 y eIF1A se unen para formar el *Complejo Multifactorial* (MFC) con una alta eficiencia de unión a la subunidad ribosomal 40S, para lo cual es necesario un conjunto de ribosomas disociados en sus dos subunidades 40S y 60S. Una vez que los dos complejos TC y MFC se han formado, las proteínas eIF2, eIF3 y eIF5 sirven como puente entre los dos complejos para dar lugar al *Complejo de Preinicio 43S* (PIC 43S)^{17,19}.

Aunque se ha reportado que el complejo PIC 43S posee la capacidad de unirse directamente mRNA mediante secuencias altamente estructuradas en las regiones 5' UTR, en el modelo canónico es necesaria la acción del complejo eIF4F para que la unión del mRNA al PIC 43S sea más eficiente y estable. El complejo eIF4F se compone de varias proteínas con múltiples funciones: *eIF4A* con actividad helicasa de RNA, *eIF4B* cofactor de la *eIF4A* helicasa, *eIF4E* cuya función es la unión a la estructura cap presente en los mRNA, la proteína de unión a Poly-A (*PABP*) y por último de *eIF4G* que es el centro de nucleación del complejo.

El complejo eIF4F tiene como principales funciones: *el reconocimiento de la estructura cap presente en los mRNA celulares, el desdoblamiento de las estructuras presentes en 5' UTR preparándolo para la unión de la subunidad 40S del ribosoma y la circularización del mRNA para potenciar la traducción*. La unión entre el complejo eIF4F y el mRNA ocurre mediante el reconocimiento de la estructura cap por el factor eIF4E; a continuación este complejo eIF4F-mRNA se une con el PIC 43S debido a la interacción entre eIF3 y eIF4G, generando de esta manera el *Complejo de Preinicio 48S* (PIC 48S)^{21,22}.

El PIC 48S es el encargado de realizar el proceso de *escaneo* sobre el mRNA en busca del codón de inicio, lo cual requiere de actividad de eIF1A, eIF5, eIF3, DDX3 (helicasa con caja DEAD) y ATP para desdoblar las estructuras secundarias en la región 5'UTR. El codón de inicio generalmente es el primer triplete AUG que se encuentre en un contexto óptimo (*secuencia rica en GC con una purina en -3 y una G en +4*) aunque en la mayoría de los casos se encuentran solamente secuencias subóptimas²¹. Una vez que el codón AUG se encuentra en el sitio P del ribosoma, ocurre la unión codón/anticodón lo que ocasiona la liberación de eIF2-GDP, eIF1 y eIF5, así como la adición de eIF5B que se encarga de atraer y acoplar a la subunidad 60S para dar lugar al ribosoma completo 80S²². En este punto, el ribosoma está completo para el proceso de decodificación del mRNA y originar el polipéptido pertinente durante el proceso de **elongación** y **terminación de la traducción**.

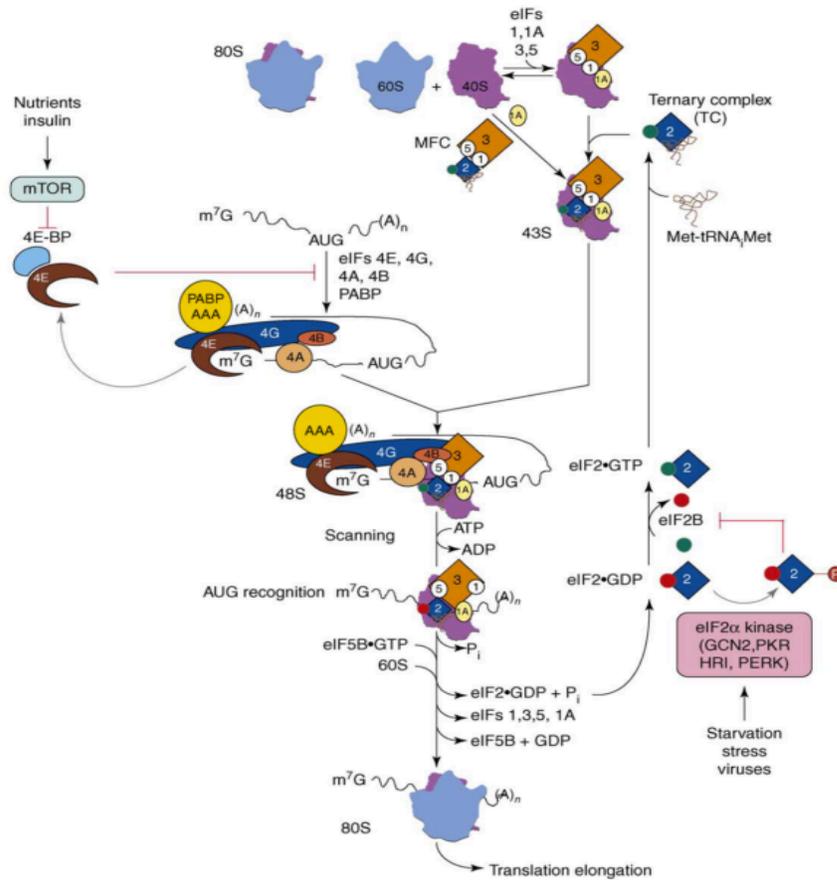


Figura 3. Inicio de la traducción celular canónica. Modelo de inicio de traducción canónica en células eucariotes. (Tomado de Hinnebusch, A. G. *eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. Trends Biochem. Sci*)

4.2. Regulación del inicio canónico de la traducción

Durante periodos de estrés celular ocasionados por deficiencia de nutrientes, infecciones virales, mal doblamiento de proteínas u otros; la célula se encuentra en la necesidad de disminuir o alterar la traducción proteica global permitiendo la conservación de nutrientes, la expresión selectiva de genes de control del ciclo celular, de la respuesta al estrés, de la respuesta inmune innata, así como también limitar la traducción de proteínas virales durante procesos de infección.

La regulación del inicio de la traducción eucariote canónico ocurre principalmente en dos niveles:

- *La fosforilación de eIF2α*, que estimula su unión con gran afinidad a la subunidad eIF2b, bloqueando el intercambio de eIF2-GDP/eIF2-GTP, el cual es el paso limitante en la formación del complejo TC¹⁹.
- *interferencia de la unión entre eIF4E con la estructura cap* mediante la proteína 4E-BP que cuando se encuentra hipofosforilada se une fuertemente a eIF4E^{22,25}.

El factor eIF2 es un heterodímero formado por tres subunidades α , β , γ ; su función principal es la unión a tRNA-met y GTP para formar el complejo ternario (TC) que servirá para la primera interacción codón-anticodón. Cuando la subunidad α de eIF2 es fosforilada funciona como un inhibidor competitivo de eIF2 β impidiendo el recambio entre GDP/GTP reduciendo la cantidad de TC formados. Los niveles fisiológicos de eIF2 α son más elevados que los de eIF2 β por lo que la fosforilación parcial de eIF2 α es suficiente para inhibir toda la proteína eIF2 β ^{22,25}. La fosforilación de eIF2 α puede ocurrir por al menos 4 cinasas diferentes dependiendo el proceso de estrés: mediante la cinasa regulada por grupo hemo "HRI" (del inglés, Heme-regulated eIF2 α kinase) que es activada por deficiencia de grupo hemo, por el tratamiento con arsenito o choque térmico; la cinasa similar a PKR llamada "PERK" (del inglés, protein kinase like PKR) la cual actúa ante estrés en el RE por proteínas mal dobladas; la cinasa de control general no reprimible 2 "GNC2" (del inglés, general control nonderepressible 2) que funciona ante deficiencia de aminoácidos; y la proteína cinasa R "PKR" (del inglés, protein kinase R) que es inducida por interferón y activada por la presencia de dsRNA en el citoplasma¹⁷.

PKR es la principal cinasa activada ante las infecciones virales, es una cinasa de serina/threonina que se induce cerca de 5 a 10 veces debido a la respuesta mediada por interferón, permite la detección de dsRNA citoplasmático producto de la replicación de virus de RNA como de DNA. Esta enzima se une al dsRNA mediante dos motivos presentes en el extremo N-terminal, provocando su dimerización y autofosforilación, activándose para llevar a cabo la fosforilación de eIF2 α ^{17,19}.

Por otra parte, eIF4E es el factor de inicio menos abundante en la mayoría de las células por lo que su regulación lo hace un blanco sencillo. El mecanismo principalmente caracterizado se refiere a las proteínas 4E-BP o proteínas de unión a 4E. Las proteínas 4E-BP se encuentran unidas a eIF4E en su estado hipofosforilado pero su hiperfosforilación por la cinasa mTOR (activada por hormonas, factores de crecimiento, presencia de nutrientes, etc.) produce la liberación del factor eIF4E permitiendo su interacción con eIF4G, dicha unión aumenta la afinidad de eIF4E para reconocer la estructura cap produciendo una estimulación de la traducción cap dependiente²⁶.

4.3. Traducción cap-independiente mediada por IRES

Durante mucho tiempo, el inicio de la traducción cap-dependiente con escaneo fue el único mecanismo reconocido mediante el cual podía llevarse a cabo la síntesis de proteínas, sin embargo, estudios sobre la traducción durante la infección por picornavirus, donde la síntesis proteica celular se encuentra prácticamente abatida, llevaron al descubrimiento de un mecanismo alternativo de inicio de la traducción. Dicho mecanismo permite la traducción sin la presencia ni el reconocimiento de la estructura cap: la subunidad 40S ribosomal se une de manera directa o con ayuda de proteínas accesorias (ITAFs, del inglés internal translation associated factors) al mRNA^{27,28}.

Las regiones en el mRNA que dirigen la unión a la subunidad 40S fueron llamadas Sitios Internos de Entrada del Ribosoma o IRES (del inglés Internal Ribosome Entry Site), se identificaron por primera vez en los mensajeros de Poliovirus para a continuación ser encontrados en otros virus y posteriormente también en mRNA celulares²⁷.

De manera general los IRES virales tienen las siguientes características: se encuentran generalmente en las regiones no traducidas (UTR) en el extremo 5' (*aunque en algunos como el IRES del virus de hepatitis C involucra una región codificante*²⁹) donde la subunidad 40S se une inicialmente, son altamente estructurados, son largos (más de 50 pb), no tienen cap en el extremo 5' (o no lo usan) y presentan múltiples marcos de lectura abiertos (ORFs)¹⁹.

Cuando se compararon los diferentes IRES identificadas (*Figura 4*), se encontró una gran divergencia estructural y de las estrategias tan diferentes del mecanismo de acción que dirigían; de tal manera que en la actualidad los IRES se clasifican en 4 grupos de acuerdo a varios criterios:

- Estructura y secuencia,
- Localización en relación al codón de inicio,

- Actividad en los diferentes tipos celulares, y
- Las proteínas accesorias que requieren, incluyendo tanto factores canónicos como de ITAFs. (De manera general a mayor grado de complejidad en la estructura secundaria menor requerimientos de eIFs o ITAFs)²².

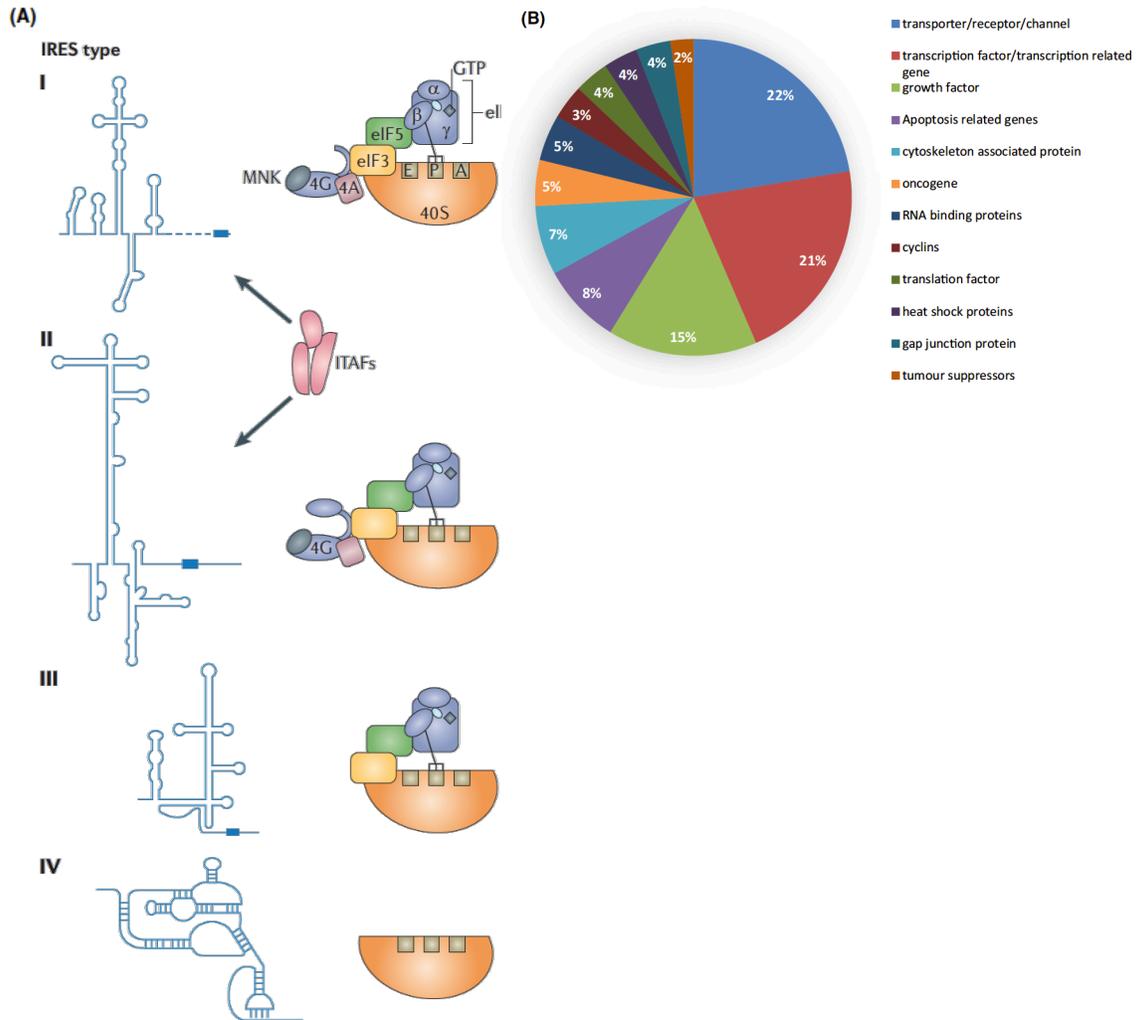


Figura 4. Traducción no-canónica cap independiente con escaneo mediada por IRES. (A) Estructuras IRES y factores necesarios para su traducción. Se muestran las estructuras representativas de los cuatro diferentes tipos de IRES conocidos, así mismo se muestra un esquema de las proteínas celulares (eIFs, cinasas, subunidad 40S ribosomal, etc) y las proteínas ITAF necesarias para el inicio de la traducción. **(B) Distribución de los IRES conocidos presentes en mensajeros celulares.** De acuerdo a lo descrito en la literatura la mayoría de los mensajeros celulares que contiene IRES codifican para factores de transcripción, proteínas de transporte, receptores o factores de crecimiento. (Inciso A) Tomado de Walsh, D. & Mohr, I. *Viral subversion of the host protein synthesis machinery. Nat. Rev. Microbiol.* Inciso B) Tomado de Lacerda, R., Menezes, J. & Romão, L. *More than just scanning: the importance of cap-independent mRNA translation initiation for cellular stress response and cancer. Cell. Mol. Life Sci.*

Los IRES de los grupos I y II abarcan todos aquellos mRNAs con una estructura parecida al IRES de poliovirus, son medianamente estructurados y tienen la característica de múltiples factores de inicio de la traducción. A pesar de sus diferencias estructurales, los IRES del grupo I y II requieren de los factores eIF1A, eIF3, eIF5, eIF4A, eIF4B y eIF4G* proteolíticamente cortado que les sirve para atraer junto con eIF3 a la subunidad 40S ribosomal.

Los IRES del grupo I realizan el proceso de escaneo en busca del codón de inicio a diferencia de los IRES del grupo II que no requieren dicho proceso; ambos grupos requieren la actividad de ITAFs, que son proteínas de unión a RNA que permiten estabilizar y alterar la estructura ternaria del IRES, promoviendo su interacción con la subunidad 40S o con eIFs. Entre los principales ITAFs empleados por estos grupos de IRES destacan el autoantígeno La, las proteínas de unión al tracto de polipirimidina (PTB), ITAF45, la proteína 2 de unión a polyC (PCBP2) y la proteína DAP5^{30,31}.

El autoantígeno La fue la primera proteína ITAF identificada, la cual se requiere para la traducción mediada por los IRES de HCV y de poliovirus, se ha determinado que La autoantígeno sirve como auxiliar en la unión de 40S a la secuencia IRES por lo que su ausencia o mutaciones bloquea la formación del complejo 80S inhibiendo la traducción de proteínas virales y por tal la replicación de poliovirus y HCV³². Por su parte, DAP5 es una proteína homóloga a eIF4G1 en sus sitios de unión a eIF3 y eIF4A, pero no posee el sitio de unión a eIF4E por lo que anteriormente se creía que era un regulador negativo del inicio de la traducción formando complejos de inicio no funcionales; sin embargo, posteriormente se identificó su actividad reguladora ITAF en la traducción de mRNA celulares mediados por IRES relacionados con los procesos de apoptosis, diferenciación celular y regulación del ciclo celular como los genes Bcl-2 y p53^{30,33}.

El grupo III de IRES está representado por el mRNA del virus de la hepatitis C (HCV), el cual posee una secuencia altamente estructurada y solo requiere de la presencia de dos factores de inicio: eIF2 y eIF3 (aunque se puede incluir en ocasiones a eIF5B). El mecanismo de inicio de traducción ha sido dilucidado parcialmente: primero la estructura IRES forma un complejo binario con la subunidad 40S ribosomal gracias a su unión directa con proteínas ribosomales y a la interacción de la secuencia GGG presente en el loop III d en el IRES con el loop ES7 presente en el rRNA 18S. A continuación, el complejo ternario TC se une al mRNA mediante eIF3, lo anterior ocasiona un cambio conformacional que posiciona el dominio II del IRES en la proteína ribosomal RPS5, estableciendo una interacción codón-anticodón, desdoblado una “estructura de tallo” o stem loop y localizando la secuencia codificante en el canal de unión a mRNA en el ribosoma^{17,30,31}.

Finalmente, el grupo IV se caracteriza por IRES con estructuras complejas que le permiten la interacción directa con la subunidad 40S sin necesidad de ningún eIFs ni ITAFs; de manera general la unión del IRES con la subunidad 40S genera un cambio conformacional que facilita la interacción con la subunidad 60S para dar lugar al ribosoma completo 80S. El IRES IV del virus de la parálisis del grillo (CrPV), otro picornavirus, no necesita del proceso de escaneo a diferencia de los demás grupos debido a que contiene una estructura en forma de tRNA que permite el posicionamiento del complejo de preiniciación y además favorece su traducción en condiciones de inhibición por fosforilación de eIF2 α ^{17,30}.

Un caso muy particular se presenta en la familia de *Flavivirus* formada por virus que presentan un genoma de una sola cadena y polaridad positiva “ssRNA” como el virus de hepatitis C (HCV), virus de Zika (ZIKV), dengue (DENV), etc. Dentro de esta familia se diferencian dos grupos debido a sus mecanismos de inicio de la traducción: el primer grupo se constituye por virus del género *Hepacivirus* (HCV), *Pestivirus* (virus de la diarrea bovina) y *Pegivirus* (virus de Hepatitis G) transmitidos por contacto con sangre y los cuales son traducidos mediante estructuras IRES localizadas en sus secuencias 5'UTR, mientras tanto un segundo grupo está formado por todos aquellos *flavivirus* que son transmitidos por artrópodos (*Arbovirus*) incluyendo al virus del dengue, Zika, virus de la fiebre del Nilo (WNV), etc. cuya traducción es cap-dependiente. Sin embargo, estudios recientes demostraron que, aunque los genomas de dengue y Zika son traducidos por un mecanismo cap dependiente, poseen en su extremo 5'UTR estructuras IRES que permiten su traducción cap independiente en células de mamífero, pero no en células de mosquito.

Lo anterior resulta muy interesante puesto que podría representar un mecanismo de regulación y control del inicio de la traducción en mensajeros virales dependiente de las condiciones celulares³⁴.

Aunque en un inicio el descubrimiento de nuevas estructuras IRES solo se limitó a mensajeros virales posteriormente comenzó la búsqueda de IRES en mensajeros celulares que llevaría a la identificación de un conjunto de mensajeros celulares que poseen estructuras IRES, los cuales se localizan en el extremo 5'UTR y pertenecen al grupo I (no son altamente estructurados, requieren el proceso de escaneo del codón AUG y necesitan múltiples factores de inicio). Los mensajeros celulares que tienen estructuras IRES forman parte de un grupo muy específico que involucra cerca del 10-15% del mRNA total y han sido clasificados de acuerdo a su función en familias de genes (*Figura 4*):

- 1) Transporte, canales, receptores y proteínas de transducción de señales (22%)
- 2) Factores de transcripción (21%)
- 3) Factores de crecimiento (15%)
- 4) Genes relacionados a apoptosis (8%)
- 5) Factores de traducción (4%)²².

La presencia de estructuras IRES en mensajeros celulares que poseen la estructura cap, podría servir de mecanismo alternativo al inicio de la traducción canónica en condiciones de estrés, como se ha propuesto para los IRES encontrados en los mensajeros de Dengue y ZIKV.

Sin embargo, el inicio de la traducción mediado por las estructuras IRES en mensajeros celulares permanece controversial aún hoy en día debido a principalmente que la identificación de estructuras IRES resulta complicada como causa de una amplia variedad de estructuras, la diversidad de mecanismos, así como las escasas pruebas para identificarlos.

Contrario a lo anterior, los IRES virales son reconocidos como un mecanismo de inicio de traducción efectiva, se han identificado sus elementos base, las proteínas que requieren e incluso estudios recientes en los IRES de HCV y CrPV mediante el uso de métodos bioinformáticos, bioquímicos y microscópicos novedosos ha permitido identificar nuevos datos sobre los mecanismos de cómo estos IRES manipulan el aparato de traducción. Este conocimiento y técnicas podrían aplicarse en un futuro a los IRES celulares con el fin de dilucidar los procesos alternos de inicio de la traducción^{27,30,31}.

4.4. Traducción cap-independiente mediada por elementos potenciadores de traducción cap-independientes (CITEs).

El inicio de la traducción mediada por *Elementos potenciadores de traducción cap-independientes* o *CITEs* (del inglés, cap independent translation elements) representa un segundo mecanismo de inicio de síntesis proteica cap-independiente, los CITEs al igual que los IRES fueron identificados por primera vez en infecciones virales, particularmente en virus de plantas.

Los CITEs son secuencias presentes en el extremo 5'UTR o en el 3'UTR donde el ribosoma se une directamente, en el mecanismo de inicio de la traducción mediado por CITEs no existe un proceso de reconocimiento de la estructura cap en el extremo 5' por el factor eIF4E y requieren del proceso de escaneo en busca del codón de inicio³⁰.

A pesar de que aún existe controversia si los CITEs representan un mecanismo diferente o son simplemente una variación de los IRES, las principales diferencias entre estos dos es que los IRES solamente se localizan en el extremo 5'UTR mientras que los CITEs se pueden encontrar en los extremos 5'UTR o 3'UTR; a su vez el mecanismo mediado por CITEs requiere un extremo 5'UTR libre y emplea el proceso de escaneo para localizar el codón de inicio AUG, en tanto los IRES pueden llevar a cabo la traducción sin necesidad de escaneo y aunque se encuentren dentro de mensajeros policistronicos, de hecho esta característica representa la base de detección de IRES.

Debido a que la mayoría de las estructuras IRES propuestas en los mRNA celulares han fallado los ensayos bicistronicos que permiten identificarlos, la traducción celular medida por CITEs comienza a cobrar importancia^{17,30,31}. Se ha sugerido que los mRNA celulares que poseen CITEs emplean la traducción cap-dependiente durante condiciones normales de la célula y que cambian a un inicio de traducción cap-independiente mediado por CITEs cuando existen procesos de estrés celular. Durante estos procesos que

pueden involucrar: la fosforilación de eIF2a o la inhibición del reconocimiento de la estructura cap por eIF4E, los CITEs reclutan algunos factores como eIF3 o eIF4G que le permiten la unión con la subunidad 40S y más importante aún, el uso de marcos de lectura alternos (uORFs) (Figura 5)³⁰.

El ejemplo más típico de traducción celular mediada por CITEs es el del mRNA APAF-1 que tiene importantes funciones en la apoptosis inducida por lesiones, por lo tanto los CITEs al igual que los IRES podría representar mecanismos de síntesis proteica alterna durante procesos de estrés celular²².

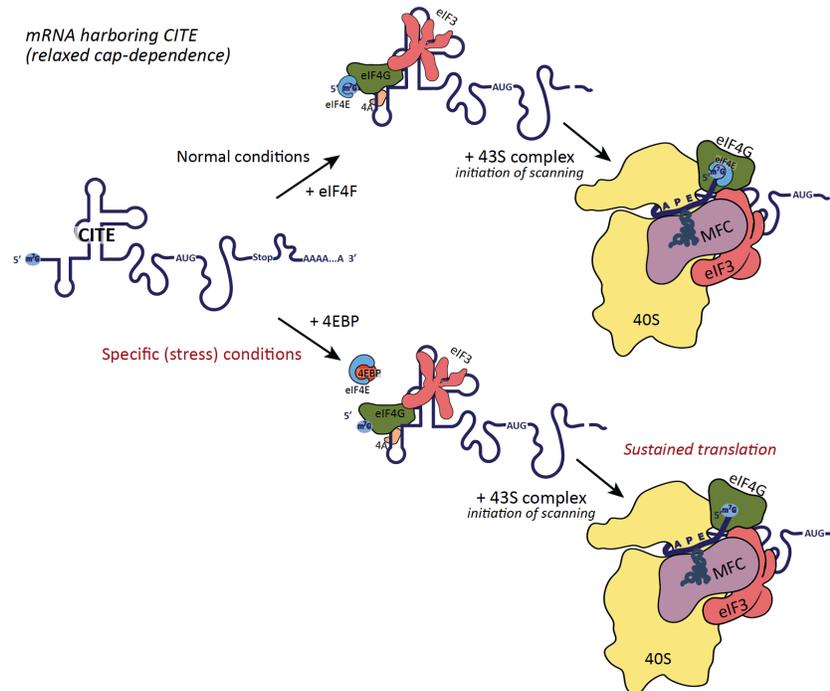


Figura 5. Traducción cap independiente mediante CITEs. Solo los mRNA celulares que poseen estructuras CITEs, son capaces de traducirse vía inicio cap independiente durante condiciones de estrés específica, aunque en una menor cantidad comparada con el inicio de traducción cap dependiente en condiciones normales. (Tomado de Shatsky, I. N., Terenin, I. M., Smirnova, V. V. & Andreev, D. E. Cap-Independent Translation: What's in a Name? Trends Biochem. Sci).

A diferencia de los CITEs celulares que se ubican en el extremo 5'UTR, los ejemplos de CITEs virales se encuentran en el extremo 3'UTR y pertenecen en su mayoría a virus de plantas con genomas de una sola cadena positiva de RNA. Los mRNAs de estos virus no poseen la estructura cap ni la cola PoliA, y para su traducción hacen uso de CITEs en el extremo 3'UTR para unir de manera directa o vía eIF4G a la subunidad 40S, su localización en el extremo 3' requiere de interacciones RNA-RNA con el extremo 5' para colocar al ribosoma cerca del codón de inicio (escaneo dependiente).

El virus de la cebada enana amarilla posee un CITE en el extremo 3' y una región complementaria al extremo 5' para dar lugar a mRNA circular, reclutando la subunidad 40S en el extremo 3' pero interactuando en el extremo 5' cercano al codón de inicio^{17,19,30}.

La presencia de IRES y CITEs en mensajeros celulares y virales que además tienen una estructura cap plantea la interrogante de la función de estas estructuras, qué condiciones se requieren para que la traducción cap-dependiente o la traducción cap-independiente sean seleccionadas y cuáles son las características que poseen los mRNAs que son traducidos más eficientemente por un mecanismo u otro.

4.5. Traducción cap-independiente mediada por metilaciones (MIREs)

La N⁶-metiladenosina (m⁶A) es una modificación reversible presente en múltiples mRNA celulares, que se ve aumentada en ciertos mensajeros durante condiciones de estrés como el ocasionado por choque térmico; durante dicho estrés la traducción cap-dependiente se encuentra inhibida, mientras que la traducción de mensajeros de proteínas de respuesta a choque térmico de manera cap-independiente se encuentra

favorecida. Recientemente se ha descrito que la metilación de una sola adenina en el mRNA de HSP70 es suficiente para unir al factor eIF3 y promover su traducción cap-independiente.

Los datos anteriores sugieren que el estrés por choque térmico induce la metilación de adeninas presentes en los extremos 5'UTR o 3'UTR de algunos mensajeros permitiendo el cambio en el mecanismo de inicio de la traducción de ser cap-dependiente a cap-independiente dirigido por metilaciones y mediado por eIF3^{22,24,30,35}.

5. El factor de inicio de traducción eIF3

El factor de inicio de la traducción 3 (eIF3) es el más grande de todos los factores involucrados en el inicio de la traducción canónica en mamíferos; se compone de 13 subunidades que dan lugar a un complejo proteico con un peso molecular de aproximadamente 800 kDa. Las 13 subunidades que lo forman no son idénticas entre sí y son llamadas desde eIF3a hasta eIF3m^{20,23,36}.

En humanos, eIF3 se forma de dos subcomplejos:

- I. complejo Yeast Like Core (YLC): formado por eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3i y eIF3g, siendo las subunidades eIF3a/eIF3b las encargadas del proceso de nucleación. Por sí solo el complejo YLC conserva la función de unión con la subunidad 40S ribosomal para la formación de los complejos PIC 43S y PIC 48S así como el reconocimiento y unión a mRNA^{20,36-38}.
- II. complejo octamérico: presenta una forma antropométrica con 5 lóbulos llamados *cabeza* (eIF3c), *brazo izquierdo* (eIF3a), *brazo derecho* (eIF3e), *pierna izquierda* (eIF3f, eIF3h y eIF3m) y *pierna derecha* (eIF3k y eIF3l).
Las subunidades eIF3a/eIF3c representan los centros de nucleación del subcomplejo octamérico; sin embargo, es esencial la presencia de eIF3b (que no forma parte de este subcomplejo) para que el complejo se pueda formar.
La proteína eIF3a es la única subunidad que forma parte de los subcomplejos YLC y octamérico^{20,36,37}.

Las subunidades eIF3d (interacciona directamente con eIF3e) y eIF3j (unida a eIF3a y eIF3b en el YLC) no forman parte de ninguno de los dos subcomplejos e incluso no se encuentran en la totalidad de los complejos eIF3 aislados, por lo que en ocasiones se consideran como subunidades asociadas (*Figura 6*)^{18,36,37}.

La complejidad estructural de eIF3 le permite desarrollar múltiples funciones que no están delimitadas solo al inicio de la traducción, sino que están distribuidas en todo el proceso de síntesis de proteínas e incluso se ha reportado la intervención de eIF3 en la exportación y la degradación de mRNAs, así como su participación en la interacción entre los procesos de traducción y transcripción³⁶. A continuación, se citan las principales funciones de eIF3 durante la traducción proteica:

- I. Ensamblaje del complejo PIC 43S: En el inicio de la traducción en condiciones limitantes de tRNA-metionina, eIF3 favorece la formación del complejo ternario (TC), a su vez eIF3 es el centro de nucleación del Complejo multifactorial (MFC) compuesto además por eIF1, eIF1A y eIF5. De tal manera que eIF3 está involucrado en la formación de los complejos TC y MFC y también estimula la unión de estos con la subunidad 40S para dar lugar al Complejo de preinicio PIC 43S^{23,37,39}.
La unión de eIF3 a la subunidad 40S ocurre en la cara expuesta al citoplasma del ribosoma, dicha localización espacial parece ideal para la función de actividades regulatorias de la traducción; a su vez, una extensión de eIF3 compuesta por eIF3b-eIF3i-eIF3g se localiza entre la interface de unión con la subunidad 60S cerca del canal de entrada del mRNA, lo cual podría relacionarse con funciones de ayuda en el escaneo de AUG y también para prevenir la unión inespecífica de las subunidades ribosomales²³.

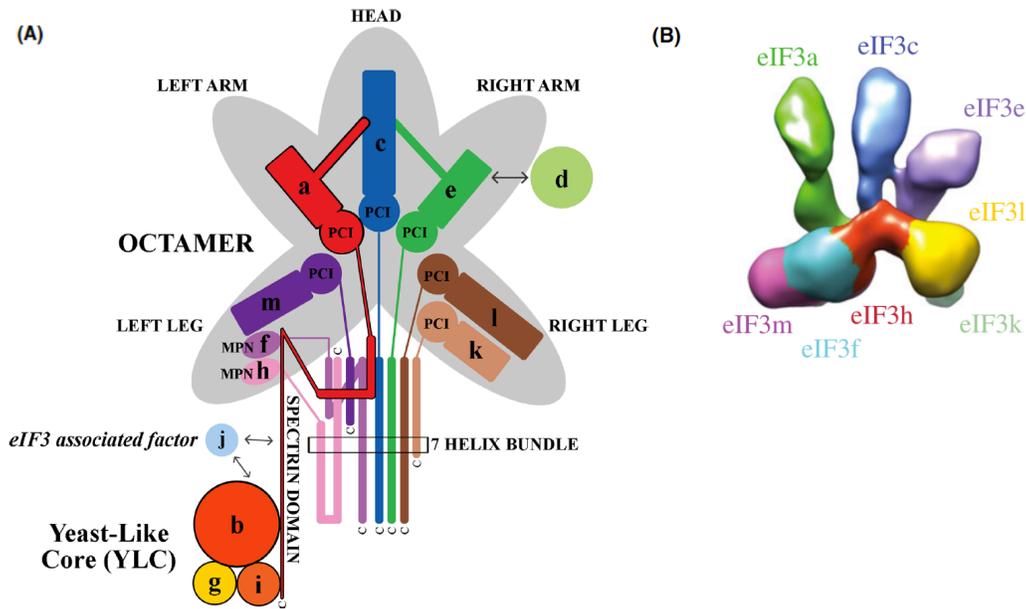


Figura 6. Estructura del factor eIF3 en humanos. (A) Modelo de la proteína eIF3 presentando su composición bimodular. eIF3 se compone de dos subcomplejos: a) complejo YLC y b) complejo octamérico. La figura muestra las interacciones entre cada subunidad que se dan en los dominios PIC, así como en el conjunto de hélice. (B) Modelo de reconstitución mediante Cryo-EM. La imagen muestra 8 subunidades de eIF3 humano, la posición fue determinada mediante marcaje del N-terminal y su comparación con la estructura de tapa del proteoma con Ila cual comparte similitud evolucionaria. (Inciso (A) Tomado de Wagner S, et. al. *Human eIF3b and eIF3a serve as the nucleation core for the assembly of eIF3 into two interconnected modules: the yeast-like core and the octamer. Nucleic Acids.* Inciso (B) Tomado de Cate. J. *Human eIF3: from "blobology" to biological insight. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.*)

- II. Unión a mRNA para la formación del complejo PIC 48S: En la traducción canónica, una vez formado el complejo PIC 43S este debe interactuar con el mRNA que se ha unido previamente al complejo eIF4F para dar lugar a la formación del complejo PIC 48S.
El mecanismo mediante el cual ocurre el reclutamiento del mRNA al PIC 43S parece ser multifactorial: 1) haciendo uso de la unión entre TC y mRNA, 2) mediante la interacción entre eIF3c, eIF3d y eIF3e con dos regiones de eIF4G^{36,40}, 3) por la asociación de eIF3 con eIF4E y la estructura cap y 4) como consecuencia de la capacidad de varias subunidades de eIF3 de unirse directamente a mRNA especializados.
La unión de eIF3 con la proteína eIF4G parece ocurrir a través del subcomplejo YLC, mientras que entre las subunidades de eIF3 que pueden unir a mRNAs se encuentran reportadas eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3d, eIF3e, eIF3f, eIF3g y eIF3h cada una de las cuales puede unir entre 300 y 400 diferentes mRNAs^{23,37,41}.
- III. Auxiliar en el escaneo en busca del codón de inicio: Se ha descrito que eIF3 también está relacionado con el proceso de escaneo y selección del codón AUG de inicio, principalmente mediante la subunidad eIF3c y su interacción con eIF1 y eIF5, a su vez las proteínas eIF3a y eIF3b interactúan con la helicasa DHX29 encargada de desdoblarse estructuras secundarias en el mRNA durante el escaneo. La función de eIF3 es servir de puente para la correcta interacción de eIF1, que es el factor principal del escaneo/selección de AUG y de eIF5 que estimula la hidrólisis del GTP presente en el complejo TC^{23,37,40,41}.
- IV. Reinicio de traducción: eIF3 está involucrado también de manera directa en el reinicio de traducción de algunos mRNAs policistrónicos virales como los de caulimovirus que infectan plantas. Se ha sugerido que eIF3g permanece unido a la subunidad 60s lo que le permite viajar con el ribosoma durante la etapa de la elongación hasta encontrar un codón de paro donde eIF3 impide la

disociación del ribosoma, para a continuación unir a un nuevo complejo TC y permitir el reinicio de la traducción sobre el mismo mRNA^{23,37,39}.

- V. eIF3 se une a la subunidad 40S e inhibe la interacción con 60S: Una vez terminada la traducción de un mRNA, el ribosoma completo 80S debe separarse en las subunidades 40S y 60S para que estén disponibles para comenzar un nuevo ciclo de traducción. eIF3 de manera conjunta con eIF4A tienen la función de disociar la unión entre las dos subunidades inmediatamente después de la lectura del codón de término; además se encarga de formar un complejo con la subunidad 40S estabilizándola y evitando de esta manera la reasociación inmediata e inespecífica entre subunidades. En este proceso, eIF3j tiene la función de unir a la subunidad 40S de manera dependiente de la cinasa mTOR, mientras eIF3d interactúa con el rRNA 18S y las subunidades eIF3a/eIF3c se asocian con las proteínas ribosomales pequeñas RPS0A/RPS10A^{23,37}.
- VI. Regulación de la traducción y traducción especializada: Aunado a las funciones que desempeña eIF3 en la traducción canónica global, se ha reportado su papel en la regulación de la traducción de un conjunto de mRNAs relacionados con control del crecimiento celular como: *apoptosis*, *diferenciación celular* y *ciclo celular*⁴¹. Esta regulación, ocurre mediante la interacción de motivos de unión a RNA presentes en las subunidades eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3d, eIF3e, eIF3f, eIF3g y eIF3h los cuales se unen a estructuras específicas en las regiones 5'UTR de los distintos mRNA permitiendo una regulación, tanto positiva como negativa, de su traducción^{20,23}.

Ahora bien, las distintas subunidades que forman el complejo eIF3 presentan una serie de labores y actividades particulares que le permiten a eIF3 ejercer su papel en los diferentes procesos mencionados anteriormente. A continuación, se citan las principales funciones de las subunidades eIF3a, eIF3b y eIF3d las cuales forman parte del presente estudio:

- **eIF3a**: es el principal centro de nucleación de los sub-complejos YLC y octamérico por lo que el silenciamiento de su expresión conlleva a la completa disgregación del complejo eIF3²⁰. eIF3a por sí sola une a la subunidad 40S mediante su interacción con proteínas ribosomales pequeñas (RPS) y con el rRNA 18S, estimula el reclutamiento de mRNA en el complejo PIC 43S para formar el complejo PIC 48S^{23,41}. La proteína eIF3a ha sido reportada como regulador de la traducción específica de diferentes mRNAs celulares, entre los que destacan los mensajeros que codifican para proteínas relacionadas con control de ciclo celular como p27kip (inhibidor de cinasas CDK) y RRM2 (reductasa que cataliza la formación de desoxiribonucleótidos, su actividad es dependiente de ciclinas)³⁷. A su vez, eIF3a también está involucrado en la traducción mediada por IRES de HCV, donde eIF3a interactúa con una región específica en el IRES de HCV sirviendo como puente entre el mRNA viral y la subunidad 40S³⁸.
- **eIF3b**: forma parte junto con eIF3a del núcleo para la formación de YLC y también del complejo octamérico aún sin formar parte de este. Al igual que eIF3a presenta diversos motivos de unión a RNA, así como también posee el motivo RNP1 que le permite la unión a la subunidad 40S ribosomal, lo anterior permite el reclutamiento de distintos mRNAs para formar el complejo PIC 48S²³.
- **eIF3d**: ha sido descrita en *N. crassa* y *S. pombe* como causa de la generación de dos diferentes complejos eIF3: un complejo eIF3 que contiene eIF3d el cual es responsable de la traducción de un set particular de mRNA y otro complejo eIF3 sin eIF3d que traduce la totalidad de mRNA²⁰. En 2016, Lee y colaboradores describieron que la proteína eIF3d está relacionada con la regulación de la traducción de un subconjunto de mRNA involucrado en proliferación celular, particularmente con el mRNA que codifica para la proteína c-JUN que forma parte del activador transcripcional AP-1. eIF3d presenta un sitio de unión a la estructura cap que permite el paso del mRNA de c-JUN para unirse con eIF3e y atraer a todo el complejo eIF3. Resulta muy interesante que esta interacción permite el ensamblado de los complejos de inicio de traducción sin necesidad del complejo eIF4F,

por lo que representa un tipo de traducción no canónica cap dependiente pero independiente de eIF4F que podría ocurrir en casos de estrés o de bloqueo de la traducción general¹⁸.

Posteriormente en 2018, de la Parra y colaboradores reportaron la interacción de eIF3d con la proteína DAP5, la cual presenta una alta homología al factor eIF4G1 y posee los dominios de unión a eIF3 y a eIF4A pero no los sitios de unión a eIF4e (proteína de unión a cap) ni PABP. En dicho estudio se hace mención a que la interacción entre DAP5 con eIF3d (con su función de unión a la estructura cap) permite la traducción de diversos mensajeros relacionados con apoptosis, movilidad celular, proliferación celular, control del ciclo celular, integrinas para señalización y reparación de DNA³³.

Con base a lo anterior, se ha sugerido que el papel de eIF3d no forma parte de las funciones canónicas de eIF3 sino que esta involucrado en promover la traducción de un set de mRNA específicos.

6. Control del inicio canónico de la traducción por virus

Los virus son plenamente dependientes del aparato de traducción celular para producir las proteínas virales esenciales para su ciclo replicativo y la producción de progenie viral; por tal, alteraciones en el aparato y mecanismo de la traducción son eventos comunes durante la infección por diferentes agentes virales, los cuales pueden ocurrir en cualquiera de los pasos de la síntesis proteica ya sea inicio, elongación o terminación²⁶ (Figura 7).

Además de la regulación ejercida por la célula en si, descrito anteriormente, como proceso de defensa antiviral para limitar la síntesis de proteínas virales o como respuesta al estrés causada por la infección, varios virus poseen estrategias propias para modificar la traducción celular en su favor¹⁹.

La modificación de la traducción celular en favor de la viral tiene principalmente dos objetivos: *centrar todos los recursos y capacidad de síntesis de la célula en la producción de proteínas virales, y restringir la síntesis de proteínas de respuesta antiviral.*

6.1. Regulación viral de la PKR

Como se mencionó anteriormente la presencia de dsRNA en el citoplasma celular producto de la replicación de virus de RNA o DNA, conlleva mediante la activación de la cinasa PKR a la fosforilación de eIF2 α ocasionando una inhibición de un alto porcentaje de la traducción celular, es por tal que múltiples virus han desarrollado estrategias para evitar esta fosforilación.

- *Antagonistas de PKR:* adenovirus y el virus de Epstein Barr (EBV) generan durante las etapas tardías de su replicación un RNA pequeño encargado de unirse a la región de PKR encargada del reconocimiento de dsRNA, se cree que de esta forma se inhibe la activación de PKR y la posterior fosforilación de eIF2 α ²⁶.
- *Proteínas de unión a dsRNA:* Las proteínas virales E3L, NS1 y σ 3 de virus vaccinia, influenza y reovirus respectivamente, se unen de manera directa al dsRNA viral y previenen su interacción con PKR evitando de tal forma la fosforilación de eIF2 α ²⁶.
- *Defosforilación de eIF2 α :* La proteína E6 del virus del papiloma humano (HPV) es capaz de activar una proteína fosfatasa celular que se encarga de desfosforilar a eIF2 α ¹⁹.
- *Inhibición de la función cinasa:* En esta estrategia, el genoma de diferentes virus codifica para proteínas que inhiben directamente la función cinasa de PKR o de PERK, actuando principalmente como pseudo-sustratos. Un ejemplo es la proteína K3L de vaccinia que tiene una alta homología al extremo N-terminal de eIF2 α ²⁶.

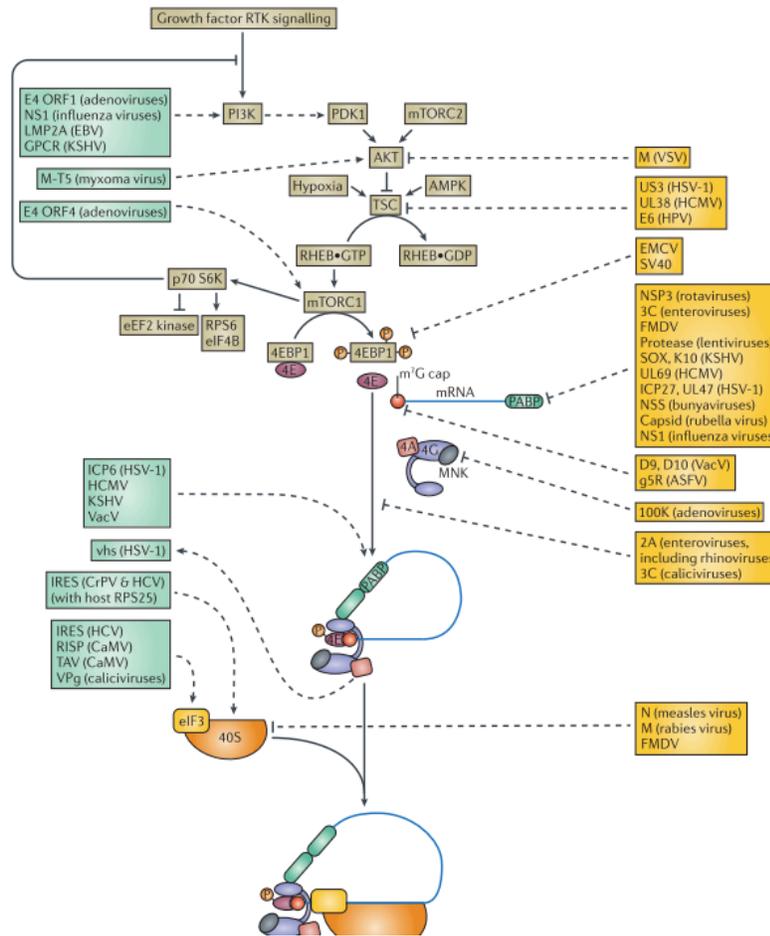


Figura 7. Control del inicio de la traducción canónica por diferentes proteínas virales. El control ejercido por los distintos virus implica tanto la regulación positiva (verde) como negativa (amarillo). (Tomado de Walsh, D. & Mohr, I. *Viral subversion of the host protein synthesis machinery. Nat. Rev. Microbiol.*).

- **Inducción de fosforilación de eIF2 α :** Algunos virus no tienen la necesidad de utilizar el complejo TC para el inicio de traducción de las proteínas virales, por tal la fosforilación de eIF2 α produce un ambiente propicio para su replicación puesto que la traducción celular esta inhibida, incluida la respuesta a IFN, y la maquinaria de traducción esta disponible para el uso del virus. Ejemplos de este evento son los virus el virus de la parálisis del grillo que posee una estructura IRES tipo IV en el extremo 5' que funge como un tRNA iniciador sustituyendo al complejo TC¹⁷.

6.2. Regulación viral de eIF4F:

El complejo proteico eIF4F presenta múltiples funciones en el inicio de la traducción cap dependiente como el reconocimiento de la estructura cap, el desdoblamiento del mRNA gracias a eIF4A o el ensamblaje con PIC 43S mediante eIF3 para dar lugar al complejo PIC 48S. No es de sorprender que numerosos virus tengan estrategias para modificar las funciones de eIF4F.

- **Degradación de eIF4G:** La proteína de andamiaje eIF4G2 es blanco de degradación mediada por la proteína 2A^{pro} del virus de polio. Los mRNA de poliovirus no presentan la estructura cap en 5' y su traducción es mediada por una estructura IRES tipo II de tal manera que la degradación proteolítica de eIF4G2 no solo inhibe la traducción celular sino también favorece la traducción cap independiente.

Otros ejemplos de degradación de eIF4G1 y eIF4G2 ocurre durante las infecciones por retrovirus, rinovirus y novovirus^{19,26}.

- **Modulación de la actividad eIF4E por proteínas de unión:** Las proteínas 4E-BP 1, 2 y 3 en su forma hipofosforilada compiten con eIF4G por la unión de la proteína eIF4E inhibiendo la formación del complejo eIF4F, la fosforilación de las proteínas 4E-BP libera al factor eIF4E permitiendo su interacción con eIF4G. La modulación de las proteínas 4E-BP tanto positiva como negativamente es uno de los mecanismos más estudiados en las diferentes infecciones virales:
 - **Hipofosforilación de proteínas 4E-BP:** el picornavirus de encefalomiocarditis (EMCV) induce la defosforilación de 4E-BP, la cual se une fuertemente a eIF4E bloqueando la traducción celular cap dependiente, este entorno favorece la traducción de los mRNA virales mediado por IRES tipo II. Por otra parte, el virus de estomatitis vesicular (VSV) mediante su proteína M inhibe la actividad de la cinasa AKT encargada de fosforilar a las diferentes 4E-BP y promueve la acumulación de 4E-BP1 hipofosforilada¹⁹.
Ambas estrategias no solo permiten la traducción preferencial de los mRNA mediados por IRES, sino también inhiben la traducción de proteínas celulares entre las que destaca la proteína de respuesta inmune Factor de regulación de interferón 7 (IRF7). Los factores de Regulación de Interferón (IRF) son una familia de factores transcripcionales que como parte de la cascada de respuesta inmune innata son fosforilados para su activación, agrupándose en homo y heterodímeros para traslocarse al núcleo y activar la transcripción de los genes de respuesta a interferón (ISGs)⁴².
 - **Hiperfosforilación y degradación de proteínas 4E-BP:** En contraste de los virus que inhiben la formación del complejo eIF4F y emplean la traducción cap independiente, la mayoría de virus de DNA presentan mensajeros virales con estructuras similares a los mRNA celulares y su traducción es cap dependiente, por lo que la presencia de un mayor número de complejos eIF4F ayuda a la replicación viral.
El virus herpes simple 1, citomegalovirus humano (HCMV) y el virus de Epstein-Barr estimulan la activación de la cinasa mTOR propiciando la hiperfosforilación de 4E-BP y la posterior liberación de eIF4E para la formación del complejo eIF4F.
Otro mecanismo interesante, es el desarrollado por el virus herpes simple 1 (HSV-1) donde se dirige la degradación vía proteosoma de 4E-BP e incluso la proteína viral ICP6 estimula la interacción entre eIF4E y eIF4G^{19,26,43}.
- **Modulación de la actividad de eIF4E por fosforilación:** Aunque la función de la fosforilación del factor eIF4E no es por completo clara, se cree está relacionada con un aumento del reconocimiento de la estructura cap, esto debido a que la inhibición de la traducción durante mitosis y shock térmico correlaciona con niveles reducidos de fosforilación de eIF4E.
La proteína L4 de adenovirus interacciona con eIF4G impidiendo su interacción con al menos una de las dos proteínas Mnk1 y Mnk2 que son las principales cinasas que fosforilan a eIF4E. La traducción de adenovirus puede llevarse a cabo en estas condiciones debido a que la misma proteína L4 y la secuencia presente en el extremo 5'UTR de los mensajeros virales permite el mecanismo de traducción especializado llamado "Ribosome shunting" en el cual la traducción inicia de manera canónica, pero estructuras secundarias presentes en el mRNA viral entre la secuencia de dos proteínas ocasionan que el ribosoma pare la traducción y la reinicie nuevamente al pasar la estructura secundaria sin la necesidad de un desensamble del ribosoma. Este mecanismo permite la síntesis de al menos dos proteínas mediante un solo mRNA y un solo inicio de la traducción cap en condiciones de bajos niveles de eIF4F^{19,26}.
- **Modulación del reconocimiento de la estructura cap por eIF4F:** El reconocimiento de la estructura cap es un paso limitante en el inicio de la traducción debido a las bajas concentraciones celulares de eIF4E, por tal diferentes virus alteran este proceso con diferentes estrategias: el virus de influenza y algunos hantavirus "roban" la estructura cap de mRNA celulares mediante enzimas decapping, la estructura cap robada es empleada como templado para la síntesis de mRNA viral y también para favorecer su traducción⁴⁴.
Existen otras estrategias de modulación del reconocimiento de la estructura cap, por ejemplo, la empleada por los calicivirus cuyos mRNA no están capeados teniendo una proteína viral VPg unida al

extremo 5' que se une directamente a diversos factores de inicio para reclutar los ribosomas; la segunda estrategia ocurre con la proteína N de hantavirus la cual posee las funciones de eIF4F supliendo su función durante la traducción. Finalmente resulta curioso el caso de los mimivirus, virus de DNA con cerca de 2Mb que codifican para una "proteína viral eIF4E", aunque su función o actividad permanece por ser dilucidada^{19,26,43}.

- *Cambio en la localización de eIF4E*: La relocalización de la proteína eIF4E puede ser empleado por distintos virus como estrategia para inhibir la traducción celular y favorecer la síntesis proteica viral. Algunos poxvirus relocalizan el complejo eIF4F en sus compartimentos de replicación viral facilitando la traducción de sus proteínas, en cambio poliovirus relocaliza a eIF4E al núcleo inhibiendo la traducción cap dependiente²⁶.

6.3. Regulación de proteínas de unión a cola PoliA

La proteína PABP tiene la importante función de circularizar el mRNA mediante su unión con la estructura poliA en el extremo 3' y con la proteína eIF4G. Algunos virus como rotavirus, lentivirus y calicivirus degradan proteolíticamente a PABP mientras que el virus de rubeola relocaliza la proteína PABP dentro de su cápside viral favoreciendo la traducción citoplasmática de sus mRNA virales que no presentan la cola poliA. Otros virus como el virus de herpes simple 1, virus de herpes asociado a sarcoma de Kaposi y rotavirus ocasionan la localización nuclear de PABP evitando su interacción con eIF4G¹⁹.

6.4. Regulación viral de eIF3:

El factor eIF3 es una proteína ubicua en todos los mecanismos de inicio de traducción con la excepción de los IRES tipo IV que no requiere ningún eIF ni ITAF para dar inicio a la traducción. Es por lo anterior que múltiples virus interaccionan con dicho factor para reclutar a la subunidad ribosomal 40S a sus mensajeros virales mediante proteínas virales o secuencias específicas en los mRNA virales. A su vez también existen casos reportados donde eIF3 es degradado o relocalizado con el objetivo de bloquear la respuesta inmune innata y la traducción canónica celular.

Se ha reportado que el factor eIF3 es utilizado por diversos virus para la traducción preferencial de sus proteínas mediante mecanismos de inicio no canónicos; el ejemplo más conocido ocurre en la infección por el virus de Hepatitis C (HVC) donde eIF3 interacciona de manera directa (mediante las subunidades eIF3a, eIF3b, eIF3d y eIF3f) con la estructura IRES presente en los mRNA virales permitiendo de esta manera la unión con la subunidad 40S para la traducción de las proteínas del virus³⁸.

La proteína VPg de calicivirus felino (FCV) y norovirus humano (HNV) que se encuentra en lugar de la estructura cap en el extremo 5' de los mRNA virales, interacciona de manera directa con eIF3 para reclutar a la subunidad ribosomal 40S en los mensajeros virales. En 2003, Daughenbaugh y colaboradores describieron la interacción entre la subunidad eIF3d y la proteína VPg de calicivirus, sugiriendo que dicha unión tiene un rol en la traducción selectiva de los mensajeros virales³⁷.

Otro ejemplo interesante ocurre durante la infección por el virus del mosaico de la coliflor (CaMV) que presenta un fenómeno de reinicio de la traducción en su mRNA policistronico mediado por eIF3: la proteína viral TAV se une a eIF3g para de esta manera interactuar con la proteína de apoyo al reinicio de la traducción (RISP). La asociación de eIF3a, eIF3c y la proteína ribosomal RPL24 con RISP acopla a TAV la subunidad 40S (mediante eIF3) y la subunidad 60S conllevando al reinicio de la traducción sobre el mRNA viral policistronico^{23,26}.

Dos mecanismos más ocurren en las infecciones por el virus Herpes simple (HSV) y el virus de fiebre amarilla (YFV). En el caso de HSV, la proteína eIF3m interactúa con los mRNA virales para aumentar la producción de las proteínas virales ICP4 e ICP0, ambas activadoras de la transcripción de genes virales durante la etapa temprana de la infección. De igual manera, la subunidad eIF3l facilita la traducción de las proteínas de YFV debido a su contacto con la proteína viral NS5, la cual presenta otras tres funciones importantes:

metiltransferasa de mRNA, actividad RNA polimerasa encargada de la replicación del genoma y finalmente una función antagonista de interferón^{40,45}.

Por otra parte, eIF3 está involucrado en otras infecciones virales debido a que es utilizado como un factor en el apagado o abatimiento de la traducción celular. Los mecanismos empleados por los distintos virus son variados:

- eIF3 es secuestrado por algunas proteínas virales como la glicoproteína de Coronavirus, la proteína M del virus de rabia o la proteína N de virus de sarampión,
- eIF3 es procesado proteolíticamente como ocurre en la infección de Picornavirus cuyas proteasas escinden las subunidades eIF3a y eIF3b.
- la interacción entre eIF3 y el complejo TC es inhibida debido a la proteína p56 que bloquea dicha unión. La proteína p56 es inducida como parte de la respuesta inmune innata debido a la presencia de dsRNA viral^{18-20,23,37,41}.

7. El proceso de traducción durante la infección por rotavirus

Durante la infección por rotavirus, la maquinaria celular de traducción es secuestrada de manera que la síntesis de proteínas celulares se ve abatida mientras que las proteínas virales son traducidas de una manera tan eficiente que al terminar el ciclo replicativo la mayoría de las proteínas producidas en la célula son de origen viral.

El estudio de los mRNAs de rotavirus ha permitido dilucidar su estructura particular:

- Presentan una estructura cap en el extremo 5' al igual que los mRNAs celulares,
- En el extremo 3' no se encuentran poliadenilados (como los mRNAs celulares) sino presentan la secuencia consenso GACC en los 11 segmentos del genoma viral,
- Las regiones 5'UTR y 3'UTR son secuencias cortas que varían de longitud entre los 11 segmentos pero que en general son más pequeñas que las encontradas en los mRNAs celulares^{46,47}.

Es el extremo 3'UTR, la región que más difiere con los mRNA celulares por lo cual se ha sugerido que podría representar parte de un mecanismo de traducción especializado que le permita a rotavirus sintetizar sus proteínas cuando la traducción celular general se encuentra apagada durante la infección.

La proteína no estructural 3 (NSP3) de rotavirus es una proteína que se une al mRNA viral precisamente en la secuencia GACC del extremo 3'UTR y ha sido identificada como una proteína reguladora de la traducción celular y viral^{25,48-51}.

NSP3 es una proteína de 35 kDa, la cual es codificada por el gen 7 de rotavirus que se encuentra en forma de homodímero, presenta una homología cercana al 85% entre los diferentes genotipos de rotavirus³. Estudios sobre su estructura han permitido identificar los siguientes dominios funcionales (*Figura 8*):

- a) *Dominio N-Terminal*: el más conservado entre los diferentes genotipos de rotavirus, su principal función es la unión con la secuencia GACC localizada en el extremo 3'UTR de los mRNAs virales. La delección de los primeros 9 aminoácidos, así como la modificación o la adición de una secuencia en dicha región ocasiona la pérdida total de su función.
- b) *Zona central*: este se forma de tres dominios que se sobrelapan, el primero se encarga de la dimerización de la proteína mediante un zipper de leucina; el segundo es el sitio de unión a la proteína ROXAN (Rotavirus X proteína asociada a NSP3) cuya función no ha sido identificada y un tercer dominio de unión a la proteína HSP90 lo cual podría estar relacionado a una estabilización y protección ante la degradación vía proteosoma.

- c) *Dominio C-Terminal*: presenta una menor conservación entre genotipos y se encarga de la unión con la proteína celular eIF4G, la cual como se mencionó anteriormente es el centro de armado del complejo eIF4F encargado del reconocimiento del cap para la interacción entre el mRNA y la subunidad 40S^{48,52,53}.

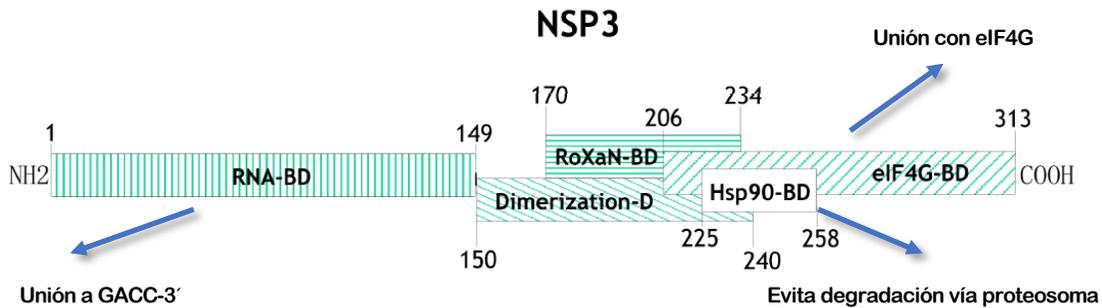


Figura 8. Representación de los dominios de la proteína NSP3. Los distintos dominios de NSP3 se muestran de manera esquemática, los números indican las posiciones de los aminoácidos y con flechas se menciona su función principal. (Tomado de López, S., Ocegüera, A. & Sandoval-Jaime, C. *Stress Response and Translation Control in Rotavirus Infection. Viruses.*)

El primer mecanismo de control de la traducción celular por rotavirus es mediado por la proteína NSP3 que interactúa con la proteína eIF4G en el mismo sitio de unión a la proteína PABP pero con una afinidad 10 veces superior, desplazando dicha proteína del PIC 43S evitando que los mRNA celulares se circularicen y por tal sean traducidos, favoreciendo así la traducción de los mRNAs virales^{46,48,51}.

Aunado a lo anterior, durante la infección por rotavirus ocurre una relocalización de la PABP y de los mRNAs celulares en el núcleo, así como la hiperpoliadenilación de estos, de manera dependiente de NSP3. La acumulación de PABP y los mRNAs poliadenilados en el núcleo de la célula es un segundo mecanismo por el cual se inhibe síntesis de proteínas de la célula durante la infección.

Un tercer mecanismo de apagado de la traducción celular por rotavirus es la inducción de la fosforilación de la proteína eIF2 α ; esta fosforilación es llevada a cabo por la cinasa PKR que detecta la presencia del dsRNA de rotavirus. Una vez que eIF2 α es fosforilada se une con eIF2B inhibiendo el intercambio de eIF2-GDP / eIF2-GTP y evitando la formación del complejo TC.^{19,54,55}

De modo interesante, el silenciamiento de NSP3 mediante siRNAs no afecta la traducción de proteínas virales, mientras que los niveles de proteínas celulares se recuperan. Además, la producción de progenie viral es mayor, quizá consecuencia del aumento del nivel de mRNA viral y dsRNA en tales condiciones⁵⁰. Es por tal, que se considera a NSP3 más una proteína que abate la traducción celular en lugar a la posición tradicional de llamarla un potenciador de la traducción viral.

En conjunto, todos estos resultados sugieren que rotavirus toma control tanto de la traducción celular como viral mediante las vías ya descritas. Sin embargo, no es claro aún cual es el mecanismo por el cual los mRNAs virales se traducen tan eficientemente en las células infectadas ni que diferencia existe en los mensajeros celulares que continúan su traducción aun durante el proceso de infección por rotavirus.

8. Proteínas ribosomales y sus funciones extraribosomales

Las proteínas ribosomales (RPs) se encuentran altamente conservadas durante la evolución, reflejando lo esencial de estas para la célula; sus funciones canónicas consisten en el procesamiento y estabilización de rRNA, así como dar forma y soporte en ribosomas maduros. La depleción de proteínas ribosomales en múltiples modelos de estudio ha demostrado que su ausencia ocasiona defectos graves en el crecimiento y desarrollo de células y organismos, producto de la alteración de la biogénesis ribosomal y la traducción de proteínas.

Reportes recientes han demostrado que las proteínas ribosomales no se encuentran solamente relacionadas con los procesos de biogénesis ribosomal y traducción proteica, describiendo *nuevas funciones extraribosomales* de estas proteínas relacionados con procesos de **regulación de proliferación y crecimiento celular, control de la respuesta inmune, transcripción y traducción especializada**⁵⁶⁻⁵⁹ (Figura 9a).

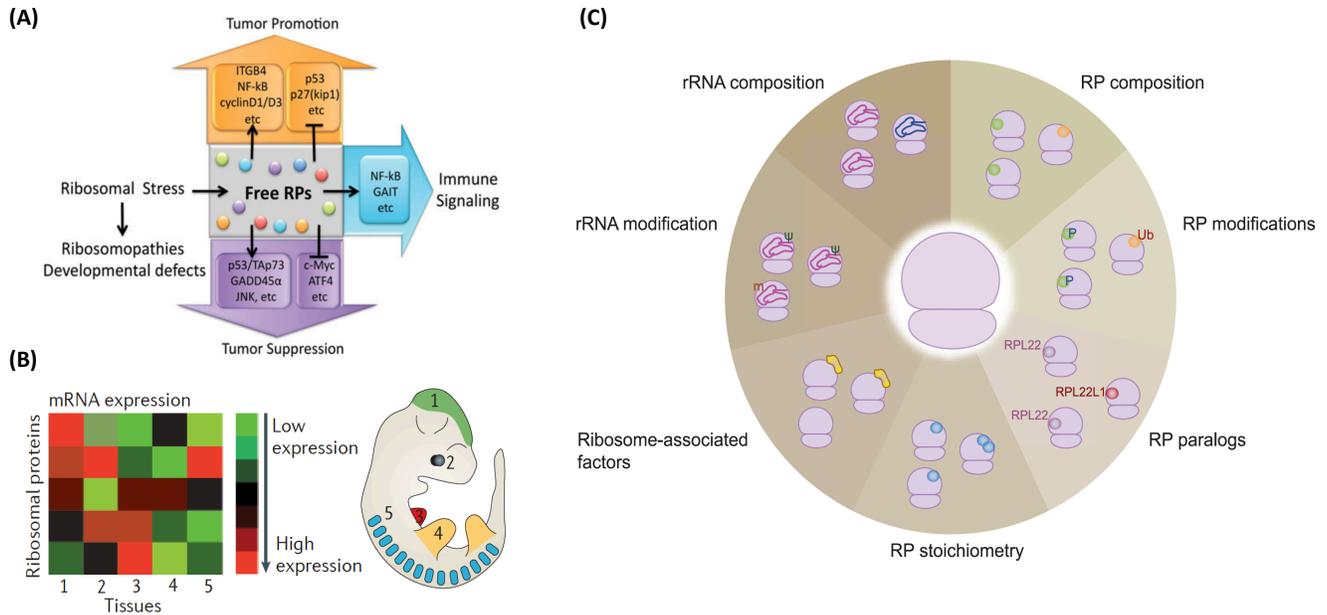


Figura 9. Funciones extraribosomales de las proteínas ribosomales y heterogeneidad ribosomal. (A) Funciones de las proteínas ribosomales libres en respuesta al stress ribosomal. Las proteínas ribosomales libres están involucradas en procesos de tumorigenesis, control del ciclo celular y respuesta inmune innata. Adicionalmente se sabe que mutaciones o disregulación de RPs conlleva a ribosomopatías y defectos del desarrollo. (B) En ratones, el patrón de la expresión de mRNA de proteínas ribosomales varía dramáticamente entre tejidos. Esto podría reflejarse en la composición ribosomal diferencial de proteínas ribosomales en distintos tipos de células. (C) Tipos de heterogeneidad ribosomal dependiendo de su composición de rRNA, proteínas ribosomales, proteínas parálogas ribosomales, factores asociados y modificación en rRNA o en proteínas ribosomales. (Inciso (A) Tomado de Xue, S. & Barna, M. *Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Inciso (B) Tomado de Zhou, X., Liao, W. J., Liao, J. M., Liao, P. & Lu, H. *Ribosomal proteins: Functions beyond the ribosome*. *J. Mol. Cell Biol.* Inciso (C) Tomado de Guo, H. *Specialized ribosomes and the control of translation*. *Biochem. Soc. Trans.*

8.1 Regulación de proliferación y crecimiento celular

Es bien conocido que el grado de proliferación celular se encuentra íntimamente relacionado con el estado de la traducción celular, es por tal que múltiples supresores tumorales y promotores oncogénicos ejercen un control sobre la biogénesis ribosomal para de esta forma disminuir o aumentar la cantidad de síntesis proteica. A su vez diversas proteínas ribosomales se encuentran sobre expresadas en diferentes tipos de cáncer implicando su papel en proceso oncogénicos, mientras que algunas otras también han sido descritas con roles de supresión tumoral o inactivación de oncoproteínas por diversas vías⁵³.

Independiente a las funciones de las proteínas ribosomales en la traducción y biogénesis ribosomal, estas proteínas también han sido descritas de manera individual y libre (no asociadas a ribosomas) como “sensores de estrés ribosomal” también llamado “estrés nucleolar” que conllevan a la activación de diferentes vías de regulación del ciclo celular, entre las que destaca la vía Hdm2-p53^{57,58,60-63}.

Las proteínas RPL5, RPL11, RPS7 y RPL23 en su forma libre al ribosoma han sido identificadas como sensores del “estrés nucleolar” mediante su interacción con la proteína Hdm2, la cual es una ubiquitin-ligasa E3 encargada de la regulación del supresor tumoral p53, mediante su ubiquitinación y posterior degradación vía proteosoma.

Durante la disrupción de la biogénesis ribosomal, las proteínas RPL5 y RPL11 libres pasan del nucléolo al nucleoplasma para unirse directamente con la proteína Hdm2 inhibiendo su actividad de ubiquitin ligasa, ocasionando que p53 no tenga una regulación negativa y sus niveles en la célula aumenten originando un arresto del ciclo celular, paro de proliferación e inducción de la apoptosis⁶⁴⁻⁶⁹.

Otro ejemplo lo representa la proteína RPS9, localizada en el túnel de unión a mRNA en la subunidad 40S y con funciones en el procesamiento del rRNA 20S, la cual se ha reportado tiene una actividad extraribosomal al interactuar con la proteína NPM1, que se encarga de unir a Hdm2 para regular los niveles de p53 de manera similar a lo realizado por las proteínas RPL5, RPL11, RPL23 y RPS7⁷⁰.

8.2 Regulación de la respuesta inmune innata

Algunas proteínas ribosomales han sido descritas como parte del proceso de regulación de la respuesta inmune innata, tal es el caso de la proteína RPL13A que interactúa con interferón gamma (IFN- γ), regulando la transcripción diferencial de genes de respuesta a la inflamación.

El interferón gamma, es un conjunto de citosinas pro- y antiinflamatorias que se encargan de regular de manera fina el proceso de inflamación. El tratamiento con IFN- γ ha demostrado elevar los niveles de mRNA de proteínas inflamatorias durante las primeras 12 h, sin embargo, la traducción de estos mRNAs disminuye después de las 12 h debido a la presencia de GAIT (Inhibidor de Traducción Activado por IFN- γ). La proteína RPL13A es un compuesto clave del complejo GAIT y se requiere para la inhibición selectiva de la traducción.

El tratamiento con IFN- γ induce la formación del complejo GAIT a las 12-16 h post-tratamiento, el proceso comienza con la fosforilación y liberación de RPL13A de la subunidad 60S ribosomal, a continuación, RPL13 se asocia con las proteínas GAPDH, EPRS y NSAP1 para formar el complejo GAIT que ejercerá su función mediante su unión con el extremo 3'UTR de los mRNA inflamatorios inhibiendo su traducción. La producción del complejo GAIT mediante IFN- γ , sirve como un mecanismo de autorregulación de la inflamación que permite que en tiempos tempranos se lleve a cabo la eliminación de patógenos, mientras que a tiempos tardíos impide la acumulación de proteínas inflamatorias previniendo el daño celular y contribuyendo a la resolución del proceso de inflamación dando paso a la regeneración celular⁵⁸.

8.3 Control de la transcripción por proteínas ribosomales

Ciertas proteínas ribosomales han sido involucradas en la regulación de la transcripción de ciertos genes, como el ejemplo de la proteína RPS3 que mediante su unión con el factor activador de la transcripción NF-kB permite la expresión de diversos genes estimulados por Interferon (ISGs)⁵⁸.

Otro caso sobresaliente de regulación de la transcripción es el de la proteína RPL11, la cual interactúa de manera directa con el activador transcripcional Myc inhibiendo la expresión de múltiples genes dependientes de este factor.

La familia de activadores Myc se conforma de tres genes altamente conservados entre los organismos: MYC, MYCN y MYCL1, los tres codifican para fosfoproteínas nucleares que funcionan como activadores específicos de la transcripción de cientos de genes. Las funciones de Myc involucran diversos procesos de la vida de la célula como transcripción, regulación de la estructura de la cromatina, traducción, replicación de DNA y biogénesis ribosomal (mediante la regulación de la transcripción de rRNA, proteínas ribosomales y factores accesorios).

Como regulador de la transcripción, Myc coordina aproximadamente el 15% de la expresión de todo el genoma de mamíferos, mediante al menos tres mecanismos distintos: 1) La unión de Myc con el factor asociado X (MAX) que permite la interacción mediante un zipper de leucinas con secuencias promotoras de la transcripción encontradas en diversos genes, 2) el complejo Myc-MAX interactúa con un segundo regulador de la transcripción, MIZ1, ejerciendo de esta manera un control sobre los genes que son activados mediante MIZ1; y finalmente, 3) Myc puede activar o reprimir la transcripción de múltiples genes mediante la remodelación de la estructura de la cromatina⁷¹.

La proteína ribosomal RPL11 emplea dos diferentes mecanismos para regular la transcripción de genes que son regulados por Myc:

- I. RPL11 interacciona directamente con la proteína Myc mediante su secuencia Myc box II, previniendo la unión entre Myc con otros factores involucrados en la remodelación de la cromatina.
- II. A si mismo, RPL11 esta involucrada en el reclutamiento de la proteína Ago2 en los mRNA de Myc ocasionando su degradación y regulando negativamente los niveles de la proteína^{58,71,72}

8.4 Heterogeneidad de ribosomas y traducción especializada

Se ha considerado tradicionalmente a los ribosomas como organelos celulares con una composición homogénea y ubicua, encargadas de la traducción celular con una capacidad catalítica más que una actividad reguladora. Descubrimientos recientes demuestran que los ribosomas distan mucho de tener una composición homogénea y en realidad, las proteínas ribosomales, rRNAs y proteínas asociadas que los forman varían dependiendo del tejido, tipo celular, fase de desarrollo celular, etc. Por tal, se ha sugerido la existencia de **ribosomas especializados**, los cuales podrían estar involucrados en la traducción específica de ciertos subgrupos de mRNAs determinando la expresión diferencial en tiempo y lugar de una proteína en un tipo celular delimitado^{56,72}.

Si bien la teoría de *ribosomas heterogéneos especializados* no ha sido aceptada al 100%, son múltiples los motivos que hacen pensar en ella. Los primeros indicios surgieron en base a las observaciones de distintos grupos de investigación sobre mutaciones en genes de proteínas ribosomales que ocasionaban la ausencia o formas truncas no funcionales de estas proteínas. En teoría, si la composición de los ribosomas fuera homogénea se esperaría que los efectos de las alteraciones en dichos genes se reflejaran de manera general en todo el organismo, sin embargo, el fenotipo de las mutaciones se encontraba localizado en ciertos tejidos: por ejemplo, mutaciones en RPL38 y RPL5 en *Drosophila sp.* ocasionan especímenes con alas particularmente más largas⁵⁶, otro caso similar ocurre en mutaciones de genes de la proteína RPL38 que en ratones produce fenotipos de cola corta, anormalidades oculares y defectos esqueléticos⁵⁸.

Las observaciones anteriores impulsaron el estudio de la composición de los ribosomas en distintos organismos, líneas celulares y etapas del desarrollo. Algunos de estos estudios fueron ensayos de la distribución de proteínas ribosomales en fetos de ratón donde se encontraron diferencias en los niveles de expresión de las RPs entre los diversos tejidos y tipos celulares (*Figura 9b*)⁵⁶.

Otro tipo de heterogeneidad en la composición se encontró en embriones de pez cebra, los cuales expresan distintos subtipos de 5.8S, 18S y 28S rRNA en células germinales en comparación a células somáticas durante la embriogénesis. Un análisis *in silico* de las secuencias 5' UTR de mRNA germinales sugieren que estos podrían unirse preferentemente a un subtipo de 18S rRNA en células germinales. En caso de comprobarse mediante análisis funcionales, este modelo representaría un proceso de regulación de la traducción mediado por ribosomas⁵⁹.

A la fecha se conoce la composición heterogénea de los ribosomas en al menos 7 diferentes maneras:

- Composición de rRNA
- Modificación al rRNA
- Composición de proteínas ribosomales
- Modificación a proteínas ribosomales
- Composición de proteínas ribosomales parálogas
- Composición de factores asociados
- Estequiometría de proteínas ribosomales (*Figura 9c*)^{56,57,59}.

Ahora bien, el que los ribosomas tengan una composición diferencial dependiente del órgano, tejido, tipo celular o etapa del desarrollo no implica una función de traducción especializada, sin embargo, lo sugiere fuertemente. La mutación de RPL38 en ratones ocasiona defectos esqueléticos donde la primera vértebra lumbar se convierte en una vértebra torácica. Se logró identificar que en células embrionales sin RPL38, la

síntesis proteica global permanece sin alteraciones, pero la traducción de un subconjunto de mRNA Hox (genes críticos en el desarrollo) se encuentra reducida, llevando a un proceso de *homeosis* que consiste en la transformación de una parte del cuerpo en otra⁵⁹.

Por su parte, durante el silenciamiento de RPS19 o RPL11 (ambas involucradas en anemia de Diamond-Blackfan) en eritroblastos de ratón, la traducción de mRNAs de Csde1 y Bag1 se encuentra disminuida. Los mensajeros de Csde1 (proteína de unión a RNA que se une específicamente a IRES) y Bag1 (chaperona de HSP70 y que además es una proteína de membrana) son sintetizados mediante traducción no canónica dependiente de IRES⁵⁹.

8.5 Proteínas ribosomales y su función en la traducción de proteínas virales

De manera independiente a los estudios sobre ribosomas especializados en procesos de desarrollo celular, especificidad de tejidos o procesos de cáncer, múltiples proteínas ribosomales han demostrado ser esenciales para la traducción especializada de distintos mRNAs virales durante infecciones por distintos virus.

Algunos ejemplos relevantes son: la proteína RPL40 ha sido encontrada importante en la traducción cap-dependiente del mRNA del virus de estomatitis vesicular (VSV) y virus de la rabia⁷³, las proteínas RPLP11/RPLP12 durante la elongación de la poliproteína de Flavivirus tanto en humano como en mosquito⁷⁴, la proteína RPS25 que permite la interacción entre la subunidad 40S con las estructuras IRES en los virus de parálisis de grillo (CrPV) y virus de Hepatitis C (HVC)⁷⁵, la proteína RPS19 que interacciona con la proteína de nucleocapside de hantavirus facilitando la traducción de sus mensajeros con estructura cap o la proteína RPS6 en la traducción mediada por IRES de HVC⁵⁸.

En todos los casos el silenciamiento de dichas proteínas inhibe la traducción viral y por tal el ciclo replicativo del virus específico, mientras que la traducción celular no se afecta o lo hace en menor proporción, esto sugiere que la síntesis de proteínas virales podría ocurrir mediante una traducción no canónica por ribosomas especializados. De manera sorprendente, durante el estudio de la proteína RPL40 en la infección por VSV se logró identificar un subconjunto de mRNAs celulares relacionados con estrés y apoptosis cuya traducción también se encontraba abatida durante el silenciamiento de RPL40, sugiriendo la presencia de ribosomas especializados que traducen dichos mRNAs en condiciones estrés celular y que el virus VSV desarrolló un mecanismo para usurpar dicha vía con el fin de asegurar la traducción de sus mensajeros en condiciones de estrés por infección^{56,73}.

A pesar de los reportes existentes sobre el papel de las proteínas ribosomales en las infecciones virales y los esfuerzos realizados por diversos grupos de estudio en materia de desarrollo embrionario y cáncer, la controversia sobre la existencia y función de los ribosomas especializados permanece activa debido principalmente a que los casos reportados de ribosomas especializados en la traducción eucarionte, con sus respectivos mecanismos de regulación, permanecen siendo escasos.

Resulta imperativo el estudio a fondo la traducción por ribosomas especializados mediante técnicas y enfoques novedosos, lo cual se verá reflejado no solo en ciencia básica sino también podría servir para encontrar potenciales blancos terapéuticos en procesos infecciosos o de cáncer.

ANTECEDENTES

Mediante un tamizaje con una biblioteca de siRNAs realizado en nuestro grupo se identificaron una serie de genes necesarios para la replicación de rotavirus en cultivo celular, estos genes fueron clasificados de acuerdo a su función en diferentes grupos tales como: transporte iónico, adhesión celular, señalización célula-célula, síntesis de proteínas, etc.⁷⁶ En el conjunto de genes relacionados con el proceso de traducción destacan una serie de proteínas ribosomales así como subunidades de los factores de inicio de traducción eIF2, eIF3 y eIF4 (Figura 10).

Del proceso de traducción, se seleccionaron 14 proteínas para ser silenciadas mediante siRNAs específicos con el objetivo de evaluar el efecto de su ausencia sobre la infectividad de rotavirus. Los datos encontrados mostraron que durante el silenciamiento de las proteínas RPS9, RPL11 y las subunidades eIF3a y eIF3b ocurre una reducción desde 60% hasta un 80% en la infectividad de rotavirus (Figura 10)

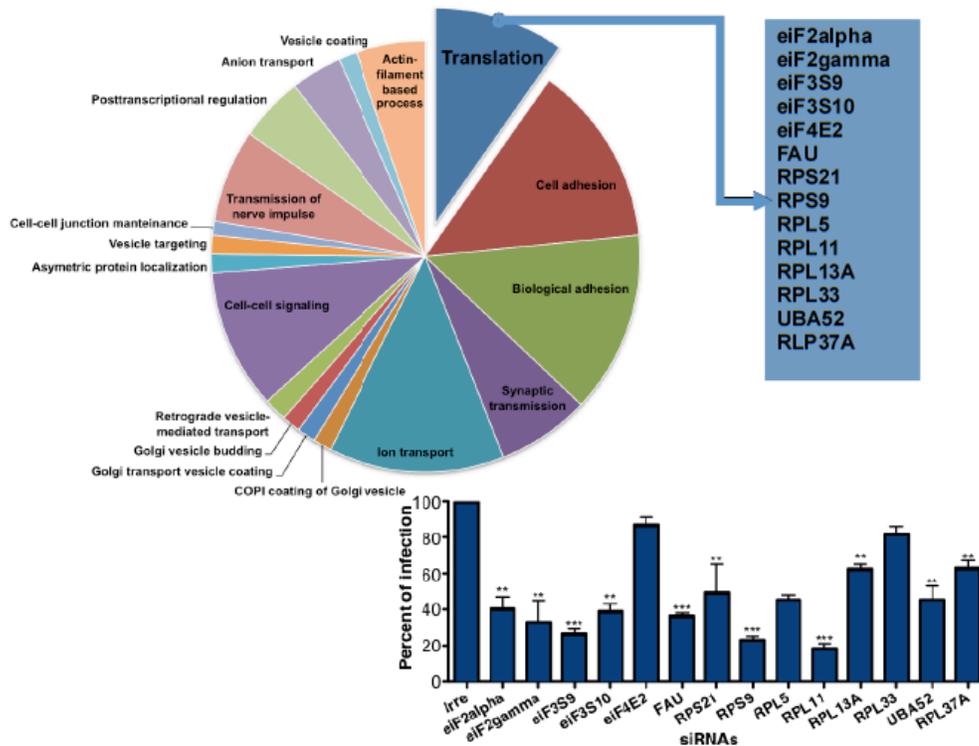


Figura 10. Tamizaje de genoma completo mediante siRNA. (A) Clasificación de las proteínas identificadas en procesos celulares definidos, durante la infección por rotavirus el proceso de traducción de proteínas celulares y virales requiere de las proteínas listadas en el cuadro de la derecha (Tomado de *Silva-ayala, D. et al. Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry. Proc. Natl. Acad. Sci.*). (B) Porcentaje de infectividad de rotavirus durante el silenciamiento mediante siRNA de las diferentes proteínas del proceso de traducción comparadas con el tratamiento con siRNA irrelevante. (Tomado de *Datos no publicados pertenecientes a Silva, D.; Ariás, C.; López, S. 2013*)

Con base a los datos obtenidos, se optó por realizar un estudio más profundo de los efectos del silenciamiento de las proteínas ribosomales RPS9 y RPL11 así como de las subunidades “a” y “b” del complejo eIF3 en el proceso de infección por rotavirus. La selección de estas proteínas es debido a varias características interesantes:

- Al silenciarlas causan una disminución significativa en la infectividad por rotavirus (entre el 60% al 80%),

- podrían representar mecanismos de traducción especializada (como los reportados por RPL40 para VSV, RPS25 para HVC, RPS6 para HCV, RPS19 para Hantavirus o eIF3d para genes celulares relacionados con estrés),⁷⁷
- tanto las subunidades eIF3a, eIF3b como las proteínas RPS9 y RPL11 se ha reportado tienen interacciones con RNA ^{18,29,78,79}

A su vez, se decidió añadir la subunidad “d” del complejo eIF3 al presente estudio debido a que esta subunidad ha sido descrita con anterioridad como una proteína de unión a RNA y más recientemente se identificó como un regulador de la traducción de un conjunto específico de mensajeros mediante su unión a dichos mRNAs y con un mecanismo de inicio de la traducción cap-dependiente pero independiente de eIF4E. Lo anterior resulta interesante puesto que durante la infección por rotavirus el silenciamiento de la proteína eIF4G, que forma parte del complejo de reconocimiento de la estructura cap junto con eIF4E, parece no tener un efecto significativo en la replicación viral^{18,20,33,36,41,50}.

HIPOTESIS

Las proteínas celulares RPL11, RPS9, eIF3a, eIF3b y eIF3d modulan la síntesis de proteínas virales y el ciclo replicativo de rotavirus a través de un mecanismo de traducción especializado de los RNAs mensajeros virales.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Estudiar el papel de las proteínas ribosomales RPS9, RPL11 y las subunidades (a, b y d) del factor de inicio de traducción eIF3 durante la infección por rotavirus.

2. Objetivos particulares

- Determinar el posible papel de las proteínas RPL11, RPS9, eIF3a, eIF3b y eIF3d en la producción de progenie viral durante la infección por rotavirus.
- Definir la relevancia de las proteínas RPL11, RPS9, eIF3a, eIF3b y eIF3d en la traducción de proteínas virales y celulares.
- Analizar la presencia de las proteínas RPL11, RPS9, eIF3a, eIF3b y eIF3d en los complejos de traducción de mRNAs virales de rotavirus.
- Establecer si las proteínas RPL11, RPS9, eIF3a, eIF3b y eIF3d tienen un papel en la replicación del genoma viral.

MATERIALES

Líneas celulares y cepas virales

La línea celular MA104 de riñón de mono verde fue cultivada en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Thermo Scientific, IL) con 5% de suero fetal bovino en condiciones de 5% CO₂ y 37 °C. La cepa viral empleada fue rotavirus de simio (RRV). Diluciones e incubaciones del virus se realizaron en medio Minimum Essential Medium (MEM) libre de SFB (Thermo Fisher Scientific, IL).

siRNAs, anticuerpos y reactivos

Los RNAs interferentes pequeños (siRNAs) utilizados fueron los siguientes: SMARTpool siGENOME Human de Dharmacon eIF3a siRNA, eIF3b siRNA, eIF3d siRNA, RPL11 siRNA y RPS9 siRNA. Los anticuerpos monoclonales empleados fueron eIF3a (sc-365789), eIF3b (sc-137214), eIF3d (sc-271516) y RPS9 (sc-390614) obtenidos de Santa Cruz Biotechnology, TX.

Se utilizaron dos anticuerpos policlonales: uno dirigido a partículas purificadas de rotavirus (α -TLPs) y el segundo contra la proteína celular vimentina, ambos obtenidos en nuestro laboratorio. Los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa utilizados fueron: conejo α -ratón conjugado (Invitrogen, OR), cabra α -conejo (Thermo scientific, IL). También se usaron los siguientes anticuerpos secundarios acoplados a Alexa: conejo α -ratón Alexa 488 y cabra α -conejo Alexa 568 (Thermo scientific, IL).

Como reactivos para los experimentos correspondientes se utilizó: luminol "Western lightning Plus system", oligofectamina, lipofectamina 2000 (Invitrogen, CA), *in vitro* Toxicology Assay Kit Lactic Dehydrogenase TOX7 (Sigma Aldrich, MO), kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, WI) y líquido de centelleo (ICN, CA). El buffer de lisis empleado en distintas pruebas contiene: Triton X-100 (0.1%), cloruro de sodio (150mM), Tris pH 8 (50mM) e inhibidor de proteasas (1%). La solución de bloqueo empleada en ensayos de Western Blot consiste en leche descremada al 5% disuelta en PBS/Tween 20.

Oligonucleótidos, enzimas y reactivos para PCR

Para extracción de RNA se utilizó Trizol (Thermo scientific, IL); para la síntesis de cDNA a partir de muestras de RNA utilizó la enzima M-MLV (Promega, WI); así mismo para los RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) se utilizó el kit KAPA SYBR Fast universal qPCR (Kapa Biosystems, CA).

Los oligonucleótidos empleados para los ensayos de RT-qPCR son los siguientes:

Oligonucleótido	Secuencia 5' -> 3'
18S Foward	CGAAAGCATTGCCAAGAAT
18S Reverse	GCATCGTTTATGGTCGGAAC
NSP4 Foward	TCCTGGAATGGCGTATTTTC
NSP4 Reverse	GAGCAATCTTCATGGTTGGAA

MÉTODOS

Infección con rotavirus cepa RRV

Los lisados con la cepa viral RRV son activados con tripsina en una concentración 10 μ g/mL, durante 30 minutos a 37°C. Las células MA104 se crecen en DMEM con 5% de suero fetal bovino a 5% CO₂ y 37°C, posteriormente se realizan lavados con MEM libre de SFB, se añade el lisado viral activado y se permite la adsorción del virus en las células durante 1 h a 37°C. Se realizan dos lavados y se incuban en MEM libre de SFB durante el tiempo requerido en cada experimento.

Determinación de título viral por formación de focos por inmunoperoxidasa

A las células MA104 previamente infectadas se les retira el medio MEM a las 14 horas post-infección (hpi) y se fijan con acetona al 80% en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. Se añade el anticuerpo α -TLPs a una concentración de 1:2000 durante 1 h a 37 °C. A continuación, se realiza un lavado con PBS y se coloca cabra α -conejo conjugado con peroxidasa a una concentración de 1:3000 durante 1 h a 37 °C.

Una vez concluido el tiempo se realiza un lavado con PBS y se agrega el sustrato carbazol. El número de focos se contó utilizando un aumento de 20X en un microscopio de campo claro (Nikon, Japón).

Transfección de siRNA

Las células MA104 se transfectaron con los siRNAs para las diferentes proteínas: RPL11, RPS9, eIF3a, eIF3b y eIF3c o un control irrelevante mediante lipofección en MEM libre de suero, utilizando el método de transfección reversa. Brevemente, en cada pozo se colocaron 90 μ L de los siRNAs correspondientes a una concentración de 2.5 μ M y en seguida la solución de oligofectamina (15 μ L por cada mL); esta mezcla se dejó incubando por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó una suspensión celular a una concentración de 1.5×10^5 cel/mL. Las células se incubaron a 37 °C por al menos 16 h, tiempo al cual el medio fue cambiado por DMEM con 10 % de SFB y se continuó incubando hasta completar 48 o 72 h de silenciamiento. Las células interferidas se infectaron con RRV a una MOI de 3 durante 14 h.

Medición de LDH para evaluar viabilidad celular

Las células MA104 fueron crecidas en placas de 96 pozos, silenciadas con los respectivos siRNAs como se mencionó anteriormente. A tres tiempos diferentes 24, 48 y 72 h, se evaluó la viabilidad celular por ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH) utilizando un estuche comercial Lactato Dehidrogenase kit TOX-7 (Sigma, México) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se realizó la determinación de LDH total y LDH liberada. La medición espectrofotométrica se realizó a 690 y 490 nm con el equipo FLUOstar Omega (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germany).

Evaluación de proteínas por Western Blot

Las células MA104 son lisadas empleando buffer de carga de Laemmli y se someten a ebullición por 10 minutos, para desnaturalizar proteínas e inactivar proteasas. Las muestras se someten a electroforesis en SDS-PAGE y son transferidas a una membrana de nitrocelulosa por 60 min o a una membrana PVDF por 45 min a 130 mA. La membrana de nitrocelulosa se bloquea 1 h a 37°C en solución de bloqueo y a continuación se coloca el anticuerpo primario durante 1 h a 37°C disuelto en solución de bloqueo; mientras tanto la membrana de PVDF se deja secar 15 minutos y a continuación se coloca el anticuerpo primario durante 1 h a 37°C. Se realizan 3 lavados de 10 min y se coloca el anticuerpo secundario durante 1 h a 37°C disuelto en solución de bloqueo. Las concentraciones de anticuerpo primario y secundario varían dependiendo de la proteína a evaluar. Se emplea el sustrato Immobilon quimoluminiscente de HRP (Merck, California, CA) para revelar las proteínas que se exponen en placas fotográficas X-Omat (Kodak, Rochester, NY). Finalmente, el análisis cuantitativo fue realizado empleando el software Image J.

Marcaje metabólico con azufre ³⁵S

Las células MA104 previamente tratadas con los siRNA correspondientes se infectan con rotavirus RRV a una MOI de 3, se retira el medio a las 7 hpi y se incuba durante 10 min con MEM sin metionina. A continuación, se realiza un lavado y se coloca nuevamente MEM sin metionina adicionado con una mezcla de aminoácidos marcados con metionina ³⁵S y cisteína ³⁵S a una concentración de 25 μ Ci/ml (Dupont, NEN) durante 60 min a 37°C. Las muestras se cosechan empleando buffer de lisis y se analizan por SDS-PAGE para finalmente exponerse en placas fotográficas X-Omat (Kodak, Rochester, NY).

Cuantificación de incorporación de marca por precipitación con TCA

Se realiza una mezcla de 10 μ l de lisado celular marcado con ³⁵S con 100 μ l de una solución de hidróxido de sodio 1M, mezclando de manera vigorosa. Después de incubar 5 min a 37°C, 50 μ l de esta solución se pasa a través de papel filtro y se deja secar. El papel filtro se incuba en una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 10% en agua por 3 min a 4°C. Después se lava en la misma solución por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente, se realizan dos lavados con etanol al 95% en agua. El papel filtro se deja secar, para colocarlo en líquido de centelleo Ecolite (ICN, Costa Mesa, CA). La cantidad de radioactividad incorporada se detecta en un contador de centelleo (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA)

Determinación de proteína por reacción de Bradford

Se realiza una curva de concentración empleando Albumina Serica Bovina (BSA) (Sigma Aldrich, MO). Las muestras obtenidas de células MA104 y los distintos puntos de la curva se incuban durante 5 minutos con reactivo de Bradford en una proporción 1/10 y la cuantificación se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante midiendo la absorbancia a 595 nm con el equipo FLUOstar Omega (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germany).

Inmunofluorescencia

Las células MA104 se crecen sobre cubreobjetos de 10 mm de diámetro estériles en placas de 48 pozos y a las 48 h son infectadas a una MOI de 3 durante 10 h. Posteriormente, las células son fijadas con una solución de paraformaldehído al 2% durante 20 min para a continuación permeabilizar con Triton X100 al 0.5%. Se incuba con el anticuerpo primario RPL11 o RPS9 (1:250) y NSP3 (1:1000) durante toda la noche a 2-8°C en solución de bloqueo (1% BSA en NH₄Cl 50Mm) pasado dicho tiempo se lava con solución de bloqueo e incuba con anticuerpo secundario a-ratón Alexa 488 verde (1:500) para RPL11/RPS9 y a-conejo Alexa 568 rojo (1:1000) para NSP3 durante 1 h a temperatura ambiente.

Se añade solución DAPI 50nM durante 30 minutos para teñir el núcleo, se coloca el cubreobjetos en el portaobjeto y se adiciona la solución de montaje CitiFlour AF1 (EMS, Hatfield, PA). La captura de imágenes se realiza con un Microscopio de epifluorescencia E600 acoplado a una cámara digital DXM1200 (Nikon, Japón).

PCR en tiempo real

El RNA obtenido de las células MA104 silenciadas con siRNA se extrajo con Trizol (Invitrogen, CA). Los oligonucleótidos empleados para amplificar los RNA de NSP4 y el RNA ribosomal se encuentran descritos en la sección de Materiales. El nivel de cada RNA se determinó por análisis de PCR en tiempo real de un paso como se ha reportado anteriormente⁸⁰. El equipo empleado es un 7500 RealTime PCR system y el software utilizado para el análisis de datos es Prism 7000 analysis software program (Applied Biosystems, CA).

Lipofección de partículas DLPs.

Las DLPs fueron obtenidas por centrifugación a equilibrio en un gradiente de cloruro de cesio como se ha descrito anteriormente⁹. Las DLPs se incuban a una concentración de 30 µg de proteína/mL en MEM sin suero con Lipofectamina 2000 (Invitrogen, CA) durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células MA104 son incubadas con 80 µL de la solución anterior durante 1h a 37°C, transcurrido el tiempo indicado se realizan dos lavados y se incuba en MEM sin SFB durante 14 horas.

Análisis estadístico

La significancia estadística fue evaluada mediante un análisis one-way ANOVA de varianza y a continuación por una comparación múltiple por test Turkey; también se emplearon análisis two-way ANOVA de varianza y comparación múltiple por test Dunnet empleando el software GraphPad Prism 5.0. (GraphPad Software Inc.). Las estrellas mostradas en las gráficas representan diferentes niveles de significancia estadística: *= p<0.05, **= p<0.01, ***= p<0.001 y ****= p<0.0001.

RESULTADOS

1. El silenciamiento de eIF3b, eIF3d, RPL11 y RPS9 no compromete la viabilidad celular.

Para determinar si las proteínas eIF3a, eIF3b, eIF3d, RPL11 y RPS9 tienen una relevancia en el ciclo replicativo de rotavirus, se estandarizaron las condiciones de tiempo y concentración de siRNA para silenciar la expresión de estas proteínas mediante RNAi en células MA104. En estos ensayos, las células MA104 fueron transfectadas con 2.5µM de los diferentes siRNAs y su efecto se evaluó a las 48h y 72h post-transfección. La condición óptima fue aquella donde los efectos adversos sobre las células no fueron tan elevados (evaluación de citotoxicidad) y los niveles proteicos se encontraron disminuidos (eficiencia de silenciamiento).

Para medir la citotoxicidad en las células se realizó la cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), la cual se encuentra presente en el citoplasma y es liberada al medio en situaciones de daño a la membrana plasmática, lo cual puede ocurrir en procesos de necrosis y otras formas de daño celular. Se pueden realizar dos tipos de determinación de la enzima LDH:

- cuantificación de la enzima LDH liberada en la que se mide la enzima liberada al medio debido al daño o muerte celular.
- cuantificación de la enzima LDH total en la que se evalúa la enzima presente dentro y fuera de la célula, lo que sirve de parámetro para cuantificar el número total de células.

Mediante los ensayos de citotoxicidad se encontró que la mejor condición para todos los siRNAs, fue aquella donde se empleó la concentración 2.5µM de siRNA durante 48 h post-transfección (hpt) debido a que el porcentaje de enzima LDH total durante el silenciamiento de las distintas proteínas no muestra diferencia significativa comparado contra la condición control que emplea un siRNA irrelevante (que no tiene ningún blanco celular) (*Figura 11a*). Por el contrario, la condición de 2.5µM de siRNA a un tiempo de 72 hpt mostró una disminución en el porcentaje de enzima LDH total en las 5 proteínas evaluadas (eIF3b, eIF3a, eIF3d, RPL11 y RPS9) (*Figura 12a*).

Los resultados mostrados en las figuras 11a y 12a solamente involucran la cuantificación de enzima LDH total, que representa la suma de la enzima citoplasmática y aquella que ha sido liberada al medio, parámetro indicativo del número de células en el pozo; a las 72 hpt la reducción de LDH total indica un menor número de células durante el ensayo lo cual se puede deber a una reducción del metabolismo celular provocando un menor crecimiento y duplicación celular^{20,36,81}.

En el caso de la cuantificación de la enzima LDH liberada (parámetro de muerte celular), no se encontró diferencia significativa en ninguna de las 2 condiciones evaluadas comparado con la condición control e incluso la cantidad de LDH liberada en ningún caso sobrepasa el valor de 5% indicando que el tratamiento con los distintos siRNA no inducen procesos de daño a la membrana celular (*Figura 11c y 12c*).

La eficiencia de silenciamiento se determinó mediante ensayos tipo Western blot utilizando anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra cada una de las proteínas a silenciar. En estos ensayos se comparó la cantidad de proteína en la condición control en la que se utiliza un siRNA con una secuencia irrelevante contra la condición tratada con un siRNA específico contra cada proteína, lo anterior se normalizó con respecto a los niveles de la proteína vimentina la cuál se usó como control de carga en cada condición.

La evaluación de la eficiencia de silenciamiento mediante Western Blot mostró que tanto la condición de 48h como la de 72h (*Figura 11b y 12b*) resultaron en porcentajes de silenciamiento similares. En el caso de eIF3a no fue posible silenciar la proteína más allá de un 15% en ambas condiciones, la proteína eIF3b junto con eIF3d fueron silenciadas de manera intermedia con una reducción entre el 60 y 65%, mientras que con las dos proteínas ribosomales RPL11 y RPS9 se logró un silenciamiento cercano al 90% tanto a 48 como a 72 hpt (*Figura 11d y 12d*).

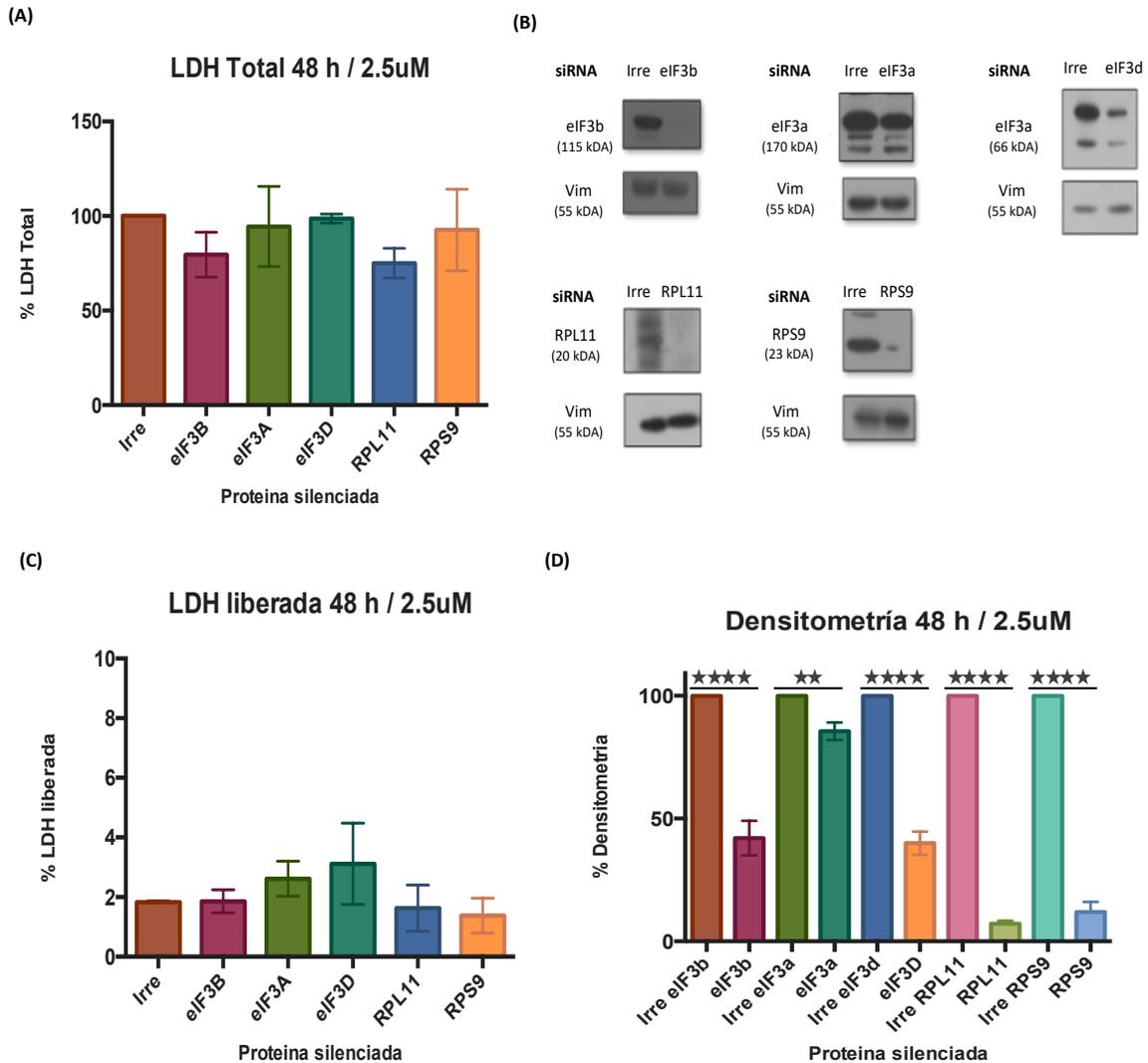


Figura 11. Estandarización de las condiciones de 48h post-transfección y concentración de 2.5 μM siRNA para el silenciamiento de las proteínas elf3b, elf3a, elf3d, RPL11 y RPS9. (A) Las células MA104 fueron silenciadas durante 48h post-transfección empleando la concentración de 2.5 μM de siRNA específico para cada una de las 5 proteínas elf3B, elf3A, elf3D, RPL11 y RPS9 así como un siRNA irrelevante. Transcurrido el tiempo determinado se mide la cantidad de enzima LDH total mediante la absorción a 690 y 490 nm. (B) Western blot representativo de las diferentes proteínas después de 48 h post-transfección empleando siRNAs específicos a 2.5 μM. (C) Las células MA104 fueron silenciadas durante 48h post-transfección empleando la concentración de 2.5 μM de siRNA específico. Transcurrido el tiempo determinado se mide la cantidad de enzima LDH liberada al medio mediante la absorción a 690 y 490 nm. (D) Densitometría de los ensayos de niveles proteicos mediante Western blot después de 48h post-transfección empleando una concentración 2.5 μM de siRNA. Las barras muestran la desviación estándar de tres ensayos independientes (n=3). Las estrellas sobre las barras indican el grado de significancia comparado contra la condición irrelevante (*=p<0.05, **= p<0.01, ***= p<0.001, ****= p<0.0001 mediante ANOVA).

Estos datos anteriores, podemos hacer las siguientes conclusiones: los resultados de cuantificación de enzima LDH liberada y total muestran que durante el tratamiento con los siRNAs a 48 hpt a una concentración de 2.5μM no existen diferencias significativas comparado contra la condición control, mientras que en la condición a las 72 hpt se observa una disminución de la cantidad total de células, sin inducir su muerte sino muy probablemente por una reducción en el crecimiento celular. La concentración de 2.5μM de siRNA permite un silenciamiento efectivo de las proteínas elf3b, elf3d, RPL11 y RPS9, a las 48 y 72 h post-transfección, observado mediante ensayos tipo western blot, no observamos reducción en los niveles de la proteína elf3a en ninguna de las condiciones analizadas por lo que se decide no continuar con los experimentos que involucran a esta proteína.

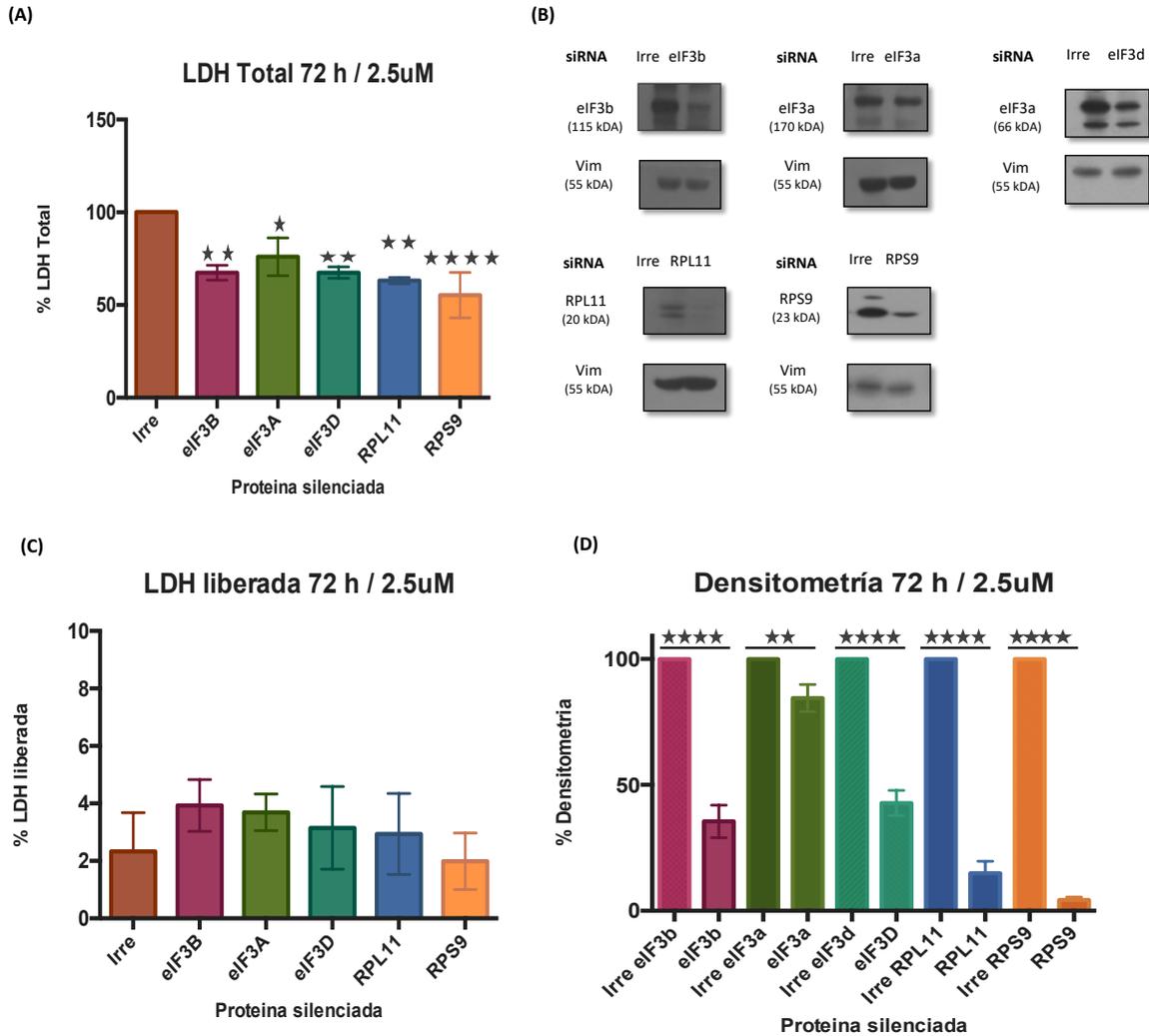


Figura 12. Estandarización de las condiciones 72h post-transfección y concentración de 2.5 μM siRNA para el silenciamiento de las proteínas eIF3b, eIF3a, eIF3d, RPL11 y RPS9. (A) Las células MA104 fueron silenciadas durante 72h post-transfección empleando la concentración de 2.5 μM de siRNA específico para cada una de las 5 proteínas eIF3b, eIF3a, eIF3d, RPL11 y RPS9 así como un siRNA irrelevante. Transcurrido el tiempo determinado se mide la cantidad de enzima LDH total mediante la absorción a 690 y 490 nm. (B) Western blot representativo de las diferentes proteínas después de 72h post-transfección empleando siRNAs específicos a 2.5 μM. (C) Las células MA104 fueron silenciadas durante 72h post-transfección a concentración de 2.5 μM de siRNA específico. Transcurrido el tiempo determinado se mide la cantidad de enzima LDH liberada al medio mediante la absorción a 690 y 490 nm. (D) Densitometría de los ensayos de niveles proteicos mediante Western blot después de 72h post-transfección empleando una concentración 2.5 μM de siRNA. Las barras muestran la desviación estándar de tres ensayos independientes (n=3). Las estrellas sobre las barras indican el grado de significancia comparado contra la condición irrelevante (*=p<0.05, **= p<0.01, ***= p<0.001, ****= p<0.0001 mediante ANOVA).

2. El silenciamiento de eIF3d, RPL11 y RPS9 disminuye la producción de progenie viral de rotavirus.

Con el objetivo de determinar si las proteínas eIF3b, eIF3d, RPL11 y RPS9 juegan algún papel durante el ciclo de infección de rotavirus, la expresión de dichas proteínas fue silenciada mediante RNA de interferencia y se evaluó el efecto de su ausencia en la producción de progenie viral. En estos experimentos, las células fueron transfectadas con los siRNA específicos a una concentración de 2.5μM y 48 hpt las células fueron infectadas con la cepa de rotavirus de simio RRV, 14 horas post-infección (hpi) las células se lisaron y la cantidad de partículas virales infecciosas se determinó mediante un ensayo de formación de focos por inmunoperoxidasa (Figura 13a).

Los resultados muestran una disminución estadísticamente significativa en comparación a las células tratadas con un siRNA irrelevante en los silenciamientos de las proteínas eIF3d, RPL11 y RPS9 con una reducción cercana al 60% en los tres casos, mientras que durante el tratamiento con siRNA para eIF3b no se observó una disminución significativa en la producción de progenie viral (*Figura 13a*)

Estos resultados sugieren que las proteínas eIF3d, RPL11 y RPS9 participan, a través de un mecanismo aún por caracterizar, en la producción de progenie viral durante la infección por rotavirus.

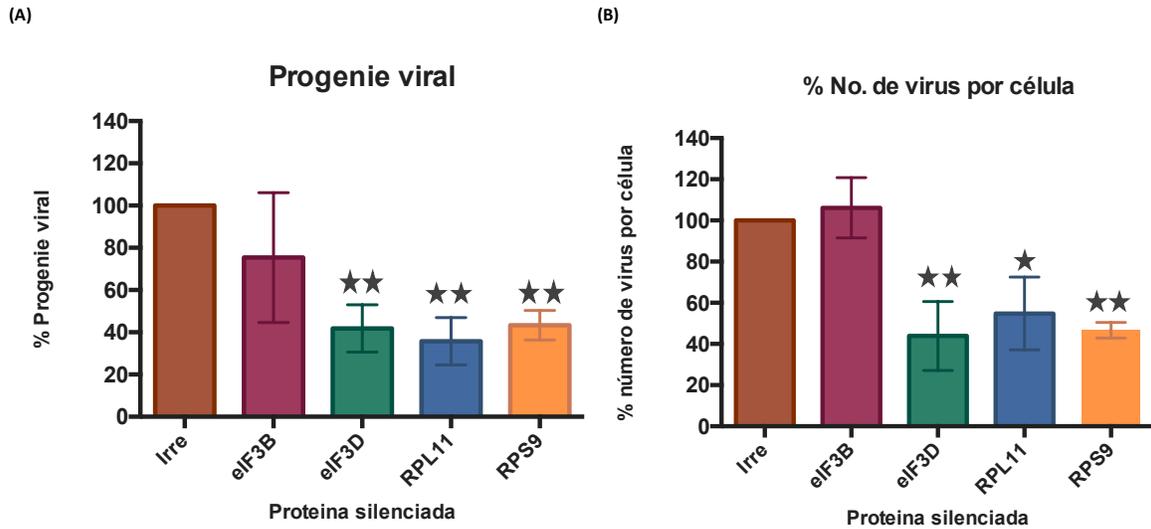


Figura 13. Progenie viral de rotavirus durante el silenciamiento de distintas proteínas. (A) La línea celular MA104 fue silenciada durante 48h post-transfección empleando una concentración de 2.5mM de siRNA específico para cada una de las 4 proteínas eIF3B, eIF3D, RPL11 y RPS9 así como un siRNA irrelevante. A continuación, se infectan con rotavirus RRV a una MOI de 3 durante 14 h. Los lisados se colectaron en buffer de lisis y fueron titulados en células MA104 mediante la técnica de Determinación de título viral por formación de focos por inmunoperoxidasa. (B) Ajuste de progenie viral considerando su relación con el número de células (tomado de cuantificación de LDH total). Para la cuantificación de enzima LDH transcurrido el tiempo determinado se mide la cantidad de enzima mediante la absorción a 690 y 490 nm. Las barras indican la desviación estándar por tres ensayos independientes (n=3). Las estrellas sobre las barras indican el grado de significancia comparado contra la condición irrelevante (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$, ****= $p < 0.0001$ mediante ANOVA).

Si bien los ensayos de citotoxicidad muestran que la diferencia en el número de células durante los silenciamientos de las distintas proteínas no fue significativa (*Figura 11a*), nos preguntamos si el efecto en la reducción de la progenie viral durante los silenciamientos de eIF3d, RPL11 y RPS9 pudiese resultar de un menor número de células en comparación al tratamiento con el siRNA irrelevante, o si la reducción de la progenie viral se debe realmente a la ausencia de las proteínas silenciadas. Para contestar esta pregunta, cuantificamos la producción de progenie viral durante el silenciamiento de las 4 proteínas, como se describió anteriormente y además determinamos la enzima LDH total, lo que nos sirvió para normalizar la producción de progenie viral con respecto al número de células presentes en cada condición. El resultado de estos ensayos muestra que la progenie viral no se modificó al silenciar eIF3b, en contraste, si existe una disminución significativa en la producción de progenie viral al silenciar la expresión de eIF3d, RPL11 y RPS9 revelando su importancia en la infección por rotavirus (*Figura 13b*).

3. La ausencia de eIF3b, eIF3d, RPL11 y RPS9 no tiene un efecto en la síntesis de proteínas virales de rotavirus.

Debido a que las proteínas analizadas en el presente estudio están relacionadas con el proceso de traducción celular decidimos evaluar si la síntesis de proteínas virales o celulares presenta alguna alteración que correlacione con la reducción de progenie viral observada durante los silenciamientos. Para ello, células silenciadas para eIF3b, eIF3d, RPL11 y RPS9 fueron marcadas metabólicamente con ^{35}S para cuantificar la síntesis *de novo* de proteínas en presencia o no de la infección por rotavirus. Las células MA104 fueron silenciadas durante 48 h con los siRNAs correspondientes y posteriormente fueron infectadas o no con rotavirus RRV durante 7 h. Transcurrido dicho tiempo se incubó con una mezcla de aminoácidos marcados

con ^{35}S durante 1 h y finalmente las muestras fueron analizadas por autorradiografía de geles de SDS-PAGE (Figura 14 y 15), así como también mediante la cuantificación de incorporación de marca por precipitación con ácido tricloroacético (TCA) (Figura 16). En los análisis de densitometría de las autorradiografías, se ajustó la cantidad de proteína mediante la cuantificación de proteínas celulares con un peso molecular entre 95 y 55 kDa en la tinción de Azul de Coomassie.

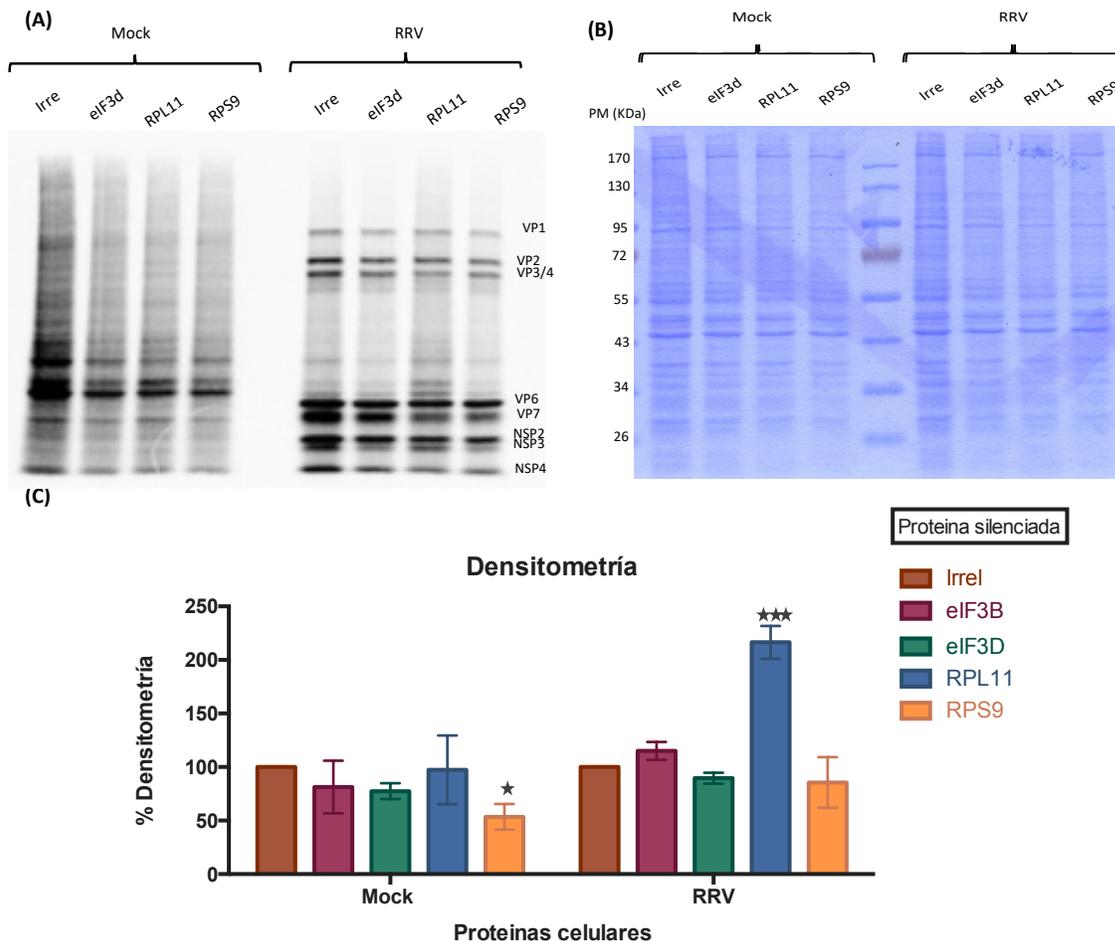


Figura 14. Marcaje metabólico con azufre ^{35}S durante la infección de rotavirus en células silenciadas. La línea celular MA104 fue silenciada durante 48h post-transfección de diferentes siRNAs para las proteínas eIF3B, eIF3D, RPL11 y RPS9 y un siRNA irrelevante. Las células se infectan con rotavirus RRV a una MOI de 3 durante 7h y posteriormente se marca con azufre ^{35}S durante 60 minutos. Los lisados son separados para su análisis mediante gel SDS-PAGE para finalmente exponerse en placas fotográficas. **(A)** Imagen representativa de autorradiografía de gel SDS-PAGE 12.5% con muestras de células infectadas con RRV o mock infectadas durante el silenciamiento de distintas proteínas. **(B)** Imagen representativa de tinción de azul de Coomassie como control de carga proteica de las imagen de autorradiografía mostrada en (A). **(C)** Densitometría de las proteínas celulares con un peso molecular entre 95 y 55 kDa marcadas radiactivamente con un peso molecular entre 95 y 55 kDa, se emplea la proteína celular con un peso molecular entre 95 y 55 kDa en la tinción de azul de Coomassie como control de carga. Las barras indican la desviación estándar por tres ensayos independientes (n=3). Las estrellas sobre las barras indican el grado de significancia comparado contra la condición irrelevante (*=p<0.05, **= p<0.01, ***= p<0.001, ****= p<0.0001 mediante ANOVA).

El análisis de las autorradiografías mostró una serie de resultados importantes: primero, en células no infectadas el silenciamiento de RPS9 parece disminuir ligeramente la síntesis de proteínas celulares (Figura 14a), la cuantificación de las bandas de las proteínas celulares con un peso molecular entre 95 y 55 kDa en células no infectadas silenciadas para RPS9 muestra una diferencia significativa en comparación a las mismas bandas de proteínas celulares en células tratadas con siRNA irrelevante (Figura 14a y 14c).

En segundo lugar, la infección de rotavirus disminuye la síntesis de proteínas celulares en gran proporción (Figura 14a) como ya se ha reportado anteriormente^{25,49,51,54}.

Por otra parte, observamos que al silenciar la expresión de la proteína RPL11 en células infectadas con RRV existe un aumento en el fondo de proteínas celulares en comparación al control infectado tratado con un siRNA irrelevante (*Figura 14a y 14c*).

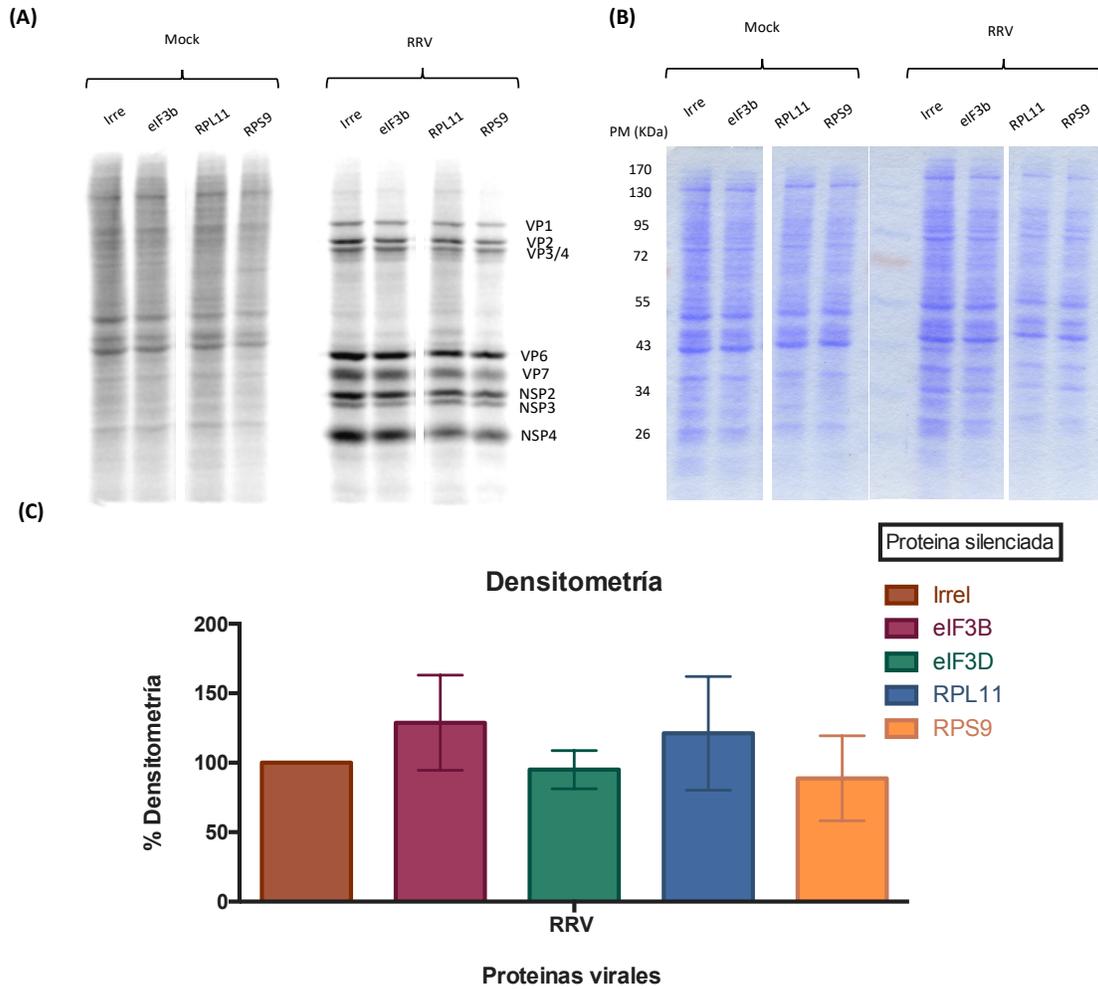


Figura 15. Marcaje metabólico con aminoácidos marcados con metionina ³⁵S y cisteína ³⁵S durante la infección de rotavirus en células silenciadas. La línea celular MA104 fue silenciada durante 48h post-transfección de diferentes siRNAs para las proteínas eIF3B, eIF3D, RPL11 y RPS9 y un siRNA irrelevante. Las células se infectan con rotavirus RRV a una MOI de 3 durante 7h y posteriormente se marca con azufre ³⁵S durante 60 minutos. Los lisados son separados para su análisis mediante gel SDS-PAGE para finalmente exponerse en placas fotográficas. **(A)** Imagen representativa de autorradiografía de gel SDS-PAGE 10% con muestras de células infectadas con RRV o mock infectadas durante el silenciamiento de distintas proteínas. **(B)** Imagen representativa de tinción de azul de Coomassie como control de carga proteica de la imagen de autorradiografía mostrada en (A). **(C)** Densitometría de las 8 proteínas virales marcadas radiactivamente observadas en el inciso (A), se emplea la proteína celular con un peso molecular entre 95 y 55 kDa en la tinción de azul de Coomassie como control de carga. Las barras indican la desviación estándar por tres ensayos independientes (n=3).

Por último, el silenciamiento de las proteínas eIF3b, eIF3d, RPL11 y RPS9 no parece afectar de manera significativa la síntesis de las proteínas virales, si bien en la autorradiografía de células infectadas y silenciadas para las proteínas eIF3d, RPL11 y RPS9 encontramos que las proteínas virales VP7, NSP3 y NSP4 se observan ligeramente disminuidas, al analizar por densitometría la cantidad de las diferentes proteínas no encontramos diferencias significativas comparadas contra los niveles de dichas proteínas en la condiciones control (*Figura 15*).

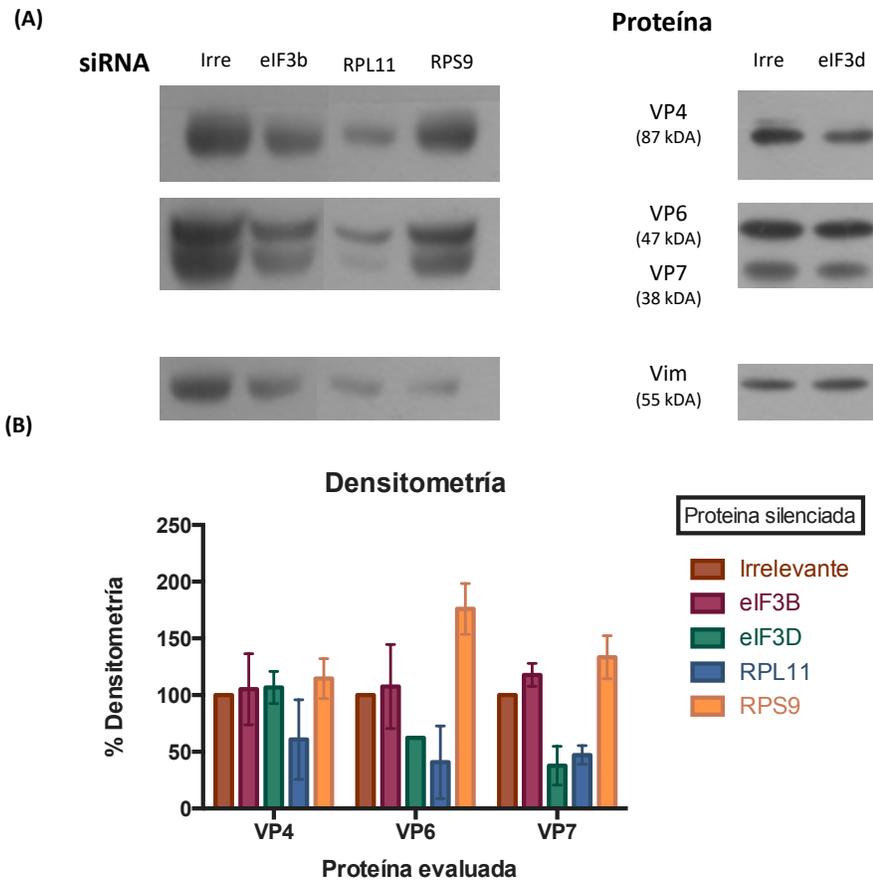


Figura 16. Análisis de la cantidad de proteína viral durante el silenciamiento de distintas proteínas. La línea celular MA104 fue silenciada durante 48h post-transfección de diferentes siRNAs para las proteínas eIF3B, eIF3A, eIF3D, RPL11 y RPS9 y un siRNA irrelevante. Las células se infectan con rotavirus RRV a una MOI de 3 durante 7h y posteriormente se marca con aminoácidos marcados con metionina ³⁵S y cisteína ³⁵S durante 60 minutos. Los lisados son separados para su análisis mediante gel SDS-PAGE para realizar Western Blot usando un anticuerpo contra la partícula TLP y contra vimentina como control de carga. **(A)** Imagen representativa de Western Blot de gel SDS-PAGE 10% con muestras de células infectadas con RRV durante el silenciamiento de distintas proteínas. **(B)** Densitometría de los ensayos de niveles proteicos mediante Western blot, se emplea la proteína celular vimentina como control de carga para evaluar a las proteínas virales VP4, VP6 y VP7. Las barras indican la desviación estándar por tres ensayos independientes (n=3).

Para complementar lo observado en la autorradiografía nos dimos a la tarea de analizar la cantidad de las proteínas virales en células silenciadas mediante ensayos de Western Blot empleando un anticuerpo contra la partícula TLP que identifica las proteínas VP4, VP6 y VP7. Los resultados de este análisis confirman que no hubo un cambio significativo en la síntesis de proteínas virales durante el silenciamiento de eIF3d, RPL11 o RPS9 (Figura 16).

A su vez, para cuantificar la cantidad de marca radiactiva absorbida ajustada por microgramo de proteína sintetizada (cpm/ μ g) en las diferentes condiciones, los lisados marcados con ³⁵S se precipitaron con TCA, lo cual permite eliminar la marca radiactiva libre mientras que la marca incorporada (cpm) presente en el precipitado es cuantificada en un contador de centelleo, para ajustar la marca incorporada por microgramo de proteína se realizó una cuantificación de proteína por el método de Bradford (Figura 17).

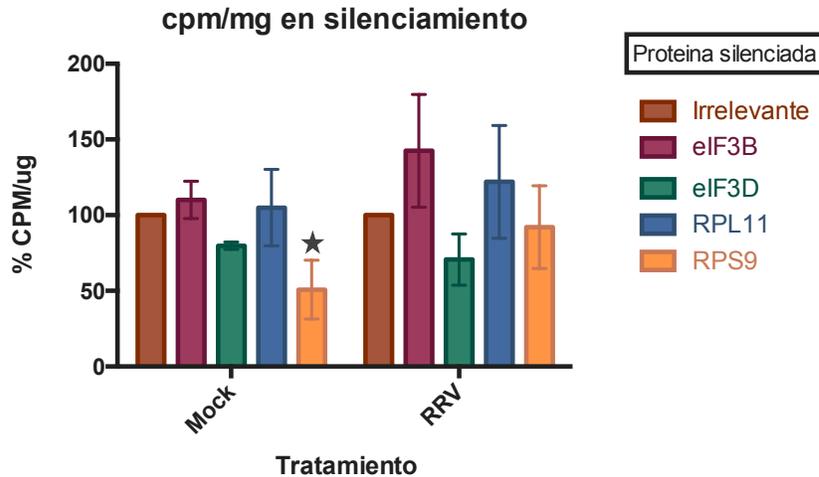


Figura 17. Cuantificación de la incorporación de marca radiactiva en síntesis proteica. La línea celular MA104 fue silenciada durante 48h post-transfección de siRNA contra eIF3B, eIF3D, RPL11 y RPS9 y un siRNA irrelevante. A continuación, las células se infectan con rotavirus RRV a una MOI de 3 durante 7h y se marcan con azufre ^{35}S durante 60 minutos. Las proteínas presentes en los lisados celulares son precipitadas con ácido tricloroacético y también se determina la concentración de proteína por el método de Bradford. Los valores de cpm/ μg se comparan con la condición irrelevante mock infectado para obtener el porcentaje de incorporación de marca radiactiva por microgramo de proteína. Las barras indican la desviación estándar por tres ensayos independientes (n=3). Las estrellas sobre las barras indican el grado de significancia comparado contra la condición irrelevante (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$, ****= $p < 0.0001$ mediante ANOVA).

Estos ensayos muestran que el silenciamiento de las proteínas eIF3b, eIF3d y RPL11 en células no infectadas, no ocasionan una disminución significativa en la incorporación de marca radiactiva, lo que sugiere que el silenciamiento de estas proteínas no afecta notablemente la síntesis *de novo* de las proteínas celulares. La única proteína cuyo silenciamiento tuvo un efecto sobre la traducción de proteínas celulares fue RPS9 disminuyendo en aproximadamente 50% la incorporación de ^{35}S lo cual concuerda con un reporte previo⁷⁸.

En el caso de las células infectadas con rotavirus RRV y silenciadas contra las diferentes proteínas, se puede observar que todas las condiciones presentan valores de cpm/ μg iguales o superiores en comparación a las células infectadas con rotavirus y tratadas con siRNA irrelevante. Es difícil concluir con base a estos resultados sobre si el silenciamiento de las proteínas ocasiona un ligero aumento en la traducción de proteínas virales puesto que durante la medición de cpm se involucra tanto a proteínas virales como a las proteínas celulares que continúan traduciéndose aún durante la infección.

En resumen, los resultados del análisis de las autoradiografías, la cuantificación de proteína viral por Western blot y de incorporación de marca radiactiva por TCA corroboran que la infección por rotavirus RRV disminuye la traducción celular global mientras la síntesis de proteínas virales se lleva a cabo de una manera eficaz. A su vez, los hallazgos más relevantes son que el silenciamiento de eIF3b, eIF3c, RPL11 y RPS9 no tiene un efecto significativo en la traducción de las proteínas virales y que el silenciamiento de la proteína RPL11 durante la infección reduce el efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas celulares producida por RRV.

4. La infección con rotavirus RRV no altera la localización subcelular de las proteínas RPL11 y RPS9.

Se ha reportado en la literatura que la proteína ribosomal RPL18 es importante para el ciclo replicativo del virus del dengue mediante su interacción con la proteína viral NS1 y que el silenciamiento por siRNA de RPL18 ocasiona una disminución en la traducción y progenie viral⁸². En ese trabajo se reportó además que, durante la infección con dengue, la proteína ribosomal RPL18 cambia su localización citoplasmática para desplazarse a la zona perinuclear, sitio donde se lleva a cabo la replicación del virus.

Para estudiar si durante la infección por rotavirus las proteínas RPL11 y RPS9 sufrían un cambio de su localización subcelular, se infectaron células MA104 con rotavirus RRV a una MOI de 3; a las 6 hpi las células se fijaron y se realizaron ensayos de inmunofluorescencia usando anticuerpos específicos contra RPL11, RPS9 y NSP4 (Figura 18). En estos ensayos encontramos que la distribución de ambas proteínas ribosomales en células infectadas es semejante a la observada en las células sin infectar. Para la proteína RPS9, su localización en células no infectadas es completamente citoplasmática (segundo panel de la figura 18b) y no hay cambios durante la infección. En el caso de RPL11, en células no infectadas su localización parece ser más homogénea apareciendo distribuida tanto en el citoplasma como en el núcleo y no se observan cambios de localización durante la infección (figura 18a).

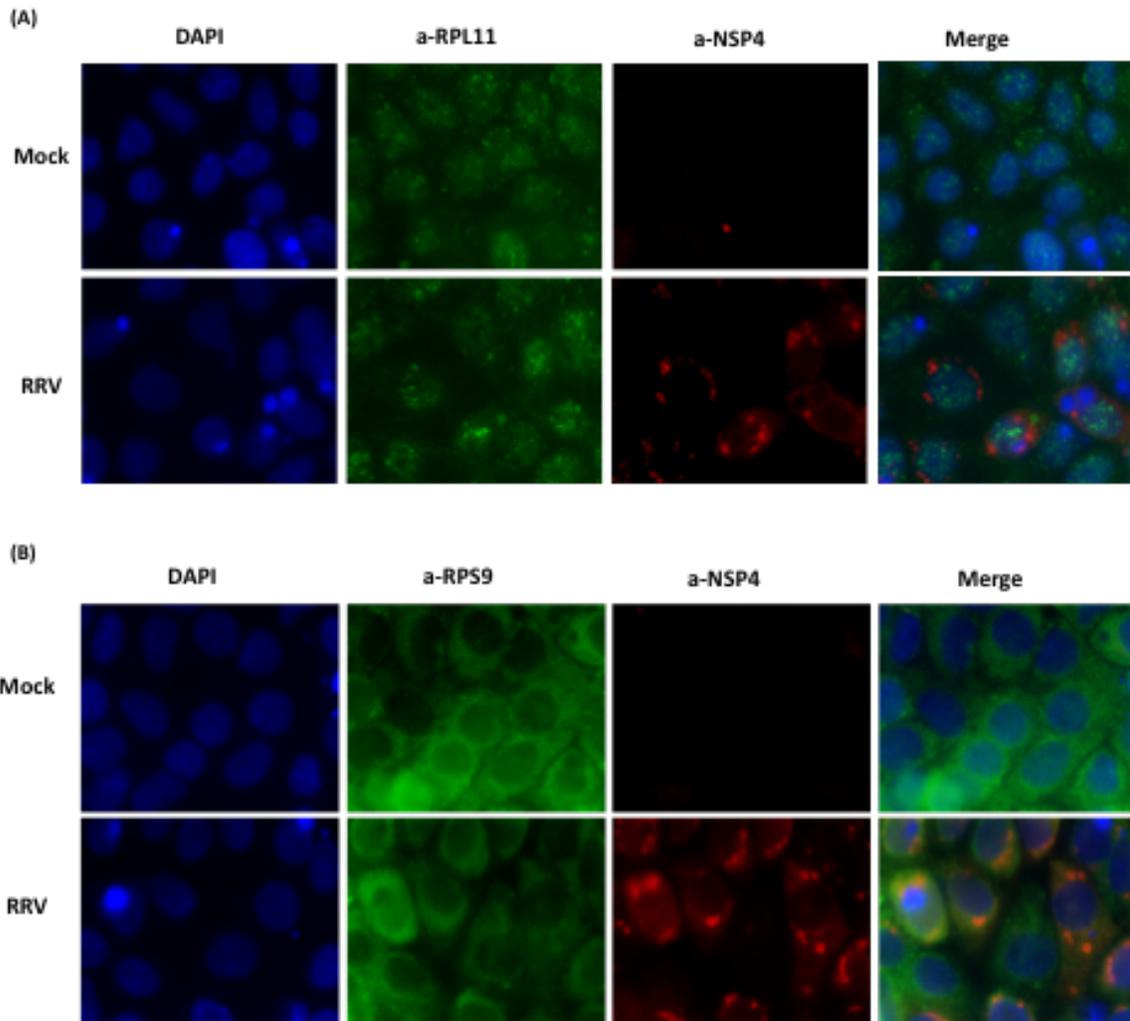


Figura 18. Localización subcelular de las proteínas RPL11 y RPS9 en células infectadas con rotavirus RRV. (A) Las células MA104 se infectaron durante 6h con rotavirus RRV a una MOI de 3, se trataron con anticuerpos monoclonales contra RPL11 (verde) y NSP4 (rojo) así mismo los núcleos son teñidos con DAPI (azul). (B) Para el caso de la proteína RPS9 se empleó la misma metodología utilizando los anticuerpos monoclonales contra RPS9 (verde) y NSP4 (rojo).

5. La replicación del genoma de rotavirus requiere de la presencia de las proteínas eIF3d y RPL11.

Ante la ausencia de un efecto en la traducción de las proteínas virales durante el silenciamiento de las proteínas eIF3b, eIF3d, RPL11 y RPS9 (Figura 15), y para explicar el porqué de la reducción de la producción de progenie viral al silenciar eIF3D, RPL11 y RPS9 (Figura 13) se evaluó la replicación del genoma viral para determinar si existía un efecto en este proceso del ciclo de replicación de rotavirus.

La cuantificación de RNA viral se realizó en células silenciadas 48 hpt empleando siRNAs contra las proteínas eIF3d, RPL11 y RPS9 e infectadas durante 8 h con rotavirus RRV. El RNA total fue extraído con Trizol y cuantificado mediante RT-qPCR empleando los oligonucleótidos descritos en Materiales y Métodos dirigidos hacia el mRNA de la proteína viral NSP4 y como control interno 18s rRNA. El nivel de cada mRNA se determinó por análisis de RT-qPCR empleando un equipo 7500 RealTime PCR system descrito con anterioridad⁸⁰.

Los resultados de este ensayo muestran que el silenciamiento de las tres proteínas tiene efecto sobre la acumulación del RNA viral; mientras que la reducción de la proteína RPS9 resultó en un aumento de la cantidad del RNA viral, la disminución de las proteínas RPL11 y eIF3d ocasionó una caída en la cantidad de RNA de rotavirus (*Figura 19*).

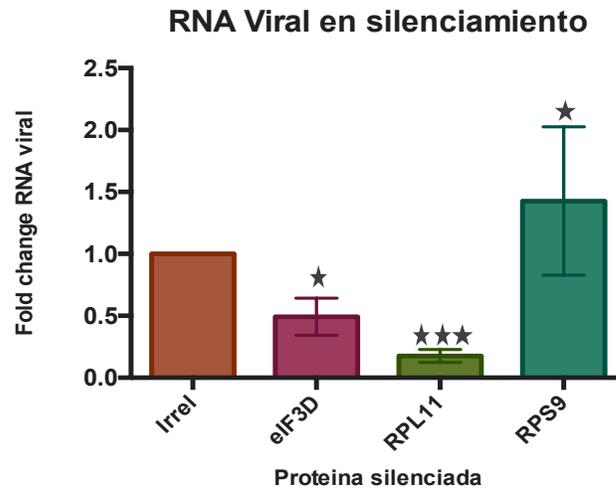


Figura 19. Cambio en la cantidad de RNA viral durante el silenciamiento de eIF3d, RPL11 y RPS9. Las células MA104 fueron silenciada durante 48h post-transfección de siRNA contra eIF3D, RPL11 y RPS9 y un siRNA irrelevante. Posteriormente fueron infectadas con rotavirus RRV a una MOI de 3 durante 8h. El RNA total fue extraído con Trizol y cuantificado mediante RT-PCR usando el sistema descrito en Materiales y Métodos. Las barras indican la desviación estándar por tres ensayos independientes (n=3). Las estrellas sobre las barras indican el grado de significancia comparado contra la condición (*=p<0.05, **= p<0.01, ***= p<0.001, ****= p<0.0001 mediante ANOVA).

Con el fin de complementar el ensayo anterior, decidimos realizar una cinética de concentración de RNA viral a diferentes horas post-infección durante los silenciamientos de eIF3d y RPL11, solo empleamos estas proteínas debido a que en estas el efecto en la alteración de la cantidad de RNA resultó más interesante para nosotros. Durante este experimento, las células MA104 fueron silenciadas durante 48 hpt con siRNAs dirigidos hacia las proteínas eIF3d y RPL11 e infectadas con rotavirus RRV durante 0, 2, 4, 6, 8 y 10h. La cantidad de RNA se cuantificó mediante RT-qPCR empleando la metodología descrita con anterioridad (*Figura 20*).

La cinética de RNA viral mostró que los silenciamientos de eIF3d y RPL11 ocasionan una disminución de la cantidad de RNA viral con una diferencia significativa a partir de las 6 h. De manera particular, el knockdown de eIF3d refleja una concentración menor de RNA viral, que logra alcanzar un 50% a las 10h en comparación con la condición control, concordando con los resultados del experimento realizado previamente a las 8 hpi. A su vez, el silenciamiento de RPL11 reduce la acumulación de RNA viral desde las 4 hpi y solo se logra detectar un 20% de RNA viral a las 10 hpi en comparación con la condición control. Efectos similares a los del silenciamiento de RPL11 en la síntesis de RNA viral han sido observados durante el silenciamiento de las proteínas virales VP1, VP2, VP3 y VP6 en la infección por rotavirus⁸³, estas proteínas participan en el proceso de replicación del RNA viral, lo que sugiere que el silenciamiento de RPL11 podría afectar la traducción de proteínas celulares involucradas en este proceso.

Cinética de RNA viral

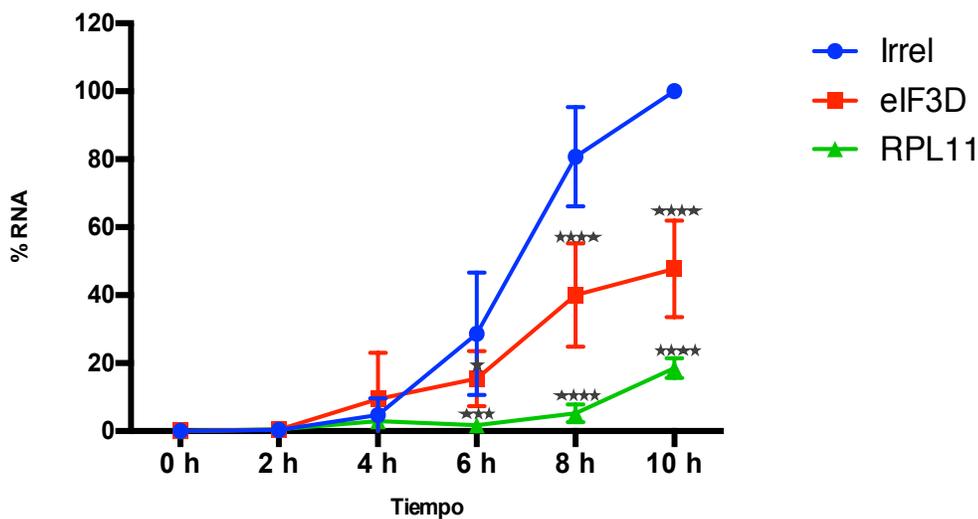


Figura 20. Cinética de la cantidad de RNA viral durante el silenciamiento de eIF3d y RPL11. Las células MA104 fueron silenciada durante 48h post-transfección de siRNA contra eIF3D, RPL11 y un siRNA irrelevante. A continuación, se infectaron con rotavirus cepa RRV a una MOI. El RNA total fue extraído a distintos tiempos con Trizol y cuantificado mediante RT-PCR usando el sistema descrito en Materiales y Métodos. Las barras indican la desviación estándar por tres ensayos independientes (n=3). Las estrellas sobre las barras indican el grado de significancia comparado contra la condición irrelevante (*=p<0.05, **= p<0.01, ***= p<0.001, ****= p<0.0001 mediante ANOVA).

6. El silenciamiento de RPL11 inhibe la entrada de rotavirus a la célula huésped

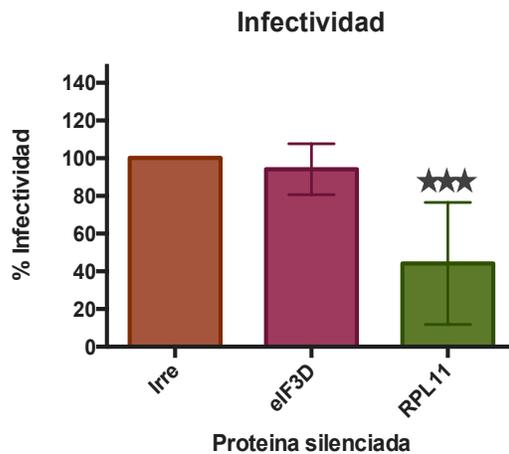
Para estudiar si la reducción en la cantidad de RNA viral al silenciar eIF3d y RPL11 observada desde las primeras 6 h podría deberse a defectos en la unión, entrada o descapsidación de las partículas virales, analizamos los primeros pasos del ciclo de replicación de rotavirus en células silenciadas contra eIF3d y RPL11 mediante ensayos de infectividad.

A diferencia del ensayo de cuantificación de progenie viral que permite evaluar el ciclo viral desde el proceso de unión hasta la salida del virus, el caracterizar la infectividad en un solo ciclo de replicación permite estudiar si los procesos iniciales de la infección (unión, entrada, descapsidación, transcripción y traducción de los mRNA virales) se encuentran alterados. En estos ensayos, las células fueron transfectadas con los siRNAs específicos contra eIF3d y RPL11 y 48 hpt las células fueron infectadas con rotavirus RRV; a las 14 hpi las células se fijaron y se cuantificó el número de células infectadas mediante un ensayo de formación de focos de inmunoperoxidasa que nos permite detectar el número de células infectadas (*Figura 21a*).

El silenciamiento de RPL11 causó una disminución en la infectividad de un 60%, lo cual sugiere que alguno de los primeros pasos del ciclo replicativo viral podría estar afectado por la ausencia de RPL11, lo cual se refleja en una menor cantidad de RNA viral sintetizado como observamos en la cinética de RNA.

Por su parte, la ausencia de eIF3d no afecta la infectividad de rotavirus, por lo que aún falta por esclarecer el mecanismo a través del cual observamos una disminución en la cantidad de RNA viral y de progenie viral al silenciar eIF3d.

(A)



(B)

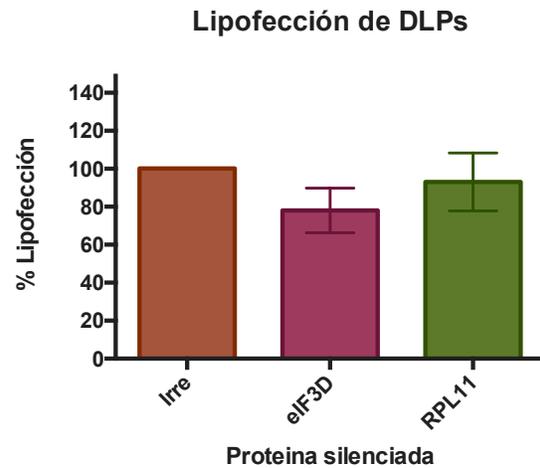


Figura 21. Infectividad de rotavirus y lipofección de partículas DLPs durante el silenciamiento de eIF3d y RPL11 (A) Las células MA104 se silenciaron durante 48h post-transfección empleando una concentración de 2.5mM de siRNAs contra eIF3D y RPL11 así como un siRNA irrelevante. A continuación, se infectan con rotavirus RRV a una MOI de 3 durante 14h, transcurrido dicho tiempo se determinó la cantidad de células infectadas mediante ensayo de formación de focos por inmunoperoxidasa **(B)** La línea celular MA104 fue silenciada con siRNAs contra eIF3D y RPL11 durante 48h post-transfección. Posteriormente se lipofectaron con partículas DLPs de rotavirus RRV a una concentración de 30 µg de proteína/mL con Lipofectamina 2000 durante 1h a 37°C, transcurrido el tiempo indicado se realizan dos lavados y se incuban en MEM libre de SFB durante 14 horas. Se determinó la cantidad de células infectadas mediante ensayo de formación de focos por inmunoperoxidasa. Las barras indican la desviación estándar por tres ensayos independientes (n=3). Las estrellas sobre las barras indican el grado de significancia comparado contra la condición irrelevante (*=p<0.05, **= p<0.01, ***= p<0.001, ****= p<0.0001 mediante ANOVA).

Para evaluar si el proceso de entrada podría ser el paso alterado por la ausencia de RPL11 se realizaron ensayos de lipofección de DLPs. Como se ha mencionado, estas partículas carecen de la capa externa formada por las proteínas VP4 y VP7 por lo cual no son infectivas ya que no pueden llevar a cabo el proceso de unión a la célula huésped; sin embargo, si las partículas DLPs son transfectadas dentro de la célula huésped son capaces de llevar a cabo el ciclo replicativo completo. En estos ensayos, las células fueron silenciadas con los siRNAs dirigidos a eIF3d y RPL11 durante 48 hpt y posteriormente fueron transfectadas con DLPs purificadas durante 1h a 37°C, el número de células infectadas en estas condiciones se determinó a las 14 h post-lipofección (*Figura 21b*). No se encontraron diferencias significativas entre el número de células infectadas por lipofección de DLPs durante los silenciamientos de eIF3d y RPL11 en comparación a las células control tratadas con un siRNA irrelevante. Lo que sugiere que el silenciamiento de RPL11 debe estar afectando algún paso en el proceso de unión o de entrada de las partículas de rotavirus, ya que la transfección de las DLPs dentro de células silenciadas para RPL11, saltando el paso de unión y entrada, permite llevar a cabo el ciclo replicativo de rotavirus como ocurre en las condiciones control.

DISCUSIÓN

Los rotavirus, al igual que muchos otros virus, han desarrollado estrategias que le permiten establecer un proceso infeccioso eficiente dentro de la célula huésped, involucrando múltiples aspectos que abarcan entre muchos otros desde la unión y entrada a la célula, pasando por el control de la respuesta inmune innata y el secuestro de la maquinaria de traducción para elaborar sus proteínas, hasta llegar a la modulación del tráfico vesicular para facilitar la salida de las partículas virales^{3,10,25}.

Inicialmente intentamos dilucidar el papel que desempeñan las subunidades “a”, “b” y “d” del factor eIF3 y las proteínas ribosomales RPL11 y RPS9 durante la infección por rotavirus, toda vez que estas proteínas habían sido identificadas previamente como relevantes en el ciclo replicativo mediante un estudio de tamizaje con una biblioteca de siRNAs⁷⁶. La estrategia experimental se basó en el silenciamiento de estas cinco proteínas empleando siRNAs específicos y la evaluación de los efectos de la ausencia de estas proteínas en las distintas etapas del ciclo replicativo de rotavirus.

Dado que no pudimos silenciar con la metodología propuesta al factor eIF3a, no continuamos con los ensayos relacionados con esta proteína.

En primer lugar, el silenciamiento de las proteínas eIF3b, eIF3d, RPL11 y RPS9 en células no infectadas mostró distintos resultados: para el caso de la subunidad eIF3b aunque su knockdown ha sido reportado con anterioridad en algunas líneas celulares, los efectos de su ausencia no son del todo claros: se sabe que eIF3b sirve de nucleación al subcomplejo YLC y su silenciamiento ocasiona el desensamble del complejo eIF3 en las unidades individuales²⁰, por lo que se sugiere que eIF3 no puede ejercer más su función provocando una reducción en la traducción de proteínas celulares.

El silenciamiento de eIF3b en células HEK293 produce una reducción en la incorporación de metionina ³⁵S de un 75-80%, ocasionando un fenómeno conocido como *proliferación celular inhibida* que consiste en un crecimiento retrasado con morfología celular alargada, menor número de células y un déficit en el metabolismo sin presencia de muerte celular^{20,36}.

Al determinar los efectos del silenciamiento de la proteína eIF3b en células MA104 no infectadas a la condición de 48 h encontramos que no existen alteraciones morfológicas en la célula, tampoco hay cambios en la viabilidad celular ni en la síntesis proteica mediante incorporación de metionina ³⁵S. Las diferencias entre nuestros resultados y los citados anteriormente podría deberse a que no se logró un silenciamiento eficiente de esta proteína en nuestros ensayos, así como también a las distintas variables involucradas: las secuencias en los siRNAs empleados, tiempo de silenciamiento o las diferentes líneas celulares, un efecto ya visto con anterioridad para eIF3a, donde dependiendo del tipo celular se observan distintos fenotipos^{20,36}.

Por otra parte, durante los tratamientos con siRNAs de las proteínas eIF3d, RPL11 y RPS9 en células MA104 no infectadas, fue posible silenciar dichas proteínas en un 60%, 90% y 80% respectivamente sin cambios en la viabilidad celular por LDH total.

El silenciamiento de RPL11 se ha reportado produce una disminución del 30% en la traducción celular⁸⁴, sin embargo nuestros resultados no muestran cambio alguno, lo cual podría explicarse nuevamente a una diferencia entre las líneas celulares empleadas, puesto que en dicho estudio se emplean una línea celular primaria de pulmón de humano mientras que nosotros lo realizamos en una línea inmortalizada de riñón de mono.

En cambio, la ausencia de RPS9 si demostró una disminución en la traducción de proteína celular cercana al 50%, así como también una alteración de la morfología dando lugar a células alargadas (datos no mostrados) lo cual es similar a lo reportado previamente en células de glioma U343MGa Cl2:6⁷⁸.

El que el silenciamiento de RPL11 no muestre cambios en la traducción celular y que la falta de RPS9 solo inhiba un 50% de dicho proceso, no indica que estas proteínas no sean relevantes para la síntesis celular, sino que podrían estar involucradas en procesos de traducción no canónicos específicos o a su vez sugerir que la presencia de estas proteínas en los ribosomas no es ubicua, retomando la teoría de los ribosomas

especializados que sugiere una diferente composición de los ribosomas dependiente del tejido, línea celular y etapa del desarrollo^{56,59,77}.

A su vez, el silenciamiento de eIF3d reflejó una ligera disminución en la síntesis de proteínas celulares en células no infectadas, aunque no suficiente para resultar en una diferencia estadísticamente significativa. El reporte previo encontrado en la literatura muestra una importante reducción en la traducción celular y en la homeostasis metabólica durante el silenciamiento de eIF3d²⁰; lo cual resulta interesante puesto que a diferencia de eIF3a y eIF3b que son centros de nucleación de los subcomplejos, eIF3d solamente se encuentra débilmente asociado con eIF3c y su silenciamiento no produce la disgregación del complejo de eIF3. Sin embargo, se sugiere que la importancia de eIF3d no radica en el papel que pueda desempeñar en la traducción general de la célula sino en promover la traducción especializada de un conjunto específico de mRNAs que codifica para proteínas de control del ciclo celular^{18,20,33}.

El silenciamiento de las proteínas eIF3d, RPL11 y RPS9 mostraron una disminución en la progenie viral de rotavirus aproximadamente en un 60% en cada condición, por lo cual decidimos determinar su efecto sobre la síntesis proteica viral, debido a que tanto el factor eIF3 como las proteínas ribosomales forman parte de la vía de inicio de la traducción canónica y no canónica.

Los resultados encontrados fueron un tanto sorprendentes puesto que mediante las dos estrategias experimentales empleadas no observamos variaciones en la cantidad de proteínas virales sintetizadas *de novo* en la ausencia de las distintas proteínas. Aunque tanto el análisis de la autoradiografía de incorporación de metionina ³⁵S como del ensayo de western blot reflejan ligeras disminuciones en algunas proteínas virales (VP7, VP6 y NSP4) en los silenciamientos de eIF3d y RPL11, estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Una observación interesante surgió durante los ensayos de silenciamiento de RPL11 en células infectadas, donde las autoradiografías mostraron una menor inhibición de en la cantidad de proteínas celulares sintetizadas *de novo* en comparación al control de células infectadas tratadas con un siRNA irrelevante. Este efecto resulta muy similar al reportado durante los silenciamientos de la proteína NSP3, donde no se observa una disminución en la síntesis de proteína viral pero sí un aumento en la síntesis de proteína celular⁵⁰.

Se ha descrito con anterioridad que la infección por rotavirus causa una disminución en la traducción de proteínas celulares debido por lo menos a tres mecanismos independientes: *la interacción de NSP3 con eIF4G para desplazar a PABP impidiendo la traducción de mRNA poliadenilados, la relocalización de PABP y mRNA celulares al núcleo y la fosforilación de eIF2 α debido a la presencia de dsRNA de rotavirus con lo cual se inhibe la formación del complejo TC*^{25,49,51,54}. El que la traducción celular no se encuentre tan afectada como en condiciones normales de infección durante el silenciamiento de RPL11 resulta muy interesante y podrían sugerirse las siguientes hipótesis:

- 1) Alguna proteína o RNA viral podría interactuar con la proteína RPL11 funcionando como un mecanismo de apagado de la traducción celular de modo similar a lo observado con NSP3⁵⁰,
- 2) RPL11 podría estar involucrada en un mecanismo de traducción especializada de mRNAs específicos, rotavirus quizá utiliza esta vía de traducción para la síntesis de algunas de sus proteínas en condiciones de inhibición de la traducción canónica. Un mecanismo similar ha sido reportado en la literatura para la proteína RPL40 en la infección por VSV, donde el silenciamiento de RPL40 no afecta la traducción de la mayoría de las proteínas celulares, pero inhibe por completo la traducción de proteínas virales y también de un subconjunto de proteínas celulares relacionadas con procesos de control del ciclo celular, respuesta al stress, señalización celular, etc. En ese trabajo, Lee y colaboradores sugieren la existencia de una traducción especializada mediada por RPL40 la cual es empleada por el virus VSV para la síntesis de proteínas virales en condiciones de inhibición de la traducción canónica cap-dependiente^{73,75}.
- 3) La cantidad de partículas infecciosas de rotavirus que entran en las células silenciadas no sea lo suficiente para inhibir la traducción celular.
- 4) La proteína RPL11 ha sido identificada como un sensor de estrés nucleolar que interactúa directamente con Hdm2 (una proteína ubiquitin ligasa E3) que se encarga de unir, ubiquitinar y enviar a degradación a la proteína de control de ciclo celular p53. Durante procesos de estrés, RPL11 es transportada del nucléolo al nucleoplasma donde se une a Hdm2 impidiendo su interacción con p53,

de tal manera que los niveles de p53 aumentan ocasionando un paro del ciclo celular así como también la inducción de apoptosis⁶⁴⁻⁶⁹. Basados en estos datos, se podría proponer que la ausencia de RPL11 evitaría su interacción con Hdm2 de modo que esta proteína podría continuar ubiquitinando y enviando a degradación a p53, los niveles de p53 no aumentarían impidiendo el paro del ciclo celular inducido por la infección de rotavirus, permitiendo de esta manera que el proceso de traducción celular no se interrumpa, lo cual permite observar en las autoradiografías un ligero aumento en la síntesis de proteínas celulares aún en presencia de la infección por rotavirus.

A pesar de que no encontramos diferencias en la traducción de proteínas virales en los silenciamientos, sería interesante evaluar este proceso mediante estrategias más finas como el análisis de perfiles ribosomales o análisis de proteómica por espectrometría de masas, con el fin de clarificar si el resultado encontrado es producto de un artefacto de los ensayos o en efecto, es un reflejo de lo que ocurre en las condiciones evaluadas.

Debido a la ausencia de cambios en la cantidad de proteínas virales sintetizadas *de novo*, decidimos evaluar la concentración del RNA viral durante los silenciamientos de las proteínas eIF3d, RPL11 y RPS9. En los ensayos de eIF3d y RPL11 encontramos una disminución importante en la cantidad de RNA viral, este fenómeno podría tener diversas causas: producto de una inhibición de la síntesis de RNA viral, como consecuencia de un aumento en el decaimiento y degradación de RNA o debido a una entrada menor de partículas de rotavirus a la célula que podría reflejarse en una menor cantidad de RNA sintetizado. Considerando lo anterior, decidimos realizar una cinética de la cantidad de RNA viral durante la infección por rotavirus en células silenciadas con el fin de visualizar en que momento de la infección comienza la disminución en la concentración del RNA viral. Resulta importante recordar que, después la entrada de rotavirus a la célula huésped tiene lugar el proceso de desnudamiento de la partícula que consiste en la pérdida de capa externa formada por las proteínas VP7 y VP4 liberando al citoplasma las DLPs. Las DLPs son transcripcionalmente activas produciendo mRNA viral que sale al citoplasma, este proceso se considera como la *primera ronda de síntesis de RNA viral*. El mRNA viral en el citoplasma presenta dos funciones importantes: primero es empleado en la traducción de proteínas virales para dar lugar a las estructuras llamadas *viroplasmos* donde desempeña la segunda función sirviendo como templado para la replicación del genoma, este proceso es conocido como una *segunda ronda de síntesis de RNA viral*⁸³.

El silenciamiento de eIF3d ocasiona una disminución en la cantidad de RNA viral a partir de las 6h, lo cual podría significar que la segunda ronda de síntesis de RNA que se lleva a cabo en los viroplasmos se encuentre alterada. Los motivos de dicha disminución podrían deberse a que el silenciamiento de eIF3d conlleva a la reducción de la traducción de alguna proteína celular que podría participar en la transcripción de los mRNAs virales. Existe un reporte previo que soporta dicha hipótesis: la inhibición de la interacción entre eIF3d y DAP5, inhibe la traducción cap dependiente de eIF3d y afecta la traducción de los factores de transcripción como ETS1, Fli-1, cJun, etc. relacionados con diferenciación, proliferación celular, apoptosis, etc^{18,38}. La evaluación de una alteración en dicho proceso es una perspectiva relevante al presente trabajo.

En el caso de la proteína RPL11, su silenciamiento ocasiona una reducción en la cantidad de RNA viral en todos los tiempos de la cinética, en comparación a las condiciones control e incluso al ensayo de eIF3d. A diferencia de lo ocurrido con eIF3d, durante el silenciamiento de RPL11 la cantidad de RNA viral se encuentra afectada desde las 4 h y no aumenta en ningún tiempo, lo cual sugiere que no es solo la segunda ronda de transcripción la que podría encontrarse alterada sino también existir un efecto desde la primera ronda de síntesis de RNA viral, algo similar a lo previamente observado durante el silenciamiento de las proteínas virales VP1, VP2, VP3 y VP6 con una cinética semejante, donde en ningún momento se lleva a cabo una replicación eficiente del RNA viral⁸³.

No es posible descartar en ninguno de estos silenciamientos el papel que puedan representar los mecanismos de procesamiento y decaimiento de RNA, por lo que sería interesante realizar estudios enfocados a determinar la vida media de los mRNAs virales con el fin de obtener conclusiones a este respecto.

Una observación que resulta interesante es que en ambos silenciamientos, a pesar de la reducción de la cantidad de RNA en los distintos tiempos de la cinética evaluada esto no se refleja en una disminución de la síntesis de proteínas virales tal y como podemos observar en las figuras 14, 15 y 16. Este fenotipo ha sido observado con anterioridad en la infección por rotavirus durante los silenciamientos de las proteínas VP1 (RNA polimerasa dependiente de RNA viral), VP3 (metiltransferasa) y VP4 (proteína de reconocimiento y unión a la célula huésped) donde su ausencia ocasiona una disminución en la concentración de RNA viral hasta en un 90% comparada con una condición control infectada reflejándose en una reducción de la progenie viral, pero no se observa ninguna alteración en la traducción de proteínas virales⁸³. Estos resultados podrían sugerir que la infección por rotavirus solo necesita una pequeña cantidad de RNA para saturar la maquinaria de traducción celular y permitir la síntesis efectiva de las distintas proteínas virales.

Otra posible explicación del efecto observado en la cantidad de RNA viral durante el silenciamiento de eIF3d y RPL11 es que el nivel de entrada de virus a la célula se encuentre reducido. Para responder a esta pregunta se evaluó la infectividad de rotavirus en células silenciadas para eIF3d y RPL11, donde los resultados muestran una clara reducción en la infectividad en la ausencia de RPL11 mientras que permanece sin cambios en el experimento de eIF3d.

Estos resultados implican que alguno de los primeros pasos de la infección de rotavirus como el proceso de unión al receptor, entrada o descapsidación de la partícula viral se encuentran afectados por el silenciamiento de la proteína RPL11. Para estudiar si la disminución de la infectividad del virus causada por la ausencia de RPL11 es debida a que la entrada del virus esta inhibida, realizamos ensayos de lipofección de DLPs. Estas partículas no son infectivas debido a que no pueden unirse y entrar a la célula, pero al ser transfectadas directamente al citoplasma (omitiendo el proceso de unión y entrada) tienen la capacidad de llevar a cabo el ciclo replicativo de rotavirus. El resultado de estos ensayos mostró que la infectividad de las DLPs transfectadas no fue afectada en las células en las que se silenció RPL11, sugiriendo que es el proceso de unión, entrada o descapsidación de rotavirus es el paso que se encuentra alterado durante la ausencia de RPL11, ya sea porque esta proteína interacciona directamente con alguna proteína involucrada en la entrada viral, o más probablemente porque RPL11 participa en la traducción de alguna o algunas proteínas que participan en los primeros eventos de la infección.

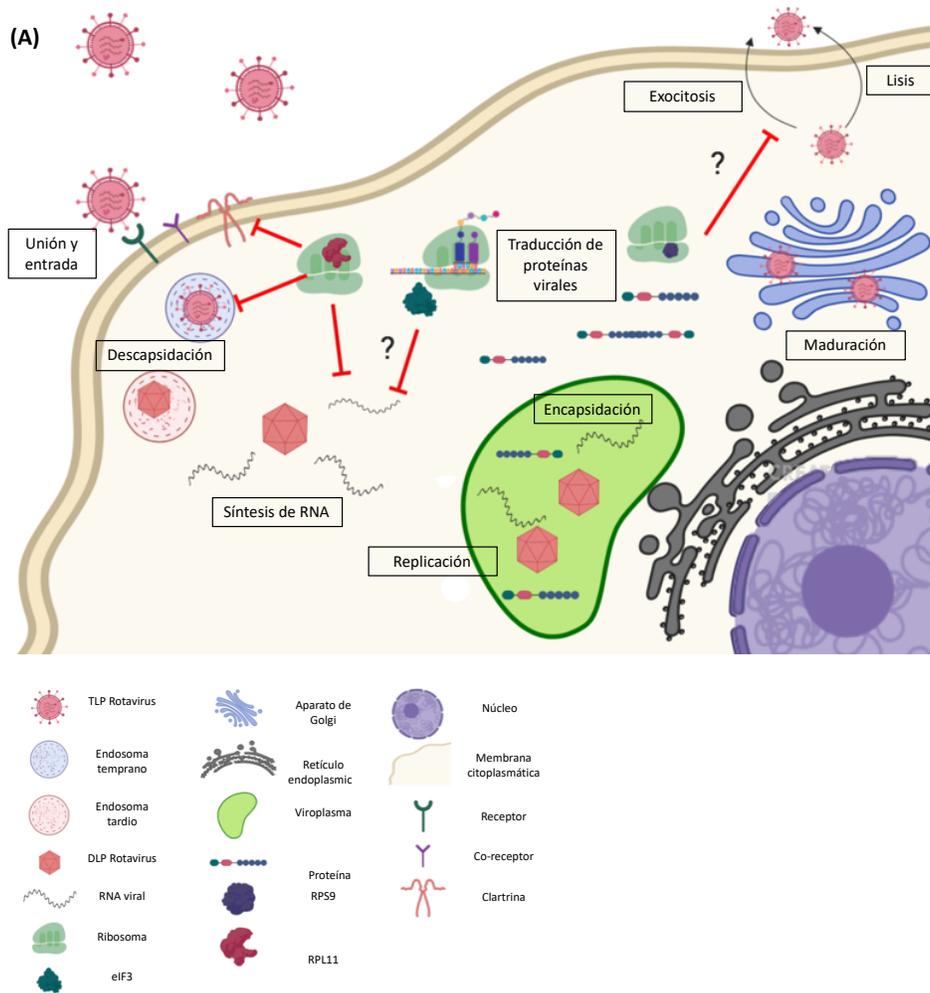
Con base a los resultados obtenidos y su análisis en conjunto, se sugiere que el silenciamiento de la proteína RPL11 podría ocasionar una traducción reducida de algunas proteínas de membrana que sirven como receptores, co-receptores, proteínas involucradas en el proceso de endocitosis o desnudamiento de la partícula viral. El knockdown de diversas proteínas relacionadas con el proceso de traducción ha demostrado alterar la síntesis de proteínas de membrana, como por ejemplo durante el silenciamiento de eIF3d donde se observa una reducción en la traducción de las integrinas ITGV, ITG α 1, ITG α 3 y ITG α 5³³, el knockdown de la proteína ribosomal RPS27 que conlleva a la disminución en los niveles proteicos de la integrina B4^{85,86}, así mismo el silenciamiento de distintas proteínas ribosomales afecta la traducción de proteínas relacionadas al tráfico vesicular, citoesqueleto, endocitosis, señalización, etc^{59,77,87}.

En conclusión, durante el presente estudio determinamos que la ausencia de las proteínas eIF3d, RPL11 y RPS9 son importantes en el ciclo de replicación de rotavirus mediante diversos mecanismos: La proteína eIF3d tiene su efecto más significativo en la disminución de los niveles de RNA viral durante la infección donde su ausencia podría relacionarse con el decaimiento de los mensajeros virales²⁵ o estar implicado en la segunda ronda de síntesis de RNA viral debido a la traducción reducida de factores requeridos para la síntesis del RNA viral^{18,33,38}; el mecanismo aún está por ser descubierto.

Para la proteína RPS9 su importancia en la replicación de rotavirus permanece siendo una incógnita, si bien observamos una disminución en la progenie viral producida no encontramos diferencia en la síntesis de proteínas virales y el aumento en la cantidad de RNA viral debe ser estudiado más a profundidad.

En el caso de la proteína RPL11, su principal efecto ocurre en las etapas tempranas de la infección donde niveles reducidos de RPL11 afectan los primeros pasos del ciclo viral causando una unión/entrada o descapsidación reducida que se refleja en la disminución de la cantidad de RNA viral, pero sin alterar la cantidad de proteína viral sintetizada y permitiendo un aumento en la traducción de proteínas celulares. Aunado a la entrada deficiente de partículas virales, el silenciamiento de RPL11 podría involucrar otros

procesos en el ciclo de rotavirus, por ejemplo, se ha descrito que el silenciamiento de algunas proteínas ribosomales afectan la traducción de proteínas relacionadas con el procesamiento y síntesis de RNA por lo que lo observado en la cinética de concentración de RNA viral podría deberse al efecto sinérgico de mecanismos de entrada y síntesis de RNA (Figura 22)^{59,77}.



(B)

siRNA	Progenie Viral	RNA	Proteína viral	Proteína celular	Infectividad	Transfección de partículas DLPs
eIF3d	↓	↓	=	=	=	=
RPL11	↓	↓	=	↑	↓	=
RPS9	↓	↑	=	↓	=	=

Figura 22. Modelo del efecto del silenciamiento de las proteínas eIF3d, RPL11 y RPS9 durante el ciclo replicativo de rotavirus. (A) En la figura se observa el tránsito de las partículas de rotavirus, en los recuadros se marca el nombre del paso y las flechas de bloqueo de color rojo representan los posibles pasos que se ven afectados durante el silenciamiento. (B) Resumen del efecto de los silenciamientos de eIF3d, RPL11 y RPS9 en los diferentes pasos del ciclo replicativo de rotavirus y síntesis de proteínas celulares. (Inciso (A) elaborado mediante software Biorender)

Los resultados encontrados, no hacen más que evidenciar la creciente necesidad de evaluar y dilucidar el proceso de traducción de las proteínas virales, así como los eventos que ocurren con la traducción celular en el contexto de la infección por rotavirus considerando los mecanismos alternativos de inicio de la traducción no canónica, sin olvidar que los distintos procesos celulares (como señalización, respuesta al estrés, control del ciclo celular o transcripción) no ocurren como mecanismos independientes sino con una red altamente interconectada.

CONCLUSIONES

- La producción de progenie viral durante la infección de rotavirus se encuentra disminuida en células silenciadas contra las proteínas eIF3d, RPL11 y RPS9.
- El silenciamiento de las proteínas eIF3b, eIF3d y RPL11 no tiene un efecto en la traducción celular general, mientras que en el caso de RPS9 su knock-down produce una disminución de la mitad de la traducción celular.
- La traducción de las proteínas virales no presenta cambios en las células tratadas con siRNAs para las proteínas, eIF3b, eIF3d, RPL11 y RPS9.
- La ausencia de la proteína RPL11 durante la infección por rotavirus ocasiona un aumento en la síntesis de proteínas celulares (*recuperación de la traducción celular*).
- El silenciamiento de las proteínas eIF3d y RPL11 produce una reducción en la cantidad de RNA viral desde las 6h postinfección, mientras que la ausencia de la proteína RPS9 ocasiona un aumento en el RNA viral a las 8h postinfección.
- El proceso de unión/entrada a la célula huésped se encuentra disminuido durante el silenciamiento de la proteína RPL11, no así en el caso de eIF3d y RPS9.

PERSPECTIVAS

- Determinar la localización celular de la proteína eIF3d durante la infección por rotavirus.
- Evaluar la cinética de transcripción de RNA viral durante la infección por RRV en células silenciadas en la proteína RPS9.
- Estudiar la distribución de mRNAs virales en perfiles polisomales de células silenciadas contra las proteínas eIF3d, RPL11 y RPS9.
- Determinar el estado de los viroplasmos formados por rotavirus en células silenciadas contra eIF3d, RPL11 y RPS9.
- Estudiar el proceso de unión de partículas de rotavirus en células silenciadas contra RPL11 mediante ensayos de binding.
- Analizar mediante estudios de proteómica que proteínas de membrana se afectaron durante el silenciamiento de RPL11.

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS

El autor de esta tesis agradece el apoyo y asesoría prestados en los diferentes ensayos y técnicas realizadas a lo largo del proyecto a la Q.F.B. Rafaela María del Pilar Espinosa Organista y el M.C. Marco Antonio Espinoza.

BIBLIOGRAFIA

1. R.I., G., U., P., M., P., J., G. & B., J. Rotavirus vaccines: Successes and challenges. *J. Infect.* **68**, S9–S18 (2013).
2. Tate, J. E. *et al.* Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children < 5 Years of Age, 2000 – 2013. **62**, (2016).
3. Estes, M. K. & Greenberg, H. B. Rotaviruses. in *Fields Virology* 1247–1395 (Lippincott Williams & Wilkins, 2013).
4. Desselberger, U. Rotaviruses. *Elsevier* **190**, 75–96 (2014).
5. Pesavento, J. B., Crawford, S. E., Estes, M. K. & Prasad, B. V. V. Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **309**, 189–219 (2006).
6. Hu, L., Crawford, S. E., Hyser, J. M., Estes, M. K. & Prasad, B. V. V. Rotavirus non-structural proteins : Structure and Function. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 380–388 (2013).
7. Estes, M. K. & Greenberg, H. B. Rotaviruses. in *Fields Virology 6^a Edition*, (Lippincott Williams & Wilkins, 2013).
8. Hoshino, Y. & Kapikian, A. Z. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *J. Heal. Popul. Nutr.* **18**, 5–14 (2011).
9. Sánchez-Tacuba, L., Rojas, M., Arias, C. F. & López, S. Rotavirus Controls Activation of the 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase/RNase L Pathway Using at Least Two Distinct Mechanisms. *J. Virol.* **89**, 12145–53 (2015).
10. Arias, C. F., Silva-Ayala, D. & López, S. Rotavirus entry: a deep journey into the cell with several exits. *J. Virol.* **89**, 890–3 (2015).
11. Silvestri, L. S., Taraporewala, Z. F. & Patton, J. T. Rotavirus replication: Plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. *J. Virol.* **78**, 7763–7774 (2004).
12. López, S. & Arias, C. F. Rotavirus – host cell interactions : an arms race. *Elsevier* **2**, 389–398 (2012).
13. Hu, L., Crawford, S. E., Hyser, J. M., Estes, M. K. & Prasad, B. V. V. Rotavirus non-structural proteins : Structure and Function. **2**, 380–388 (2013).
14. Trask, S. D., McDonald, S. M. & Patton, J. T. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 165–177 (2012).
15. Garcés, Y. *et al.* Nanoscale organization of rotavirus replication machineries. *bioRxiv* **XXI**, 1–5 (2018).
16. James, C. C. & Smyth, J. W. Alternative mechanisms of translation initiation: An emerging dynamic regulator of the proteome in health and disease. *Life Sci.* **212**, 138–144 (2018).
17. Lacerda, R., Menezes, J. & Romão, L. More than just scanning: the importance of cap-independent mRNA translation initiation for cellular stress response and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 1659–1680 (2017).
18. Lee, A. S., Kranzusch, P. J., Doudna, J. A. & Cate, J. H. D. eIF3d is an mRNA cap-binding protein that is required for specialized translation initiation. *Nature* **536**, 96–9 (2016).
19. Flint, J., Rall, G. F., Racaniello, V. R. & Skalka, A. M. *Principles of Virology, Bundle. Journal (Canadian Dental Association)* **70**, (2015).
20. Wagner, S., Herrmannová, A., Šikrová, D. & Valášek, L. S. Human eIF3b and eIF3a serve as the nucleation core for the assembly of eIF3 into two interconnected modules: the yeast-like core and the octamer. *Nucleic Acids Res.* **44**, 10772–10788 (2016).
21. Jackson, R. J., Hellen, C. U. T. & Pestova, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 113–127 (2010).
22. Lacerda, R., Menezes, J. & Romão, L. More than just scanning: the importance of cap-independent mRNA translation initiation for cellular stress response and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 1–22 (2016).
23. Hinnebusch, A. G. eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 553–562 (2006).
24. James, C. C. & Smyth, J. W. Alternative mechanisms of translation initiation: An emerging dynamic regulator of the proteome in health and disease. *Life Sci.* **212**, 138–144 (2018).
25. López, S., Oceguera, A. & Sandoval-jaime, C. Stress Response and Translation Control in Rotavirus Infection. *Viruses* **8(162)**, 1–13 (2016).
26. Walsh, D. & Mohr, I. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 860–875 (2011).
27. Johnson, A. G., Grosely, R., Petrov, A. N. & Puglisi, J. D. Dynamics of IRES-mediated translation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **372**, 20160177 (2017).

28. Komar, A. A. & Hatzoglou, M. Cellular IRES-mediated translation: The war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle* **10**, 229–240 (2011).
29. Sun, C. *et al.* Two RNA-binding motifs in eIF3 direct HCV IRES-dependent translation. *Nucleic Acids Res.* **41**, 7512–7521 (2013).
30. Shatsky, I. N., Terenin, I. M., Smirnova, V. V. & Andreev, D. E. Cap-Independent Translation: What's in a Name? *Trends Biochem. Sci.* **43**, 882–895 (2018).
31. Yamamoto, H., Unbehaun, A. & Spahn, C. M. T. Ribosomal Chamber Music: Toward an Understanding of IRES Mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 655–668 (2017).
32. Costa-mattioli, M., Svitkin, Y. & Sonenberg, N. La Autoantigen Is Necessary for Optimal Function of the Poliovirus and Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site In Vivo and In Vitro †. **24**, 6861–6870 (2004).
33. de la Parra, C. *et al.* A widespread alternate form of cap-dependent mRNA translation initiation. *Nat. Commun.* **9**, 1–9 (2018).
34. Song, Y., Mugavero, J. & Stauff, C. B. Dengue and Zika Virus 5' = Untranslated Regions Harbor. *MBio* **10**, 1–16 (2019).
35. Brocard, M., Ruggieri, A. & Locker, N. m6A RNA methylation, a new hallmark in virus-host interactions. *J. Gen. Virol.* **98**, 2207–2214 (2017).
36. Wagner, S., Herrmannová, A., Malík, R., Peclinovská, L. & Valášek, L. S. Functional and Biochemical Characterization of Human Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 in Living Cells. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 3041–3052 (2014).
37. Dong, Z. & Zhang, J. T. Initiation factor eIF3 and regulation of mRNA translation, cell growth, and cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **59**, 169–180 (2006).
38. Cate, J. H. D. Human eIF3: from 'blobology' to biological insight. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **372**, 20160176 (2017).
39. Erzberger, J. P. *et al.* Molecular architecture of the 40S-eIF1-eIF3 translation initiation complex. *Cell* **158**, 1123–35 (2014).
40. Gomes-Duarte, A., Lacerda, R., Menezes, J. & Romão, L. eIF3: a factor for human health and disease. *RNA Biol.* **15**, 26–34 (2018).
41. Lee, A. S. Y., Kranzusch, P. J. & Cate, J. H. D. eIF3 targets cell-proliferation messenger RNAs for translational activation or repression. *Nature* **522**, 111–114 (2015).
42. Morelli, M., Ogden, K. M. & Patton, J. T. Silencing the alarms : Innate immune antagonism by rotavirus NSP1 and VP3. *Virology* 1–10 (2015). doi:10.1016/j.virol.2015.01.006
43. Jan, E., Mohr, I. & Walsh, D. A Cap-to-Tail Guide to mRNA Translation Strategies in Virus-Infected Cells. *Annu. Rev. Virol.* **3**, 283–307 (2016).
44. Burgui, I., Yanguéz, E., Sonenberg, N. & Nieto, A. Influenza Virus mRNA Translation Revisited: Is the eIF4E Cap-Binding Factor Required for Viral mRNA Translation? *J. Virol.* **81**, 12427–12438 (2007).
45. Best, S. M. The Many Faces of the Flavivirus NS5 Protein in Antagonism of Type I Interferon Signaling. **91**, 1–14 (2017).
46. Vende, P., Piron, M., Castagne, N. & Poncet, D. Efficient Translation of Rotavirus mRNA Requires Simultaneous Interaction of NSP3 with the Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4G and the mRNA 3' J End. *Am. Soc. Microbiol.* **74**, 7064–7071 (2000).
47. Gratia, M. *et al.* Challenging the Roles of NSP3 and Untranslated Regions in Rotavirus mRNA Translation. *PLoS One* 1–24 (2016). doi:10.1371/journal.pone.0145998
48. Piron, M., Delaunay, T., Grosclaude, J. & Poncet, D. Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *J. Virol.* **73**, 5411–21 (1999).
49. Gratia, Matthieu; Sarot,Emeline; Vende, Patrice;Charpilienne, Annie; Duarte, M. Rotavirus NSP3 Is a Translational Surrogate of the Poly(A) Binding Protein-Poly(A) Complex. *J. Virol.* **89**, 8773–8782 (2015).
50. Montero, H., Arias, C. F. & Lopez, S. Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 Is Not Required for Viral Protein Synthesis. *Am. Soc. Microbiol.* **80**, 9031–9038 (2006).
51. Padilla-Noriega, L., Paniagua, O. & Guzmán-León, S. Rotavirus Protein NSP3 Shuts Off Host Cell Protein Synthesis. *Virology* **298**, 1–7 (2002).
52. Vitour, D. *et al.* RoXaN, a Novel Cellular Protein Containing TPR, LD, and Zinc Finger Motifs, Forms a Ternary Complex with Eukaryotic Initiation Factor 4G and Rotavirus NSP3 RoXaN, a Novel Cellular Protein Containing TPR, LD, and Zinc Finger Motifs, Forms a Ternary. *J. Virol.* **78**, 3851–3862 (2004).
53. Dutta, D. *et al.* Active participation of cellular chaperone Hsp90 in regulating the function of rotavirus nonstructural protein 3 (NSP3). *J. Biol. Chem.* **286**, 20065–20077 (2011).
54. Rojas, M., Arias, C. F. & López, S. Protein Kinase R Is Responsible for the Phosphorylation of eIF2 α in Rotavirus Infection. *J. Virol.* **84**, 10457–10466 (2010).
55. Sherry, B. Rotavirus and reovirus modulation of the interferon response. *J. Interf. Cytokine Res.* **29**, 559–567 (2009).

56. Xue, S. & Barna, M. Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 355–369 (2012).
57. Shi, Z. *et al.* Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Mol. Cell* **67**, 71–83.e7 (2017).
58. Zhou, X., Liao, W. J., Liao, J. M., Liao, P. & Lu, H. Ribosomal proteins: Functions beyond the ribosome. *J. Mol. Cell Biol.* **7**, 92–104 (2015).
59. Guo, H. Specialized ribosomes and the control of translation. *Biochem. Soc. Trans.* BST20160426 (2018). doi:10.1042/BST20160426
60. Deisenroth, C. & Zhang, Y. Ribosome biogenesis surveillance: Probing the ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway. *Oncogene* **29**, 4253–4260 (2010).
61. Golomb, L., Volarevic, S. & Oren, M. P53 and ribosome biogenesis stress: The essentials. *FEBS Lett.* **588**, 2571–2579 (2014).
62. Simsek, D. *et al.* The Mammalian Ribo-interactome Reveals Ribosome Functional Diversity and Heterogeneity. *Cell* **169**, 1051–1065.e18 (2017).
63. Genuth, N. R. & Barna, M. Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: From genes to organisms. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 431–452 (2018).
64. Zhang, Q., Xiao, H., Chai, S. C., Hoang, Q. Q. & Lu, H. Hydrophilic residues are crucial for ribosomal protein L11 (RPL11) interaction with zinc finger domain of MDM2 and p53 protein activation. *J. Biol. Chem.* **286**, 38264–38274 (2011).
65. Zheng, J. *et al.* Structure of human MDM2 complexed with RPL11 reveals the molecular basis of p53 activation. *Genes Dev.* **29**, 1524–1534 (2015).
66. Goudarzi, K. M. & Lindström, M. S. Role of ribosomal protein mutations in tumor development (Review). *Int. J. Oncol.* **48**, 1313–1324 (2016).
67. Bhat, K. P. *et al.* Essential role of ribosomal protein L11 in mediating growth inhibition-induced p53 activation. *EMBO J.* **23**, 2402–2412 (2004).
68. Voronina, E. N., Kolokol, T. D., Nechaeva, E. A. & Filipenko, M. L. Structural – Functional Analysis of the Human Gene for Ribosomal Protein L11. *Mol. Biol.* **37**, 362–371 (2003).
69. Zhang, Y. *et al.* Ribosomal Protein L11 Negatively Regulates Oncoprotein MDM2 and Mediates a p53-Dependent Ribosomal-Stress Checkpoint Pathway. *Mol. Cell Biol.* **23**, 8902–8912 (2003).
70. Lindström, M. S. & Zhang, Y. Ribosomal protein S9 is a novel B23/NPM-binding protein required for normal cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **283**, 15568–15576 (2008).
71. Van Riggelen, J., Yetil, A. & Felsner, D. W. MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 301–309 (2010).
72. Lindström, M. S. Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 167–170 (2009).
73. Lee, A. S.-Y., Burdeinick-Kerr, R. & Whelan, S. P. J. A ribosome-specialized translation initiation pathway is required for cap-dependent translation of vesicular stomatitis virus mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 324–9 (2013).
74. Rafael K. Campos, Benjamin Wong, Xuping Xieb, Yi-Fan Lua, Pei-Yong Shib, Julien Pomponc, Mariano A. Garcia-Blanco, Shelton S. Bradricka, . RPLP1 and RPLP2 are essential flavivirus host factors that promote early viral protein accumulation. *J. Virol.* **91**, e01706-16 (2016).
75. Landry, D. M., Hertz, M. I. & Thompson, S. R. RPS25 is essential for translation initiation by the Dicistroviridae and hepatitis C viral IRESs. *Genes Dev.* **23**, 2753–2764 (2009).
76. Silva-ayala, D. *et al.* Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110** (25), 10270–10275 (2013).
77. Lee, A. S.-Y., Burdeinick-Kerr, R. & Whelan, S. P. J. A ribosome-specialized translation initiation pathway is required for cap-dependent translation of vesicular stomatitis virus mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 324–329 (2013).
78. Lindström, M. S. & Nistér, M. Silencing of ribosomal protein S9 elicits a multitude of cellular responses inhibiting the growth of cancer cells subsequent to p53 activation. *PLoS One* **5**, (2010).
79. Wang, H., Feng, J., Zhou, T., Wei, L. & Zhou, J. Involvement of RPL11 in the enhancement of P53 stability by a podophyllum derivative , a topoisomerase II inhibitor. **42**, 121–129 (2018).
80. Montero, H., Rojas, M., Arias, C. F. & Lo, S. Rotavirus Infection Induces the Phosphorylation of eIF2 α but Prevents the Formation of Stress Granules \square . *Am. Soc. Microbiol.* **82**, 1496–1504 (2008).
81. Cheng, D. dong *et al.* Down-regulation of RPS9 inhibits osteosarcoma cell growth through inactivation of MAPK signaling pathway. *J. Cancer* **8**, 2720–2728 (2017).
82. Cervantes-Salazar, M. *et al.* Dengue virus NS1 protein interacts with the ribosomal protein RPL18: This interaction is required for viral translation and replication in Huh-7 cells. *Virology* **484**, 113–126 (2015).
83. Ayala-Breton, C. *et al.* Analysis of the Kinetics of Transcription and Replication of the Rotavirus Genome by RNA

- Interference. *J. Virol.* **83**, 8819–8831 (2009).
84. Teng, T., Mercer, C. A., Hexley, P., Thomas, G. & Fumagalli, S. Loss of Tumor Suppressor RPL5/RPL11 Does Not Induce Cell Cycle Arrest but Impedes Proliferation Due to Reduced Ribosome Content and Translation Capacity. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 4660–4671 (2013).
85. Wang, W. *et al.* Ribosomal proteins and human diseases: Pathogenesis, molecular mechanisms, and therapeutic implications. *Med. Res. Rev.* **35**, 225–285 (2015).
86. Xu, X., Xiong, X. & Sun, Y. The role of ribosomal proteins in the regulation of cell proliferation, tumorigenesis, and genomic integrity. *Sci. China Life Sci.* **59**, 656–672 (2016).
87. Shi, Z. *et al.* Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Mol. Cell* **67**, 71–83.e7 (2017).