



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

IMPORTANCIA DEL ESTADO DIMÉRICO DE LA PROTEÍNA NO  
ESTRUCTURAL 3 (NSP3) DE ROTAVIRUS EN SU FUNCIÓN INHIBITORIA DE  
LA TRADUCCIÓN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:  
EDGAR REYNA ROSAS

TUTOR PRINCIPAL  
LUIS PADILLA NORIEGA  
Facultad de Medicina, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA  
Facultad de Química, UNAM  
ENRÍQUE GARCÍA HERNÁNDEZ  
Instituto de Química, UNAM

Ciudad de México. Mayo, 2021



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.

*Para mis Padres*  
*Margarita y Carlos*

## **Ítaca**

Cuando emprendas tu viaje a Ítaca  
pide que el camino sea largo,  
lleno de aventuras, lleno de experiencias.  
No temas a los lestrigones ni a los cíclopes  
ni al colérico Poseidón,  
seres tales jamás hallarás en tu camino,  
si tu pensar es elevado, si selecta  
es la emoción que toca tu espíritu y tu cuerpo.  
Ni a los lestrigones ni a los cíclopes  
ni al salvaje Poseidón encontrarás,  
si no los llevas dentro de tu alma,  
si no los yergue tu alma ante ti.

Pide que el camino sea largo.  
Que muchas sean las mañanas de verano  
en que llegues -¡con qué placer y alegría!-  
a puertos nunca vistos antes.  
Detente en los emporios de Fenicia  
y hazte con hermosas mercancías,  
nácar y coral, ámbar y ébano  
y toda suerte de perfumes sensuales,  
cuantos más abundantes perfumes sensuales puedas.  
Ve a muchas ciudades egipcias  
a aprender, a aprender de sus sabios.

Ten siempre a Ítaca en tu mente.  
Llegar allí es tu destino.  
Mas no apresures nunca el viaje.  
Mejor que dure muchos años  
y atracar, viejo ya, en la isla,  
enriquecido de cuanto ganaste en el camino  
sin aguantar a que Ítaca te enriquezca.

Ítaca te brindó tan hermoso viaje.  
Sin ella no habrías emprendido el camino.  
Pero no tiene ya nada que darte.

Aunque la halles pobre, Ítaca no te ha engañado.  
Así, sabio como te has vuelto, con tanta experiencia,  
entenderás ya qué significan las Ítacas

-Constantino Cavafis-

## **Financiamientos**

La realización de este proyecto fue financiada por dos apoyos del Consejo nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), CB2011/168046 y I0012/264230. Otro apoyo fue brindado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, IN201212. Y un apoyo por parte del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

## **Agradecimientos**

Agradezco al Consejo nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me otorgó con el registro 347725 durante el periodo 2013-2017.

Agradezco al Programa de Apoyo a los Estudiantes del Posgrado (PAEP) por los apoyos económicos otorgados durante mi doctorado para asistir a múltiples congresos nacionales e internacionales.

Agradezco al Dr. Luis Padilla Noriega por su valiosa tutoría durante todo mi doctorado. Al Dr. Renato León Rodríguez, a la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, a la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, al Dr. Enrique García Hernández, Hugo Contreras Treviño y a todos los doctores que formaron parte de mis jurados y evaluación de tesis por su enorme aportación al proyecto.

Agradezco enormemente a mi familia: A mi madre Margarita Rosas Flores y mi padre Carlos Reyna Martinez por su confianza, apoyo y amor. A mi hermana Laura Reyna Rosas por ser siempre mi mayor ejemplo y mi apoyo incondicional. A mi Hermano Eduardo Reyna Rosas y su familia por su apoyo brindado.

Agradezco infinitamente a mi pequeña familia: Mi amada esposa Iris Dinorah Garcia Tello por todo el apoyo incondicional, por su confianza en mí, su amor que me motiva a nunca rendirme y su alegría que es mi alegría. A mi pequeña Luneta que sin ella no seríamos la tripleta de la suerte.

Agradezco a mis amigos incondicionales que a pesar de los años siguen brindándome un pequeño espacio de sus vidas para compartir conmigo.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	7
INTRODUCCIÓN .....	8
1. Generalidades .....	8
1.1 Reconociendo a rotavirus .....	8
1.2 El ciclo replicativo de rotavirus .....	10
2. Estudios sobre NSP3 y dilucidación de sus funciones .....	11
2.1 Dominios de NSP3 .....	11
2.2 El estudio estructural de NSP3 como forma de abordar la función. ....	15
2.3 Consecuencias funcionales de NSP3 en los procesos celulares. ....	15
2.4 Hallazgo en NSP3 de un nuevo dominio de unión a la proteína celular RoXaN .....	16
2.5 Cuestionamientos al modelo de estimulación de la traducción de NSP3 .....	17
2.6 El descubrimiento de la interacción de NSP3 con HSP90 y su relevancia .....	19
2.7 NSP3 y estrés celular por la respuesta de proteínas no plegadas .....	20
2.8 Debate sobre la función de estimulación de la traducción viral de NSP3. ....	21
3. La chaperona HSP90 como un regulador clave de la proteostasis celular. ....	23
3.1 La importancia de CHIP para regular la función de HSP90 y la vía de degradación por el proteasoma. ....	27
3.2 La importancia de HSP90 en la regulación de infecciones virales. ....	28
4. El inicio de la traducción celular y la importancia que juega el factor eIF4G1 .....	29
4.1 Particularidades e importancia del factor de iniciación de la traducción eIF4G .....	32
4.2 La proteína PABP, un eslabón que regula la traducción junto con eIF4G1 .....	35
4.3 El corte de eIF4G como regulación de su función traduccional .....	35
4.4 La regulación traduccional durante la apoptosis está asociada a las variantes de eIF4G. ...	38

5. La modificación postraducciona l y la degradación proteica como mecanismo de regulación traduccional por infecciones virales. ....	45
5.1 La regulación proteica por el proteasoma. ....	49
5.2 Regulación postraducciona l por el sistema UPS durante la infección por rotavirus. ....	52
6. Antecedentes específicos .....	54
HIPÓTESIS.....	57
OBJETIVO .....	57
OBJETIVOS PARTICULARES .....	57
METAS.....	57
METODOLOGÍA .....	58
RESULTADOS .....	65
DISCUSIÓN .....	80
CONCLUSIONES .....	93
BIBLIOGRAFÍA.....	94
ANEXO: ARTÍCULO PUBLICADO .....	100

## RESUMEN

Los rotavirus son de gran importancia social debido a que causan la muerte por gastroenteritis de aproximadamente 200 mil personas anualmente alrededor de todo el mundo. Estos virus han sido estudiados desde hace varias décadas y por lo cual han servido para el entendimiento del ciclo replicativo del virus, así como los procesos celulares en los cuáles interfiere. La proteína no estructural 3 (NSP3) de rotavirus se une al factor de iniciación de la traducción 4G1 (eIF4G1) y a la chaperona Hsp90, necesaria para su dimerización, y se ha demostrado que inhibe o, en algunas condiciones, incrementa la traducción de la célula hospedera. Un modelo ampliamente aceptado propone que NSP3 inhibe la traducción de ARNm con CAP y poliadenilados al afectar la interacción entre sus extremos 5' y 3', ya que se une a eIF4G1 en el mismo sitio que reconoce la proteína de unión a poli-A (PABP), desplazándola y linearizando a los ARNm. Otro modelo propone que NSP3 secuestra a eIF4G1 en complejos con la chaperona Hsp90, basado en la capacidad de inhibir la traducción celular de mutantes de NSP3 deficientes en dimerización, pero con su dominio de unión a Hsp90 intacto. Nuestro objetivo fue determinar el nivel de traducción de la célula hospedera en diferentes condiciones de expresión de NSP3 que afecten la proporción de las dos formas funcionales putativas, intermediarios de dimerización y dímeros. Utilizando un sistema inducible del virus vaccinia para expresar NSP3 del rotavirus Rhesus (RRV), determinamos la cinética de la inhibición de la traducción de la célula hospedera por marcaje metabólico, la acumulación de NSP3 total por Western blot (WB) y la acumulación de formas diméricas e intermediarios de dimerización de NSP3 por WB no disociativo (WB-ND). La expresión de NSP3 de RRV resultó en una cinética lineal lenta de inhibición de la traducción de la célula hospedera que correlacionó bien con la tasa de acumulación de la suma de intermediarios de dimerización y



dímeros, pero difirió de la tasa exponencial de acumulación de NSP3 total. El tratamiento con el derivado de geldanamicina 17-DMAG, un fármaco que inhibe la dimerización dependiente de Hsp90, redujo la forma dimérica NSP3 hasta tres veces, pero paradójicamente en lugar de revertir, potenció la inhibición de la traducción celular hasta tres veces. Finalmente, resultados preliminares sugieren que el inhibidor del proteasoma MG132 en combinación con el 17-DMAG revierte la inhibición de la traducción de NSP3. Estos resultados son consistentes con el modelo que propone que NSP3 de rotavirus inhibe la traducción celular secuestrando a eIF4G1 en complejos ternarios Hsp90-NSP3-eIF4G1.

## **INTRODUCCIÓN**

### **1. Generalidades**

Los rotavirus son el principal agente causante de gastroenteritis en humanos [1, 2]. Se estima que provoca cerca de 200 mil muertes anualmente principalmente en menores de 4 años. Esta enfermedad suele afectar con una mayor intensidad a países en desarrollo [3, 4]. Actualmente se cuenta con un par de vacunas eficaces para prevenir la enfermedad grave por rotavirus caracterizada por deshidratación [3, 4].

#### **1.1 Reconociendo a rotavirus**

Los rotavirus pertenecen al género *Rotavirus* de la familia *Reoviridae*. Presentan un genoma de once segmentos de ARN de cadena doble (ARNcd) que codifican para doce proteínas. Seis de estas proteínas son denominadas VPs debido a que conforman a las tres capas proteicas del virión [5]. La capa externa está compuesta por las proteínas VP4 y VP7; la primera forma estructuras parecidas a espículas que interaccionan con los receptores celulares durante su proceso de

entrada a la célula, mientras que VP7 forma trímeros que se arreglan para formar una capa delgada. Ambas proteínas inducen anticuerpos neutralizantes y sirven para clasificar los rotavirus en serotipos de VP4 y VP7, denominados P y G. La proteína VP6 constituye la capa intermedia, es la más abundante del virión y se arregla en forma de trímeros. La capa interna está constituida por la proteína VP2, la cual contiene al genoma y a las proteínas VP1 y VP3 que interactúan con el genoma. VP1 es la polimerasa de ARN-dependiente-de-ARN (RdRp) y VP3 es la proteína encargada de añadir la estructura CAP a los segmentos de ARN [5-7].

Las otras seis proteínas son no estructurales, denominadas por lo tanto como NSP por sus siglas en inglés para Non Structural Protein, las cuales están implicadas en la replicación y evasión de la respuesta inmune durante la infección celular [6, 7]. La primera, llamada NSP1, es la principal proteína encargada de evadir la respuesta inmune innata por la vía de interferón [8]. NSP2 y NSP5 interactúan entre ellas para formar estructuras electrodensas llamadas viroplasmos en las cuales se replica el genoma viral, se inicia la morfogénesis viral y se ensamblan las partículas de dos capas (DLPs). NSP4 se inserta en el retículo endoplásmico para permitir la entrada de las estructuras DLP al organelo, donde se ensambla la capa proteica externa. Mientras que de NSP6 aún no se ha podido determinar su función con precisión, pero se ha observado localizado en las mitocondrias y se ha observado que la expresión de esta proteína no es esencial para el virus [9, 95]. Finalmente, NSP3 es una proteína que está asociada a la regulación traduccional debido a que puede interactuar tanto con ARNm virales como con componentes de la maquinaria de la traducción [10].

## **1.2 El ciclo replicativo de rotavirus**

Rotavirus lleva a cabo su ciclo replicativo en el citoplasma de la célula hospedera, inicialmente la partícula viral es endocitada y luego se desestabiliza la capa proteica externa, generando partículas DLP que son transcripcionalmente activas. Las DLP sintetizan los 11 ARNm virales que luego son traducidos con ayuda de la maquinaria celular. Las proteínas virales VP1, VP2, VP3, VP6, NSP2 y NSP5 se acumulan en los viroplasmos, en donde se llevará a cabo la replicación del material genético a partir de los ARNm virales. Es en estos compartimentos virales donde se empaqueta y conforman la capa interna e intermedia del virión, formado DLPs ensambladas *de novo* que son activas para sintetizar los ARNm virales. Una vez constituidas las DLPs, salen del viroplasma gemando al retículo endoplásmico en donde adquieren la tercera capa proteica y quedan como TLPs (Triple Layered Particles) que representan partículas virales maduras (Figura. 1) [1, 11-13].

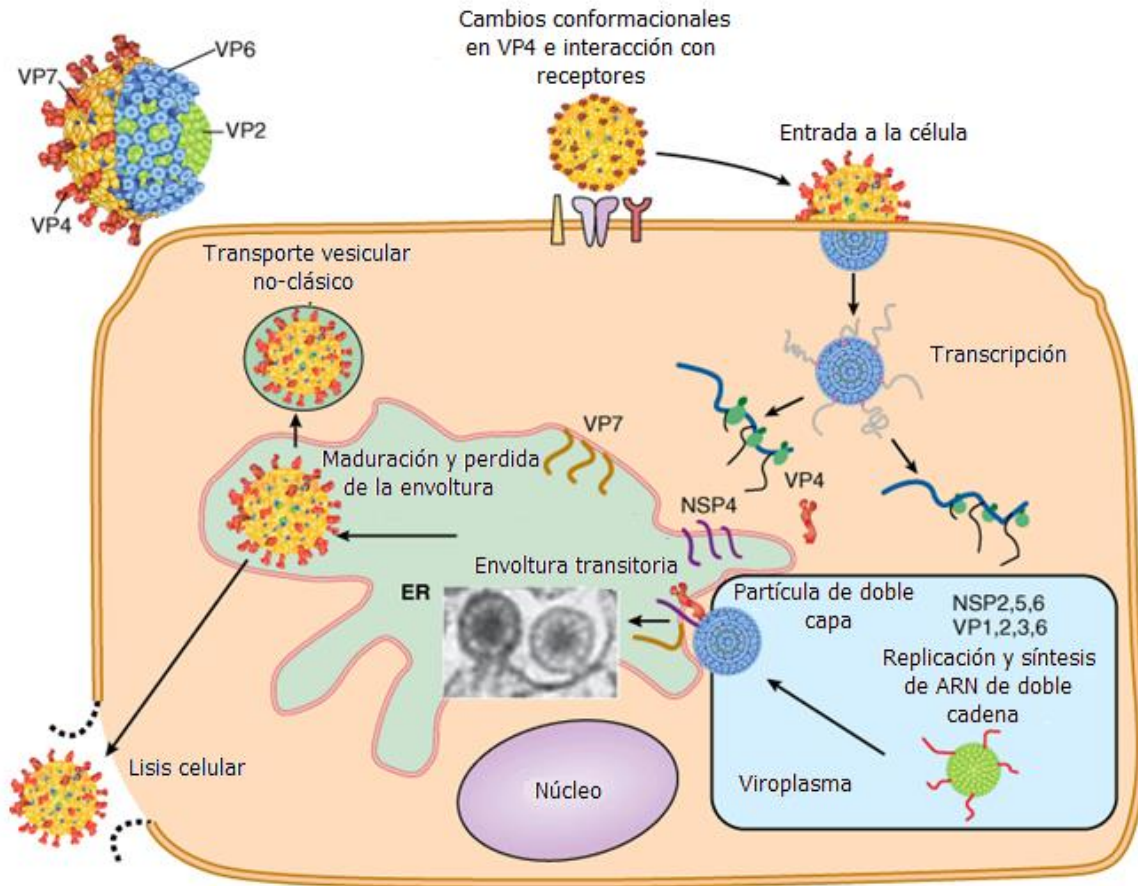


Figura 1. Ciclo replicativo de rotavirus (Imagen cortesía de MK Estes).

## 2. Estudios sobre NSP3 y dilucidación de sus funciones

### 2.1 Dominios de NSP3

La proteína NSP3 tiene 313 aminoácidos y presenta en su extremo amino un dominio (aa 4-149) que se une específicamente a la secuencia consenso –UGACC presente en los extremos 3' de todos los 11 ARNm virales [14, 16, 17]. Esta secuencia de cinco nucleótidos se propone que sirve de la misma manera que la cola de poli-A en los extremos 3' de los ARNm celulares, que son

reconocidos por la proteína PABP (poly-A binding protein) y a partir de esto se pueden traducir eficientemente [15,16, 17].

Posteriormente por medio del sistema de dos híbridos se identificó, en el extremo carboxilo de NSP3, un dominio de unión al factor de iniciación de la traducción 4G1 (eIF4G1) [18]. Interesantemente, NSP3 reconoce el mismo sitio con el que eIF4G1 interacciona con PABP, y se demostró que NSP3 desplaza a PABP de su unión a eIF4G1 *in vivo*, encontrándose que al expresar NSP3 PABP se relocaliza hacia el núcleo celular [18]. Con base en estos hallazgos se propuso que NSP3, al desplazar a PABP de los complejos traduccionales, ocasiona la linearización de los ARNm celulares y consecuentemente inhibe la traducción celular. Mientras que NSP3 al unirse a los ARNm virales y también a eIF4G1, estimula la traducción viral sobre la celular [18] (Figura. 2).

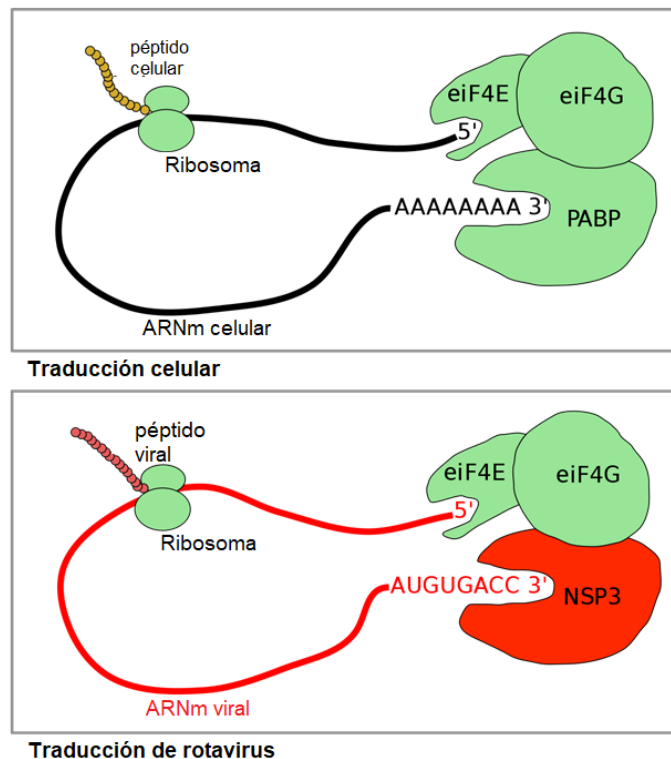


Figura 2. Formas de circularización de ARNm por medio de los factores de iniciación de la traducción en ausencia y presencia de una infección por rotavirus en donde NSP3 desplaza a PABP de la interacción con eIF4G1 para poder circularizar los ARNm virales. Tomado de Piron M. et al. 1998.

NSP3 forma multímeros en condiciones no reductoras en ensayos de geles de poliacrilamida [19], mientras que por ensayos de dos híbridos se observó que NSP3 es capaz de unirse consigo misma [14]. Con estos antecedentes, se mapeó un dominio de dimerización entre los aminoácidos 150-206, el cual fue probado por el ensayo de dos híbridos y que se podía predecir era consecuencia de la presencia de estructuras coiled coil [14]. Y finalmente se corroboró que en el extremo carboxilo del NSP3, entre los aminoácidos 206-313, se encuentra el dominio de interacción con el extremo amino de eIF4G1.

Por otro lado, algo muy interesante que se observó en estos mismos estudios de expresión de proteínas mutantes de NSP3 analizados por medio de geles en condiciones no reductoras, es que la expresión independiente del fragmento correspondiente al dominio de unión a ARNm y parte del fragmento de dimerización son capaces de dimerizar en ausencia de los demás dominios (Figura. 3) [14]. Este hallazgo sugiere participación de cisteínas del extremo amino de la proteína en multimerización.

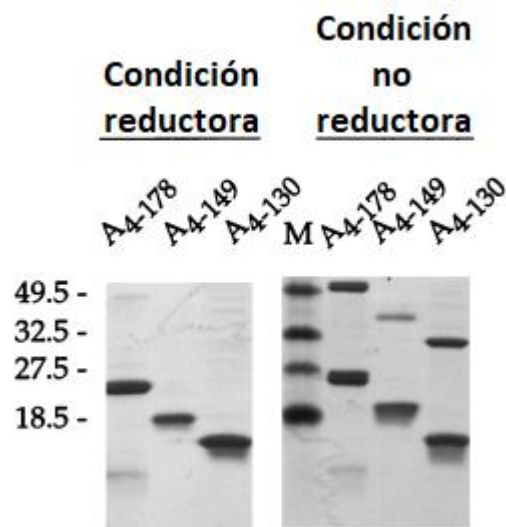


Figura 3. Imagen de proteínas purificadas de NSP3 con deleciones en distintos sitios de la proteína, analizadas por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no-reductoras y teñidas con azul de Coomassie en donde se observa que cada fragmento es capaz de dimerizar en condiciones no reductoras (panel de la derecha). Tomado de Piron, M. et. al. 1999 [14].

Además de que se pudo concluir que las funciones de unión a los ARNm y de interacción con eIF4G1 son independientes entre sí, haciéndose notar que la composición aminoacídica de NSP3 le adjudican propiedades muy particulares las cuales favorecen su agregación dimérica o multimérica con otras proteínas [19]. Mientras que al expresar proteínas mutantes las cuales les hace falta alguno de los dominios funcionales, permitió observar que cada proteína era capaz de interactuar con sus blancos aún en ausencia de algún segmento [14].

Interesantemente, en este mismo estudio se utilizó el dominio de unión a ARN de NSP3 junto con un oligoribonucleótido que corresponde a la secuencia que reconoce NSP3 en el extremo 3' de los ARNm virales. Estos componentes se analizaron con la técnica llamada Biacore, la cual sirve para analizar interacción proteína-proteína a partir de inmovilizar a la proteína de interés (o parte de ella) en un chip, mientras se hace pasar un flujo de proteínas o péptidos que se presumen pueden ser blancos de interacción, y con la cual se puede obtener la afinidad de uniones, cantidad de partículas unidas o sucesión entre las interacciones, entre otras cosas. En el estudio, lo que se inmovilizó fue un oligonucleótido que corresponde a la secuencia consenso reconocida por NSP3, mientras que el flujo que se hizo pasar correspondía a un fragmento de NSP3 correspondiente al extremo amino (aminoácidos 34-178), el cual es el responsable de interactuar con los ARNm. Se observó que dos péptidos de NSP3 interactúan con un sólo oligonucleótido, e interesantemente esto ocurre en un proceso multipasos en donde un péptido es capaz de unirse al oligonucleótido, posteriormente se asocia el segundo péptido de NSP3 y la disociación se da de la misma manera [14]. Y aunque este acercamiento es de manera *in-vitro* bajo condiciones muy particulares, resultó

un acercamiento novedoso y propositivo acerca de las interacciones y el proceso que podría seguir NSP3 durante la infección viral.

### **2.2 El estudio estructural de NSP3 como forma de abordar la función.**

También se realizaron ensayos de cristalografía con rayos-X que permitieron conocer la estructura tridimensional de NSP3 asociada con sus blancos funcionales. Se obtuvo la estructura de un fragmento amino de NSP3 co-cristalizado con la secuencia de los cuatro nucleótidos terminales de los extremos 5' de los ARNm de rotavirus. Estos cristales mostraron que el extremo amino forma homodímeros asimétricos con una forma de corazón una vez que interactúan con los nucleótidos -GACC [20]. De manera independiente, se cristalizó el extremo carboxilo de NSP3 el cual también sólo se pudo realizar en presencia del segmento de 19 aminoácidos que reconoce en eIF4G1. Este cristal mostró que se forman homodímeros simétricos conformados por  $\alpha$  hélices que presentan dos sitios idénticos de unión a eIF4G1. Esta interacción es similar a la que presenta la proteína celular homóloga en función: PABP; aunque NSP3 presenta una mayor afinidad que PABP [21]. Actualmente sólo existen modelos cristalográficos de los extremos de NSP3, sin lograrse aún la cristalización de la proteína completa, ni del fragmento intermedio responsable de la dimerización, lo que limita comprender si estas dos formas del extremo amino y carboxilo permanecen iguales cuando se encuentra la proteína completa e interactuando con sus blancos funcionales.

### **2.3 Consecuencias funcionales de NSP3 en los procesos celulares.**

Estudios tempranos del efecto de NP3 sobre la traducción celular se realizaron con el gen reportero de luciferasa, produciendo *in vitro* ARNm con el extremo 3' -UGACC de los rotavirus o con cola de poli-A y transfectando en una línea celular transformada para expresar



constitutivamente a NSP3. Con este enfoque se determinó que NSP3 estimula moderadamente la traducción de ARN con cola de poli-A y en mayor medida la traducción de ARNm con el extremo –UGACC [15]. Con estos hallazgos los investigadores propusieron que NSP3 tiene una función homóloga a la de PABP que estimula la traducción de ARNm virales pero también tiene un efecto sobre ARNm celulares poliadenilados a través de efectos sobre todo en el complejo de iniciación de traducción eIF4F que forman eIF4E, eIF4G1 y eIF4A [15].

En un estudio posterior, el cual presentaba un enfoque *in vivo* para el análisis de los procesos celulares en los que está implicado NSP3, se construyó un virus recombinante de vaccinia el cual expresaba a NSP3 por medio de la inducción con isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactósido (IPTG). Bajo este enfoque se analizó el efecto de la expresión de NSP3 en ausencia de los demás componentes de rotavirus sobre la traducción celular. Lo que se observó fue que conforme se aumentaba la expresión y concentración de NSP3, disminuía la síntesis de proteínas celulares. Por otro lado, de manera complementaria, se analizó la expresión de tres proteínas mutantes de NSP3 en donde a cada una le hacía falta un dominio, una de ellas no presentaba el dominio amino de unión a ARNm ( $\Delta R$ ), otra el dominio de dimerización ( $\Delta D$ ) y la tercera el dominio de unión a eIF4G1 hacía el extremo carboxilo ( $\Delta 4G$ ), con dichas mutantes se pudo observar que sólo  $\Delta R$  tenía la capacidad de inhibir la traducción celular al igual que la proteína silvestre, mientras que las otras dos proteínas no. Este resultado apoya la idea de que NSP3 al unirse a eIF4G1 era responsable de inhibir la traducción celular al impedir la circularización de los ARNm celulares, además de que para lograrlo era necesario que la proteína viral presentara un estado dimérico [22].

#### **2.4 Hallazgo en NSP3 de un nuevo dominio de unión a la proteína celular RoXaN**

Posteriormente se pudo discernir que NSP3 presentaba otro dominio funcional de interacción con la proteína RoXaN, denominada así por sus siglas en inglés Rotavirus X protein Associated with

NSP3. Por medio de la técnica de dos híbridos, este dominio fue localizado entre los aminoácidos 163-237 los cuales corresponden a un segmento dentro del dominio de dimerización de NSP3 y el inicio del de unión a eIF4G1. Esta proteína se describe como perteneciente a una familia de proteínas llamadas paxilinas, las cuales pueden funcionar como un adaptador al citoesqueleto y donde cada proteína perteneciente a esta familia presenta características específicas; una de ellas es la presencia de un motivo LD con una secuencia LDxLLxL, además de un dominio TRP (tetratricopéptido). Ambos dominios hacia el extremo amino le permiten tener interacción con diversas proteínas o con multicomplejos proteicos; mientras que hacia su extremo carboxilo se encuentran cinco motivos de dedos de zinc los cuales permiten interaccionar con ácidos nucleicos [23].

NSP3 interacciona con el dominio LD de RoXaN, además de que su interacción permite la formación de complejos ternarios conformados por RoXaN, NSP3 y eIF4G1, siendo NSP3 el eslabón con el cuál interaccionan las otras dos proteínas. Estas características permitieron proponer que la interacción entre NSP3 y RoXaN puede servir durante la replicación de rotavirus para ayudar a NSP3 en la regulación de la traducción celular, además de poder localizar a los ARNm virales en lugares específicos de la célula como parte de esta regulación [23].

### **2.5 Cuestionamientos al modelo de estimulación de la traducción de NSP3**

En un estudio de abatimiento de la expresión de NSP3 con siRNA (ARN pequeños de interferencia, por sus siglas en inglés) que reducen en aproximadamente 80% el nivel de expresión de NSP3 en células infectadas con rotavirus concluyó que NSP3 no era necesaria para la traducción de los ARNm de rotavirus, pero sí era capaz de inhibir la traducción celular. Sin embargo, cuando se inhibió la expresión de eIF4G1 con su respectivo siARN, en ausencia de la infección con rotavirus

se obtuvo que la traducción celular se podía efectuar de forma muy parecida a la condición en donde se expresaba eIF4G1, mientras que durante la infección con rotavirus, el silenciamiento de eIF4G1 no modificaba el nivel de inhibición provocado por rotavirus en presencia del factor traduccional. Con base en estos resultados se propuso que cada uno de los dominios funcionales de NSP3 podían actuar independientemente del otro, por lo que no necesariamente estarían funcionando simultáneamente [24].

En otro estudio consecutivo, este mismo grupo de trabajo observó que durante la infección con rotavirus, el factor de iniciación 2 es fosforilado en la subunidad alfa (eIF2 $\alpha$ ), lo cual impide que el proceso de traducción se lleve a cabo debido a que no se produce el complejo ternario (met)ARNT-eIF2-GTP requerido para iniciación. Sin embargo este hallazgo reveló que este tipo de inhibición de la traducción no es responsable del total de la inhibición provocada por rotavirus sino más bien parece ser un complemento a la afectación provocada por NSP3, el cual ocurre desde las primeras horas de infección [25].

Posteriormente, un estudio abordó la función y participación de RoXaN durante la infección celular por rotavirus y su asociación con el proceso inhibitorio de la traducción celular. En este estudio, por primera vez se determinó la localización de las proteínas involucradas. Primero, por medio de ensayos de inmunofluorescencia se pudo observar que cuando existe la infección por rotavirus y expresión de NSP3, PABP está localizada en el núcleo, mientras que de manera natural se encuentra mayoritariamente en el citoplasma. Este efecto se encontró relacionado al hecho de que NSP3 al desplazar a PABP de su interacción con eIF4G1, provoca su relocalización al núcleo, ya que al transfectar una mutante de NSP3 que no presenta el dominio de unión a eIF4G1, dicho fenómeno no sucede. Por otro lado, contrariamente a lo observado a PABP, RoXaN se encuentra

principalmente en el citoplasma durante la infección con rotavirus y en el núcleo en células no infectadas [26].

Mediante ensayos de coimmunoprecipitación, se observó que RoXaN puede estar asociado a PABP por medio de un intermediario de ARNm y exportar a PABP al citoplasma a través de su dominio LD. Aunado a esto, mutaciones en el dominio de unión a RoXaN de NSP3 revierten la relocalización de PABP al núcleo. Con base en estos hallazgos se propuso que NSP3 desplaza a PABP de su unión con eIF4G1 lo que provoca su relocalización al núcleo, mientras que al retener a RoXaN en el citoplasma se evita que pueda asociarse a ARNm unidos a PABP y con esto impedir la salida al citoplasma de los transcritos celulares [26, 27].

### **2.6 El descubrimiento de la interacción de NSP3 con HSP90 y su relevancia**

Como resultado de diversas herramientas informáticas llamadas “segundo empleo”, del inglés “moonlighting” se identificaron nuevas proteínas blanco o procesos celulares en los cuáles podrían estar involucradas las proteínas virales de rotavirus, mediante el uso de diversos programas que están enfocados a dar predicciones con base en la secuencia aminoacídica de una proteína. En el caso de rotavirus, se utilizaron diversas plataformas para predecir modificaciones postraduccionales en cada una de sus proteínas y su susceptibilidad para ser fosforiladas, SUMOiladas, ubiquitinadas, entre otras modificaciones [28]. Así se encontró que una de las proteínas involucrada durante la infección celular con rotavirus es la de choque térmico HSP90 (denominada HSP por sus siglas en inglés y 90 por su peso molecular en kilodaltons), la cual estaba regulando de manera positiva la replicación viral, y asistiendo procesos de sobrevivencia viral por evasión de vías de respuesta inmune [29].

Posteriormente se encontró que HSP90 interacciona directamente con NSP3 y se identificó el dominio responsable entre los aminoácidos 225-258, que se traslapa con el dominio de unión a eIF4G1 y el dominio de unión a RoXaN. También se encontró que HSP90 asiste su dimerización, ya que al inhibir la función de HSP90 con el reactivo 17DMAG (el cual es un derivado del inhibidor específico de HSP90 geldanamicina), se observó que el monómero de NSP3 es susceptible a degradación por el proteasoma y por lo tanto depende de la unión con HSP90 para estabilizarse y evitar su degradación. También, por medio de ensayos de inmunoprecipitación, se observó que si no existe dicha interacción, NSP3 no llega a ser dimérico o lo hace de una manera ineficiente, postulándose que la interacción sólo sucede con el monómero y no con el dímero de NSP3. Además, conforme se observa la aparición del dímero, disminuyen la interacción con HSP90 y la presencia de formas monoméricas de NSP3. Finalmente, por medio de ensayos de Western Blot No Disociativos (en presencia de baja concentración del detergente SDS y en ausencia del agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol) se determinó que NSP3 producida por traducción *in vitro* requiere de al menos 30 minutos para la aparición de dímeros. Aunado a estos hallazgos, se observó que en células infectadas con rotavirus existe una menor cantidad de PABP en complejos con eIF4F y PABP se relocaliza al núcleo, mientras que cuando se afecta la función de HSP90 con el 17DMAG, PABP se localiza en el citoplasma. Con base en estos resultados se concluyó que la dimerización de NSP3 asistida por HSP90 permite que la proteína viral sea funcional para efectuar su función sobre la traducción celular [30].

### **2.7 NSP3 y estrés celular por la respuesta de proteínas no plegadas**

Una de las respuestas que comúnmente se desata al estrés en las células por una infección viral es la llamada “respuesta de proteínas no plegadas” (UPR por sus siglas en inglés Unfolded Protein Response), la cual involucra al retículo endoplásmico y resulta de la acumulación en este organelo

de proteínas mal plegadas a causa de una alteración en los mecanismos que censan condiciones de estrés, dichos mecanismos son regulados por las chaperonas. Diversas chaperonas regulan su expresión por medio de diversos factores de transcripción que se originan en el Retículo Endoplásmico como es el factor XBP1. Durante una infección con rotavirus, se encontró que NSP3 puede regular la síntesis de este factor transcripcional, lo que resulta en una alteración en el proceso UPR que conlleva a que no comience la respuesta a estrés, favoreciendo la replicación viral [31].

Un estudio encontró que, durante la infección por rotavirus, los ARNm de la célula son localizados principalmente en el núcleo pero no así cuando se silencia la expresión de NSP3 con un ARNsi. Por lo tanto se propuso que la principal causa por la cual NSP3 es responsable de la inhibición de la traducción celular es por el bloqueo de la salida de los ARNm celulares del núcleo al citoplasma y no por la competición y afectación funcional de los factores y/o de los complejos de iniciación de la traducción [33].

### **2.8 Debate sobre la función de estimulación de la traducción viral de NSP3.**

Con el fin de estudiar el efecto de NSP3 sobre ARNm diversos, se produjeron ARNm reporteros creados a partir de la fusión de un gen de luciferasa de renilla, el cual poseía la estructura cap en su extremo 5' pero era modificado en su extremo 3' de tres formas, una tenía las características de los ARNm de rotavirus con la secuencia consenso UGACC, la segunda forma poseía características de un ARNm celular el cual tenía una cola de poli-A, mientras que la tercera forma poseía una secuencia distinta a las dos formas anteriores con el fin de que fuera irrelevante para la interacción con NSP3. Con la transfección de estos ARNm, se infectaron células con cepas de rotavirus y se observó que los niveles de traducción de cada uno de los reporteros fueron

aumentados en comparación a las células sin infección, siendo aquellos reporteros con las características de rotavirus los que presentaban una mayor traducción. Aunado a esto, se observó que estas condiciones de estimulación de la traducción estaban asociadas a la presencia de NSP3, con lo que los investigadores comentaron que los reportes anteriores en donde se mencionaba que NSP3 no promovía la traducción, se debía a que la metodología utilizada en esos estudios (silenciamiento con RNA de interferencia) sólo permitía una reducción en la expresión de NSP3 pero no era total. Mientras que en este estudio, al observar la estimulación tanto de ARNm con características virales como celulares se debe a que la unión conjunta con eIF4G1 y eIF4E por NSP3 que permite que se una con cualquier ARNm a través de la estructura CAP en el extremo 5' de los ARNm [34].

Estos aspectos resultaron complementarios a los resultados obtenidos en un estudio reportado un año después por el mismo grupo de trabajo, donde se observó que la ausencia de la estructura cap, o las secuencias consenso que son reconocidas por NSP3 en los ARNm, son indispensables para aumentar su traducción decenas de veces. Con base en estos resultados se propuso que la función de cada uno de los dominios de NSP3 no funciona de manera aislada a la de los otros, ya que la estructura de NSP3 es relevante para su óptima función de estimulación de la traducción. Otra propuesta de los investigadores fue que NSP3 puede funcionar como un sustituto de PABP durante la traducción, lo que es difícil de conciliar con el modelo de inhibición de la traducción propuesto anteriormente en el sentido de que NSP3 se une a eIF4G1 en el sitio reconocido por PABP y desplaza a este factor evitando así la interacción entre los extremos 5' y 3' de los ARNm poliadenilados [35].

### **3. La chaperona HSP90 como un regulador clave de la proteostasis celular.**

Durante un estado de estrés en la célula, se desencadena una respuesta de supervivencia caracterizado por una menor actividad en procesos como es el transporte celular, procesamiento del ADN y ARN, así como disminución en la síntesis proteica, entre otros. Pero contrastantemente, se expresan proteínas que de manera normal tienen un bajo nivel de síntesis, denominadas de estrés o de choque térmico (HSP-s) que pueden ser inducidas por diversos estímulos estresantes para la célula como pueden ser: calor, frío, radiación UV, contaminantes metálicos, exceso de calcio dentro de la célula, infecciones bacterianas o virales, entre muchos otros [36, 37].

La función de estas proteínas chaperonas es mantener la homeostasis en la célula y resultan de vital importancia durante enfermedades. Estas proteínas son muy antiguas y ampliamente conservadas, se encuentran desde células procariontes y en todas las eucariontes [37].

Las chaperonas son una gran familia de proteínas que se encargan principalmente de unirse a proteínas recién sintetizadas para estabilizarlas y modificar su plegamiento, oligomerización, ensamble, transporte a sitios particulares, o destinarlas a degradación. La mayoría de ellas no trabajan solas, sino más bien forman oligómeros y/o en unión con co-chaperonas que pueden estar modificando una determinada función de cada chaperona. Además de que la función en algunas de ellas está determinada por el uso e hidrólisis de moléculas de ATP, lo cual provoca un cambio estructural en las chaperonas, un paso esencial durante la asistencia de sus blancos proteicos. Estas proteínas no determinan la estructura terciaria de las proteínas a las que se unen, pero las ayudan a encontrar determinadas conformaciones de manera más eficiente. Otro de los papeles de las chaperonas es servir como colectores de proteínas “dañadas” ya que su agregación y/o persistencia en la célula puede interferir de manera negativa en diversos procesos celulares.



Algunas de las chaperonas denominadas pequeñas y de la familia HSP90 fueron asociadas a procesos de reciclamiento y degradación de proteínas [36, 37].

Dentro de la familia de chaperonas de HSP90, se han reportado hasta 17 genes codificantes para ellas, seis de ellas funcionales y once catalogadas como pseudogenes [38, 39]. Es una proteína muy abundante en la célula la cual se estima puede llegar a representar hasta el 10% del total de las proteínas en condiciones de estrés y el 2% en condiciones normales [39, 40]. Existen dos isoformas denominadas alfa y beta que se encuentran en una relación 2:1 respectivamente y dependiendo del linaje celular varían en su peso molecular, sin embargo los rangos van desde los 82 kDa hasta los 90 kDa y aunque presentan un 95% de identidad, se ha reportado que sus funciones no son reemplazables ya que presentan clientes específicos así como funciones particulares [38, 39]. Esta chaperona forma dímeros y contiene al menos dos sitios activos, uno en su extremo amino y otro en el carboxilo [36, 41, 42]. Se ha visto que modula la señalización de diversas vías celulares como es el ciclo celular, también regula el desarrollo del organismo o la respuesta a cambios en el ambiente. Aunado a esto regula el mantenimiento de telómeros, la apoptosis, la progresión de mitosis, el transporte vesicular, la respuesta inmune; todos estos procesos son regulados debido a que algunas de sus proteínas cliente son factores de transcripción, cinasas, entre otras, por lo que su expresión y función es vital para la célula [37]. Se han descrito una gran variedad de proteínas que interactúan con HSP90, entre las que se encuentran HSP40, HSP70, Hop/p60, Cdc37, Aha1 las cuales están principalmente asociadas a su función de plegamiento, mientras que co-chaperonas como CHIP, Ubr1, Cul5, entre otras, están descritas como reguladoras de su función canalizante a degradación [36, 37].

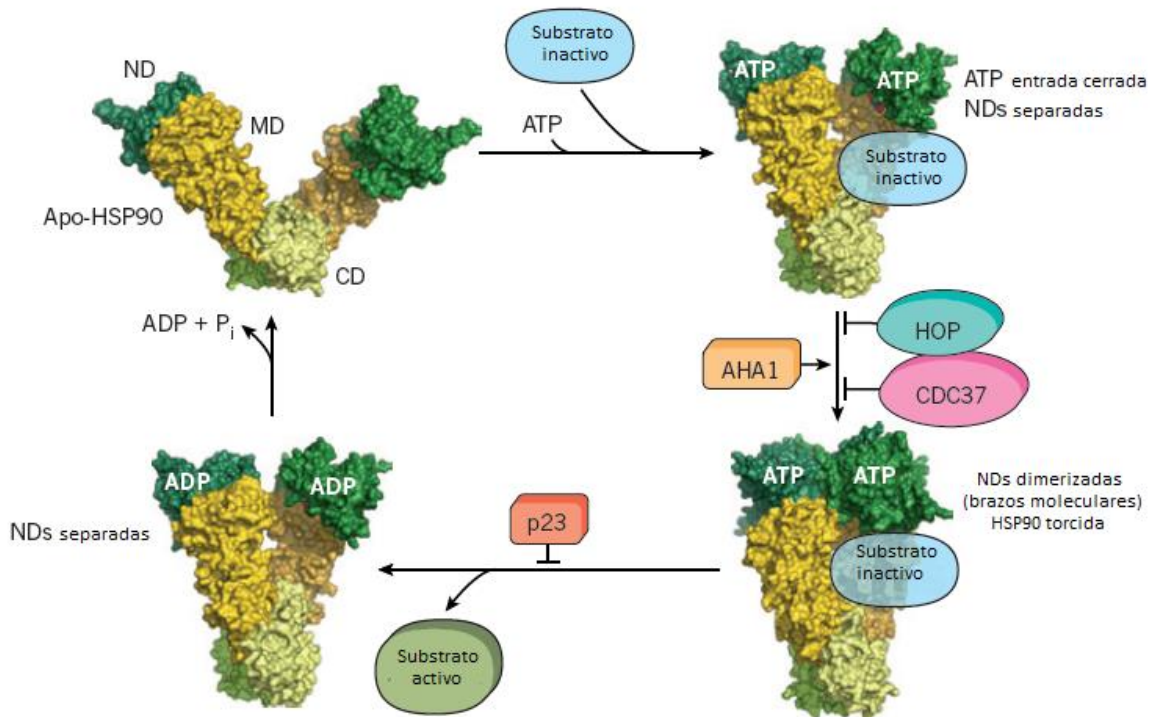


Figura 4. Esquema del ciclo estructural y funcional de HSP90. Tomado de Hartl F. *et.al.* 2011 [37] donde se muestra las distintas estructuras que presenta HSP90. Primero en su estado abierto, en la cual no se encuentra interaccionando con alguna molécula. Posteriormente al unir ATP a su extremo amino, adquiere un estado que permite interaccionar con sus blancos. Una vez unido a una proteína blanco adquiere un estado cerrado el cual cambia estructuralmente al utilizar la molécula de ATP y una vez terminada su interacción vuelve a su estado abierto.

HSP90 es una proteína a la cual se le ha podido adjudicar una gran variedad de propiedades ya que no sólo es capaz de asistir el plegamiento de sus proteínas cliente, sino que también puede determinar diversas conformaciones de una misma proteína [36]. Sin embargo, presenta una importante participación en el proceso de degradación vía proteasoma. La proteína se divide en tres dominios, el dominio amino que es donde reside un sitio de unión a ATP y el cual es el mejor conocido y descrito; el dominio medio en donde la chaperona interacciona tanto con sus blancos proteicos como con sus co-chaperonas y el dominio carboxilo sirve para permitir la dimerización de la proteína, permite interacción con co-chaperonas y se ha observado que también es capaz de

unir moléculas de ATP [37, 42] (Figura. 4). El primer reporte donde se identificó la unión de ATP, fue en el extremo amino, sin embargo en estudios más recientes se pudo determinar, con la ayuda de compuestos que bloquean el dominio amino, que HSP90 es capaz de seguir consumiendo ATP por lo que se pudo determinar que existe un sitio de unión en el dominio carboxilo el cual se encuentra sobrelapado con el dominio de dimerización de la proteína [42]. Aunado a esto, la abundante cantidad de sitios de unión en HSP90 sugieren la presencia de una variedad de superficies activas de interacción. Lo que hace posible la creación de compuestos farmacológicos que pueden servir como reguladores de su función. En la actualidad existen una variedad de compuestos que pueden unirse a HSP90, como es el novobiocin, cisplatino, o compuestos provenientes de plantas como es el (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) que se unen al extremo carboxilo; por otro lado, el radicicol, la geldanamicina y sus variantes como es el 17DMAG, se unen al sitio de unión a ATP en el extremo amino e inhiben su función al bloquear este sitio, lo que provoca la disociación del complejo proteico y subsecuentemente la degradación de sus clientes [41, 43, 44], mientras que los inhibidores del extremo carboxilo se unen al segundo sitio de unión a ATP. Interesantemente se ha encontrado que HSP90 en unión con sus inhibidores es susceptible a proteólisis, mostrando distintos fragmentos dependiendo de si el inhibidor se encuentra en el extremo amino o el carboxilo, los cuales son estabilizados mientras se encuentren unidos a su inhibidor. En el caso de los fragmentos correspondientes a inhibidores que se encuentran en el extremo carboxilo, genera un fragmento de 50kDa el cual aún es capaz de unir ATP y ser inmunoprecipitado. Finalmente se pudo determinar que la unión de ATP en el extremo amino, es necesaria para desenmascarar el sitio activo en el extremo carboxilo y permitir la interacción con cochaperonas y/o para unir ATP en este sitio. Estos inhibidores han resultado muy eficientes y específicos debido a que la conformación que tienen los sitios activos, por ejemplo el del extremo amino de HSP90, tiene una muy particular e inusual curvatura [41]. En el caso del inhibidor

17DMAG el cual presenta una menor toxicidad que la geldanamicina, ha resultado mucho más eficiente para el estudio de HSP90 y de suma relevancia en el combate de células cancerosas, ya que muchos de los clientes de HSP90 están sobre expresados en dichas células y al inhibir a la chaperona, estos clientes son degradados [43, 44]. Finalmente se ha reportado que HSP90 en asociación con co-chaperonas como CHIP, puede ser reprogramada para servir como una vía para degradación por el proteasoma ya que CHIP funciona como una proteína E3 responsables de la ubiquitinación y canalización al proteasoma [36] .

### **3.1 La importancia de CHIP para regular la función de HSP90 y la vía de degradación por el proteasoma.**

La proteína CHIP interacciona con el extremo carboxilo terminal de Hsc70, es una co-chaperona que si bien primero se descubrió asistiendo las funciones de Hsc70, ahora se sabe que también sirve como co-chaperona de HSP70 y HSP90 y tiene una función como proteína E3 ligasa de ubiquitina, la cual presenta una expresión ubicua, además de ser conservada evolutivamente en muchos linajes celulares. Estas características hacen que la proteína esté implicada en diversos procesos celulares como el plegamiento celular, degradación proteica, tráfico de proteínas, señalización, transcripción y apoptosis [36, 45].

Mientras que su interacción con HSP90 sucede al unirse en el lugar que ocupa la co-chaperona p23, ocasionando que la función de plegamiento de HSP90 se inhiba y se torne su función en la degradación de proteínas. Este proceso de degradación es por vía del proteasoma, y se lleva a cabo a través del dominio U-box de CHIP y de ahí que pueda llevar a cabo su función de ligasa E3. Su función se ha observado es dependiente de la interacción con HSP70 o HSP90. Aunque se ha reportado que no es la misma función entre HSP90 y HSP70, ya que con HSP90 se asocia a una

estabilización de las proteínas mientras que con HSP70 en la degradación. Y teóricamente, todos los clientes de HSP70 y HSP90 son sustratos de CHIP. Además de que juega un papel importante en la expresión de las chaperonas HSP70 y HSP90 ya que también regula la expresión del factor HSF1 el cual es el encargado de transcribir a HSP70 y HSP90 en condiciones de estrés, lo que regula a su vez la degradación de HSP70 al ubiquitarla cuando la célula se encuentra en un estado de recuperación del estrés celular, permitiendo una homeostasis en la expresión de las chaperonas por CHIP [36, 40, 45].

### **3.2 La importancia de HSP90 en la regulación de infecciones virales.**

Existe una aparente necesidad de HSP90 en casi la totalidad de las infecciones virales sin importar el tipo y clase de virus que se trate, en donde la replicación viral se ve íntimamente asociada a la funcionalidad de HSP90, ya que de ser inhibida la función de la chaperona, dicha replicación se ve comprometida. Esto se ha explicado por la importancia que juega HSP90 en el mantenimiento de la homeostasis celular. De manera adicional a esto, en virus principalmente citopáticos, que suelen necesitar una síntesis elevada de un cierto tipo de proteína viral en un corto periodo de tiempo, HSP90 ayuda a que ciertas proteínas tengan un correcto plegamiento, además de controlar las cantidades proteicas sin que se generen agregados y se conviertan citotóxicos, así como el control de diversas señalizaciones celulares como la respuesta inmune, apoptosis, entre otras, para permitir la correcta replicación de los virus [46].

En la mayoría de los casos, se ha podido evidenciar que al inhibirse a HSP90, se afecta la acumulación de una o varias proteínas virales lo cual refleja la necesidad de esta chaperona ya sea para tener un plegamiento correcto, una mayor estabilidad o una menor degradación. Y por lo tanto existen diversos estudios que han catalogado a proteínas virales como clientes de HSP90. Uno de estos clientes son las polimerasas virales, un ejemplo es la polimerasa del virus de la

hepatitis B humana. También el virus de la influenza A requiere la interacción con HSP90 para que su polimerasa pueda establecer una correcta replicación. Y de manera general se ha observado que HSP90 es necesaria en la mayoría de los virus pertenecientes a la familia Herpesviridae [46].

Así mismo se ha observado la interacción de HSP90 con diversas proteínas estructurales, dentro de las cuales se encuentran las de los virus de la familia de los *Picornaviridae*, como son poliovirus, rinovirus y coxsackievirus, en donde la maduración y correcta acumulación de las copias que comprenden a sus capsides están asociadas a la interacción con HSP90. Mientras que otro de los ejemplos de proteínas no estructurales que necesitan la participación de HSP90 es el virus vaccinia, ya que al inhibirse a la chaperona se afecta su replicación, específicamente de los genes de expresión intermedia y tardía [46]. También podemos enlistar la ya comentada interacción de HSP90 con la proteína NSP3 de rotavirus, que si bien puede ser considerada como una participación o interacción que permite la regulación traduccional, a través de alterar la función de otras proteínas que participan durante este proceso traduccional, también hemos mencionado que esta regulación parece ser más compleja que sólo afectar este aspecto. Y como estos ejemplos existen muchos más en donde HSP90 regula la infección viral a través de interaccionar y regular la expresión de sus proteínas.

#### **4. El inicio de la traducción celular y la importancia que juega el factor eIF4G1**

La traducción es el proceso en el cual se lleva a cabo la síntesis de polipéptidos a través del ensamblaje y elongación de una cadena de aminoácidos por medio de ribosomas competentes. Este proceso es de suma importancia y demanda un gran gasto energético (se estima que consume el 50% de la energía de la célula) [47], el cual implica varias etapas en donde al inicio de la traducción es el más regulado. Conlleva al menos la participación de nueve proteínas o también

llamados factores de iniciación de la traducción [48]. En total se han descrito trece factores de iniciación de la traducción y cinco proteínas auxiliares (que no se les denomina como tal un factor pero que están involucrados durante el proceso) [49]. Dentro del total de los factores, hay algunos que son determinantes para que el proceso se lleve a cabo, como es el factor eIF2, encargado de formar el complejo ternario el cual comprende a eIF2, una molécula de GTP y el ARNt de iniciación. Otro factor con un papel importante es eIF4E, encargada de reconocer la estructura CAP en los ARNm. Por otro lado eIF3, que representa el factor con mayor peso molecular, se encarga de unir tanto factores traduccionales como las subunidades ribosomales. eIF4A es una helicasa encargada de desenrollar al ARNm y es importante para ARNm con estructura secundaria en el extremo 5' no traducido. Y finalmente eIF4G, una de las proteínas andamio en el inicio de la traducción ya que se une con eIF4E, eIF4A, eIF3, y la proteína PAPB (de la cual se hablará a detalle más adelante), para circularizar los ARNm, posteriormente acoplar este complejo a la subunidad ribosomal 43S y así formar el complejo de 48S [49].

Posteriormente a la formación del complejo de 48S con ayuda de los factores antes mencionados, el factor eIF3 recluta a la subunidad mayor ribosomal 60S, la cual se acopla a la subunidad menor desplazando a los factores de iniciación y dará paso al segundo paso de la traducción que es la elongación con base en la lectura del ARNm para pasar al último paso de la traducción en donde al reconocer y leer codones de paro se concluirá la síntesis [49].

Sin embargo la regulación de la traducción puede ocurrir a muchos niveles, a través de modificaciones postraduccionales de los factores de iniciación, como son fosforilaciones, sumoilaciones, etc; otra forma de ser regulados es la presencia de una o varias isoformas del mismo factor que puede remplazar las funciones del factor principal, complementarlas o tener

funciones específicas sobre ARNm particulares o contextos celulares adversos, por ejemplo eIF4A (1 y 2) los cuales son codificados por dos genes distintos al igual que eIF4G (1 y 2) [48, 50].

Otra forma de regulación es a través de regulación estricta de su expresión, debido a que muchos de los factores realizan su función a partir de la competencia por la unión con otros factores, proteínas celulares o el mismo ARNm; es por eso que su variación altera esta competencia y conlleva en determinados casos el bloqueo del proceso o una alteración que puede provocar cáncer [47, 48]. En levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) se ha podido determinar la concentración de la mayoría de los factores de iniciación de la traducción, encontrando que dentro de los factores más abundantes está eIF4A con 800 mil moléculas/cel. mientras que eIF2B $\alpha$  y eIF4G1 son los dos factores menos abundantes con 20 mil y 18 mil moléculas/cel. respectivamente. eIF4E presenta altas concentraciones (340 mil moléculas/cel.), más de 10 veces más que eIF4G1, pero dado que existen proteínas que funcionan como reguladores negativos de eIF4E como p20 en levaduras (y 4E-BP en células de mamífero) la cual bajo condiciones de estrés aumenta su expresión para unirse a eIF4E e impedir que se una a eIF4G1 [51].

A pesar de la importancia que puede tener el conocer las concentraciones de los factores traduccionales, son escasos los estudios que se hayan dedicado a cuantificarlos en células de mamífero. Uno de los pocos estudios se realizó en células cancerosas de cervix (Hela), en donde se pudo determinar la concentración de eIF4G1 y otros factores pertenecientes al complejo eIF4F, siendo para el caso del factor 4G su concentración de dos millones de moléculas por célula, mientras que para eIF4A de 10 millones de moléculas, aunque cabe aclarar que HeLa son células cancerosas que pueden tener alteraciones en el nivel de factores de traducción por lo que estos resultados no pueden extrapolarse a otro tipo de células [52].



#### **4.1 Particularidades e importancia del factor de iniciación de la traducción eIF4G**

La proteína eIF4G1 pertenece a toda una familia que se puede clasificar de manera general como eIF4G, en la que se encuentran dos isoformas eIF4G1 y eIF4G2. eIF4G1 es el prototipo de la familia y comparte una moderada identidad con la isoforma eIF4G2 (46% en humanos) aunque sí presentan dominios y funciones similares [48, 53]. El ARNm de eIF4G1 presenta un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES por sus siglas en inglés) en la región 5', la cual permite su traducción preferencial (47-49).

Aunadas a estas dos principales proteínas de la familia, existen otras que se expresan en distintas condiciones o con variaciones funcionales pero que mantienen el papel de andamiaje entre distintos factores traduccionales o ribosomales, como lo hace eIF4G1. Una de ellas es la proteína DAP5 (p97, NAT1) que mantiene un 30% de homología con el extremo carboxilo de eIF4G1. Aproximadamente presenta sólo un tercio de eIF4G1, careciendo del extremo amino y diversos reportes asocian a esta proteína con una traducción independiente de CAP, en partículas de ARNm con IRES. Dos proteínas más de la familia, con una menor homología y principalmente con la parte intermedia de eIF4G1 son paip-1 (proteína-1 interactuando con la proteína PABP) y PDCD4 (proteína de muerte celular programada 4) que primero fue llamada DUG [48, 54].

Aunado a esta variedad de proteínas con funciones similares, eIF4G1 siempre ha presentado dificultades para estudiarse. En un principio fue denominada como p220 debido a sus características de migración en SDS-PAGE, aunque siempre ha sido observada como un conjunto de al menos cuatro bandas que migran alrededor de los 220 kDa [52, 55]. Por otro lado, al clonar su cDNA y predecir su peso, en realidad la proteína tiene un peso de 154kDa y las explicaciones para la migración variable en geles es atribuida a modificaciones post-traduccionales que puede sufrir la proteína en su extremo amino [48].

eIF4G1 presenta al menos 6 dominios funcionales, en el primer tercio correspondiente al extremo amino, se encuentra el dominio de unión a la proteína PABP y a eIF4E, asociado con la traducción dependiente de CAP; en la parte intermedia está un dominio de unión a eIF4A y otro a eIF3, esta región es la más conservada entre distintos linajes celulares y resulta esencial para el acoplamiento de los complejos ribosomales 43S con los ARNm, incluso cuando ha sido fragmentada con caspasa 3 (ver abajo) y sólo queda el dominio intermedio denominado MFAG, puede seguir funcionando para traducir ARNm con secuencias IRES; mientras que en el extremo carboxilo se encuentra un segundo dominio de unión a eIF4A y un dominio de unión a la cinasa Mnk1, este segmento de la proteína se propone sirve como modulador traduccional (Figura. 5) [48, 54, 56].

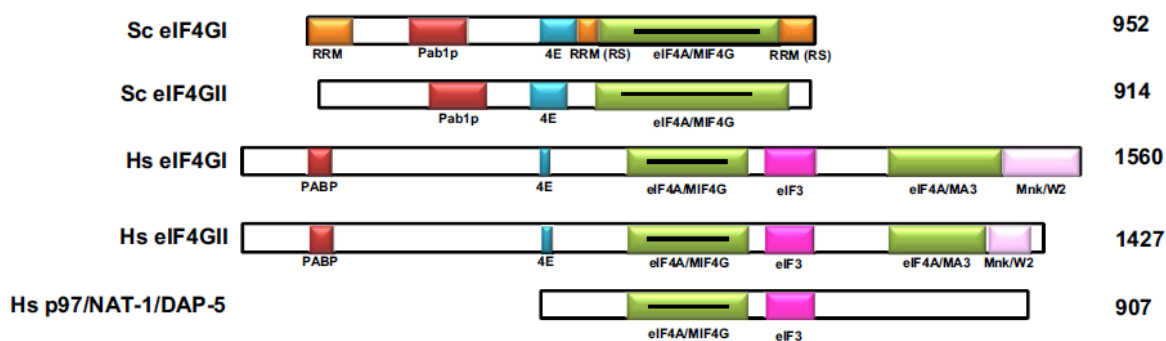


Figura 5. Esquemas de la composición de dominios que comprenden a distintas proteínas pertenecientes a la familia de las eIF4G en células de humano (Hs) o de levadura (Sc). Tomado de Das, S. and Das, B. 2016 [54].

Aunque por algunos grupos es debatido el hecho de que el ARNm de eIF4G1 presenta una secuencia IRES que permite su síntesis preferencial, incluso bajo condiciones de estrés celular, mientras que otros argumentan que eIF4G1 presenta diversos promotores de iniciación de su transcripción (los principales denominados  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y otros 6 con menor importancia) con los cuales

la proteína puede tener una expresión continua aunque con una menor o distinta funcionalidad [57], ocurriendo esto mismo para eIF4G2 aunque con una menor cantidad de promotores.

También es importante mencionar la localización celular de eIF4G1 porque a pesar de que su localización es citoplásmica, existen reportes donde se ha observado que eIF4G1 se puede encontrar en el núcleo. Aunque por otro lado, otros estudios han observado que la forma de eIF4G1 que se encuentra en el núcleo pertenece sólo a un pequeño fragmento del extremo amino (MFAG) que permite su relocalización debido a una secuencia básica en dicho segmento, pensándose que debe cumplir un papel distinto al traduccional, más bien sirviendo para reclutar ARNm y posteriormente exportarlos al citoplasma, además de poder participar en procesos de pre-splicing o sobrevivencia y degradación de los ARNm [54, 58].

Un aspecto de gran relevancia es la capacidad que presenta eIF4G1 para formar multicomplejos proteicos. Es por eso que en los primeros estudios donde se trataba de aislar componentes traduccionales, muchas veces se obtenía un complejo denominado eIF4F, formado por eIF4A, eIF4E y eIF4G1 [52]. Esta capacidad que presenta eIF4G1, ha sido descrita como una forma de acoplar de manera más eficiente tanto otros factores traduccionales, como ARNm a los complejos ribosomales. Aunado a esto, se ha observado que la eficiencia funcional de cada uno de los involucrados en los complejos proteicos, es mejorada a que si ejercieran su función de manera aislada [48, 56, 59]. Pero eIF4G1 no sólo interacciona con factores traduccionales, también se ha observado interaccionando con diversas proteínas celulares y virales. Entre las proteínas virales se encuentran las proteasas de los virus pertenecientes a los picornavirus 2A y L, la proteína NS1 de influenza, la proteasa de retrovirus HIV PR, NSP3 de rotavirus, entre otras. Dentro de las celulares está MnK1, cinasa encargada de regular la función de eIF4E, la chaperona HSP27 o la ya mencionada PABP, entre otras [48].

#### **4.2 La proteína PABP, un eslabón que regula la traducción junto con eIF4G1**

La proteína de unión a la cola de poli-A en los ARNm, PABP (poly(A) binding protein) pertenece a la familia de proteínas que contienen dominios de RRM conservados, los cuales le permiten interactuar con ARNm. Su interacción con el extremo 3' de los ARNm permite su circularización al interactuar simultáneamente con eIF4G1 el cual debe estar unido a eIF4E [60]. Esta interacción permite que los ARNm sean más estables y tengan un mejor procesamiento durante la traducción. Y aunque en diversos sistemas *in vitro* de traducción se ha observado que la circularización no es necesaria para poder llevar a cabo la traducción de los ARNm, dicho mecanismo presenta un efecto sinérgico sobre las funciones de los distintos complejos ribonucleoproteicos [50, 61, 62] (Figura 6).

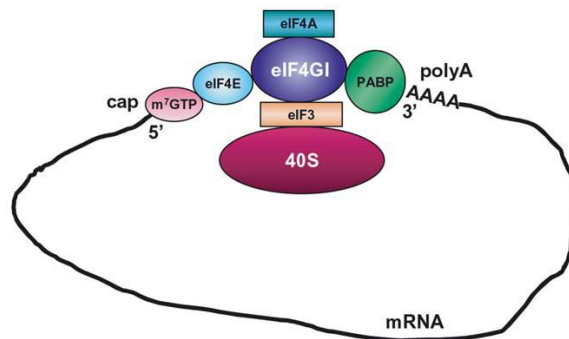


Figura 6. Esquemas de la circularización de los ARNm celulares por medio de la interacción con distintos factores de iniciación de la traducción y la proteína PABP. Tomado de Tomado de Prévôt, D. et. al. 2003 [48].

#### **4.3 El corte de eIF4G como regulación de su función traduccional**

La proteasa 2A perteneciente a poliovirus, fue una de las primeras proteínas identificadas en cortar a eIF4G1. Esta proteasa al igual que la proteína L del virus de la enfermedad de la boca y pie (FMDV por sus siglas en inglés) cortan a eIF4G1 alrededor del aminoácido 640 que corresponde

prácticamente a todo el dominio amino, privando a la proteína del dominio de unión a PABP y de unión a eIF4E. Este fragmento que inhibe considerablemente la traducción celular, el cual es denominado p100 (debido a su peso molecular) es útil para traducir los ARNm de los virus de poliomielitis y FMDV por una ruta no convencional de traducción mediada por secuencias IRES. De la misma manera, el virus de VIH, sintetiza una proteasa que corta a eIF4G1 en dos sitios generando tres distintos fragmentos funcionales (Ch1, Mh y Ch2). Aunado a estos hallazgos, también se ha encontrado que en infecciones por poliovirus, se corta a eIF4G2 con un retraso con respecto al corte de eIF4G1, mientras que el corte de ambas isoformas correlaciona con una inhibición celular completa y su colapso. Por otro lado, otros grupos de investigación reportan que al igual que para el caso de eIF4G1 y 2, la proteína PABP es igualmente cortada bajo la infección de estos tipos virales. Contribuyendo cada uno de estos eventos para el correcto establecimiento de la inhibición traduccional (Figura 7) [48].

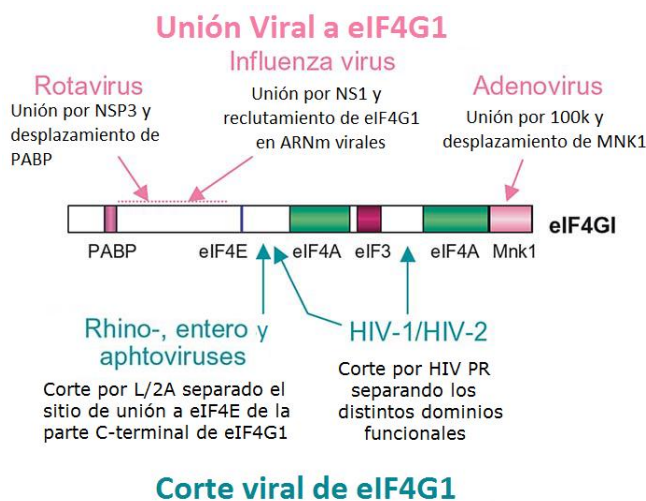


Figura 7. Esquema de los distintos sitios de eIF4G1 en donde se ha reportado interacción con proteínas virales. Esquema modificado de Prévôt, D. et. al. 2003 [48].

Por otro lado, el corte de eIF4G1 no sólo se ha observado en infecciones virales, ya que también existen proteasas celulares que llevan a cabo este tipo de control de eIF4G1 bajo condiciones de

estrés. Por ejemplo, bajo la presencia de diferentes agentes tóxicos como cisplatino o etopósido se inducen un corte y degradación de eIF4G1, también al ser dañadas con luz UV, entre otros tipos de agentes o factores. Si bien cada una de estas afectaciones pueden ser encasilladas como contextos de pro-apoptosis, resultan ser los contextos más estudiados en los que se observa el corte por proteasas (como caspasas) de eIF4G1, siendo la caspasa 3 la proteína mejor caracterizada con dicha función [48, 63].

La caspasa 3 corta en dos sitios a eIF4G1 generando tres fragmentos (N-FAG, M-FAG y C-FAG) que separan los tres dominios funcionales de la proteína [63]. El primer corte funcional ocurre hacia el extremo amino, dejando un fragmento de aproximadamente 120 kDa, posteriormente se corta en dos este primer fragmento, de los cuales uno corresponde a la parte intermedia de la proteína (M-FAG) y que traduccionalmente es más activo que la proteína completa el cual tiene un peso de 76 kDa. Todos estos fragmentos son muy parecidos a los generados por las proteasas virales, aunque no con las mismas funciones. Este fragmento intermedio de eIF4G1 presenta los dominios de unión a eIF4E, eIF4A y eIF3 y de manera funcional tanto M-FAG como el fragmento de 120kDa, son capaces de unir a eIF4A, eIF4E y ribosomas (Figura 8). De igual manera, caspasa 3 corta a eIF4G2 durante procesos apoptóticos [48, 63].

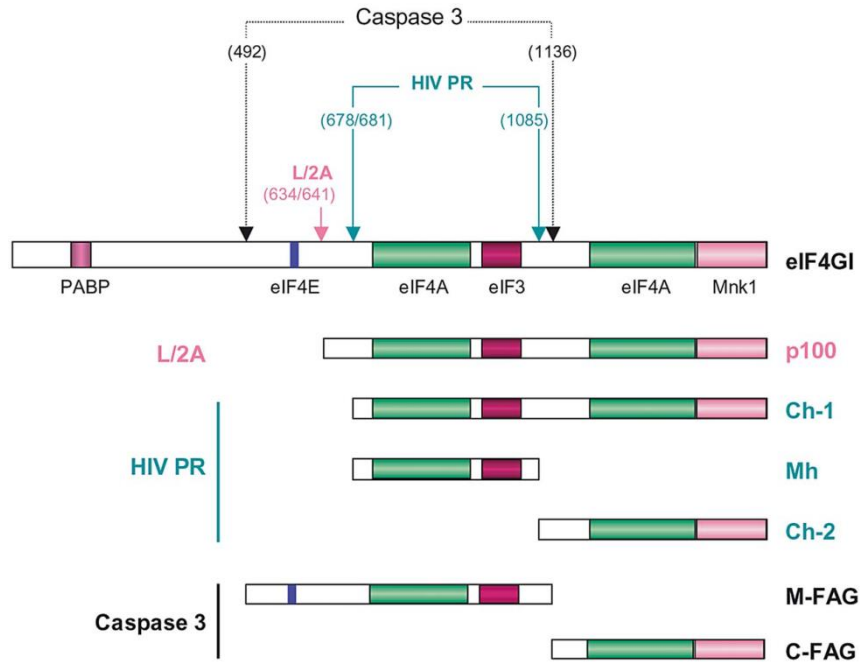


Figura 8. Comparación de los distintos fragmentos de eIF4G1 generados por el corte de proteasas de origen viral o celular. Tomado de Prévôt, D. et. al. 2003 [48].

Durante la apoptosis, este corte de eIF4G1 ocurre rápidamente y se correlaciona con una inhibición de la traducción celular, que resulta parcial ya que el completo procesamiento de eIF4G1 sólo alcanza a inhibir la traducción en un 65%, por lo que se postula que el remanente traduccional debe de corresponder a la función de uno de estos fragmentos funcionales [48, 64]. Aunque otra de las hipótesis planteadas es el remplazamiento funcional por una o varias de las proteínas pertenecientes a la familia de las 4G que durante el proceso de apoptosis, presentan una mayor expresión y funcionalidad como es DAP5, Pdcd4 o Paip1,2 [48].

#### **4.4 La regulación traduccional durante la apoptosis está asociada a las variantes de eIF4G.**

La alteración en la estricta regulación de eIF4G1 provoca un cambio en la homeostasis celular, que conlleva la alteración de algunos procesos celulares como es el crecimiento desregulado de la

célula, senescencia, incremento del tiempo de vida de la célula, procesos de autofagia, apoptosis y entre otros que incluso pueden llegar a generar cáncer [54]. Sin embargo, existen en la célula diversos mecanismos que tratan de contener con esta alteración, y uno de esos mecanismos es el remplazo funcional con alguna de las variantes de la familia 4G o la persistencia funcional por alguno de los fragmentos que se originan del corte de eIF4G1, como es MFAG [54, 63].

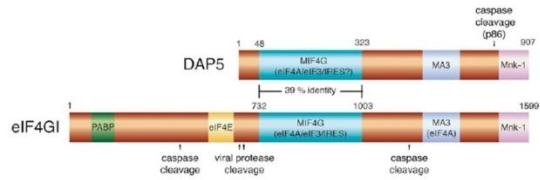
Si bien la homología e identidad de los miembros de esta familia no es tan grande, por ejemplo DAP5 sólo presenta alrededor de un 40% de identidad en el dominio MFAG de eIF4G1 y eIF4G2 [65], Paip por su parte presenta un 25% de identidad con la porción media de eIF4G2 [66], mientras que eIF4G2 tiene un 46% de homología con eIF4G1 [48], y de PCDC4 aunque no se ha descrito el grado de homología con algunas de las dos isoformas principales de eIF4G, se ha estimado que presenta una alta similitud en sus dominios correspondientes a MA3 [67]; incluso el mismo fragmento MFAG de eIF4G1 puede ser visto como una variante independiente por sus particulares funciones sobre la traducción y de hecho es con base en este fragmento donde podemos encontrar la mayor similitud entre todas las proteínas de la familia, mientras sus tamaños y estructuras pueden igualmente variar.

Lo que parece realmente importante durante la comparación funcional de estas proteínas, es la presencia de dominios que permitan reclutar lo mínimo necesario para poder iniciar la traducción. Algunas de estas proteínas son expresadas bajo contextos de estrés, mientras en otros estudios se puede apreciar que su abundancia es alta en condiciones normales. Así mismo, en ciertas circunstancias puedan traducir ARNm específicos como son los que tienen IRES, pero bajo otros contextos de estudio se puede observar la traducción de ARNm que no tienen IRES, además de que muchas de estas proteínas han sido encontradas como reguladores negativos de la traducción, ya que pueden modular la función de eIF4G1. Pero tal vez su papel más relevante se

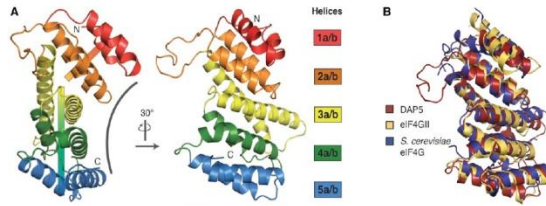


ha encontrado asociado durante los procesos de apoptosis. Podemos mencionar algunas de estas características necesarias, que comparten cada una de estas proteínas y que hacen posible la traducción bajo un contexto no canónico [54]. En la Figura 9 se muestra cada una de las proteínas pertenecientes a la familia eIF4G en comparación con la proteína prototipo eIF4G1. En donde se puede apreciar que existen variaciones en la composición de dominios entre cada proteína en comparación con eIF4G1, pero los dominios que todas las proteínas presentan son el dominio de unión a eIF3, eIF4A (el factor traduccional más abundante), los 5 dominios HEAT que son parte del segmento intermedio de eIF4G (MFAG) y los cuales están descritos como capaces de formar multicomplejos proteicos, además del dominio MA3 que se ha denominado como un segundo dominio de unión a eIF4A y que es el posible regulador traduccional, al condicionar la interacción con eIF4A [66, 67].

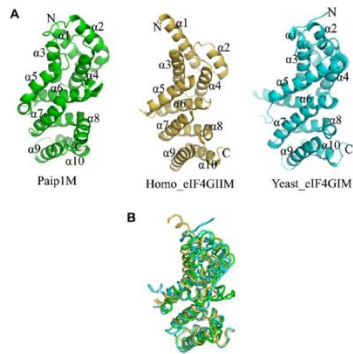
**Comparación entre los dominios de DAP5 y eIF4G1**



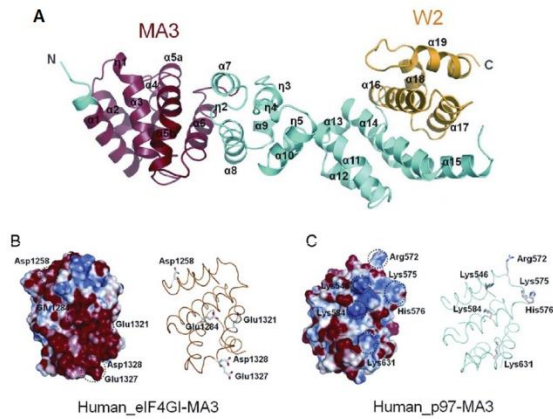
**Representación de los 5 dominios HEAT repetidos y comparación entre eIF4G2 y DAP5**



**Representación de los 5 dominios HEAT repetidos de Paip1 y eIF4G2 así como su comparación**



**Representación del dominio MA3 y W2 en DAP5 así como la comparación del dominio MA3 entre DAP5 y eIF4G1**



**Dominios en Pdcd4**



Figura 9. Comparación de los dominios HEAT y MA3 entre distintas proteínas de la familia de eIF4G. Imágenes tomadas y modificadas de Fan, M. et. al. 2010, Virgili, G. et. al. 2013, Lei, J. et. al. 2011, Lankat-Buttgereit, B. and Göke, R. 2003.

Una de las proteínas pertenecientes a la familia de 4G más estudiadas, después de eIF4G2, es DAP5 (death-associated protein 5) también conocida como p97 o NAT1, la cual a pesar de que tiene una expresión ubicua, se presenta funcionalmente activa durante los procesos apoptóticos, tiene una homología con los dos tercios del extremo carboxilo de eIF4G1, y carece del extremo amino que le impide interactuar con eIF4E y PABP, estas características fueron asociadas con una inhibición dominante negativa de la traducción bajo condiciones normales de crecimiento celular, aunque también puede funcionar como un activador traduccional bajo condiciones normales o de estrés. En condiciones apoptóticas puede sufrir un corte por caspasas, privándola del extremo carboxilo la cual puede modificar su función, aunado a que su expresión provoca la degradación de eIF4G1. Esta proteína además de presentar los dominios de unión a eIF3 y eIF4A, presenta un dominio MA3 que se caracteriza por tener dos  $\alpha$  hélices que confieren una carga negativa que permite la interacción proteína-proteína, particularmente con eIF4A, aunque en el caso de DAP5 este dominio presenta una carga positiva y por tanto previene la interacción con eIF4A, de ahí que en algunas condiciones se encuentre asociado a la inhibición traduccional. Sin embargo, el dominio de unión a eIF4A y eIF3, han permitido asociarla a una activación traduccional independiente de CAP en donde se regula la expresión de ARNm con IRES. Estas características determinan las diferencias en el acoplamiento a los complejos ribosomales en ausencia de eIF4E y PABP [47, 65, 68].

Para el caso de la proteína Paip se tiene mucho menos conocimiento acerca de sus mecanismos funcionales sobre la traducción celular, al igual que su tipo de expresión y regulación, aunque se ha observado que su expresión y función está asociada al desarrollo de diversos procesos patológicos entre los que está el desarrollo de cánceres. Hasta el momento se sabe que hay tres

isoformas de esta proteína: Paip1, Paip2A y Paip2B, implicadas tanto en la estimulación traduccional como la inhibición de la misma, siendo Paip1 la encargada de promover la traducción y las otras dos en la inhibición. Sus funciones antagónicas están determinadas por los dominios funcionales que poseen. Paip2 al igual que Paip1 presentan dos dominios de unión con PABP (dominios PAM1 y PAM2) pero Paip1 presenta un dominio adicional en comparación con Paip2 que se localiza en su porción intermedia y que corresponde a un dominio HEAT el cual le confiere un mayor tamaño y la capacidad de unirse a otros factores traduccionales. Este dominio HEAT como se mencionó anteriormente, presenta una similitud con el segmento intermedio de eIF4G ya que consiste en 10  $\alpha$ -hélices arregladas como cinco motivos HEAT antiparalelos, igual que en el caso de eIF4G. Esta característica le permite a la proteína interactuar específicamente con eIF3 y eIF4A, aunado a la interacción con PABP necesarios para estimular la traducción celular [66, 69].

Finalmente la proteína Pdc4 (Programmed cell death 4), anteriormente descrita en la familia de las 4Gs como DUG, es una proteína que ahora se sabe se encuentra desregulada durante el inicio y progreso de la apoptosis [47]. En esta proteína fue donde se describió por primera vez el dominio MA3 asociado a procesos de apoptosis. Esta proteína posee dos dominios NLS que le permiten ser relocalizada del citoplasma al núcleo, además de dos dominios MA3 los cuales presentan una alta homología con los dominios de eIF4G1 y eIF4G2 [70]. Estos dominios, que presentan dos  $\alpha$ -hélices conservadas, como ya se mencionó, permiten interactuar con eIF4A e impiden que eIF4G se una a ella. De esta forma se ha observado que Pdc4 inhibe la actividad helicasa de eIF4A lo que hace que sea propongá como un regulador negativo de la traducción, principalmente de la dependiente de CAP y por lo cual ha sido asociado como un supresor de tumores e inhibidor de carcinogénesis [47, 67].

Esta descripción estructural de las proteínas de la familia 4G, las cuales no son consideradas dentro del mecanismo canónico de traducción, nos muestran la relevancia de los dominios HEAT y MA3 para reclutar la mínima cantidad de factores traduccionales para llevar a cabo la síntesis de proteínas. En donde la interacción con eIF3 permite la asociación con los complejos ribosomales y la necesaria participación de eIF4A para poder estimular la traducción de los ARNm que pueden presentar las estructuras comunes de CAP y poliA, pero también de ARNm con IRES. Sin embargo la expresión de estas proteínas, así como la producción del fragmento MFAG de eIF4G1, se da preferencialmente durante los procesos de iniciación y desarrollo de apoptosis, donde la síntesis de proteínas se encuentra desregulada y los mecanismos por los cuales se traduce son distintos [54]. Este proceso desregulado de la síntesis de proteínas está íntimamente asociado a la actividad de caspasas. Esta actividad de caspasas provoca un corte proteolítico de factores de iniciación e inhibición de la traducción, sin embargo como parte de esta desregulación conlleva a la utilización de otras vías para remplazar estas que fueron afectadas. Uno de los aspectos relevantes para la sobrevivencia de la célula viene de la participación de los ARNm con IRES los cuales cobran gran relevancia, ya que varios de ellos son genes implicados en la proliferación (Myc, FGF2, IGF2, PDGF2) la sobrevivencia celular (cIAP1, XIAP, Bcl-2, Apaf-1) el ciclo celular (p53, p27, PITSLRE) y la angiogénesis (VEGF-A, HIF-1 $\alpha$ ) [47].

También son relevantes los mecanismos de etiquetación y degradación de proteínas por la vía del proteasoma [71]. Este mecanismo comienza al haber una alteración en la expresión y función de aquellas proteínas encargadas de mantener la proteostasis, y dado que proteínas como las chaperonas censan que existe una variación en la acumulación de proteínas implicadas en la proliferación, sobrevivencia celular, ciclo celular y angiogénesis es que se comienza a activar las vías de degradación [37]. Todos estos tipos de cambios se asocian con la regulación

postraduccional, un aspecto que se ha observado es de suma importancia durante diversos tipos de infecciones con patógenos, entre ellos los virales [71].

#### **5. La modificación postraduccional y la degradación proteica como mecanismo de regulación traduccional por infecciones virales.**

Las funciones y estructuras que adquieren ciertas proteínas son muy diversas y dependen del contexto celular, algunas de estas variaciones se encuentran determinadas por mecanismos ajenos a las que puede generar la sola expresión del genoma. Aunado a esto, estas modificaciones están sujetas a la variedad y cantidad de proteínas existentes en la célula ya que su concentración genera un impacto sobre otras. Las chaperonas y otras proteínas se encuentran implicadas en este tipo de modificaciones postraduccionales [37].

Existen muchos tipos de modificaciones como es la adición de diversos grupos químicos o moléculas simples (fosfatos, acetatos, metilos, etc.), moléculas complejas (cadenas de carbohidratos, lípidos, etc.), proteínas pequeñas (ubiquitinas, SUMO) o el rompimientos de proteínas (proteólisis), estas sirven para modificar o inhibir la función de una cierta proteína, y con esto tratar de contener la alteración a la homeostasis celular (Figura 10) [72].

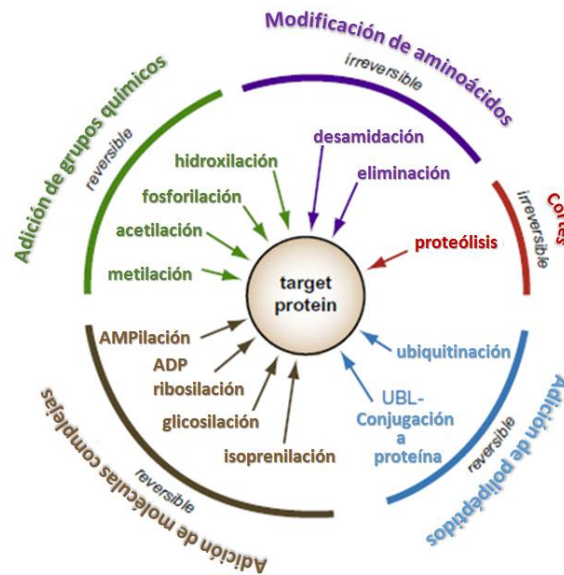


Figura 10. Diagrama representativo de las distintas categorías de modificaciones postraduccionales que tiene las proteínas. Tomado de Ribet, D. and Cossart, P., 2010 [71, 72].

Cada una de las enzimas encargadas de estas modificaciones son estrictamente reguladas, de las cuales se han reportado alrededor de 300. Algunos de los cambios que provocan son reversibles, como es la adición de moléculas pequeñas o las complejas, mientras que otros son irreversibles como la modificación de aminoácidos o la proteólisis. Las modificaciones reversibles se pueden encontrar más comúnmente, ya que su adición no necesariamente altera la proteólisis celular, un ejemplo de esto es la fosforilación o acetilación. Y aunque son modificaciones más frecuentes y dinámicas, no implican que sean más sencillas, cada una de estas tiene condiciones específicas para conjugarse a las proteínas, una de estas particularidades es la posición del residuo aminoacídico, que puede determinar si una proteína deja o no de funcionar [71, 72].

Sin embargo, debido a que la ubiquitinación es la principal modificación asociada a nuestro tema, es que ahondaremos en sus particularidades y su participación durante la proteólisis de las proteínas. La ubiquitinación es la formación de cadenas de ubiquitinas, estos pequeños péptidos de 9 kDa aproximadamente, están presentes en todos los organismos eucariontes y se unen a las

proteínas por medio de uniones covalentes. Esta modificación es reversible por enzimas denominadas DUBs (por sus siglas en inglés para Enzimas que *DesUbiquitan*). Es un proceso que requiere la participación de varias enzimas; la proteína E1 encargada de la activación de las ubiquitinas, la E2 encargada de la conjugación entre ellas y E3 es una ligasa encargada de unir las a las proteínas blanco. Puede existir distintos tipos de E3 dependiendo del tipo de dominio que se encarga de unir los péptidos (dominio HECT, Cullin-RING o U-box motivos). Sin embargo, el requerimiento de cada una de estas tres enzimas durante este proceso es distinto, ya que para el caso de la enzima E1 sólo se sintetizan unas cuantas variedades de ella, mientras que para E2 sólo existen unas cuantas docenas de proteínas, pero para el caso de E3 la célula expresa cientos de variantes con esta función [71, 73, 74].

Por otro lado, dependiendo del residuo a donde se una la molécula o el polipéptido va a depender el destino que sufra la proteína. Las monoubiquitinaciones están implicadas en el transporte y localización de proteínas, endocitosis, reparación de ADN, transducción de señales celulares o regulación de la transcripción. Las poliubiquitinaciones puede ocurrir de diversas formas, pueden ser formadas como una cadena lineal o como una ramificación, esto depende de la lisina en la cual se una la siguiente molécula de ubiquitina, presentando siete posibles lisinas para unirse. La unión de cadenas en la lisina-48 es la más comúnmente asociada a la degradación por vía del proteasoma. Mientras que las uniones en la lisina-63 participan en la transducción de señales celulares, el tráfico vesicular o la reparación del ADN [71, 74].

Esta versatilidad en la modificación de las proteínas y sus funciones por medio de la ubiquitinación ha servido como estrategia por los virus para su replicación. Una de estas formas es la afectación en la regulación de las enzimas E1, E2 o E3 de las células, o al poseer proteínas que funcionan de manera homóloga a estas. Un ejemplo de un virus que codifican proteínas homólogas a E2 están



los ASFV (Virus de la fiebre de cerdos africanos) un virus de ADN que codifica la proteína UBCv1 la cual puede transferir ubiquitinas conjugadas a histonas de los hospederos y regular tanto su propia expresión génica como distintas funciones de la célula. Para el caso de virus que codifican proteínas homologas a E3 existen muchos, entre ellos los factores tempranos E1B-55k o E4orf6 codificados por adenovirus, los cuales pueden asociarse con diversas proteínas asociadas a la función E3-ligasa que permiten reclutar a cullin1 y cullin2 para llevar a cabo la poliubiquitinación. Otro tipo de virus son los de Herpes, como el del sarcoma de Kaposi, el cual codifica a K5 y K3 que son proteínas asociadas a proteínas con dominios RING-CH y permiten la degradación de diversos componentes membranales de las células entre ellos el MHC-1 y así evadir la respuesta inmune, y como estos ejemplos hay muchos más como el virus del papiloma, virus de inmunodeficiencia humana, etc. Mientras otros virus sólo se encargan de bloquear la función de la E3 celular como es el virus vaccinia, al expresar la proteína A49 la cual se une a la E3-ligasa  $\beta$ -TrCP y bloquea la vía NF- $\kappa$ B; otro ejemplo son los rotavirus, los cuales al sintetizar a NSP1 que, al igual que vaccinia, interfiere con la función de la E3-ligasa  $\beta$ -TrCP, además de que ella misma funciona como una E3-ligasa y bloquea la vía NF- $\kappa$ B y provoca la degradación de  $\beta$ -TrCP, IRF3/5/7/9 y ayuda a evadir la respuesta inmune celular [75].

Por otro lado, el proteasoma también lleva a cabo una regulación postraduccional por proteólisis, un aspecto que comúnmente no es tomado en cuenta ya que en muchas ocasiones la función del proteasoma es asumida meramente como la degradación (total) de las proteínas, sin embargo, dentro de las múltiples formas de degradación que presenta la célula, la degradación del proteasoma es la forma más organizada y sistematizada que tiene y por lo tanto presenta una gran variedad de funciones [76].

### **5.1 La regulación proteica por el proteasoma.**

El proteasoma es un complejo de proteínas muy grande que puede ser subdividido de acuerdo al arreglo proteico que forma. Este gran complejo degrada proteínas que han sido etiquetadas con cadenas de poliubiquitinas, y este tipo de degradación está implicado en la regulación de casi todos los procesos celulares como metabolismo, ciclo celular, transducción de señales, respuesta inmune y apoptosis, denominada esta regulación Sistema de Ubiquitina Proteasoma o UPS [76].

La parte principal del proteasoma es un complejo catalítico, conocido como complejo 20S del proteasoma o como CP (por sus siglas en inglés para partícula núcleo), con un peso aproximado de 750 kDa y con una forma parecida a un barril por donde pasan los péptidos para ser degradados. Otro de los complejos es la partícula regulatoria (RP por sus siglas en inglés) también conocida como 19S que sirve como activador del proteasoma, tiene un peso aproximado de 700 kDa y donde se acoplan dos partículas de manera simétrica a un extremo del CP para formar el complejo 26S. De manera específica el RP reconoce y selecciona a los péptidos que han sido marcados con poli-Ub, posteriormente retira estas cadenas de ubiquitina para que se reciclen las moléculas, después desdobla la proteína y la transloca al interior del complejo CP. Y aunque existen otros complejos proteicos como el denominado 11S, no son totalmente entendidos aún, pero se piensa que sirven igual que 19S para regular la entrada al complejo 20S. En conjunto, la combinación de estos tres complejos puede formar seis distintos tipos de proteasoma (Figura 11) y sus funciones pueden ser igualmente variables, ya que se ha observado que la combinación de 20S y 11S reconoce proteínas no poliubiquitinadas y puede degradarlas [77, 78].

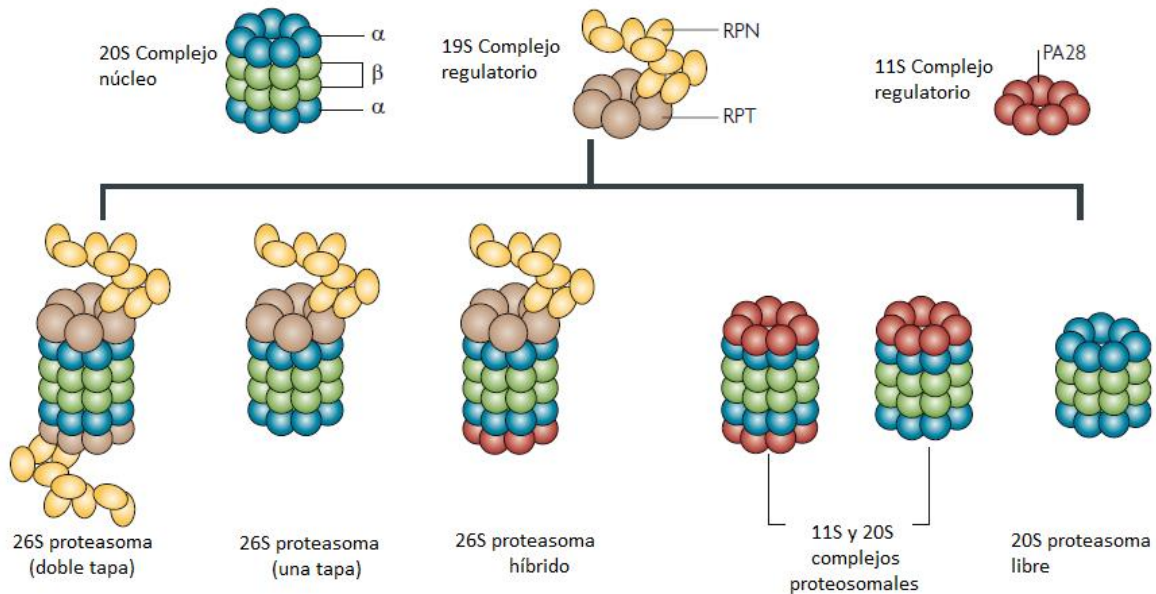


Figura 11. Comparación entre los distintos componentes proteicos que puede comprender el proteasoma. Tomado de Tai, H.C. and Schuman, E. M. 2008 [78].

Algunas de las particularidades que presenta este complejo proteasomal y que permite regular la traducción celular es la degradación de ácidos nucleicos, entre ellos ARNm, ya que algunas de las proteínas que componen al anillo  $\alpha$  del núcleo del proteasoma tienen funciones de ARNasas y con esto impedir la síntesis de algunas proteínas [73]. Aunado a este tipo de regulación traduccional, el proteasoma puede degradar ciertos componentes encargados de la regulación de la iniciación de la traducción. Por un lado, se ha descrito la degradación de tres factores de iniciación de la traducción: eIF4E, eIF3a y eIF4G. El proteasoma es capaz de degradar sólo a eIF4G del complejo eIF4F y a la subunidad eIF3a del complejo eIF3, generando productos con distintas capacidades y funciones a las descritas, pero que modifica el acoplamiento de los ARNm a los complejos ribosomales 48S y por lo tanto su traducción. Mientras que para el caso de eIF4E, al modificar su estado de ubiquitinación, provoca una inhibición en su degradación por el proteasoma, incrementando su acumulación, y esto dificulta la unión a las estructuras CAP de los ARNm,

además de que afecta su capacidad de unirse a eIF4G así como su disponibilidad para ser fosforilado. Además, existen otras proteínas que al ser degradadas por el proteasoma, alteran la regulación traduccional como es el caso de 4E-BP y Paip2 [73].

También se ha documentado que la inhibición del proteasoma provoca la formación de Gránulos de Estrés (SG por sus siglas en inglés) que se caracterizan por contener multicomplejos de ARNm que no se tradujeron y proteínas o agregados proteicos, entre los que pueden estar factores de iniciación de la traducción (eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF3, eIF2 y PABP) o componentes ribosomales como la subunidad 40S [73].

Aunado a esto, se ha observado que existe una demanda muy grande de reservas libres de moléculas de ubiquitina y durante condiciones de estrés son rápidamente disminuidas, mostrando que estas reservas de Ub son limitadas y condicionadas a las necesidades celulares. Por otro lado, durante la traducción celular, existe ubiquitinación de las proteínas recién sintetizadas, lo que provoca que aproximadamente del 5% al 30% del total de las proteínas sean degradadas sin siquiera haber alcanzado su estado maduro, un fenómeno denominado ubiquitinación co-traduccional. Reflejando que la ubiquitinación es constante y determinante para la proteostasis celular [79].

El ensamblaje del proteasoma así como su óptima función se logra con la participación de chaperonas. Por un lado, se han reportado nueve chaperonas determinadas como PACs (por sus siglas en inglés para Chaperonas de Ensamble al Proteasoma) que permiten su acoplamiento y que se describe son estrictas para la asistencia del proteasoma [76], sin embargo muchas otras chaperonas (que normalmente asisten el plegamiento de las proteínas), ayudan a la degradación por el proteasoma, siendo HSP70 y HSP90 las normalmente asociadas al proceso [40].

Como anteriormente se mencionó, ambas chaperonas presentan una co-chaperona estricta que sirve como ligasa E3 de ubiquitina, y que permite prescindir del sistema común de ubiquitinación y canalizar bajo sus condiciones a las proteínas con las que interacciona a degradación. Aunado a esto, HSP90 presenta una función importante en la regulación funcional y estabilidad de las ligasas E3, ya que son clientes específicos de esta chaperona [36]. Por otro lado, la asociación con el proteasoma puede ocurrir con determinados complejos, por ejemplo se ha observado a HSP90 asociada al complejo 11S proteosomal, y si bien no se ha entendido a detalle las funciones del complejo 11S, esta asociación no se ha observado con el 20S, aunque se ha visto que la unión entre 11S y HSP90 ha correlacionado con la degradación de agregados proteicos que se encuentran causando un estrés en la célula. A su vez, algunas de las subunidades del complejo 11S pueden asistir el re-plegamiento de proteínas clientes de HSP70 y HSP90. Por lo que se sugiere que 11S (y posiblemente 20S) puede servir como vínculo entre el proteasoma y las chaperonas en la resolución y/o degradación de agregados proteicos [78].

### **5.2 Regulación postraducciona por el sistema UPS durante la infección por rotavirus.**

Durante infecciones virales, el proteasoma no sólo puede estar regulando la cantidad y acumulación de las proteínas virales, las cuales son un aspecto muy importante para poder llevar a cabo su replicación óptimamente; también se puede estar regulando la expresión del ARN viral a través de fragmentar los genomas virales. Un ejemplo de esto es el caso del virus del mosaico del tabaco (TMV) en donde su genoma es fragmentado; o el caso de VIH donde una parte de las estructuras en su ARNm (TAR) es degradado en dos fragmentos [73].

Por otro lado, la poliubiquitinación asociada a la degradación vía proteasoma es un tema de gran relevancia en el caso de la infección por rotavirus. La simple inhibición del proteasoma con el fármaco MG132 es capaz de reducir la replicación y progenie viral de rotavirus. Esta determinación

surge de un estudio donde se encontró que rotavirus canaliza a degradación por el proteasoma diversas proteínas reguladoras de la vía NF- $\kappa$ B, un mecanismo necesario para su óptima replicación. Sin embargo, al abordar la función del proteasoma sobre la traducción viral y celular durante la infección, se observó que su inhibición afecta la síntesis de proteínas tanto celulares como virales, hecho que puede revertirse al agregar aminoácidos para el caso de las proteínas celulares, pero no así para restaurar la replicación viral. Esto se pudo vincular con el hecho de que durante la inhibición del proteasoma, se afecta la transcripción de los genes de rotavirus. Además de esto, una de las observaciones más interesantes durante estos estudios fue la importancia de la poliubiquitinación para la replicación viral además del efecto que tiene el inhibir proteasoma sobre este mismo aspecto. Ya que al inhibir al proteasoma hay una disminución en la cantidad libre de ubiquitina, esto se asoció a que el proteasoma no se encontraba reciclando estas moléculas durante su proceso de degradación. Sin embargo, al añadir por transfección moléculas de ubiquitina, no se restaura la cantidad de ubiquitinas libres, ni se restablece la capacidad replicativa del virus. Es así que se llega a la conclusión de que la poliubiquitinación en las proteínas de rotavirus juega un rol importante durante la replicación viral [80].

Existe una variación temporal de la concentración de proteínas de rotavirus conforme avanza la infección por rotavirus, y si bien hay una diferencia en la vida media de estas proteínas, el tiempo con el que decaen no correlaciona con los tiempos en los cuales varía esta concentración de cada proteína (Tabla 1). Un ejemplo de esto es NSP1, la cual se describe como una de las proteínas menos abundantes, muchas veces indetectables por algunas metodologías, y además con una elevada susceptibilidad a degradación por el proteasoma, la cual se estima que ocurre casi inmediatamente a la terminación de la síntesis de esta proteína. Sin embargo, esta susceptibilidad puede modificarse dependiendo de la interacción que tenga con proteínas virales, celulares o con

el ARNm de rotavirus, ya que estas interacciones pueden estabilizar a NSP1 y aumentar su abundancia en la célula al evadir su degradación por el proteasoma. Esta proteína viral que tiene características de E3 ligasa de ubiquitina, puede ser un reflejo de la importancia que juega el proteasoma para la regulación óptima de los componentes virales así como el desarrollo y progreso de la replicación viral de rotavirus [81].

Proteins	3 h	6 h	9 h	12 h	15 h
VP1	7.2	4.0	3.7	2.8	3.8
VP2	11.1	10.4	9.6	7.5	8.0
VP3-4	25.8	11.5	10.3	8.0	9.5
NSP1	ND	ND	ND	<0.1	<0.1
VP6	22.2	30.7	32.8	35.6	33.3
VP7	ND	10.7	10.2	9.1	6.5
NSP2	11.1	7.6	7.3	6.5	7.7
NSP3	20.6	4.4	5.3	7.0	7.7
NSP4-5	3.0	20.7	20.8	23.4	23.4
Viral	21.2	74.6	78.9	84.3	85.1
Cellular	78.8	25.4	21.1	15.7	14.9

Tabla 1. Porcentaje de síntesis de proteínas virales y celulares a diferentes tiempos post-infección. La síntesis de proteínas virales y celulares en células BSC1 infectadas con el virus RRV, basado en análisis densitométricos de los resultados provenientes del estudio de Piña-Vázquez, C. et. al. 2007 [81].

## 6. Antecedentes específicos

En un estudio previo al presentado en esta tesis, nos propusimos encontrar condiciones en las cuales la proteína NSP3 expresada a través del sistema inducible del virus vaccinia permitiera establecer la inhibición máxima de la traducción celular. Así iniciamos el estudio de la cinética de inhibición de la traducción por NSP3 induciendo con 2 mM de IPTG en donde durante las primeras horas de expresión de la proteína viral no se inhibió la traducción sino a partir de la 8va hora de inducción de NSP3, hasta alcanzar un máximo de inhibición del 70% del total de la traducción

celular aproximadamente a las 20 h de infección viral. Mientras que la acumulación de NSP3 se observaba con una dinámica exponencial sigmoideal y alcanzando un valor máximo de 4 millones de moléculas por célula. Por otro lado, se pudo establecer una variación de la metodología de Western blot, llamada Western Blot No Disociativo (WBND) que permitió analizar la presencia de formas diméricas, o multímeros de mayor peso molecular, con el fin de asociar la forma oligomérica con el grado de inhibición de la traducción celular. A partir de esto se pudo determinar que las formas diméricas aparecen a partir de la octava hora de haber inducido la expresión de NSP3, asociados al proceso de maduración de la proteína. Al utilizar concentraciones 10 a 100 veces menores a 2 mM del inductor (IPTG), se observó que la acumulación de NSP3 se ve disminuida considerablemente (hasta 8 veces) sobre todo si la inducción es interrumpida y se deja así por largos tiempos (0-12 h en ausencia del inductor). Estos resultados por un lado permitieron proponer que existe una relación entre la cantidad de moléculas de NSP3 (en especial de aquellas que están en forma de dímero) y el grado de inhibición de la traducción celular, además de plantear que NSP3 presenta un retraso funcional hasta alcanzar el estado dimérico. También, se obtuvo un valor preliminar de la concentración máxima cuantificable de NSP3 que es capaz de provocar el máximo nivel inhibitorio de la traducción, el cual fue de 4 millones de moléculas, mientras que para el caso de eIF4G1 se ha estimado en otro estudio que su concentración es de 2 millones de moléculas por célula y con base en estos dos datos sugerimos una relación estequiométrica entre el factor traduccional eIF4G1 y NSP3 de 1:2, y dada esta relación molar es que se puede llevar a cabo la inhibición traduccional. Finalmente, al observarse que existía una dinámica de degradación de NSP3 muy importante y que si bien no se abordaron las condiciones óptimas para analizar la relación con el proteasoma, las distintas variables de inducción y lapsos en ausencia del inductor permitieron proponer que las concentraciones observadas sólo pueden



explicarse a través de la degradación por el proteasoma, las cuales son determinantes para poder establecer un efecto inhibitorio de la traducción [82].

Aunado a esto, en un estudio reciente realizado por nuestro grupo de trabajo, se propuso un modelo hipotético en el cual NSP3 inhibe la traducción celular al secuestrar a eF4G1 con ayuda de la chaperona HSP90. Para llegar a este planteamiento nos servimos de distintas proteínas mutantes de NSP3 y un inhibidor del proteasoma, que permitieron delimitar con mayor precisión los efectos de NSP3 sobre la traducción celular. Uno de los aspectos obtenidos y de relevancia para este trabajo fue que al analizar a NSP3 por medio del Western Blot No Disociativo, la proteína bajo condiciones no reductoras pudo ser identificada en su forma de intermediario de dimerización y evidenciando que presenta características distintas al monómero y al dímero de NSP3. Esta aseveración se pudo sustentar al mostrar que la banda obtenida por el WBND que aparentemente se observa como un monómero de NSP3 con un peso de 36 kDa, en realidad representa mayoritariamente al intermediario de dimerización, pues bajo el análisis de vida media de la banda observada, esta permanece por más tiempo que el dímero que presenta una mayor estabilidad que el monómero, siendo la vida media del dímero de 60 min. mientras que para la banda que se observa como monómero, su vida media fue de 134 min. Aunado a este dato, se observó que dentro de las tres aparentes formas de NSP3 (monómero, dímero e intermediario de dimerización) el intermediario es la forma más estable ya que de las tres formas presenta la menor susceptibilidad a ser degradada por el proteasoma [10]. Con esta información hemos podido empezar a dilucidar que NSP3 presenta características aun indeterminadas que le permiten establecer su efecto inhibitorio de la traducción.

## **HIPÓTESIS**

El proceso de dimerización de NSP3 produce complejos tripartitos NSP3-HSP90-eIF4G1 que secuestran a eIF4G e inhiben la traducción celular.

## **OBJETIVO**

Estudiar el proceso de dimerización de NSP3 con relación a su efecto inhibitorio sobre la traducción celular, tratando de identificar complejos con HSP90 y eIF4G1 y su importancia durante la inhibición de la traducción celular.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar la cinética de inhibición de la traducción celular por NSP3.
2. Determinar la cinética de síntesis de NSP3.
3. Determinar la cinética de acumulación de NSP3.
4. Determinar la cinética de aparición de dímeros y monómeros de NSP3.
5. Determinar el efecto de inhibir a HSP90 sobre la(s) función(es) de NSP3.
6. Determinar la formación de complejos entre NSP3, HSP90 y eIF4G1 por co-inmunoprecipitación.
7. Determinar la importancia del sistema UPS sobre las funciones de NSP3.

## **METAS**

- 1 Determinar la importancia de la presencia de dímeros de NSP3 para poder inhibir la traducción celular, al realizar análisis de WBND.

- 2 Determinar la importancia de la proteína HSP90 en la dimerización de NSP3 al inhibirla con el compuesto 17DMAG en distintas condiciones de expresión de vNSP3 y analizando el efecto sobre la función inhibitoria de la traducción por medio de marcaje metabólico de proteínas; y la presencia de formas diméricas por WBND.
- 3 Identificar la formación de complejos multiproteicos entre NSP3, HSP90 y eIF4G1 por medio de inmunoprecipitaciones y Western blot.
- 4 Abordar la determinación de la degradación de NSP3 al analizar formas poliubiquitinadas de NSP3 por medio de inmunoprecipitaciones y Western blot, así como el análisis de la degradación por el proteasoma al inhibirlo con el reactivo MG132 y detección por Western blot.

## **METODOLOGÍA**

### **Células.**

Se utilizaron las líneas celulares de BSC1 correspondientes a células de riñón de mono verde (*Cercopithecus aethiops*) donadas por el Dr. R. Rosales y la línea celular Hela derivadas de cáncer de cérvix humano donadas por el Dr. A. González, ambos de la Universidad Nacional Autónoma de México. Ambas líneas se mantuvieron en Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM, Corning) adicionado con 7% de suero fetal de bovino (MEM-7) y 100 UI de penicilina, estreptomycin. Los cultivos para análisis en presencia de aminoácidos radioactivos se realizaron con el medio Medio Mínimo Esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que carecen de los aminoácidos L-metionina y L-cisteina (DMEM Cis- Met-, Corning).

### **Anticuerpos y reactivos.**

Se utilizaron los siguientes anticuerpos comerciales: anticuerpo anti-HSP90 monoclonal producido en ratón (BD Biosciences, Cat.610419), anti-  $\beta$ -Actin monoclonal producido en ratón (GeneTex, Cat.GTX26276), anti-GAPDH monoclonal producido en ratón (Millipore, Cat. MAB374), anti-eIF4G1 monoclonal producido en conejo (Cell Signaling, Cat.2498), anti-conejo IgG-HRP producido en cabra (Santa Cruz Biotechnology, Cat.SC-2030), anti-ratón IgG HRP producido en cabra (Santa Cruz Biotechnology, Cat.SC-2005), anti-rata IgG HRP producido en pollo (Santa Cruz Biotechnology, Cat.SC-2956), anti-Ub IgG HRP producido en ratón (Santa Cruz Biotechnology, Cat.SC-8017). Se usaron los siguientes reactivos: Isoropil- $\beta$ -D-tiogalactósido (IPTG) (Research Organics, Cat.70571), el colorante de geles Sypro Red (Thermo Fisher Scientific, Cat. S6663), el inhibidor de HSP90 17-Dimetilaminoetilamino-17-demetoxigeldanamicina (17DMAG) (Santa Cruz Biotechnology, Cat. SC-202005), el inhibidor del proteasoma MG132 (Sigma-Aldrich, Cat. C2211), y el marcador metabólico de proteínas EasyTag Express protein labeling Mix [35S] (PerkinElmer, Cat.NEG772). También se usó el estuche de inmunoprecipitación Pierce Cosslink Immunoprecipitation Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat. 26147). El suero hiperinmune de rata anti-NSP3 fue producido en nuestro laboratorio.

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

La secuencia correspondiente a NSP3 de la cepa RRV de rotavirus, fue clonada en el plásmido VOTE.1 (Vaccinia virus, Operon lac, T7 RNA polymerase, Encephalomyelitis virus IRES) proporcionado por B. Moss (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EEUU) [83]. El plásmido resultante fue insertado en el genoma de la cepa parental del virus vaccinia vT7lacOI para producir el virus vaccinia recombinante que expresa el gen siete de RRV, denominado vNSP3, descrito anteriormente [22]. La expresión de la proteína recombinante es inducible con IPTG en células de mamífero. Este gen de NSP3 posee una secuencia IRES perteneciente al virus de la

encefalomiocarditis la cual permite que el gen de nuestro interés sea traducido preferencialmente. Además de esto, los ARNm del virus vaccinia poseen estructuras CAP y colas de poli-A, de la misma forma que los ARNm celulares, por lo que la traducción del virus es igualmente inhibida por la expresión de NSP3.

#### **Análisis del nivel de expresión de NSP3 y su efecto inhibitorio sobre la traducción.**

Se sembraron en placas de 6 pozos  $5 \times 10^5$  células BSC1/pozo con medio MEM-7, se incubaron 24 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> hasta que llegaron a confluencia ( $9.5 \times 10^5$  cels).

Pasadas las 24 h se activó el virus vNSP3, y la cepa parental vT7lacOI como control, para lograr una MOI de 10. El virus se incubó 30 min a 37°C en presencia de tripsina, posteriormente se sonicó en copa durante 20 s/3 veces a una amplitud (%) de 60. Una vez preparado el inóculo, se retiró el medio de las células y se añadió a cada pozo 400 µL de MEM-2.5 (MEM conteniendo 2.5% de SFB) más 100 µL del virus activado permitiéndose la adsorción durante 1 h y mezclando cada 10 min. Luego, durante la segunda hora se añadió 500 µL de MEM-2.5 por pozo y se dejó incubando a 37°C. Pasada la segunda hora se retiró el medio con el virus se añadió 1.5 mL de MEM-2.5 y se incubó a 37 ° C.

Posteriormente a las células BSC1 infectadas con vNSP3 se les añadió IPTG 2 mM y se incubó a 37°C durante distintos intervalos de inducción (0.5-20 h) hasta antes de la cosecha. Para realizar el marcaje metabólico de proteínas, se sometió a las células a ayuno lavando dos veces con 1 ml de DMEM Met- Cis- y se añadió 300 µL de DMEM Met- Cis- por 20 min a 37°C. Posteriormente las células que se marcaron radioactivamente añadiendo 20 µCi de [<sup>35</sup>S]Met y [<sup>35</sup>S]Cis por pozo durante una hora, mezclado cada 10 min. Al concluir el marcaje metabólico se cosecharon las células a 4°C, retirando el medio y añadiendo 1 mL de PBS frío, se desprendieron las células con gendarme. Se centrifugaron las células en frío a 14000 rpm, y se almacenaron a -20°C.

Se tomaron  $4.75 \times 10^5$  cels. se lisaron con 20  $\mu$ l de amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 5 mM  $MgCl_2$ , 0.4 U/mL DNasa I, 0.01 mg/mL RNasa A y 5.38  $\mu$ L de inhibidor de proteasas Complete<sup>®</sup>), mezclando para solubilizar la pastilla de células. Posteriormente se sonicaron en copa durante 20 s/3 veces. Se añadió a cada uno amortiguador de carga Laemmli 1:1 y se hirvieron por 5 min en baño María. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE en gel al 12% de poliacrilamida, a 9 mA.

Los geles se secaron y se revelaron en el escaneador para detectar radioisótopos phosphorimager Molecular Imager FX System (Bio Rad) y Typhoon-FLA9500 (Amersham Biosciences). Las imágenes obtenidas se analizaron por densitometría con el programa ImageJ y se determinó el nivel de inhibición a causa de la infección por vNSP3, tomando como control el valor densitométrico obtenido por células infectadas sólo con el vector vaccinia vT7.

#### **Análisis de la acumulación de NSP3, HSP90 y eIF4G1.**

Se procesaron  $1.18$  o  $2.36 \times 10^5$  cels infectadas con vNSP3 para el análisis por Western blot. Las células se lisaron y se corrieron por SDS-PAGE de la misma manera que en el caso del marcaje metabólico.

Los geles se transfirieron a membranas de polivinildenedifloride (PVDF) (BioRad) durante 45 minutos a 150 mA en una cámara de electrotransferencia semiseca (Hoeffer). Posteriormente se bloquearon las membranas con 5% de leche baja en grasa en amortiguador TTBS (Tris-HCl 1 M pH 7.5 [20mM], NaCl [0.5M] KCl [0.0015M], Tween-20 0.5%) por 4 h o durante toda la noche. Una vez bloqueadas se incubaron con el anticuerpo primario de rata anti-NSP3 a una dilución 1:20,000 en TTBS durante 2 h o toda la noche. Se lavaron 3 veces con TTBS y se incubaron con el anticuerpo

secundario anti-IgG de rata 1:20,000 en TTBS durante 1 h. Las membranas se revelaron en placas radiográficas para quimioluminiscencia (Kodak Film: KDK X-OMAT LS FLM 13 x 18).

De forma paralela al análisis de NSP3 por Western blot, se analizó la acumulación de eIF4G1 (dilución 1:8000) y HSP90 (dilución 1:8000). Para el caso de eIF4G1 se utilizó el anticuerpo que reconoce los residuos alrededor de la Alanina-881 el cual es capaz de identificar con gran especificidad a la proteína completa como a los subproductos de esta.

Para el análisis de control de carga que fue realizado en algunos casos se procesó para detección simultánea de  $\beta$ -Actina (dilución 1:15000) con la de las proteínas de interés antes mencionadas. Alternativamente se realizó el tratamiento de “stripping” de las membranas para la remoción de los anticuerpos utilizados en un principio y posteriormente analizar la presencia de la proteína GAPDH (dilución 1:15000). También fue utilizada la tinción con Sypro Red de los geles ya transferidos y determinación de la cantidad total de proteínas por carril muestreado.

Las radiografías obtenidas por el Western blot fueron fotografiadas con un fotodocumentador Kodak Bio Imagin System DNR Mini Bis Pro y analizadas por densitometría con el programa ImageJ.

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

Para el análisis de los dímeros de NSP3 se tomo en cuenta las metodologías descritas en la literatura [30, 84] y realizando algunas modificaciones a estas. Las células infectadas con vNSP3 en presencia de IPTG fueron lisadas y puestas en una variación del amortiguador de carga Laemmli el cual contiene bajas concentraciones de SDS (0.5%) y en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol. Estas muestras se incubaron por 30 min a 4 ° C y fueron analizadas por

SSD-PAGE a 4 °C. Posteriormente se realizaron de manera rutinaria los análisis de Western blot.

#### **Inhibición de la chaperona HSP90.**

Con base en los resultados preliminares donde se establece la máxima inhibición de la traducción celular y la máxima acumulación de dímeros de NSP3 se eligió el tiempo de 16 h de inducción de NSP3 para explorar los efectos de inhibir a HSP90 con el reactivo 17DMAG variando la concentración del IPTG (0, 12.5 y 50  $\mu$ M) que tienen un efecto de baja expresión de NSP3 aunado a dos dosis de 17DMAG (alta dosis de 10  $\mu$ M y baja dosis de 0.5  $\mu$ M). Para este enfoque se administró justo después de terminada la infección con vNSP3 la dosis correspondiente de 17DMAG y dos horas después de añadió el IPTG, hasta acumular 16 h de inducción de NSP3 y 18 h de inhibición de HSP90. Terminadas las exposiciones se cosecharon las células y se analizaron por las metodologías antes descritas.

#### **Determinación de la formación de complejos tripartitos por inmunoprecipitación.**

Se infectaron células Hela con el virus vNSP3 siguiendo el mismo esquema de infección descrito anteriormente. Se indujo la expresión de NSP3 por 16 h con una concentración de 50  $\mu$ M de IPTG. En los casos donde se quería determinar los procesos de formación de complejos al inhibirse a la chaperona HSP90, se añadió a las células el 17DMAG a una concentración de 0.5  $\mu$ M. Posteriormente se lisaron las células y se utilizó un pozo completo perteneciente a una caja de 6 pozos (aprox.  $9.5 \times 10^5$  cels) para el desarrollo de la inmunoprecipitación con Pierce Crosslink Immunoprecipitation Kit (Thermo Fisher Scientific) siguiendo el procedimiento descrito en el manual del estuche. Se realizó la inmunoprecipitación de NSP3, eIF4G1 y HSP90 utilizando los mismos anticuerpos que para la detección por WB. Una vez obtenidas las muestras



inmunoprecipitadas se realizó el ensayo de WB, utilizando como control de muestras sin tratarse para la inmunoprecipitación (llamadas células totales) un cuarto de pozo correspondiente a aproximadamente  $2.5 \times 10^5$  cels para cada caso muestreado y en el caso de las muestras inmunoprecipitadas el soluto total obtenido del procedimiento. Las muestras fueron reveladas como se describió anteriormente para NSP3, eIF4G1 y HSP90.

### **Análisis de la degradación de NSP3.**

Los ensayos de detección de NSP3 poli-ubiquitina se realizaron de la misma forma que los ensayos de inmunoprecipitación para NSP3 antes descritos. Una vez realizado el ensayo de inmunoprecipitación con el kit Pierce Crosslink Immunoprecipitation (Thermo Fisher Scientific) se realizó la detección por WB de la proteína con el anticuerpo anti-Ub tanto de los controles de células totales como de las muestras inmunoprecipitadas. Por otro lado, el uso del inhibidor del proteasoma (MG132) fue utilizando a una concentración de (5  $\mu$ M) por un periodo largo de exposición de 18 h. Mientras que en el caso del uso conjunto del MG132 con el 17DMAG (10  $\mu$ M), los compuestos se pusieron al mismo tiempo, y 2 h después se indujo la expresión de NSP3 con 100  $\mu$ M de IPTG y detección por WB.

### **Análisis estadístico.**

Los datos aquí mostrados son expresados como el promedio  $\pm$  desviación estándar correspondientes a tres experimentos independientes (n=3). En los experimentos correspondientes al uso del inhibidor 17DMAG se realizó un análisis por ANOVA de una vía o ANOVA de dos vías en conjunto con un análisis de Tukey, con un CI de 95% de diferencia. Todos los resultados que fueron significativos ( $p < 0.05$ ) fueron marcados con un asterisco (\*).

## RESULTADOS

**NSP3 inhibe la traducción celular de forma gradual mientras que su acumulación y degradación se da rápidamente.**

Nuestro primer objetivo fue determinar cinética con la que NSP3 inhibe la traducción celular en células BSC1 de riñón de mono, las cuales se infectaron con el virus recombinante vNSP3 y se indujo su expresión con isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración máxima (2 mM). Con estas condiciones de expresión, se indujo la síntesis de NSP3 durante distintos intervalos de tiempo que iban de 0.5 a 20 h previos al marcaje metabólico de proteínas con [ $^{35}$ S] L-Met y [ $^{35}$ S] L-Cys durante 1 h, así como para el análisis de acumulación de NSP3 por Western blot. La síntesis de NSP3 determinada por marcaje metabólico de pulso ocurre exponencialmente durante las primeras horas, llegando a su máximo nivel a las 8 h de inducción y se reduce poco del nivel máximo en las horas posteriores (Figura 12 A y D). En el caso de la traducción celular determinada por densitometría del carril completo para cada condición, se observó una inhibición lineal gradual desde los tiempos cortos de inducción y llega a su máximo nivel a partir de las 16 h, siendo esta inhibición de aproximadamente el 70% del total de la traducción celular (Figura 12 A y D). Por otro lado, al analizarse por Western blot, pudimos ver que a partir de tiempos tempranos de inducción se detecta a NSP3 y es hasta las 8 h de inducción en donde encontramos el máximo nivel acumulativo, el cual se mantiene durante las horas posteriores sin variar notablemente (Figura 12 B y E). Sin embargo al analizar cada una de las cinéticas obtenidas (tanto de la síntesis como de la acumulación) por un lado podemos mencionar que no existe una correlación cinética entre la forma en que se sintetiza/acumula NSP3 y la forma en que se inhibe la traducción; y por otra parte se pudo deducir que existe degradación de NSP3 debido a que la síntesis de NSP3

disminuye mínimamente a partir de su máximo nivel (Figura 10 D), pero la acumulación de la proteína se estabiliza (Figura 12 E).

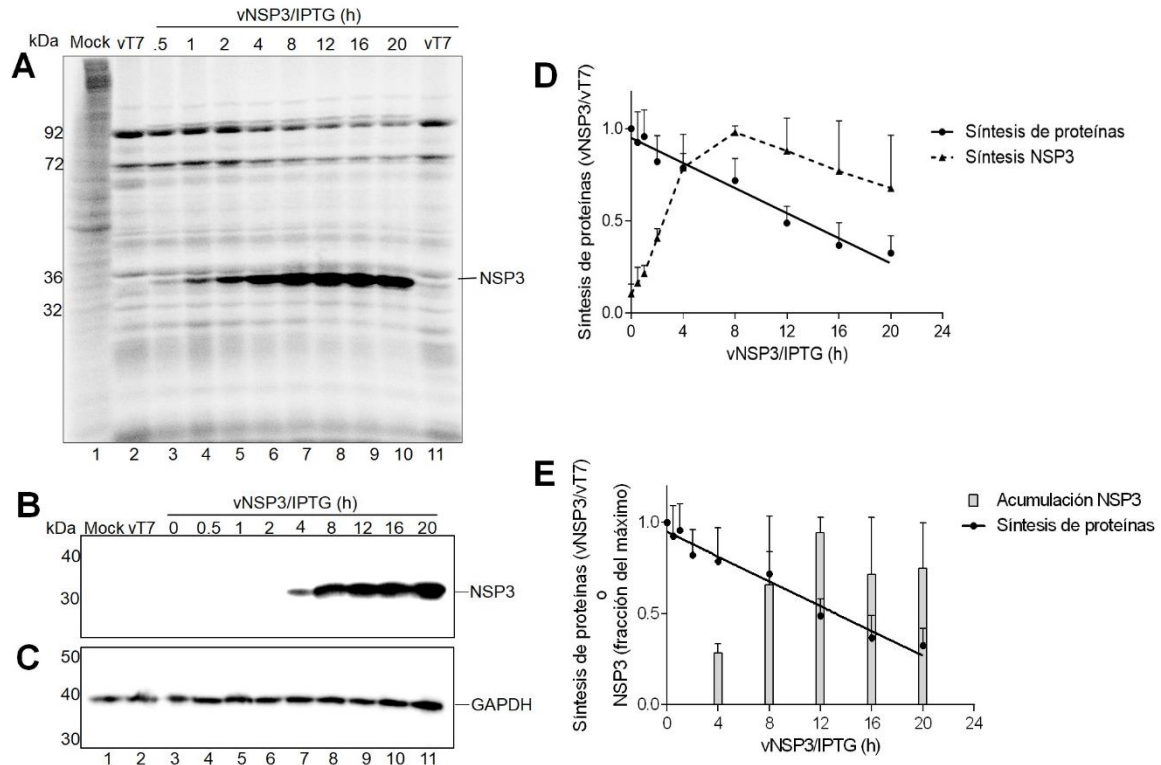


Figura 12. Cinética de acumulación de NSP3 e inhibición de la traducción celular. A) Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y autoradiografía de células BSC1 simulando infección (mock), infectadas con vT7lacOI (vT7) o con vNSP3 e inducidas con IPTG 2 M durante 0.5-20 h previas al marcaje con  $[^{35}\text{S}]$  L-Met y  $[^{35}\text{S}]$  L-Cys. B y C) Western blot de células procesadas como en A, pero omitiendo marcaje metabólico y procesando por Western blot con anti-NSP3 (B) o anti-GAPDH (C). D) Gráfica que muestra la inhibición de la traducción celular, y la síntesis de NSP3, basada en densitometría de tres experimentos como el mostrado en A. E) Gráfica del nivel de acumulación de NSP3 basada en densitometría de tres experimentos como el mostrado en B, mostrando también la inhibición de la traducción como en la gráfica D. Las barras indican desviación estándar.

### La aparición y acumulación de dímeros de NSP3 no explica la dinámica de inhibición de la traducción celular.

Nuestro segundo acercamiento fue determinar la relevancia de la forma dimérica de NSP3 en la inhibición de la traducción celular. Para este fin utilizamos Western blot no disociativo (WBND),

una técnica que permite detectar dímeros de NSP3, gracias que son resistentes a tratamiento con concentraciones bajas del detergente SDS, y además detecta intermediarios de dimerización de esta proteína (complejos de HSP90 dimérica y dos monómeros de NSP3) gracias a que, a pesar de migrar como monómeros, prácticamente se encuentran libres de monómeros *bona fide* por ser altamente inestables y prácticamente indetectables [10]. Se infectaron células BSC1 con vNSP3 o vT7lacOI como control y se indujeron con IPTG entre 0.5-20 h previas a procesamiento por WBND con anti-NSP3 o con anti-GAPDH. La forma dimérica aparece a partir de la 4ta hora de inducción y alcanza su máximo nivel de acumulación a partir de las 16 h de inducción (Figura 13 A y C). Por su parte, la forma intermediario de dimerización presenta cierto retraso en su acumulación en relación al dímero a la 4ta hora y parece alcanzar su nivel máximo a las 8 h y luego mantenerse estable (Figura 13 A y C).

Sin embargo la acumulación de dímeros o de intermediarios de dimerización presentan una inflexión a las 8 h por lo que no correlacionan bien con la cinética de inhibición de la traducción que no presenta inflexión (Figura 13C). Sin embargo si sumamos los valores del dímero con los del intermediario de dimerización existe una mejor correlación, la sumatoria correlaciona mejor con la cinética de inhibición de la traducción, lo que consideramos como una hipótesis de trabajo.

Aunado a esto se pudo observar que existe otra variedad de la proteína que puede ser observable por esta metodología, y esa es la presencia de formas de mayor peso molecular a la del dímero que se observan como un barrido de bandas, las cuales posiblemente pueden corresponder a formas poliubiquitinadas del dímero de NSP3 lo cual nos indicaría la posible degradación de la proteína por el proteasoma. Esta variedad de NSP3 se acumula mayoritariamente en los tiempos más largos de inducción de la proteína (Figura 13 A).

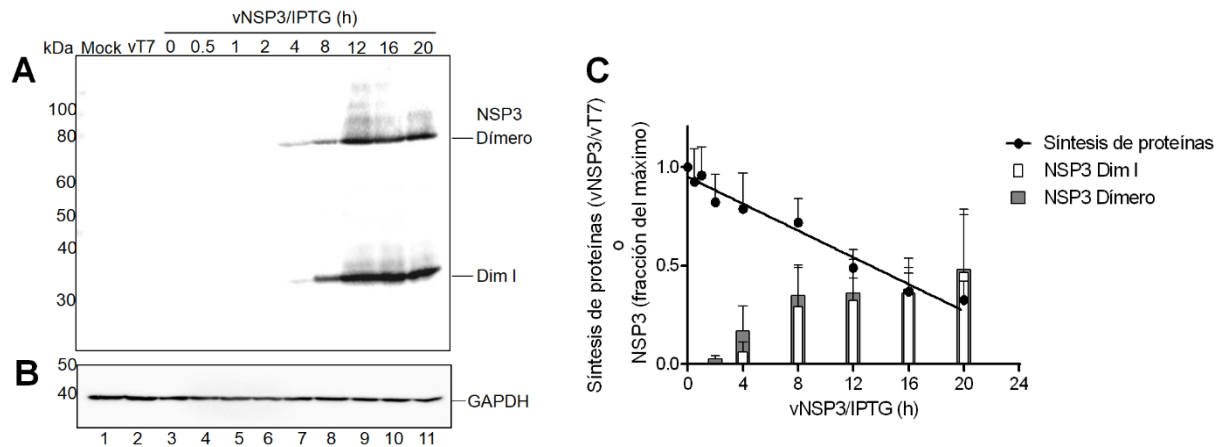


Figura 13. Cinética de acumulación de dímeros y Dim I de NSP3. A y B) Western blot no disociativo de células BSC1 simulando infección (mock), infectadas con vT7lacOI (vT7) o con vNSP3 e inducidas con IPTG 2 M durante 0.5-20 h, en las mismas condiciones que se describen en la Figura 10A, y procesando con anti-NSP3 (A) o GAPDH (B). Se indica la ubicación esperada de dímeros (72 kDa) e intermedio de dimerización -Dim I- (36 kDa). B) Gráfica que muestra la inhibición de la traducción celular de la imagen 10 A y el nivel de acumulación de dímeros y monómeros de NSP3, en base a tres experimentos como el mostrado en A. Las barras indican desviación estándar.

**La inhibición de HSP90 provoca la disminución de dímeros pero no de intermediarios de dimerización de NSP3 y no altera el efecto inhibitorio de la traducción.**

Con el fin de abatir la formación de dímeros de NSP3, nuestro siguiente enfoque fue inhibir a la chaperona HSP90 con el reactivo 17DMAG el cual se une al sitio activo de unión a ATP de HSP90 y consecuentemente esperábamos revertir la inhibición de la traducción proporcionalmente al abatimiento de los dímeros de NSP3 que se acumularan en esta condición [30]. Lo que obtuvimos fue que en presencia del 17DMAG, disminuye la acumulación de dímeros de NSP3 significativamente, mientras que en el caso de intermediarios de dimerización no hubo variación significativa (Figura 14 B y E). Pero a pesar de esta disminución en el nivel de acumulación de dímeros no se afectó la inhibición de la traducción en comparación a la condición control en ausencia de la droga (Figura 14 A y D). Estos resultados sustentan nuestra hipótesis de que los intermediarios de dimerización de NSP3 son capaces de inhibir la traducción celular. Por otro lado,

también se puede sugerir que el dímero es susceptible a degradación, posiblemente por el proteasoma.

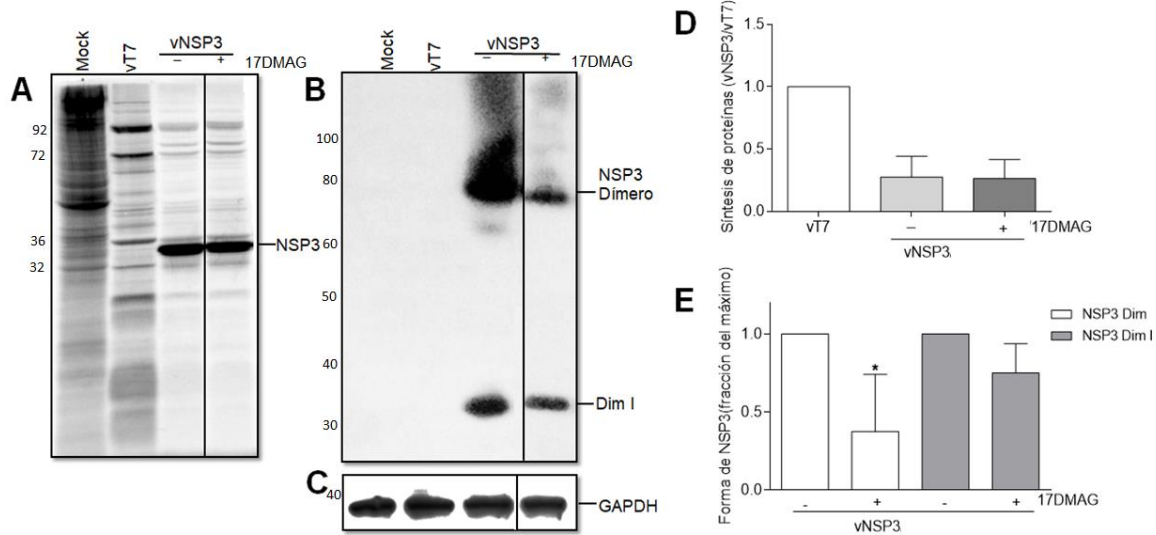


Figura 14. Efecto de inhibir a HSP90 sobre la acumulación y función de NSP3. A) Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y autoradiografía de células BSC1 simulando infección (mock), infectadas con vT7lacOI (vT7) o con vNSP3 e inducidas con IPTG 2 mM durante 20 h previas al marcaje con  $[^{35}\text{S}]$  L-Met y  $[^{35}\text{S}]$  L-Cys en presencia de  $5 \mu\text{M}$  del inhibidor 17DMAG. B y C) Western blot no disociativo anti-NSP3 muestra la acumulación de dímeros (72 kDa) y monómeros (36 kDa) de NSP3 durante 20 h de expresión de NSP3 con IPTG 2 mM en presencia de  $5 \mu\text{M}$  del inhibidor 17DMAG revelando con anti-NSP3 (B) o anti-GAPDH (C). D) Gráfica que muestra el efecto del 17DMAG sobre la función inhibitoria de la traducción celular por NSP3, basada en tres experimentos como el mostrado en A. E) Gráfica que muestra el efecto del 17DMAG sobre la acumulación de dímeros y monómeros de NSP3 en presencia o ausencia del inhibidor 17DMAG, basada en tres experimentos como el mostrado en B. Los asteriscos significan diferencia significativa determinada por medio de ANOVA de una vía  $p \leq 0.05$ . Las imágenes A, B y C fueron cortadas y reconstruidas a partir de un mismo experimento, con el fin de mostrar las condiciones de nuestro interés y eliminando condiciones exploratorias.

### **Papel de HSP90 sobre el estado oligomérico de NSP3 y su funcionalidad para inhibir la traducción celular.**

HSP90 regula muchas señalizaciones celulares y la forma en la cual influye sobre una proteína puede ser muy variable, por lo que no siempre tiene el mismo efecto su inhibidor 17DMAG ya que dependiendo de las condiciones celulares, la inhibición puede ser parcial, momentánea o incluso no

inhibir la función [41, 43]. Es por eso que, con base en estos antecedentes, decidimos ampliar el rango de análisis de las afectaciones que se tienen al utilizar el 17DMAG sobre la función de HSP90 y consecuentemente de NSP3. Por lo tanto, variamos las concentraciones del 17DMAG (concentración baja de 0.5  $\mu$ M y concentración alta de 10  $\mu$ M) así como las concentraciones del inductor IPTG (concentración baja de 12.5  $\mu$ M y moderada de 50  $\mu$ M), con el fin de tener un efecto claramente discernible. Contrariamente a lo esperado, 17DMAG no revirtió el efecto inhibitorio de NSP3 sobre la traducción celular sino la potenció (Figura 15 A y B). Por otro lado, al analizar la acumulación de NSP3 se obtuvo que al utilizar bajas dosis del 17DMAG no hay una variación significativa en la acumulación de los dímeros ni de la forma Dim I (Figura 15 C, D y E), pero si existe una exacerbada acumulación de formas de mayor peso del dímero (Figura 15 C y F), lo cual posiblemente puede deberse a una mayor poliubiquitinación del dímero el cual está en proceso de ser degradado. Mientras que a altas dosis del 17DMAG la acumulación disminuye aún más, siendo las diferencias significativas tanto para el dímero como para Dim I, pero resaltando que para el dímero hay una reducción de casi tres veces en comparación al control (Figura 15 C, D y E), lo que sustenta la propuesta de la degradación, principalmente del dímero de NSP3 y en segunda instancia del Dim I, y la suma de ambas degradaciones (dímero y Dim I) posiblemente es la responsable de la potenciación de la inhibición de la traducción.

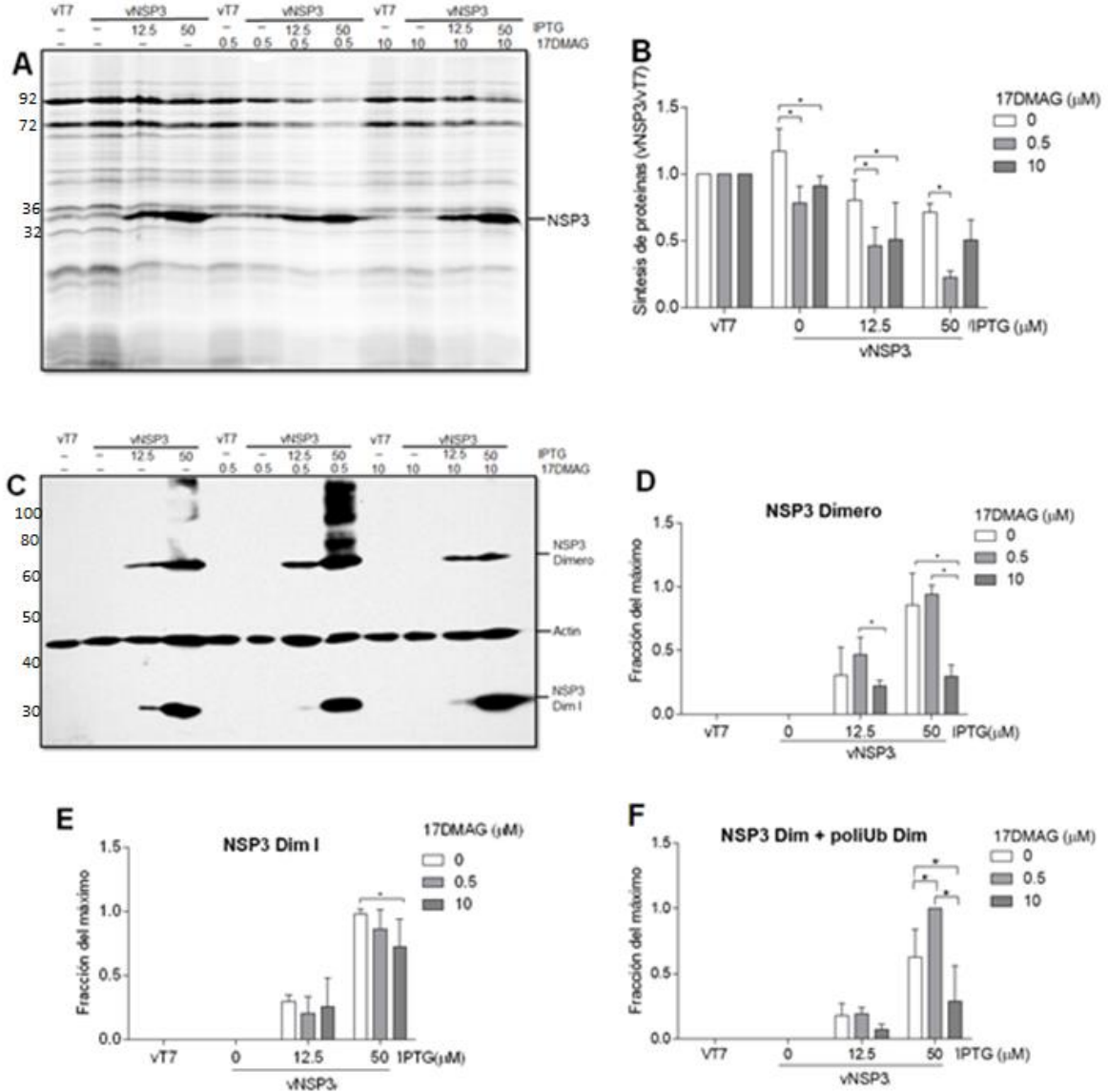


Figura 15. La inhibición de HSP90 con 17DMAG reduce la acumulación de dímeros y potencia la inhibición de la traducción por NSP3. A) Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y autoradiografía de células BSC1 simulando infección (mock), infectadas con vT7lacOI (vT7) o con vNSP3 e inducidas con IPTG 2 M durante 20 hr previas al marcaje con  $[^{35}\text{S}]$  L-Met y  $[^{35}\text{S}]$  L-Cys en presencia de dos concentraciones de IPTG (12.5 y 50  $\mu\text{M}$ ) o en ausencia del inductor y en presencia de dos concentraciones de 17DMAG (0.5 y 10  $\mu\text{M}$ ) o en ausencia del inhibidor. B) Gráfica que muestra el efecto del 17DMAG sobre la función inhibitoria de la traducción celular por NSP3 basada en tres experimentos como el mostrado en A. C) Western blot no disociativo anti-NSP3 y anti-actina, se muestra la acumulación de dímeros (72 kDa) y monómeros (36 kDa) de NSP3 durante 20 hr de expresión de NSP3 con dos concentraciones de IPTG (12.5 y 50  $\mu\text{M}$ ) o en ausencia del inductor y en presencia de dos concentraciones de 17DMAG (0.5 y 10  $\mu\text{M}$ ) o en ausencia del inhibidor. Así mismo se observa el control de carga correspondiente a la proteína actina. D) Gráfica que muestra el efecto del



17DMAG sobre la acumulación de dímeros en ausencia o presencia de las dos concentraciones del inhibidor 17DMAG en base a tres experimentos como el mostrado en C. E) Gráfica que muestra el efecto del 17DMAG sobre la acumulación de Dim I en ausencia o presencia de las dos concentraciones del inhibidor 17DMAG basada en tres experimentos como el mostrado en C. F) Gráfica que muestra el efecto del 17DMAG sobre la sumatoria del dímero más el barrido de bandas de mayor peso al dímero en ausencia o presencia de las dos concentraciones del inhibidor 17DMAG basada en tres experimentos como el mostrado en C. Los asteriscos significan diferencia significativa determinada por medio de ANOVA de una vía  $p \leq 0.05$ .

### **Exploración preliminar del efecto de 17DMAG sobre la acumulación de eIF4G1 y HSP90.**

Partiendo de la hipótesis de la formación de complejos tripartitos (NSP3-HSP90-eIF4G1) como parte de un secuestro funcional de eIF4G1 por parte del intermediario de dimerización de NSP3 y la posible degradación de este complejo para explicar la potenciación del efecto inhibitorio de la traducción, realizamos ensayos preliminares de Western blot variando las concentraciones de 17DMAG y del inductor IPTG.

A pesar de que estos análisis carecen de repeticiones y un control de carga pudimos obtener un panorama de lo que ocurre durante la expresión de NSP3 e inhibición de HSP90. Por un lado, se pudo determinar la acumulación de eIF4G1 en presencia de NSP3, siendo muy baja la detección de la forma completa de 220 kDa, mientras que el fragmento de aproximadamente 70 kDa (que podría corresponder a MFAG) es la principal forma detectable (Figura 16 A). Aunado a esto, en presencia de 17DMAG parece haber una mayor acumulación de la forma completa de eIF4G1.

Por otro lado, en el caso de HSP90 sólo se pudo determinar que conforme existe un mayor estrés celular ya sea por la infección y grado de acumulación de NSP3 así como la presencia y cantidad del inhibidor 17DMAG (además de la suma de ambos factores), provocaban una mayor acumulación de HSP90 (Figura 16 A). Sin embargo, cuando se modificó el Western blot disociativo por el Western blot- no-disociativo (WBND), se pudo detectar una banda de un peso ligeramente

mayor a 90 kDa la cual dependiendo de la concentración del IPTG y 17DMAG aumenta su acumulación (Figura 16 B). Esta banda puede corresponder a la isoforma alfa de HSP90 la cual se expresa preferencialmente bajo condiciones de estrés [39].

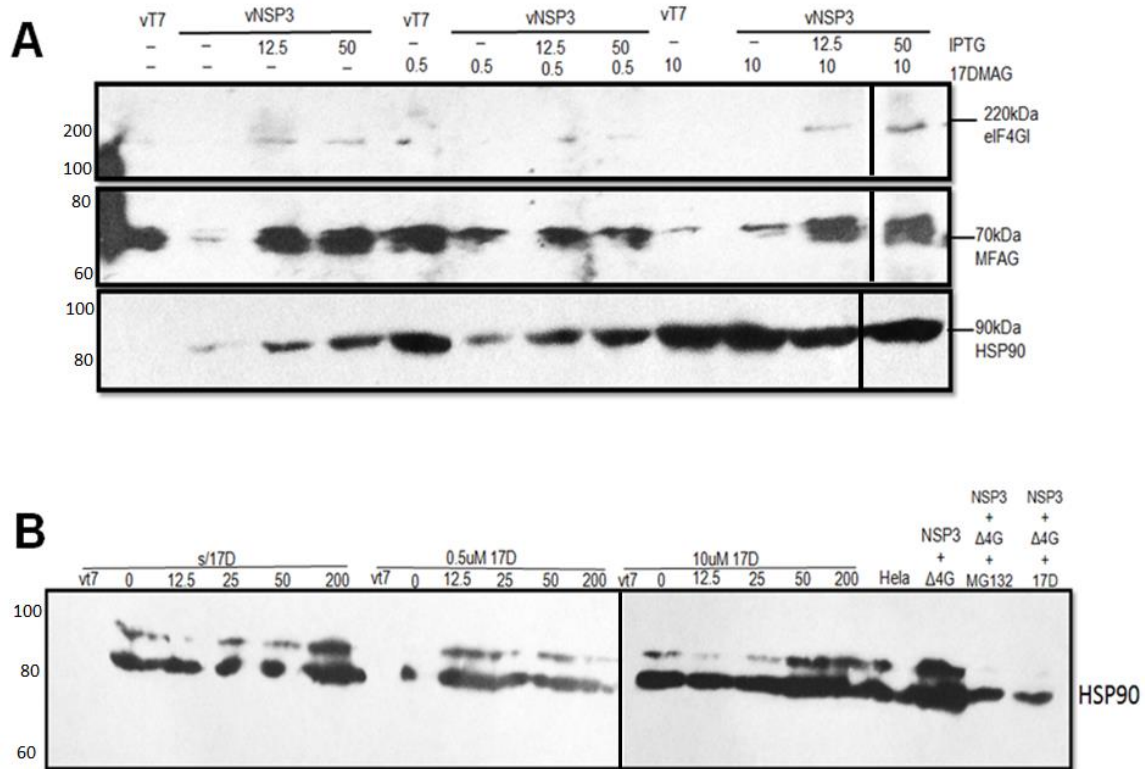


Figura 16. Acumulación de eIF4G1 y HSP90 durante infección con vNSP3 y en presencia del inhibidor 17DMAG. Western blot de eIF4G1 y HSP90 en ausencia o presencia de dos distintas concentraciones de 17DMAG (0.5 y 10  $\mu$ M) e IPTG (12.5 y 50  $\mu$ M), en el panel superior se observa la forma completa de eIF4G1 (220 kDa), en el panel intermedio un fragmento de 70 kDa de eIF4G1 y en el panel inferior a HSP90 (90 kDa). B) Western blot no disociativo de HSP90 en ausencia o presencia de dos distintas concentraciones de 17DMAG (0.5 y 10  $\mu$ M) y múltiples concentraciones de IPTG (0-200  $\mu$ M), aunada a la presencia del inhibidor del proteasoma MG132 o en co-infecciones con el virus v $\Delta$ 4G el cual expresa una variante mutada de NSP3 la cual carece del dominio de unión a eIF4G1. Estos experimentos no presentan repeticiones ni control de carga. La imagen A corresponde al mismo experimento, la cual fue editada y reconstruida para mostrar la totalidad de condiciones realizadas pero obtenidas en distintas radiografías. La imagen B corresponde a un experimento independiente la cual fue editada y reconstruida para mostrastrar la totalidad de condiciones realizadas, provenientes de dos radiografías.

**NSP3 forma complejos tripartitos con HSP90 y eIF4G1 con los cuales puede inhibir la traducción celular.**

Con el fin de seguir abordando la hipótesis de la formación de complejos tripartitos NSP3-HSP90-eIF4G1, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación en las condiciones de mayor potenciación (expresión moderada de NSP3 (50  $\mu$ M IPTG) y baja dosis del 17DMAG (0.5  $\mu$ M), sin embargo no obtuvimos resultados en células BSC1 por lo que se cambió a la línea celular Hela, con el beneficio de que en dichas células existe una expresión abundante tanto de eIF4G1 como de HSP90.

Primero inmunoprecipitamos a la proteína NSP3 y se analizó la interacción tanto con eIF4G1 como con HSP90, obteniéndose interacción con ambas proteínas tanto en la condición en ausencia como en presencia del 17DMAG (Figura 17). Sin embargo, parece que existe una mayor interacción con ambas proteínas en la condición en presencia del inhibidor de HSP90 17DMAG, lo que hace sugerir que efectivamente existe una formación de complejos ternarios los cuales se favorecen en presencia del inhibidor.

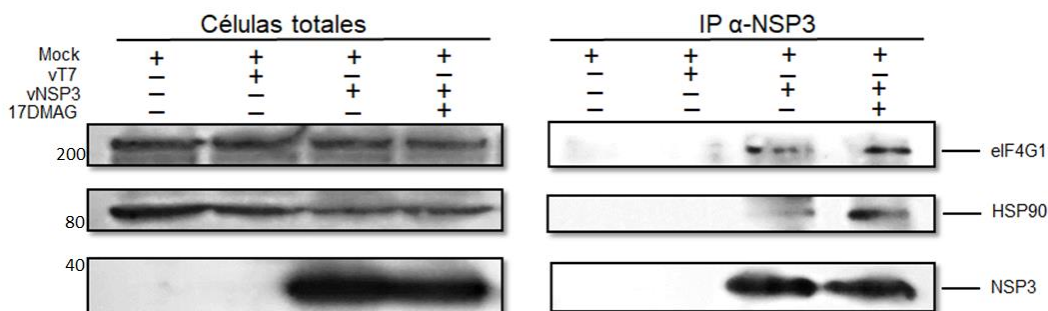


Figura 17. Western blot de la coimmunoprecipitación con anti-NSP3 para detectar a eIF4G1, HSP90 y NSP3 en presencia o ausencia de 17DMAG (0.5  $\mu$ M) con 16 h de inducción de NSP3 con IPTG (12.5  $\mu$ M). En los paneles de la izquierda se muestra la acumulación total de cada una de las proteínas de interés, proveniente del extracto total de las células. En los paneles de la derecha se muestra la detección de las proteínas coimmunoprecipitadas eIF4G1 y HSP90, así como la inmunoprecipitación de NSP3. Este experimento fue repetido al menos tres veces.

Se realizó el mismo experimento de la Figura 15 pero modificando el formato de inmunoprecipitación, uniendo a eIF4G1 a columnas con resina de agarosa, y se obtuvieron resultados similares al co-inmunoprecipitar tanto a NSP3 como a HSP90 con anti-NSP3, y también parece existir una mayor interacción entre las proteínas en presencia del inhibidor de HSP90 (Figura 18). Aunado a esto, un hallazgo muy interesante e inesperado fue encontrar interacción entre eIF4G1 y HSP90 (Figura 18), ya que esta interacción no se ha reportado en la literatura por lo que no se ha considerado a eIF4G1 como un cliente de la chaperona. En el control de infección con el vector vT7 parece no haber presencia de eIF4G1 (Figura 18), posiblemente porque la infección por vaccinia provoca la canalización de eIF4G1 a gránulos de estrés haciendo inaccesible al menos a una fracción de esta proteína [85].

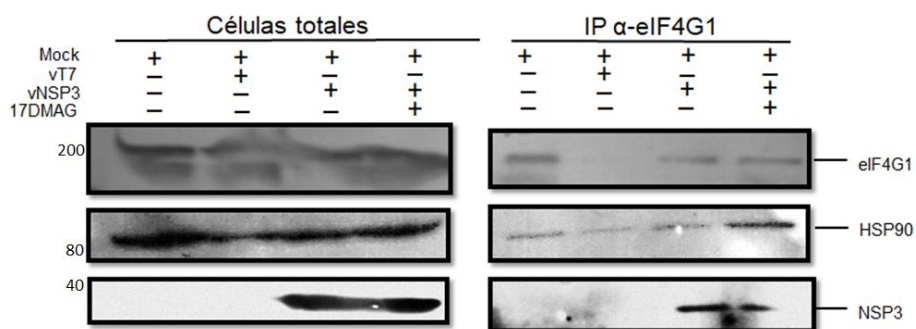


Figura 18. Western blot de la coinmunoprecipitación con anti-eIF4G1 para detectar a NSP3, HSP90 y eIF4G1 en presencia o ausencia de 17DMAG (0.5  $\mu$ M) con 16 h de inducción de NSP3 con IPTG (12.5  $\mu$ M). En los páneces de la izquierda se muestra la acumulación total de cada una de las proteínas de interés, proveniente del extracto total de las células. En los páneces de la derecha se muestra la detección de las proteínas coinmunoprecipitadas NSP3 y HSP90, así como la inmunoprecipitación de eIF4G1. Este experimento fue repetido al menos tres veces.

Finalmente, se trató de realizar el formato de inmunoprecipitación de HSP90, sin embargo cuando se realiza la inmunoprecipitación de HSP90 y detección de la misma por Western blot (control

positivo de la inmunoprecipitación) se detectan dos formas de menor peso molecular (una de >50 kDa y otra >20 kDa), probablemente como resultado de una proteólisis de HSP90 (Figura 19).

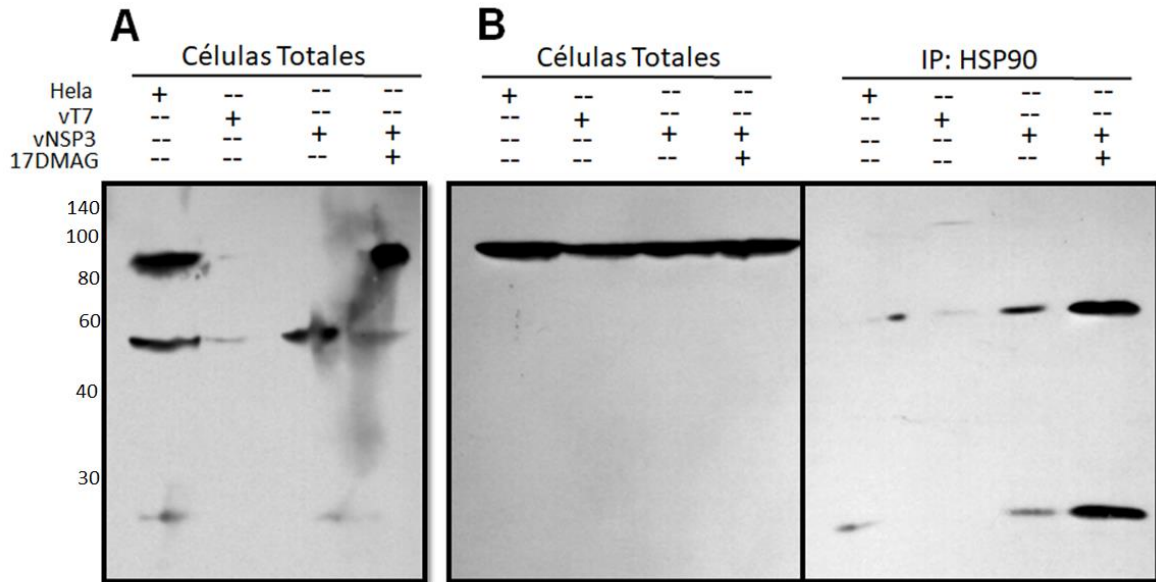


Figura 19. Western blot de la inmunoprecipitación con anti-HSP90 para detectar a HSP90 en presencia o ausencia de 17DMAG (0.5  $\mu$ M) con 16 h de inducción de NSP3 con IPTG (12.5  $\mu$ M). A) Imagen de la acumulación total de HSP90 proveniente del extracto total de las células en donde la banda superior corresponde a un peso de 90 kDa aproximadamente y las bandas por debajo de 50 y 20 kDa aproximadamente. B) En los paneles de la izquierda se muestra la acumulación total de HSP90 proveniente del extracto total de las células. En los paneles de la derecha se muestra la detección de la proteína inmunoprecipitada HSP90 donde se observan mayoritariamente las bandas de 50 y 20 kDa aproximadamente. Este resultado fue obtenido tres veces.

### Possible poliubiquitinación de NSP3.

Debido a que NSP3 se estabiliza en presencia del inhibidor del proteasoma MG132 [10] y que detectamos formas de NSP3 de peso molecular mayor al de dímero, decidimos investigar si ocurre la poliubiquitinación de NSP3 tanto en ausencia como en presencia del 17DMAG. Las células infectadas se analizaron por medio de inmunoprecipitación de NSP3 y revelado por Western blot contra las proteínas de ubiquitina. Encontramos que a pesar de que no hay bandas definidas que

corroboren con certeza la identificación de NSP3 o complejos de mayor peso, en la condición en ausencia del 17DMAG existe una aparente banda de gran tamaño en el peso correspondiente a los 36 kDa y un escaso difuminado de aparentes formas poliubiquitinadas. Mientras que en la condición en presencia del 17DMAG, la banda más abundante desaparece y se ve un barrido muy notorio de lo que posiblemente podrían ser formas poliubiquitinadas de NSP3 (Figura 20). Estos resultados no son concluyentes debido a que no se hicieron repeticiones ni contamos con imágenes nítidas.

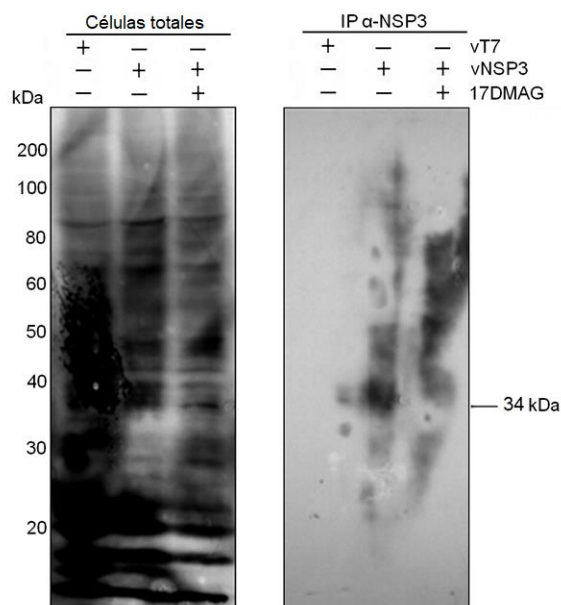


Figura 20. Western blot de la inmunoprecipitación con anti-NSP3 para detectar a NSP3 poliubiquitinada, en presencia o ausencia de 17DMAG (0.5  $\mu$ M) con 16 h de inducción de NSP3 con IPTG (12.5  $\mu$ M). En el panel de la izquierda se muestra la acumulación total del extracto proteico de las células. En el panel de la derecha se muestra la detección de las proteínas inmunoprecipitadas y que son reconocidas con el anticuerpo contra ubiquitinas. Este experimento fue realizado dos veces.

### **Posible relevancia de HSP90 y el proteasoma en la función inhibitoria de la traducción de NSP3.**

Debido a la dependencia del virus vaccinia del proteasoma [86], utilizamos el inhibidor MG132 durante toda la infección viral pero reduciendo la concentración. Con estas modificaciones analizamos las diferencias en la acumulación de NSP3 en presencia o ausencia del 17DMAG y MG132, aunado al análisis sobre la traducción celular por marcaje metabólico. Encontramos que hubo reversión de la inhibición de la traducción al usar conjuntamente los inhibidores 17DMAG y MG132 (Figura 21). Comprobamos que el uso prolongado del MG132 tiene un efecto sobre la traducción de vaccinia (Figura 21 A), ya que el patrón de síntesis de proteínas es diferente al que obtuvimos en condiciones similares pero sin el uso de MG132 en otros experimentos, sin embargo esto no afectó el nivel de inhibición de la síntesis de proteínas celular y de vaccinia que causa la expresión de NSP3 (Figura 21 B). Pero lo más resaltante del análisis de la síntesis traduccional es la reversión de la inhibición de la traducción celular y de vaccinia que se presenta sólo cuando se usan conjuntamente ambos compuestos, ya que el uso individual de cada una no afecta la inhibición de la traducción por NSP3 (Figura 21 A y B). Aunado a esto, la acumulación de NSP3 analizado por WBND mostró que en presencia de ambos inhibidores había una disminución de un poco más de dos veces en la concentración tanto del dímero como del intermediario de dimerización en comparación con las otras condiciones (Figura 21 C, D y E), algo inesperado ya que al encontrarse presente el inhibidor del proteasoma lo que se esperaba era una mayor acumulación de NSP3.

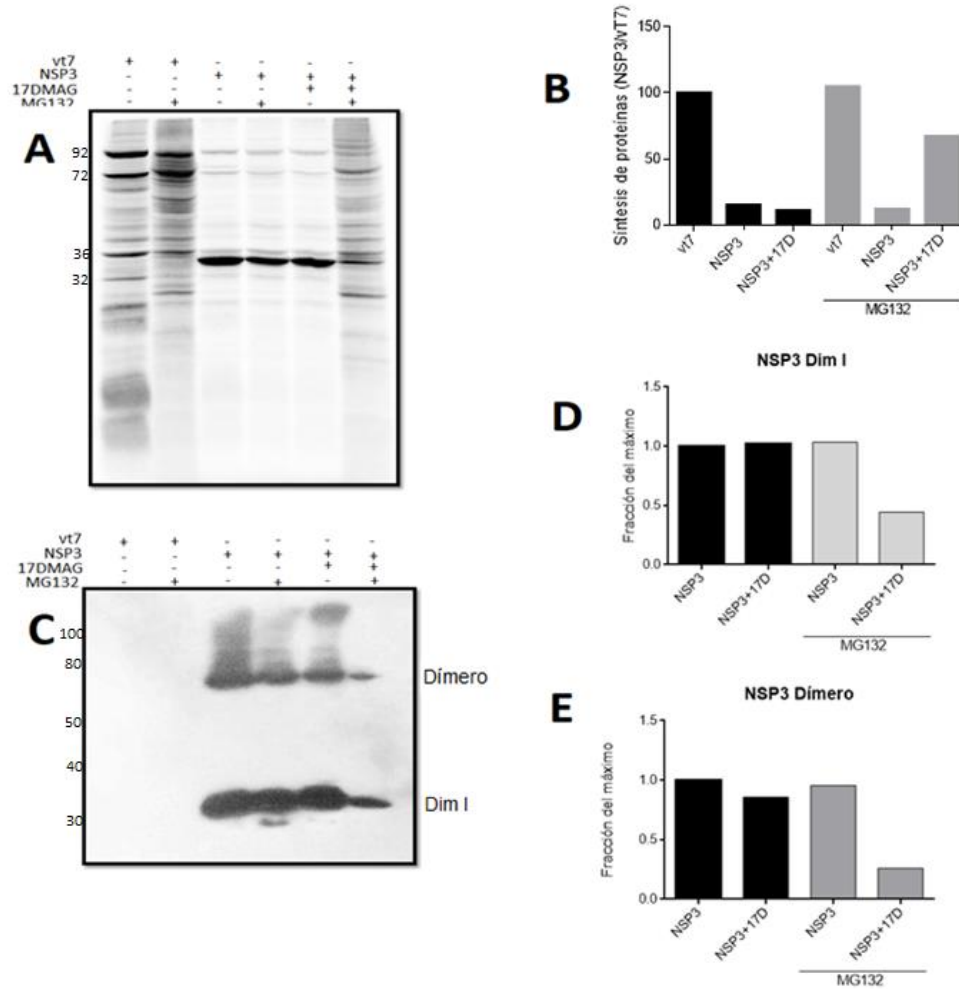


Figura 21. Reversión de la inhibición de la traducción por NSP3 en presencia de 17DMAG y MG132. A) Imagen del efecto inhibitorio de la traducción analizado por medio de marcaje metabólico de proteínas [<sup>35</sup>S] L-Met y [<sup>35</sup>S] L-Cys durante 16 h de expresión de NSP3 con IPTG 2 mM en ausencia o presencia (5 μM) de los inhibidores 17DMAG y MG132 durante 18 h. B) Gráfica que muestra el grado de traducción celular exponiendo la reversión en la última barra de la gráfica. C) Western blot no disociativo anti- NSP3 muestra la acumulación de dímeros y Dim I de NSP3 con las mismas condiciones experimentales que en A. D) Gráfica que muestra la acumulación Dim I de NSP3 con las mismas condiciones experimentales que en A. E) Gráfica que muestra la acumulación dímeros de NSP3 con las mismas condiciones experimentales que en A. Este resultado se ha obtenido dos veces, no se cuenta con control de carga.



## DISCUSIÓN

### Modelo del mecanismo de inhibición de la traducción de NSP3.

Existe un debate acerca de las tres funciones propuestas para NSP3 de rotavirus, inhibición o estimulación de la traducción celular y estimulación de la traducción viral. Si bien todas estas funciones han sido generalmente aceptadas, no es claro el por qué una proteína puede tener funciones aparentemente antagónicas.

El grupo de D. Poncet propone [18] que NSP3 inhibe la traducción celular del ARNm con CAP y poliadenilados debido a un desacoplamiento entre los extremos 5' y 3', con relocalización de PABP al núcleo, mientras que nuestro grupo propone que la causa de la inhibición de la traducción no es la linearización de los ARNm, ni la relocalización de PABP, sino el secuestro de eIF4G1 al formar complejos tripartitos entre NSP3-eIF4G1-HSP90, como se muestra en la Figura 22.

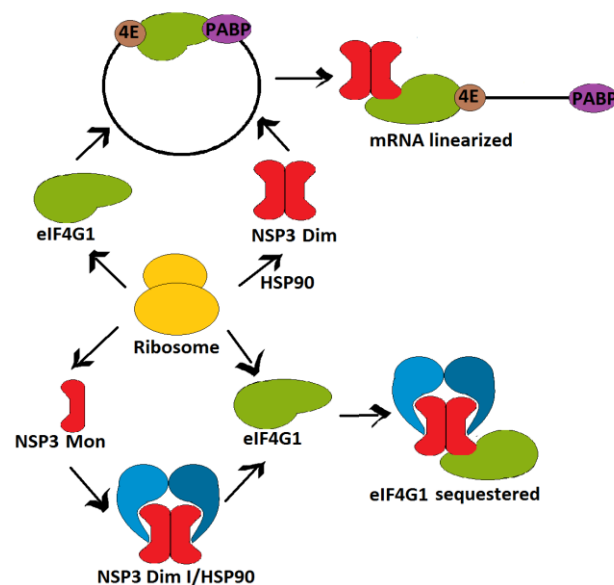


Figura 22. Esquema que compara el modelo de inhibición de la traducción de NSP3 por medio de la linearización de los ARNm y el modelo propuesto por nuestro laboratorio que implica el secuestro de eIF4G1. Imagen tomada de Contreras-Treviño, H. et. al. 2017 [10].

## **Compración de las cinéticas de acumulación de dímeros y monómeros de NSP3 con la cinética de inhibición de la traducción celular.**

En este estudio encontramos que la síntesis y acumulación de NSP3 en el sistema de expresión inducida VOTE llegan a su máximo nivel a las 8 h, con una cinética exponencial sigmoidea, y se mantienen prácticamente constantes en las horas posteriores. Por otro lado, la inhibición de la traducción empieza a ocurrir desde los tiempos más tempranos (0.5 y 1 h) y no tiene una forma sigmoidea sino lineal, lo que cuestiona cómo ocurre la inhibición de la traducción temprano en la inducción cuando aún se detecta acumulación detectable de la proteína. Otro aspecto relevante y que repercute en la conceptualización funcional de NSP3 es la relevancia que tiene la degradación de la proteína, ya que al analizar las cinéticas de síntesis y acumulación de NSP3, se pudo deducir que debe de existir una enorme degradación de la proteína, mientras que también paradójicamente la vida media reportada es larga, de 200 min [81], posiblemente porque las determinaciones de vida media son incapaces de detectar a la fracción más inestable de la proteína.

El establecimiento de una meseta de acumulación de NSP3 podría estar determinado por el nivel de eIF4G1 recién sintetizada que hay en la célula que evitaría la susceptibilidad de NSP3 a degradación. Esta hipótesis no es nueva ni extraña, ya que en diversos tipos de virus se ha podido observar que la interacción con factores traduccionales es determinante para permitir la acumulación e incremento de proteínas virales, ya que una concentración óptima de una o varias proteínas juega un papel importante para la replicación viral [62]. Y por lo tanto para el caso de NSP3, su proceso de maduración no sólo estaría determinado por la interacción con HSP90 sino también por la unión a eIF4G1 recién sintetizada. Esta hipótesis contemplaría el hecho de que NSP3 sin ser dimérica sería capaz de unirse a eIF4G1, algo que tampoco se ha reportado, pero que

en otros estudios se ha observado al menos para el caso de la interacción con los ARNm, ya que al utilizar la metodología de Biacore, se observó que NSP3 puede interactuar con el ARNm antes de dimerizar [14].

En cuanto a la cinética de acumulación de dímeros e intermediarios de dimerización de NSP3, la sumatoria de ambas formas de NSP3 fue la que mejor correlacionó con la cinética de inhibición de la traducción, aportando así evidencia consistente con la funcionalidad de los intermediarios de dimerización para inhibir la traducción celular.

Esta nueva propuesta funcional tiene muchas consideraciones que modifican en gran medida lo que se había establecido para NSP3 en otros estudios. Por un lado, cambia la concepción de la funcionalidad de NSP3 ya que se consideraba que únicamente el dímero era funcional y capaz de interactuar con eIF4G1, ahora proponemos que el intermediario de dimerización es un estadio de NSP3 que no sólo representa la transición de maduración de la proteína, sino que es funcional para inhibir la traducción. Por otro lado, el intermediario de dimerización al distinguirse y diferenciarse tanto del monómero como del dímero, crea una nueva forma de NSP3 discreta, con características particulares, como es su vida media, susceptibilidad a degradación por el proteasoma, funcionalidad y capacidad de interacción con diversas proteínas. Y, dadas las nuevas consideraciones, sería necesario cambiar el modelo con el cual se explicaba la inhibición de la traducción.

### **Papel de HSP90 en la funcionalidad de NSP3 para inhibir la traducción celular**

Para el estudio del papel de la chaperona HSP90 en la dimerización de proteínas el inhibidor más comúnmente utilizado es geldanamicina o su derivado 17DMAG, el cual se sabe que al unirse al sitio de unión a ATP en el extremo amino de HSP90 resulta suficiente para bloquear la función de

la chaperona. 17DMAG, droga que ya se había utilizado anteriormente para determinar que NSP3 es susceptible a degradación por el proteasoma y que afectaba su función de relocalizar a PABP al núcleo [30], sin embargo en nuestro estudio el tratamiento con 17DMAG fue insuficiente para afectar la traducción celular analizada por marcaje metabólico, pero sí en la acumulación de dímeros sin afectar significativamente la acumulación de intermediarios de dimerización (Fig. 14), por lo que se propone que el intermediario de dimerización es responsable de que la inhibición se mantenga. Este resultado además de contrastante a lo esperado, hace evidente que el uso del inhibidor 17DMAG no es suficiente para afectar la función de NSP3, lo cual se encuentra relacionado a los reportes donde se describe que la unión del 17DMAG al sitio activo de HSP90 no impide que interacte con sus clientes [43]. Es por eso que pensamos que, en nuestro estudio, el uso del 17DMAG afecta la capacidad de HSP90 para asistir a NSP3 pero no impide que interacte con ella, y de alguna forma es capaz de ser funcional. Por otro lado, tampoco podemos dejar de lado el hecho de que puede existir diferencias entre las isoformas de HSP90 para ser afectada por el 17DMAG y si estas diferencias son el reflejo de los resultados que observamos, ya que estas particularidades entre las isoformas y su afectación por el 17DMAG no han sido reportadas.

**La degradación de complejos entre NSP3 y su blanco funcional podría ser relevante en el mecanismo de inhibición de la traducción.**

En el enfoque experimental de inhibición de HSP90 con 17DMAG permitió sorprendentemente encontrar una potenciación de la inhibición traducción al utilizar variantes en la concentración tanto del IPTG como del 17DMAG, en condiciones en las que se abatió el nivel de acumulación de dímeros de NSP3. Con base en este resultado proponemos que la degradación de complejos de NSP3 con su blanco funcional NSP3 podría ocurrir simultáneamente explicando así la potenciación de su función inhibitoria de la traducción.

Por un lado, se observaron formas de mayor peso que los dímeros de NSP3 que se habían venido observando en todos los experimentos en donde se realizaba WBND ya sea en los tiempos más largos de inducción de IPTG o en las condiciones de presencia del 17DMAG. Pensamos que estas formas corresponden a dímeros de NSP3 poliubiquitinadas y que su presencia evidencia su proceso de degradación. El hecho de que intermediario de dimerización sea difícilmente afectado con el 17DMAG, hace sugerir que la potenciación en la inhibición de la traducción se debe a un efecto dual de inhibición por los intermediarios de dimerización y la degradación de NSP3 formando complejos con su blanco funcional. En ambos mecanismos HSP90 tendría un papel fundamental que pasa de asistencia en el plegamiento de NSP3 a una canalización a degradación por el proteasoma, como en otros estudios, en donde el tiempo de exposición al compuesto resulta en enriquecimiento de la mayoría de los componentes que se encuentran asociados a HSP90, incluyendo las isoformas y co-chaperonas (Aha1, Cdc37, HOP entre otras) modificacndo sus funciones [87].

**La acumulación de HSP90 y eIF4G1 podría ser relevante en la función inhibitoria de la traducción de NSP3.**

Los niveles de acumulación de eIF4G1 y HSP90 bajo las distintas concentraciones tanto de IPTG como del 17DMAG presentaron variaciones. En células Hela u otras líneas celulares cancerosas 17DMAG provoca una acelerada degradación de los blancos funcionales de HSP90 y consecuentemente un proceso de apoptosis a través de la inducción de señalizaciones vinculadas a la participación de caspasas [88]. Mientras que en nuestro sistema de estudio, el uso de la línea celular BSC1 revela un menor daño por el 17DMAG que no involucra la apoptosis de las células, observándose un incremento en la acumulación de HSP90, con un aparente aumento de la isoforma alfa de HSP90, lo cual podría implicar una diferencia funcional sobre NSP3 dependiendo

de la isoforma de HSP90 que interaccione con ella, por ejemplo diferenciarse entre una asistencia o la degradación de NSP3.

Mientras que para el caso de eIF4G1 existe una gran variedad de mecanismos por los cuales se puede traducir sin ser necesaria la forma íntegra de la proteína. Esto hace que para cada tipo celular haya una consideración con respecto a su grado de expresión (incluso temporalmente) y por lo tanto no pueden ser extrapolables datos que indique el grado de expresión/acumulación de una línea o tipo celular a otra. En las células BSC1 obtuvimos variaciones en el nivel de expresión de eIF4G1 ya sea por la expresión de NSP3 o la presencia del inhibidor 17DMAG. Con esto consideramos que nuestro modelo inhibitorio debe contener con estas variaciones de eIF4G1 y no pensar que la proteína se presenta de una única forma y de manera inalterable durante su interacción con NSP3. Durante el análisis de eIF4G1 por western blot nos dimos cuenta que su detección, en comparación con otras proteínas, es muy complicada, lo cual podría estar asociado a su baja estabilidad. Sin embargo, en presencia del 17DMAG observamos una mayor acumulación. En células que expresan NSP3 observamos una forma de menor peso (alrededor de 70 kDa) resultado de una probable degradación de la proteína completa y que genera la formación de MFAG [48]. La aparente forma MFAG parece ser la principal forma de eIF4G1 presente durante la infección con vNSP3 posiblemente porque puede tener un papel importante para poder seguir traduciendo en presencia de NSP3.

Sin embargo, pensamos que el posible mecanismo de inhibición de la traducción por NSP3 debe contemplar a eIF4G1 completa, la cual es secuestrada justo después de ser sintetizada para formar un multicomplejo proteico con NSP3 y HSP90 y posteriormente a esto, sufrir la degradación.

**La formación de multicomplejos proteicos podría ser el reflejo de la ruta de degradación de NSP3 y sus blancos funcionales.**

Nuestros ensayos de coimmunoprecipitación para estudiar la formación de complejos tripartitos NSP3-HSP90-eIF4G1 sugieren la interacción entre eIF4G1 y HSP90 en la línea celular HeLa que es de tipo cancerosa, la cual presenta una abundancia mayor de eIF4G1 y HSP90 que en una célula no cancerosa y por tanto esta interacción podría ser no detectable en otras líneas celulares [63]. Además de esto, esta interacción no está reportada en la literatura ni predicha con métodos bioinformáticos, pero se postula que HSP90 dadas sus características estructurales y funcionales puede interactuar con prácticamente cualquier proteína siempre y cuando presente un sitio expuesto e inestable [40]. Y dado que la proteína eIF4G1, como se ha reportado y observamos en los ensayos de WB, es muy inestable y susceptible a degradación, hace pensar que la interacción de HSP90 podría ocurrir cuando eIF4G1 esté recién sintetizada ayudando a prevenir su degradación.

Otro resultado no esperado de los ensayos de inmunoprecipitación fue la detección de fragmentos de 50 y 30 kDa inmunoprecipitando con anti-HSP90 y revelando con este mismo anticuerpo. En la literatura se ha observado que se producen distintos fragmentos de HSP90 como parte de corte por una proteasa, una de ellas es tripsina que fue comprobado *in vitro*, sin embargo no se sabe si existe alguna proteasa que tenga un reconocimiento específico y que actúe bajo condiciones de estrés. Se han generado fragmentos de HSP90 de 50 kDa, los cuales tienden a generar oligómeros (como tetrámeros) y estos pueden ser inmunoprecipitados [41] [89]. Además, un fragmento del extremo carboxilo de HSP90 no sólo es capaz de unir ATP, sino que tiene una mayor afinidad que un fragmento del extremo amino e incluso que la proteína completa [42].

Por otro lado existe evidencia que muestra que el uso de inhibidores de HSP90 no modifican el reconocimiento por anticuerpos para ser identificada por western blot, pero sí afecta la detección para ser inmunoprecipitada por los mismos anticuerpos, esto indica que los inhibidores de HSP90 (ya sea de unión en su extremo carboxilo o amino) modifican la conformación de HSP90 y ocasionan la posible susceptibilidad a corte por proteasas [41]. Interesantemente, al hacer nosotros una predicción de cortes de HSP90 con distintos programas bioinformaticos como ExpAsy, Prosper y Screencap3, entre otros, encontramos que uno de los sitios más probables de corte por una proteasa (hipotéticamente una caspasa) es alrededor del aminoácido 515 lo cual genera un fragmento en el extremo amino de aproximadamente 50 o 60 kDa. Con base en estas consideraciones es tentador especular sobre formas fragmentadas de HSP90 que podrían ser funcionales y capaces de interaccionar con NSP3. También podemos mencionar que estas suposiciones nos hablan por otro lado de la degradación por el proteasoma no sólo de NSP3, sino posiblemente también de HSP90 y eIF4G1.

Exploramos la presencia de NSP3 poliubiquitinada por inmunoprecipitación, donde encontramos bandas que podrían representar proteínas poliubiquitinadas. A partir de esto, nosotros pensamos que en ausencia del 17DMAG las proteínas corresponderían mayoritariamente a la acumulación de monómero poliubiquitinado de NSP3, mientras en presencia del inhibidor 17DMAG el patrón podría corresponder a proteínas de mayor peso al monómero, y por lo tanto representar la poliubiquitinación tanto del monómero como del dímero. Esta degradación podría estar mediada por la actividad de HSP90 y su co-chaperona CHIP, las cuales son responsables de poliubiquitinar a los blancos de esta chaperona [36]. El suceso anterior se ha reportado en otros trabajos, ya que cuando se inhibe a HSP90 con geldanamicina por periodos largos, se modifica el sitio de poliubiquitinación, por lo que de etiquetarse el aminoácido normal K48 el cual es comúnmente se



asocia a la degradación por el proteasoma, se cambia al aminoácido K63 además de que se puede modificar la cantidad de ubiquitinación que se agrega y con esto no sólo se modifica la cantidad y forma de degradación de las proteínas blanco, sino también alterar la función de las mismas al no ser degradadas [79]. Este concepto extrapolado a nuestros resultados podría ser motivo de una modificación funcional sobre NSP3 y la posible degradación no solo de ella sino también de sus blancos funcionales (Figura 24).

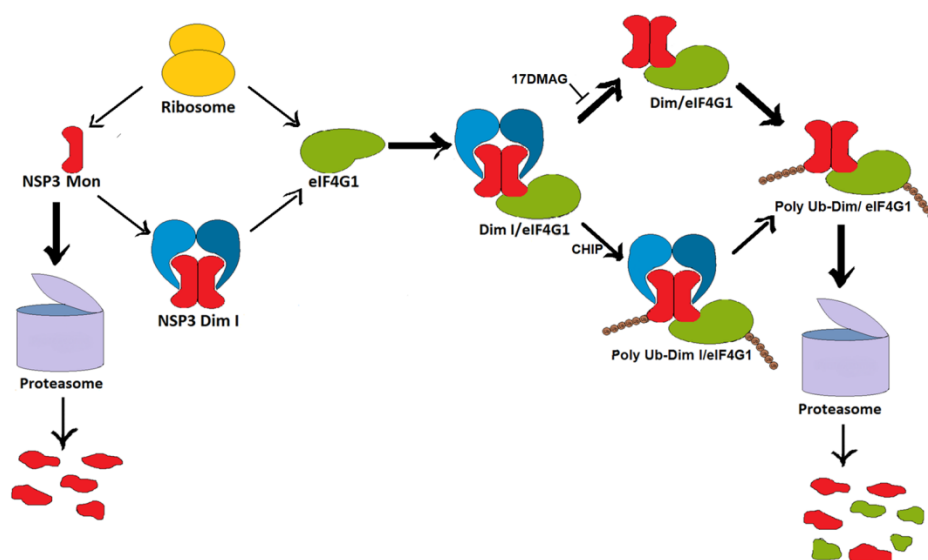


Figura 24. Esquema que complementa el modelo propuesto de inhibición por secuestro de eIF4G1 en Contreras-Treviño H.I. et. al. 2017 [10], en donde se añade la degradación conjunta de NSP3 y eIF4G1 como proceso dual de inhibición de la traducción. Este modelo fue creado por Reyna-Rosas E.

### **Evidencia que sugiere la participación de la chaperona HSP90 y el proteasoma en la función inhibitoria de la traducción de NSP3.**

En células infectadas por rotavirus hay inducción progresiva de apoptosis al incrementar la multiplicidad de infección y el tiempo post-infección [94] NSP3 es susceptible a degradación por la vía del proteasoma [10]. Estas características hacen relevante considerar que la función inhibitoria de la traducción de NSP3 ocurre en un contexto de estrés celular y durante este proceso hay una profusa degradación de esta proteína.

La inhibición simultánea de la chaperona HSP90 con 17DMAG y del proteasoma con MG-132, pero no los compuestos individuales, fueron la única condición que nos permitió revertir la inhibición traduccional de NSP3. Este sorprendente resultado involucra por primera vez los mecanismos de degradación asociados a la vía proteosomal en la función inhibitoria de la traducción de NSP3. El tratamiento con ambas drogas fue también la única condición en la que observamos degradación no sólo de los dímeros, sino también de los intermediarios de dimerización logrando así restaurarse hasta casi el 70% del total de la síntesis. Hipotetizamos que los complejos ternarios NSP3-HSP90-eIF4G1 no sólo se forman sino también son muy estables activando su degradación con la ayuda de CHIP para canalizarlos al proteasoma. Otra forma de contender con el estrés que cause la acumulación de complejos tripartitos NSP3-HSP90-eIF4G1 es a través de proteasas, las cuales estarían cortando a NSP3 y muy probablemente también a HSP90 y a eIF4G1, explicando la aparición de fragmentos de cada una de las proteínas. Uno de estos fragmentos producto del corte de eIF4G1 podría generar a MFAG, la cual al ser funcional, es capaz de revertir la inhibición traduccional observada en nuestros experimentos, mientras que los fragmentos putativos de 30 y 50 kDa de HSP90 que se detectaron en ensayos de inmunoprecipitación podrían ser también resultado del estrés celular inducido por los complejos tripartitos.

Esta nueva hipótesis puede ser muy bien apoyada por la evidencia experimental encontrada en la literatura. Por un lado eIF4G1 es una proteína tan versátil que no puede ser considerada como una molécula de acoplamiento estática, sino más bien un molde dinámico el cual puede adoptar diferentes estados conformacionales para construir complejos ribonucleoproteicos que permitan la iniciación de la traducción [48]. La sola interacción de eIF4G1 con otra proteína puede ocasionar cambios conformacionales, los cuales pueden resultar en un estado propenso a corte por caspasas [90]. Tomando esto en cuenta, nuestro escenario donde eIF4G1 es degradado por el proteasoma es posible por el hecho de que este factor es una de las tres proteínas de inicio de la traducción degradadas por el proteasoma [73], por lo que resulta factible que NSP3 en unión con eIF4G1 sean degradados de manera conjunta.

Se ha documentado que las caspasas son las responsables principales de cortar proteínas en condiciones de estrés, esto sustenta nuestro escenario hipotético acerca de la disociación de los complejos a causa de caspasas [63]. Estas proteasas pueden tener distintos grados de expresión y función dependiendo de la condición de estrés a la que se encuentre la célula [63, 64]. Una de las diferencias funcionales es el tipo de corte proteico, ya que de un solo corte en condición de homeostasis se puede pasar al corte en varios sitios en condiciones de estrés, los cuales muchas veces no se tenían documentados o reportados [63]. Por otro lado, el uso del 17DMAG crea condiciones que desencadena la síntesis de caspasas, ya que al inhibir a HSP90 con este reactivo se ocasiona la inhibición de la ruta Jak/STAT, lo cual es responsable de la expresión de caspasas principalmente de la 3 [91], la cual pensamos es responsable no solo del corte de eIF4G1 sino también de NSP3.

En otros estudios se ha podido observar que el corte proteico de eIF4G1 conlleva a una interacción y acoplamiento con proteínas diversas que permitan una traducción a partir de este fragmento de

EIF4G1. Se ha observado al fragmento interaccionando con eIF3 pero en asociación con otra proteína desconocida de un peso molecular de 55k Da, lo cual permite la traducción celular [92, 93]. Este tipo de interacción se asemeja mucho a lo que proponemos en nuestro estudio y sistema de expresión de NSP3.

En cuanto a la hipótesis de corte proteolítico de NSP3, hemos observado un fragmento de 30 kDa por ensayos de WB, como una banda tenue al expresar a esta proteína en el sistema inducible del virus vaccinia, y se incrementa en presencia del inhibidor del proteasoma MG132 [10]. Por lo tanto, nos dimos a la tarea, al igual que en el caso de HSP90 antes mencionado, de analizar la probabilidad de corte de NSP3 por caspasa 3 con los mismos programas bioinformáticos mencionados para el caso de HSP90; encontrando que se predice un corte en el extremo carboxilo, que generaría un fragmento de 27 kDa el cual correspondería al dominio de unión a eIF4G1 y que converge con el dominio de unión a HSP90 y el término del dominio de unión a RoXaN. Con base en este corte putativo de NSP3 proponemos un modelo de inhibición de la traducción por un mecanismo dual de secuestro y degradación por causa de la interacción de eIF4G1 asociada con NSP3 en presencia de HSP90 (Figura 25).

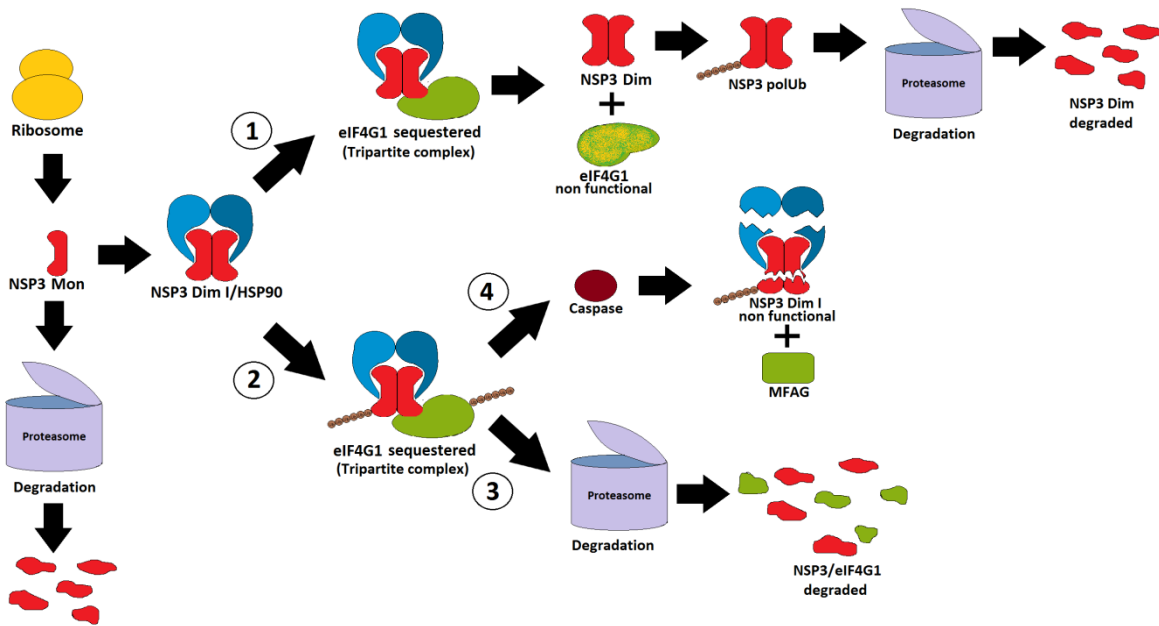


Figura 25. Modelo de inhibición de la traducción celular por NSP3. NSP3 recién sintetizada en su estado monomérico es altamente susceptible a degradación por el proteasoma, pero cuando interacciona con HSP90 formando el complejo NSP3 Dim I/HSP90 puede seguir dos rutas. 1) Formar el complejo tripartito en donde se secuestra a eIF4G1 con el cual NSP3 alcanza su estado maduro en su forma dimérica, disociando el complejo y dejando a eIF4G1 en un estado disfuncional y posteriormente NSP3 ser degradado por la vía canónica del proteasoma. 2) NSP3 al formar el complejo tripartito con eIF4G1 que no puede disociarse, provoca que HSP90 en conjunto con su co-chaperona CHIP poliubiquitinen tanto a NSP3 como a eIF4G1, esto provocaría que el complejo sea degradado de dos formas. 3) La vía principal sería por el proteasoma, lo cual degradaría tanto a NSP3 como a eIF4G1, ocasionando la inhibición de la traducción mencionado anteriormente. 4) en una forma secundaria a la degradación por el proteasoma, si el complejo no puede disociarse de HSP90 o si la función del proteasoma se ve comprometida, el complejo tripartito sería cortado por una proteasa muy probablemente la caspasa 3, lo que ocasionaría la fragmentación de las tres proteínas involucradas, pero importantemente dejando un fragmento de eIF4G1 (MFAG) el cual sería capaz de seguir traduciendo.

## CONCLUSIONES

1. NSP3 presenta una forma distinta al monómero y dímero que llamamos intermediario de dimerización la cual es funcionalmente diferente.
2. NSP3 inhibe gradualmente la traducción celular en un proceso que no sólo depende de la presencia de dímeros de NSP3.
3. La chaperona HSP90 participa durante el proceso de inhibición de la traducción de NSP3.
4. El mecanismo de inhibición de la traducción parece tener distintas fases las cuales implican la degradación de NSP3 y probablemente también la de sus blancos funcionales.
5. NSP3 interacciona simultáneamente con elf4G1 y HSP90 formando multicomplejos proteicos los cuales se encuentran presentes durante la inhibición de la traducción.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Gray, J. and U. Desselberger, *Rotavirus: Methods & Protocols*. 1st ed. Methods in Molecular Medicine. 2000, Totowa: Humana Press.
2. Shawn, R., Greenberg H, *Encyclopedia of Virology*. Segunda ed, ed. A. Press. Vol. 3. 1999, San Diego. 1576-1592.
3. Tate, J.E., et al., *2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis*. *Lancet Infect Dis*. **12**(2): p. 136-41.
4. Parashar, U.D., et al., *Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004*. *J Infect Dis*, 2009. **200 Suppl 1**: p. S9-S15.
5. Matthijssens, J., et al., *Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG)*. *Arch Virol*, 2011. **156**(8): p. 1397-413.
6. Trask, S.D., S.M. McDonald, and J.T. Patton, *Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication*. *Nat Rev Microbiol*, 2012. **10**(3): p. 165-77.
7. Patton, J.T., *Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins*. *J Gen Virol*, 1995. **76 ( Pt 11)**: p. 2633-44.
8. Chung, K.T. and M.A. McCrae, *Regulation of gene expression by the NSP1 and NSP3 non-structural proteins of rotavirus*. *Archives of Virology*, 2011. **156**(12): p. 2197-2203.
9. Taraporewala, Z.F. and J.T. Patton, *Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae*. *Virus Res*, 2004. **101**(1): p. 57-66.
10. Contreras-Trevino, H.I., et al., *Species A rotavirus NSP3 acquires its translation inhibitory function prior to stable dimer formation*. *Plos One*, 2017. **12**(7): p. e0181871.
11. Jayaram, H., M.K. Estes, and B.V. Prasad, *Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication*. *Virus Res*, 2004. **101**(1): p. 67-81.
12. Lopez, S. and C.F. Arias, *Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance*. *Trends Microbiol*, 2004. **12**(6): p. 271-8.
13. Estes, M., Kapikian AZ, *Rotaviruses: Field's Virology*. a Wolters Kluwer Business, ed. L.W. Wilkins. Vol. Two. 2007. 1917-1975.
14. Piron, M., et al., *Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3*. *Journal of Virology*, 1999. **73**(7): p. 5411-5421.
15. Vende, P., et al., *Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end*. *Journal of Virology*, 2000. **74**(15): p. 7064-7071.
16. Poncet, D., C. Aponte, and J. Cohen, *Rotavirus Protein Nsp3 (Ns34) Is Bound to the 3' End Consensus Sequence of Viral Messenger-Rnas in Infected-Cells*. *Journal of Virology*, 1993. **67**(6): p. 3159-3165.
17. Poncet, D., S. Laurent, and J. Cohen, *4 Nucleotides Are the Minimal Requirement for Rna Recognition by Rotavirus Nonstructural Protein Nsp3*. *Embo Journal*, 1994. **13**(17): p. 4165-4173.
18. Piron, M., et al., *Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F*. *Embo Journal*, 1998. **17**(19): p. 5811-5821.
19. Mattion, N.M., et al., *Characterization of an oligomerization domain and RNA-binding properties on rotavirus nonstructural protein NS34*. *Virology*, 1992. **190**(1): p. 68-83.

20. Deo, R.C., et al., *Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer*. Cell, 2002. **108**(1): p. 71-81.
21. Groft, C.M. and S.K. Burley, *Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization*. Molecular Cell, 2002. **9**(6): p. 1273-1283.
22. Padilla-Noriega, L., O. Paniagua, and S. Guzman-Leon, *Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis*. Virology, 2002. **298**(1): p. 1-7.
23. 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*. Journal of Virology, 2004. **78**(8): p. 3851-3862.
24. Montero, H., C.F. Arias, and S. Lopez, *Rotavirus nonstructural protein NSP3 is not required for viral protein synthesis*. Journal of Virology, 2006. **80**(18): p. 9031-9038.
25. Montero, H., et al., *Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2 alpha but prevents the formation of stress granules*. Journal of Virology, 2008. **82**(3): p. 1496-1504.
26. Harb, M., et al., *Nuclear Localization of Cytoplasmic Poly(A)-Binding Protein upon Rotavirus Infection Involves the Interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN*. Journal of Virology, 2008. **82**(22): p. 11283-11293.
27. Keryer-Bibens, C., et al., *The rotaviral NSP3 protein stimulates translation of polyadenylated target mRNAs independently of its RNA-binding domain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. **390**(2): p. 302-306.
28. Chattopadhyay, S., et al., *Computational identification of post-translational modification sites and functional families reveal possible moonlighting role of rotaviral proteins*. Bioinformatics, 2010. **4**(10): p. 448-51.
29. Dutta, D., et al., *The molecular chaperone heat shock protein-90 positively regulates rotavirus infection*. Virology, 2009. **391**(2): p. 325-333.
30. Dutta, D., et al., *Active Participation of Cellular Chaperone Hsp90 in Regulating the Function of Rotavirus Nonstructural Protein 3 (NSP3)*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(22): p. 20065-20077.
31. Trujillo-Alonso, V., et al., *Rotavirus Infection Induces the Unfolded Protein Response of the Cell and Controls It through the Nonstructural Protein NSP3*. Journal of Virology, 2011. **85**(23): p. 12594-12604.
32. Arnold, M.M., et al., *Rotavirus variant replicates efficiently although encoding an aberrant NSP3 that fails to induce nuclear localization of poly(A)-binding protein*. Journal of General Virology, 2012. **93**: p. 1483-1494.
33. Rubio, R.M., et al., *Rotavirus Prevents the Expression of Host Responses by Blocking the Nucleocytoplasmic Transport of Polyadenylated mRNAs*. Journal of Virology, 2013. **87**(11): p. 6336-6345.
34. Gratia, M., et al., *Rotavirus NSP3 Is a Translational Surrogate of the Poly(A) Binding Protein-Poly(A) Complex*. Journal of Virology, 2015. **89**(17): p. 8773-8782.
35. Gratia, M., et al., *Challenging the Roles of NSP3 and Untranslated Regions in Rotavirus mRNA Translation*. Plos One, 2016. **11**(1).
36. Theodoraki, M.A. and A.J. Caplan, *Quality control and fate determination of Hsp90 client proteins*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2012. **1823**(3): p. 683-688.
37. Hartl, F.U., A. Bracher, and M. Hayer-Hartl, *Molecular chaperones in protein folding and proteostasis*. Nature, 2011. **475**(7356): p. 324-332.
38. Hickey, E., et al., *Sequence and Regulation of a Gene Encoding a Human 89-Kilodalton Heat-Shock Protein*. Molecular and Cellular Biology, 1989. **9**(6): p. 2615-2626.



39. Zou, M., et al., *Evolutionarily conserved dual lysine motif determines the non-chaperone function of secreted Hsp90alpha in tumour progression*. *Oncogene*, 2017. **36**(15): p. 2160-2171.
40. Pratt, W.B., et al., *Proposal for a role of the Hsp90/Hsp70-based chaperone machinery in making triage decisions when proteins undergo oxidative and toxic damage*. *Experimental Biology and Medicine*, 2010. **235**(3): p. 278-289.
41. Yin, Z.Y., E.C. Henry, and T.A. Gasiewicz, *(-)-Epigallocatechin-3-gallate Is a Novel Hsp90 Inhibitor*. *Biochemistry*, 2009. **48**(2): p. 336-345.
42. Garnier, C., et al., *Binding of ATP to heat shock protein 90 - Evidence for an ATP-binding site in the C-terminal domain*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(14): p. 12208-12214.
43. Stebbins, C.E., et al., *Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: Targeting of a protein chaperone by an antitumor agent*. *Cell*, 1997. **89**(2): p. 239-250.
44. Jez, J.M., et al., *Crystal structure and molecular modeling of 17-DMAG in complex with human Hsp90*. *Chemistry & Biology*, 2003. **10**(4): p. 361-368.
45. Cao, Z., et al., *CHIP: A new modulator of human malignant disorders*. *Oncotarget*, 2016. **7**(20): p. 29864-29874.
46. Geller, R., S. Taguwa, and J. Frydman, *Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2012. **1823**(3): p. 698-706.
47. Faye, M.D. and M. Holcik, *The role of IRES trans-acting factors in carcinogenesis*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, 2015. **1849**(7): p. 887-897.
48. Prevot, D., J.L. Darlix, and T. Ohlmann, *Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G*. *Biology of the Cell*, 2003. **95**(3-4): p. 141-156.
49. Jackson, R.J., C.U.T. Hellen, and T.V. Pestova, *The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010. **11**(2): p. 113-127.
50. Sonenberg, N. and T.E. Dever, *Eukaryotic translation initiation factors and regulators*. *Current Opinion in Structural Biology*, 2003. **13**(1): p. 56-63.
51. von der Haar, T. and J.E. McCarthy, *Intracellular translation initiation factor levels in *Saccharomyces cerevisiae* and their role in cap-complex function*. *Mol Microbiol*, 2002. **46**(2): p. 531-44.
52. Duncan, R., S.C. Milburn, and J.W.B. Hershey, *Regulated Phosphorylation and Low Abundance of HeLa-Cell Initiation-Factor Eif-4f Suggest a Role in Translational Control - Heat-Shock Effects on Eif-4f*. *Journal of Biological Chemistry*, 1987. **262**(1): p. 380-388.
53. Gradi, A., et al., *A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G*. *Molecular and Cellular Biology*, 1998. **18**(1): p. 334-342.
54. Das, S. and B. Das, *eIF4G-an integrator of mRNA metabolism?* *Fems Yeast Research*, 2016. **16**(7).
55. Duncan, R. and J.W.B. Hershey, *Identification and Quantitation of Levels of Protein-Synthesis Initiation-Factors in Crude HeLa-Cell Lysates by Two-Dimensional Polyacrylamide-Gel Electrophoresis*. *Journal of Biological Chemistry*, 1983. **258**(11): p. 7228-7235.
56. Nielsen, K.H., et al., *Synergistic activation of eIF4A by eIF4B and eIF4G*. *Nucleic Acids Research*, 2011. **39**(7): p. 2678-2689.
57. Coldwell, M.J. and S.J. Morley, *Specific isoforms of translation initiation factor 4G1 show differences in translational activity*. *Molecular and Cellular Biology*, 2006. **26**(22): p. 8448-8460.

58. Coldwell, M.J., et al., *Expression of fragments of translation initiation factor eIF4GI reveals a nuclear localisation signal within the N-terminal apoptotic cleavage fragment N-FAG*. Journal of Cell Science, 2004. **117**(12): p. 2545-2555.
59. Pyronnet, S., et al., *Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits Mnk1 to phosphorylate eIF4E*. Embo Journal, 1999. **18**(1): p. 270-279.
60. Wells, S.E., et al., *Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors*. Molecular Cell, 1998. **2**(1): p. 135-140.
61. Michel, Y.M., et al., *Cap-poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts - Investigation of the requirements for poly(A)mediated stimulation of translation initiation*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(41): p. 32268-32276.
62. McKinney, C., C. Perez, and I. Mohr, *Poly(A) binding protein abundance regulates eukaryotic translation initiation factor 4F assembly in human cytomegalovirus-infected cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(15): p. 5627-5632.
63. Bushell, M., et al., *Cleavage of polypeptide chain initiation factor eIF4GI during apoptosis in lymphoma cells: characterisation of an internal fragment generated by caspase-3-mediated cleavage*. Cell Death Differ, 2000. **7**(7): p. 628-36.
64. Bushell, M., et al., *Changes in integrity and association of eukaryotic protein synthesis initiation factors during apoptosis*. European Journal of Biochemistry, 2000. **267**(4): p. 1083-1091.
65. Virgili, G., et al., *Structural Analysis of the DAP5 MIF4G Domain and Its Interaction with eIF4A*. Structure, 2013. **21**(4): p. 517-527.
66. Lei, J., et al., *Crystal structure of the middle domain of human poly(A)-binding protein-interacting protein 1*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011. **408**(4): p. 680-685.
67. Lankat-Buttgereit, B. and R. Goke, *Programmed cell death protein 4 (pdcd4): A novel target for antineoplastic therapy?* Biology of the Cell, 2003. **95**(8): p. 515-519.
68. Fan, S.L., M.Z. Jia, and W.M. Gong, *Crystal structure of the C-terminal region of human p97/DAP5*. Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 2010. **78**(10): p. 2385-2390.
69. Derry, M.C., et al., *Regulation of poly(A)-binding protein through PABP-interacting proteins*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 2006. **71**: p. 537-543.
70. Goke, A., et al., *DUG is a novel homologue of translation initiation factor 4G that binds eIF4A*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. **297**(1): p. 78-82.
71. Ribet, D. and P. Cossart, *Post-translational modifications in host cells during bacterial infection*. Febs Letters, 2010. **584**(13): p. 2748-2758.
72. Acar T., A.P.P., Karahan M., Akdeste Z. , *Post-translational modifications of proteins in Applications of Molecular Genetics in Personalized Medicine*, K. Ulucan, Editor. 2015, OMICS International Group eBooks: CA p. 20.
73. Brooks, S.A., *Functional interactions between mRNA turnover and surveillance and the ubiquitin proteasome system*. Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna, 2010. **1**(2): p. 240-252.
74. Huang, X.D. and V.M. Dixit, *Drugging the undruggables: exploring the ubiquitin system for drug development*. Cell Research, 2016. **26**(4): p. 484-498.
75. Wimmer, P. and S. Schreiner, *Viral Mimicry to Usurp Ubiquitin and SUMO Host Pathways*. Viruses-Basel, 2015. **7**(9): p. 4854-4872.
76. Tanaka, K., *The proteasome: from basic mechanisms to emerging roles*. Keio J Med. **62**(1): p. 1-12.

77. Bhattacharyya, S., et al., *Regulated protein turnover: snapshots of the proteasome in action*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014. **15**(2): p. 122-133.
78. Tai, H.C. and E.M. Schuman, *Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction*. Nature Reviews Neuroscience, 2008. **9**(11): p. 826-838.
79. Quadroni, M., A. Potts, and P. Waridel, *Hsp90 inhibition induces both protein-specific and global changes in the ubiquitinome*. Journal of Proteomics, 2015. **120**: p. 215-229.
80. Lopez, T., et al., *Replication of the Rotavirus Genome Requires an Active Ubiquitin-Proteasome System*. Journal of Virology, 2011. **85**(22): p. 11964-11971.
81. Pina-Vazquez, C., et al., *Post-translational regulation of rotavirus protein NSP1 expression in mammalian cells*. Archives of Virology, 2007. **152**(2): p. 345-368.
82. Reyna-Rosas, E., *Estudio de la relación estequiométrica in vivo entre el regulador traduccional NSP3 de rotavirus y el factor de iniciación 4g*, in *Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas*. 2012, Universidad Nacional Autónoma de México: Ciudad de México. p. 84.
83. Ward, G.A., et al., *Stringent chemical and thermal regulation of recombinant gene expression by vaccinia virus vectors in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 6773-7.
84. Aponte, C., et al., *Expression of two bovine rotavirus non-structural proteins (NSP2, NSP3) in the baculovirus system and production of monoclonal antibodies directed against the expressed proteins*. Arch Virol, 1993. **133**(1-2): p. 85-95.
85. Welnowska, E., et al., *Translation of mRNAs from Vesicular Stomatitis Virus and Vaccinia Virus Is Differentially Blocked in Cells with Depletion of eIF4GI and/or eIF4GII*. Journal of Molecular Biology, 2009. **394**(3): p. 506-521.
86. Satheshkumar, P.S., et al., *Inhibition of the ubiquitin-proteasome system prevents vaccinia virus DNA replication and expression of intermediate and late genes*. J Virol, 2009. **83**(6): p. 2469-79.
87. Fierro-Monti, I., et al., *Dynamic Impacts of the Inhibition of the Molecular Chaperone Hsp90 on T-Cell Proteome Have Implications for Anti-Cancer Therapy*. Plos One, 2013. **8**(11).
88. Rao, R., et al., *Co-treatment with heat shock protein 90 inhibitor 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (DMAG) and vorinostat A highly active combination against human mantle cell lymphoma (MCL) cells*. Cancer Biology & Therapy, 2009. **8**(13): p. 1273-1280.
89. Martinez, J., et al., *Oxidative and cold shock cause enhanced induction of a 50 kDa stress protein in Trichinella spiralis*. Parasitology Research, 2002. **88**(5): p. 427-430.
90. Ohlmann, T., et al., *The proteolytic cleavage of eukaryotic initiation factor (eIF) 4G is prevented by eIF4E binding protein (PHAS-I; 4E-BP1) in the reticulocyte lysate*. Embo J, 1997. **16**(4): p. 844-55.
91. Khurana, N. and S. Bhattacharyya, *Hsp90, the concertmaster: tuning transcription*. Frontiers in Oncology, 2015. **5**.
92. Wyckoff, E.E., J.W. Hershey, and E. Ehrenfeld, *Eukaryotic initiation factor 3 is required for poliovirus 2A protease-induced cleavage of the p220 component of eukaryotic initiation factor 4F*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(24): p. 9529-33.
93. Wyckoff, E.E., R.E. Lloyd, and E. Ehrenfeld, *Relationship of eukaryotic initiation factor 3 to poliovirus-induced p220 cleavage activity*. J Virol, 1992. **66**(5): p. 2943-51 .
94. Chaibi C., Cotte-Laffitte J., Sandré C., Esclatine A., Servin A.L., Quérou A.M., Géniteau-Legendre M, *Rotavirus induces apoptosis in fully differentiated human intestinal Caco-2 cells*. Virology. 2005. **20**;332(2):480-90

- 95 komoto, S., Kanai, Y., Fukuda, S., Kugita, M., Kawagishi, T., Ito, N., Sugiyama, M., Matsuura, Y., Kobayashi, T., Taniguchi, K. *Reverse Genetics System Demonstrates that Rotavirus Nonstructural Protein NSP6 Is Not Essential for Viral Replication in Cell Culture.* J Virol, 2017. **13**;91(21) e00695-17. doi: 10.1128/JVI.00695-17.

# The accumulation of rotavirus NSP3 dimers does not correlate with the extent of host cell translation inhibition

Edgar Reyna-Rosas<sup>1,2,3</sup> , Hugo I Contreras-Treviño<sup>1,2,3</sup>, Renato León-Rodríguez<sup>3</sup> , Leticia Rocha-Zavaleta<sup>3</sup> , Tzvetanka D Dinkova<sup>4</sup>  & Luis Padilla-Noriega<sup>\*2,3</sup> 

<sup>1</sup>Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

<sup>3</sup>Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

<sup>4</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

\*Author for correspondence: [lpadilla@unam.mx](mailto:lpadilla@unam.mx)

**Aim:** We aimed to determine the functionality of rotavirus NSP3 dimers. **Materials & methods:** We expressed rhesus rotavirus NSP3 and determined the kinetics of host cell translation inhibition and the levels of accumulated dimerization intermediates and dimers. **Results:** We observed a linear kinetics of host cell translation inhibition, which correlated well with the sum of the dimerization intermediates and dimers. Treatment with 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin reduced the accumulation of NSP3 dimers and potentiated host cell translation inhibition. **Conclusion:** Our results show that NSP3 dimer formation does not correlate with host cell translation inhibition and suggest that both NSP3 dimers and dimerization intermediates are functional and inhibit host cell translation.

**Lay abstract:** **Aim:** Two rotavirus NSP3 proteins join together to form 'rotavirus protein synthesis regulator (NSP3) two-subunit assemblages'. We aimed to determine the functionality of NSP3 two-subunit assemblages, which inhibit the synthesis of host proteins. **Materials & method:** We expressed NSP3 in cells and measured the level of host protein synthesis and the levels of partially formed NSP3 assemblages and fully formed NSP3 assemblages. **Results:** As inhibition of host protein synthesis increased linearly, so did the level of partially formed NSP3 assemblages and fully formed NSP3 assemblages. Treatment with alvespimycin (an inhibitor of NSP3 assemblage formation) reduced the accumulation of fully formed NSP3 assemblages and did not affect the accumulation of partially formed NSP3. Treatment with alvespimycin increased the inhibition of host protein synthesis. **Conclusion:** Our results showed that the level of NSP3 assemblages does not correlate with the level of inhibition of host protein synthesis. This suggests that both partially formed NSP3 assemblages and fully formed NSP3 assemblages are functional.

First draft submitted: 27 July 2020; Accepted for publication: 24 September 2020; Published online: 12 October 2020

**Keywords:** eukaryotic initiation factor-4G • gene expression regulation • Hsp90 heat-shock protein • NSP3 protein • protein dimerization • protein multimerization • RNA binding proteins • RNA viruses • rotavirus • ubiquitous tetratricopeptide containing protein RoXaN, human

*Rotavirus A* (RVA) is a species of the genus *Rotavirus* within the *Reoviridae* family. The genome of RVA consists of 11 segments of dsRNA that encode 11 or 12 proteins: six structural that form a triple-layered capsid (VP1 to VP4, VP6 and VP7) and six nonstructural (NSP1 to NSP5 and NSP6 in some strains) that participate in regulation of gene expression and viral replication, among other functions [1].

RVA NSP3 is a 34 kDa protein [1] with an RNA-binding domain (RBD) at its amino terminus (aa 1–149) that binds the 3'-terminal UGACC sequence of viral mRNAs and an eIF4G1-binding domain (GBD) at its carboxy terminus (aa 206–313) that binds eIF4G1 [2], a translation initiation factor with a key role in recruiting ribosomal 43S preinitiation complexes to eukaryotic mRNAs [3]. These domains are connected by a coiled-coil region (aa

159–245) that contain the minimum sequence sufficient to multimerize in a yeast two-hybrid system (two-hybrid interaction domain [HID], aa 150–206) [2] and a domain needed for the interaction with the cellular protein RoXaN, the RoXaN-binding domain (aa 163–237) [4]. RoXaN binds AU-rich elements that are present at the 3'-untranslated region of many short-lived mRNAs, thus affecting their stability and efficiency to be translated [5]. In addition, the coiled-coil overlaps a domain needed for binding to a chaperone, the Hsp90-binding domain (HS90BD, aa 225–258) [6]. In spite of the lack of the HID, both the RBD and the GBD are dimeric in the *in vitro* conditions used to crystalize them [7,8]. The RBD bound to the viral mRNA 3'-consensus hexanucleotide is an asymmetric homodimer with a single RNA-binding tunnel [7], whereas the GBD bound to a 30 residue fragment of eIF4G1 is a symmetric homodimer with two eIF4G1-binding sites [8].

The interaction between NSP3 and Hsp90 is essential for NSP3 dimerization and functionality. *In vitro* translated full-length NSP3 in the presence of the Hsp90 inhibitor 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG), as well as NSP3 lacking the HS90BD, were unable to dimerize [6]. In cells infected with RVA, the nuclear localization of poly(A)-binding protein (PABP) was impaired by treatment with 17-DMAG [6] and by combined mutations in the GBD (affecting binding to eIF4G1) and in the HID/RoXaN-binding domain (affecting dimerization and/or binding to RoXaN) [9,10]. Interestingly, Chawla-Sarkar and colleagues described nondissociating western blotting (WB-ND) as a method to differentiate NSP3 dimers from dimerization intermediates, which are transient forms of this protein consisting of two monomeric subunits bound to dimeric Hsp90 [6]. After *in vitro* translated NSP3 was coimmunoprecipitated with anti-Hsp90, the NSP3 proteins migrated as monomers by nondissociating electrophoresis, despite being dimerization intermediates. Further treatment of the immunoprecipitated NSP3-Hsp90 complexes with fresh reticulocyte lysates showed that the dimerization intermediates were converted to stable dimers free of Hsp90, according to their migration by WB-ND, which corresponded to the molecular weight of the dimer [6]. Although the ratio of *bona fide* monomers versus dimerization intermediates that together formed an apparently monomeric band in WB-ND is unknown, this band consisted mostly of dimerization intermediates, based on the vast difference in susceptibility to proteasomal degradation between the highly unstable *bona fide* monomers versus the relatively stable dimerization intermediates [6]. In addition, WB-ND was used to differentiate NSP3 dimers from dimerization intermediates by combining this method with protein synthesis inhibition via cycloheximide to show that the half-lives of these two forms of the NSP3 protein are different, with dimerization intermediates having a longer half-life (134 min) than dimers (60 min) [9]. Finally, WB-ND was used to show that *bona fide* NSP3 monomers are far more susceptible to the proteasome than dimers or dimerization intermediates [6].

RVA NSP3 inhibits [11] or under some conditions, slightly favors the translation of host cell mRNAs, in other words, capped and polyadenylated mRNAs [12]. In addition, NSP3 dramatically enhances the translation of RVA mRNAs, in other words, capped and containing the 3'-end sequence UGACC [13,14]. Using the vaccinia virus expression system described below, NSP3 severely inhibited the translation of cellular and vaccinia viral mRNAs, both of which are similarly capped and polyadenylated [11]. In contrast, truncated NSP3 with full-length RBD and GBD but lacking the HID was not functional to inhibit host cell translation [11]. Two hypotheses to explain NSP3 host cell translation inhibition have been proposed. First, Piron *et al.* proposed that NSP3 inhibits the translation of cellular polyadenylated mRNAs by disrupting 5'-to-3' mRNA interactions based on the finding that NSP3 removed PABP from eIF4G1 *in vitro* [15]. Second, Contreras-Treviño *et al.* proposed that NSP3 sequesters eIF4G1 in NSP3 dimerization intermediates with the chaperone Hsp90 based on the ability of NSP3 point mutants with intact HS90BDs to inhibit host cell translation although their ability to form dimers was severely impaired [9]. Furthermore, using a cell line constitutively expressing NSP3 or transient cytoplasmic NSP3 expression programmed by electroporation with RVA-like mRNAs (capped and with the 3'-terminal sequence UGACC), NSP3 dramatically enhanced the translation of viral mRNAs [13,14]. In one of these studies, NSP3 mutants with deletions in the RBD or GBD failed to enhance RVA-like mRNA translation, suggesting that NSP3 brings viral mRNAs into contact with the translation initiation complex by simultaneously interacting with eIF4G1 and the 3' end of viral mRNA [14]. Further studies have questioned the ability of NSP3 to enhance translation of RVA mRNAs based on data showing that the knockdown of NSP3 expression in RVA-infected cells by RNA interference failed to inhibit viral protein synthesis [16]. This study could not eliminate the possibility that very little NSP3 is sufficient to allow the synthesis of viral proteins. Paradoxically, NSP3 also slightly enhances host cell translation under conditions that are difficult to compare with studies showing the opposite effect, as the levels of NSP3 expression in each case are unknown. Using RVA-infected cells or a cell line stably expressing NSP3 programmed by electroporation with synthetic polyadenylated or nonpolyadenylated mRNAs, NSP3 slightly enhanced the translation of both

polyadenylated and nonpolyadenylated mRNAs [12]. The NSP3 expression levels in these assays were low due to the effect of electroporation and/or the low constitutive NSP3 expression of the cell line used. In contrast, the vaccinia virus expression system that was used to demonstrate the inhibitory effect of NSP3 on host cell and vaccinia virus translation yielded extremely high expression levels of nontoxic proteins [17].

We aimed to determine the level of host cell translation inhibition under conditions of differential NSP3 expression likely to affect the ratio of dimers versus dimerization intermediates. Knowledge of the functionality of NSP3 dimerization intermediates and dimers was expected to contribute to deciphering the mechanism by which NSP3 inhibits host cell translation. To address this aim, we used an inducible vaccinia viral expression system to determine the kinetics of the accumulation of total NSP3 and its presumed functional forms, dimerization intermediates and dimers and the effect of these forms on host cell translation determined by metabolic labeling of proteins. We also tested the ability of NSP3 dimerization intermediates to inhibit host cell translation by inhibition of Hsp90-dependent NSP3 dimerization with 17-DMAG, followed by an assessment of its effect on host cell translation. Our results show that the level of accumulated NSP3 dimers does not necessarily correlate with the extent of host cell translation inhibition and suggest that both NSP3 dimers and dimerization intermediates are functional and inhibit host cell translation.

## Materials & methods

### Reagents & antibodies

The following reagents were used: isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Research Organics, OH, USA, cat. 70571) and 17-DMAG (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA, cat. SC-20-2005). The following commercially available primary antibodies were used: mouse monoclonal anti-GAPDH (EMD Millipore, MA, USA, cat. MAB374), mouse monoclonal anti-Hsp90 (developed against full-length Hsp90 [Hsp90fl], Santa Cruz Biotechnology, cat. SC-69703) and mouse monoclonal anti-Hsp90 (developed against aa 586–732 near the carboxy terminus of Hsp90 [Hsp90ct], BD Biosciences, NJ, USA, cat. 610419). The following horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were used: chicken antirat IgG (Santa Cruz Biotechnology, cat. SC-2956) and goat antimouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, cat. SC-2005). Hyperimmune anti-NSP3 rat serum was produced in our laboratory against recombinant full-length NSP3 (aa 4–315) of the simian RVA SA11 (E. Reyna-Rosas, Unpublished Data).

### Cells & viruses

The *Cercopithecus aethiops* BS-C-1 cell line (ATCC CCL-26) was obtained from R. Rosales (Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico). The HeLa human cervical cancer cell line (ATCC CCL-2) was obtained from A. Gonzalez-Noriega (Universidad Nacional Autónoma de México). The vaccinia virus vT7lacOI was obtained from B. Moss (National Institutes of Health, MD, USA). The vaccinia virus vNSP3 (formerly named vRRV7) containing rhesus rotavirus (RRV) gene 7 to express wild-type NSP3 was produced in our laboratory [11]. The BS-C-1 and HeLa cell lines were cultured at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in Eagle's minimum essential medium supplemented with 7% fetal bovine serum (Biowest, Mexico) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin).

### Metabolic labeling of proteins in vaccinia virus-infected cells

We expressed the RRV NSP3 gene using the VOTE (vaccinia virus/*lac* operon/T7 RNA polymerase/encephalomyocarditis [EMC] internal ribosome entry site [IRES]) mammalian cell expression system. In the VOTE system, mammalian cells are infected with a recombinant vaccinia virus carrying the target gene transcribed from a T7 RNA polymerase promoter, whose expression is regulated by an *Escherichia coli lac* operator and the presence of an IRES from the EMC virus in the target gene mRNA results in high levels of expression [17]. We performed metabolic labeling of proteins with [<sup>35</sup>S]-methionine and [<sup>35</sup>S]-cysteine in BS-C-1 cells infected with the vNSP3 virus carrying the NSP3 gene or its parental virus vT7lacOI lacking the NSP3 gene, as previously described [9] with some modifications. Briefly, confluent BS-C-1 cells in six-well plates were infected with vaccinia virus at a multiplicity of infection (MOI) of 10. In some experiments, 0, 0.5 or 10  $\mu$ M 17-DMAG was added at 3 h postinfection (hpi) and 2 h before induction. Subsequently, at different times prior to metabolic labeling of proteins, the inducer IPTG (0, 12.5, 50 or 2000  $\mu$ M) was added and maintained. Thirty minutes ahead of completing induction, the cells were starved for 30 min at 37°C with methionine- and cysteine-free Dulbecco's modified Eagle medium (Thermo Fisher Scientific, MA, USA, cat. MT17204Cl). Labeling was started

simultaneously in all wells, in other words, at the same postinfection time, by adding 20  $\mu\text{Ci}/\text{well}$  EasyTag Express protein labeling mix [ $^{35}\text{S}$ ] (PerkinElmer, MA, USA, cat. NEG772) in 500  $\mu\text{l}$  of methionine- and cysteine-free Dulbecco's modified Eagle medium. The cells were incubated for 1 h and harvested by washing twice with cold phosphate-buffered saline (PBS), followed by scraping in 1 ml of cold PBS. The cells were divided into two 0.5 ml aliquots per well and centrifuged at  $13,200 \times g$  for 5 min. The cell pellets were suspended in 20  $\mu\text{l}$  of lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.4 U/ml DNase I, 0.01 mg/ml RNase A and Complete<sup>®</sup> protease inhibitors [Hoffman La Roche, Basel, Switzerland, cat. 11836153001]) and incubated for 10 min at room temperature. The cell lysates were mixed with 20  $\mu\text{l}$  of  $2\times$  Laemmli sample buffer (62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8], 20% glycerol, 4% SDS and 2%  $\beta$ -mercaptoethanol) and heated in a boiling water bath for 5 min. Labeled proteins were separated by 12% SDS-PAGE and analyzed by autoradiography and densitometry. Molecular weight was assessed based on predominant late vaccinia viral proteins detected in cells infected with vT7lacOI [18]. Analysis to determine the effect of NSP3 on host cell translation was performed by quantitating the densitometry profiles (excluding the NSP3 band) of three independent experiments performed on different days.

### Western blotting & nondissociating western blotting

Western blotting (WB) and WB-ND were performed as previously described [9] with some modifications. Briefly, BS-C-1 cells in six-well plates ( $9.5 \times 10^5$  cells per well) were infected with vNSP3 or vT7lacOI at an MOI of 10. In some experiments, 0, 0.5 or 10  $\mu\text{M}$  17-DMAG was added at 3 hpi. Subsequently, at the indicated time, the inducer IPTG (0, 12.5, 50 or 2000  $\mu\text{M}$ ) was added and maintained. At the end of induction, the cells were harvested by washing twice with cold PBS and scraping in 1 ml of cold PBS. The cells were divided into four 0.25 ml aliquots and centrifuged at  $13,200 \times g$  for 5 min. The cell pellets were suspended in 20  $\mu\text{l}$  of lysis buffer, incubated for 10 min at room temperature and sonicated 3-times for 20 s in a cold environment. Under dissociating conditions (WB), the cell lysates were mixed with 20  $\mu\text{l}$  of  $2\times$  Laemmli sample buffer and heated in a boiling water bath for 5 min. Under nondissociating conditions (WB-ND), the cell lysates were mixed with 20  $\mu\text{l}$  of  $2\times$  nondissociating sample buffer (62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8], 0.8% SDS and 20% glycerol) and incubated for 30 min on ice. The proteins were separated by 12% SDS-PAGE (conducted in a cold room for WB-ND) and transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Bio-Rad, CA, USA, cat. 162–0177). One lane of biotinylated protein markers (Cell Signaling Technology, MA, USA, cat. 7727) was used to estimate the sizes of the proteins. The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline (TBS) at room temperature for 1 h. The membranes were incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  with anti-NSP3 (1:20,000), anti-Hsp90ct (1:8000) or anti-GAPDH (1:15,000) in 1% nonfat dry milk in T-TBS (0.05% Tween-20 in TBS), followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated antirat IgG (1:20,000) or horseradish peroxidase-conjugated antimouse IgG (1:20,000) in 1% nonfat dry milk in T-TBS for 1 h at room temperature. Finally, the blots were developed with SuperSignal West Femto chemiluminescence substrate (Pierce, IL, USA) according to the manufacturer's instructions. The blots were detected using x-ray film (X-Omat, Eastman Kodak Company, NY, USA). Densitometry analysis from three independent experiments performed on different days was performed with ImageJ software (NIH, MD, USA) by analyzing the pixels for the low-molecular-weight NSP3 band, consisting of dimerization intermediates and the high-molecular-weight band, consisting of NSP3 stable dimers, but excluding the smeared band of high molecular weight forms of NSP3 that migrated above the dimer band. Densitometry values were normalized to the loading control using the formula  $X(\text{target protein}) = X(\text{loading control}) \text{ maximum}/X(\text{loading control})$  each lane and the average values of the normalized data were brought into the same range [0,1] using the formula  $X' = X/X\text{maximum}$ . All WB and WB-ND images shown in black outlined rectangles were obtained from single blots.

### Immunoprecipitation

HeLa cells in six-well plates were infected with vNSP3 or vT7lacOI at an MOI of 10. Subsequently, at 2 hpi the inducer IPTG (12.5  $\mu\text{M}$ ) was added. After 16 h of induction, the cells from each well ( $\sim 9.5 \times 10^5$  cells) were washed twice with cold PBS, scraped in 1 ml of cold PBS and spun at  $13,200 \times g$  for 5 min. The cell pellets were then used for immunoprecipitation assays with a Pierce crosslink immunoprecipitation kit (Thermo Fisher Scientific, cat. 26147) according to the manufacturer's instructions, except that the optional protease inhibitors were substituted with Complete protease inhibitor cocktail. During the immunoprecipitation step, 3  $\mu\text{l}$  of hyperimmune anti-NSP3 serum, 20  $\mu\text{l}$  of anti-Hsp90fl or 40  $\mu\text{l}$  of anti-Hsp90ct IgG were included. Samples were processed by 12% SDS-PAGE and WB assays were developed as indicated above.



### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, CA, USA). The effect of 17-DMAG on host cell translation inhibition or RVA NSP3 was analyzed using one-way or two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test, respectively, with a 95% CI. The effect of low RVA NSP3 expression in the absence of inducer was analyzed using Student's *t*-test. Values of  $p \leq 0.05$  indicated statistical significance.

## Results

### RVA NSP3 expression leads to slow linear kinetics of host cell translation inhibition

We studied the kinetics of host cell translation inhibition and the accumulation of total NSP3 using the inducible vaccinia virus VOTE system [17]. Using this system, high levels of NSP3 expression have been shown in cells infected with the recombinant vaccinia virus vNSP3 carrying the RRV NSP3 gene compared with its parental strain vT7lacOI lacking the NSP3 gene [11]. BS-C-1 cells were infected with vNSP3 or the control virus, vT7lacOI, and NSP3 expression was induced from 0 to 20 h with 2 mM IPTG prior to pulse labeling with [<sup>35</sup>S]-labeled amino acids and harvesting. The results were analyzed by SDS-PAGE, autoradiography and densitometry analysis (Figure 1A). As determined by three independent experiments, the expression of RRV NSP3 led to a slow linear kinetics of host cell translation inhibition, reaching a maximum 70% reduction in host cell translation at 20 h postinduction (Figure 1B).

### Comparison of the kinetics of NSP3 synthesis & accumulation

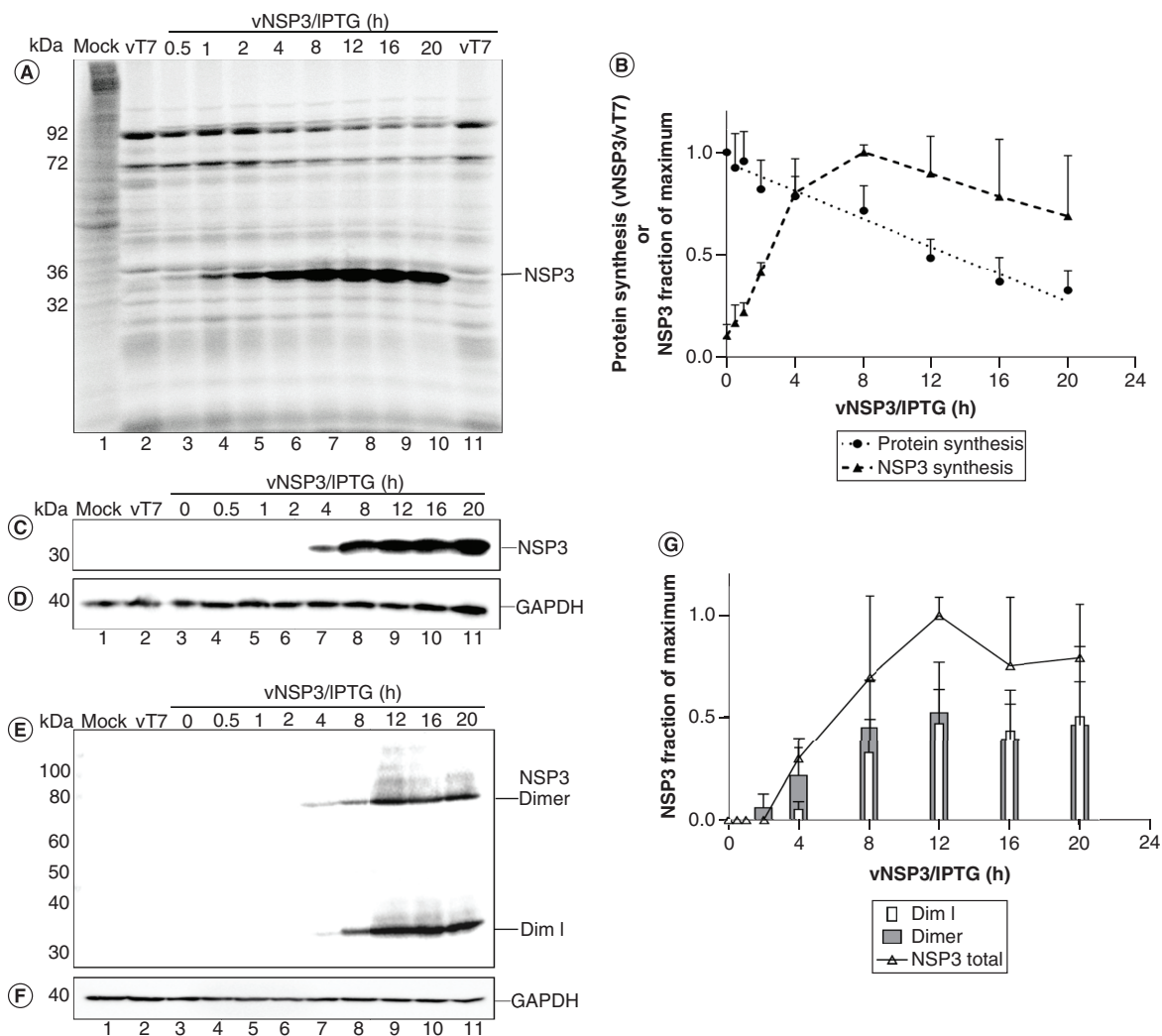
Based on the metabolic labeling data shown in Figure 1A, we determined the kinetics of NSP3 synthesis obtained with 0–20 h of induction (Figure 1A). NSP3 synthesis increased exponentially, reaching a maximum at 8 h postinduction and surprisingly, the expression level remained high over the following 12 h, with a small gradual decrease of at most 33% compared with the earlier peak by 20 h postinduction (Figure 1B). We also determined the rate of NSP3 accumulation over 0–20 h of induction using WB with anti-NSP3 or anti-GAPDH antibodies (Figure 1C & D). Based on three independent experiments, the accumulation of NSP3 increased linearly after induction, apparently lagging behind NSP3 synthesis, reached a maximum at 12 h postinduction and remained constant for the following 8 h (Figure 1G). The identification of an early exponential NSP3 accumulation, followed by a long plateau phase accompanied by a minimal decline in NSP3 synthesis, suggests that post-translational regulation occurs to maintain a constant level of accumulated NSP3.

### The slow linear kinetics of host cell translation inhibition correlates with the sum of the NSP3 dimerization intermediate & dimer

Because the correlation between the rates of host cell translation inhibition and NSP3 accumulation had not been thoroughly examined, the correlation between the rates of host cell translation inhibition and the accumulation of two forms of the protein that are presumably functional, in other words, dimers and dimerization intermediates, was determined. Previous studies had demonstrated that the band with a molecular weight corresponding to that of the monomer determined by WB-ND consisted of mostly dimerization intermediates [9]. BS-C-1 cells were infected with the recombinant vaccinia viruses vNSP3 or vT7lacOI and NSP3 expression was induced from 0 to 20 h with 2 mM IPTG prior to harvesting and analysis by WB-ND with anti-NSP3 or anti-GAPDH antibodies (Figure 1E & F). As determined by three independent experiments, NSP3 dimers accumulated in a linear manner over the first 8 h postinduction, after which accumulated NSP3 dimer levels were maintained (Figure 1G). Similarly, NSP3 dimerization intermediates accumulated in a linear manner over the first 12 h postinduction, after which accumulated dimerization intermediate levels were maintained. Interestingly, the sum of NSP3 dimers and dimerization intermediates showed approximate linear kinetics over the same length of time as total NSP3, in other words, 12 h of induction and correlated best with the linear rate of host cell translation inhibition, in contrast with the accumulation of NSP3 dimers, which reached its maximum level as early as 8 h postinduction. In this study and in previous studies, we consistently observed a smeared band over a range of molecular weights higher than the molecular weight of the dimer late after induction, as determined by WB-ND (Figure 1E) [9].

### Inhibition of NSP3 dimerization with 17-DMAG reduces the accumulation of NSP3 dimers & potentiates host cell translation inhibition

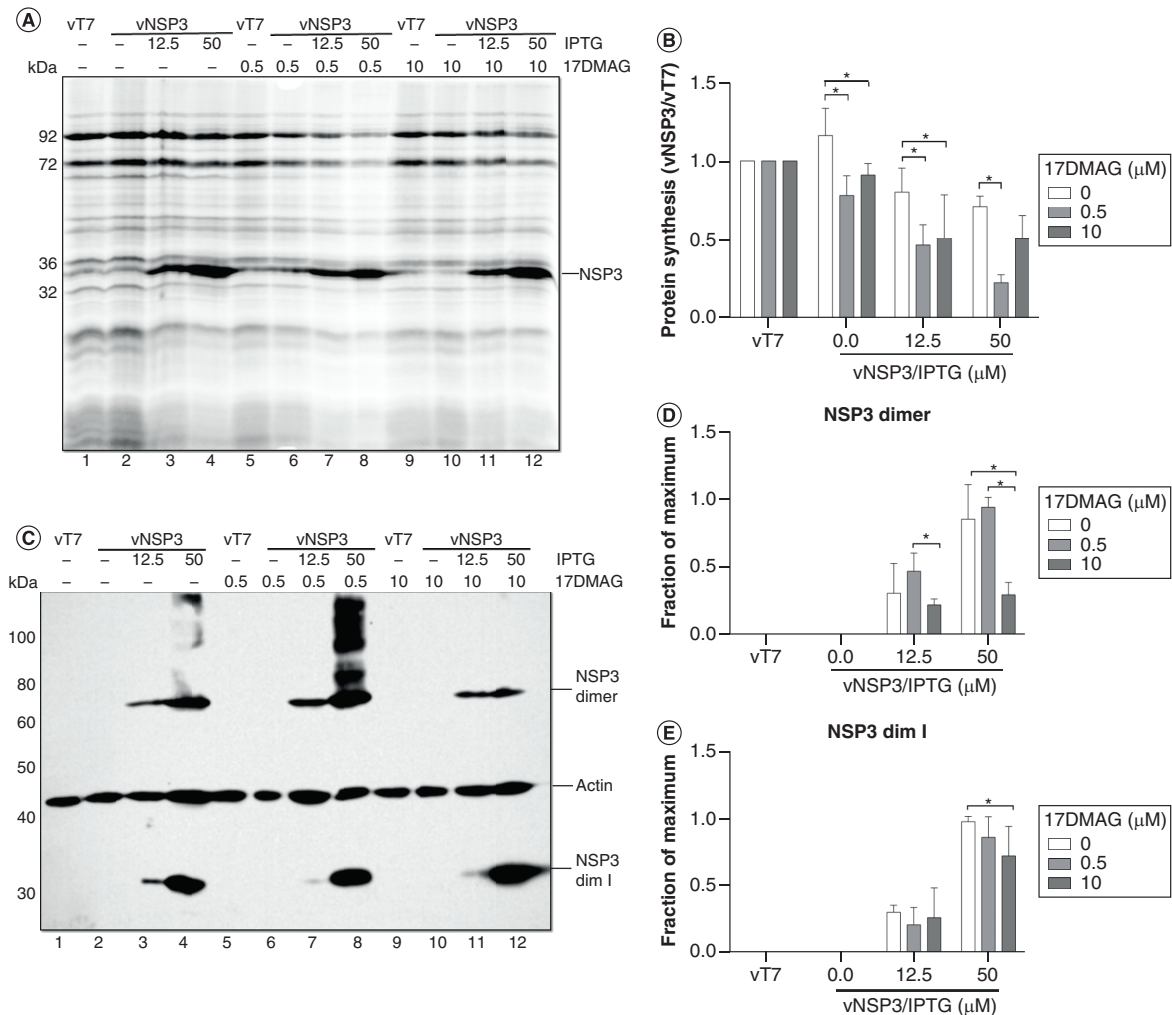
Based on prior *in vitro* studies demonstrating that 17-DMAG inhibits NSP3 dimerization [6], we aimed to determine the *in vivo* effect of 17-DMAG on NSP3 dimerization and host cell translation inhibition. 17-DMAG inhibits



**Figure 1. Kinetics of host cell translation inhibition, NSP3 synthesis and NSP3 dimer and dimerization intermediate accumulation in BS-C-1 cells infected with vNSP3.** Identical numbers of BS-C-1 cells were mock infected or infected with the parental virus vT7lacOI (vT7) or vNSP3 at an MOI of 10. Expression of NSP3 was induced with 2 mM IPTG for the indicated periods prior to pulse labeling. One set of cells was pulse labeled for 1 h with [<sup>35</sup>S]-methionine and [<sup>35</sup>S]-cysteine and the second set was incubated for 1 h without metabolic labeling. Finally, the cells were harvested at 23 h postinfection; the first set of cells was analyzed by SDS-PAGE and autoradiography (A), and the second set was analyzed by WB (C & D) and WB-ND (E & H) with anti-NSP3 or anti-GAPDH antibodies. The molecular weights of four predominant vaccinia virus proteins detected in cells infected with vT7lacOI (A) and those of molecular weight markers (C, D, E and F) are indicated to the left. Based on densitometry analysis of three independent metabolic labeling experiments, the fraction of total protein synthesis in cells infected with vNSP3 (compared with cells infected with vT7lacOI) and the fraction of maximum NSP3 synthesis were determined (B). In addition, based on three experiments without metabolic labeling, the accumulation of total NSP3 was determined by WB and the accumulation of NSP3 dimers and dimerization intermediates was determined by WB-ND (G). Error bars indicate the standard deviation.

IPTG: Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside; MOI: Multiplicity of infection; WB: Western blotting; WB-ND: Nondissociating western blotting.

the ATPase activity of Hsp90, which affects the dissociation of the chaperone from its client proteins [19]. We anticipated that this drug would revert the inhibitory effect of NSP3 on host cell translation, commensurate with its effect on NSP3 dimerization. To address this aim, BS-C-1 cells were infected with the recombinant vaccinia viruses vNSP3 or vT7lacOI and treated with a low or high dose of 17-DMAG, in other words, 0.5 or 10 μM, respectively. The cells were then induced for 20 h with a low or medium dose of IPTG, in other words, 12.5 or 50 μM, respectively, pulse labeled for 1 h with [<sup>35</sup>S]-labeled amino acids and harvested. The harvested cells were



**Figure 2.** The effect of low and high doses of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin on host cell translation inhibition and accumulation of the dimeric and dimerization intermediate forms of NSP3 in BS-C-1 cells infected with vNSP3 under treatment with an inducer at low and medium doses. Identical numbers of BS-C-1 cells were infected with vT7lacOI (vT7) or vNSP3 at an MOI of 10. The infected cells were treated with 0, 0.5 or 10  $\mu$ M 17-DMAG at 3 h postinfection and induced with 0, 12.5 or 50  $\mu$ M IPTG at 5 h postinfection. After 16 h of induction in the presence of the drug, one set of cells was pulse-labeled for 1 h with [ $^{35}$ S]-methionine and [ $^{35}$ S]-cysteine and a second set of cells was incubated for 1 h without metabolic labeling. Finally, the cells were harvested at 22 h postinfection; the first set of cells was analyzed by SDS-PAGE and autoradiography (A), and the second set was analyzed by WB-ND with anti-NSP3 and anti-actin antibodies (C). The molecular weights of four predominant vaccinia viral proteins detected in cells infected with vT7lacOI (A) and those of molecular weight markers (C) are indicated to the left. Based on densitometry analysis in three independent experiments, the fraction of total protein synthesis in cells infected with vNSP3 was determined and compared with that in cells infected with vT7lacOI (B), and the accumulation of NSP3 dimers (D) or dimerization intermediates (E) was determined. Error bars indicate the standard deviation. Asterisks indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) determined by two-way ANOVA. 17-DMAG: 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin; IPTG: Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside; MOI: Multiplicity of infection; WB-ND: Nondissociating western blotting.

analyzed by SDS-PAGE, autoradiography (Figure 2A) and WB-ND with anti-NSP3 and anti-beta actin antibodies (Figure 2C). Based on three independent experiments, the low dose of 17-DMAG potentiated host cell translation inhibition with the inducer at both doses by less than twofold with 12.5  $\mu$ M IPTG and up to threefold with 50  $\mu$ M IPTG (Figure 2B). In addition, unexpectedly, 17-DMAG at both doses enhanced host cell translation inhibition in the absence of the inducer (Figure 2B). Previous studies demonstrated that under hypertonic conditions (which favor the translation of mRNAs containing the IRES of the EMC virus), the infection of BS-C-1 cells with vNSP3 inhibited host cell translation by 33% in the absence of the inducer and in the absence of detectable NSP3 [11]. This

finding strongly suggests that despite the lack of an inducer, cells infected with vNSP3 express low levels of NSP3. Based on three independent WB-ND experiments, inducer at the medium dose tested (50  $\mu$ M) combined with a high dose of 17-DMAG caused a threefold decrease in the accumulation of NSP3 dimers (Figure 2D), marginally reduced the accumulation of dimerization intermediates (Figure 2E), and most strikingly, caused the smeared band of high molecular weight, that migrates above the dimers, to disappear (Figure 2C). The association between reduced levels of NSP3 dimer accumulation and potentiation of its host cell translation inhibitory function in cells treated with 17-DMAG demonstrates that the level of NSP3 dimer accumulation does not necessarily correlate with the extent of host cell translation inhibition. Based on these data, it remains unclear whether the reduction in NSP3 dimer accumulation depends on the effects of the drug on the input or degradation of NSP3 dimers or both.

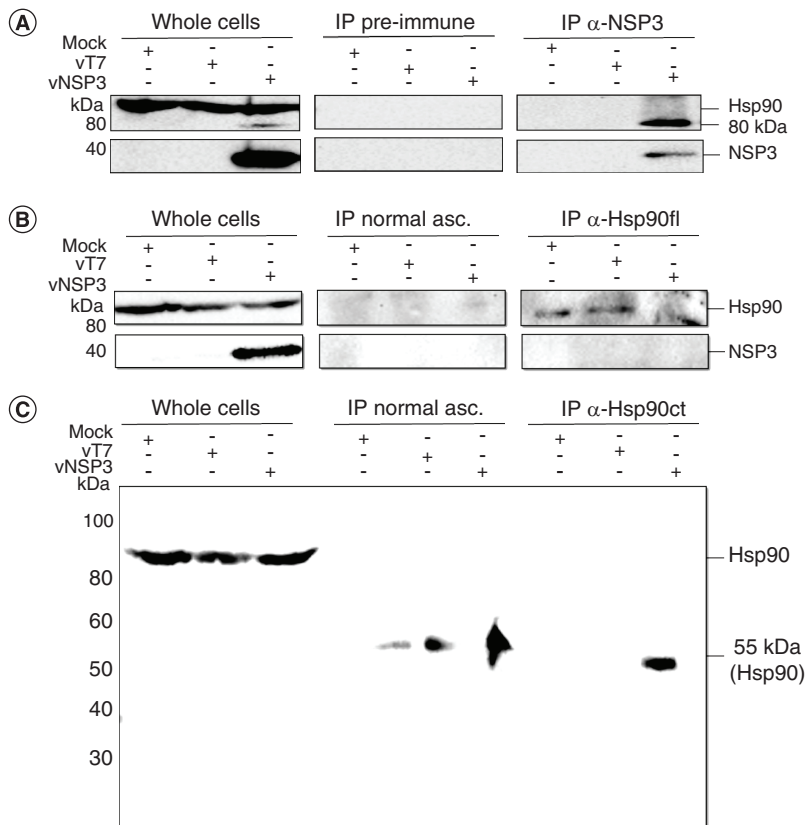
### NSP3 coimmunoprecipitates with an 80 kDa putative cleavage product of Hsp90

Prior studies showed coimmunoprecipitation of NSP3 with Hsp90 in *C. aethiops* MA-104 cells infected with the simian RVA SA11 and direct association of the HS90BD with the C-terminal 12-kDa region of Hsp90 (Hsp90 alpha aa 629–731) using a mammalian cell two-hybrid system [6]. Based on these data, NSP3 was expected to interact with Hsp90 in any mammalian cell; despite this, we were unable to detect coimmunoprecipitation of NSP3 with Hsp90 in preliminary assays using BS-C-1 cells (data not shown). Therefore, we switched to the use of the HeLa human cell line, which is commonly used in immunoblot assays involving translation initiation factors [20]. To confirm the interaction of NSP3 with Hsp90 and start to study their interactions with other cellular proteins, HeLa cells were mock infected or infected with the recombinant vaccinia viruses vNSP3 or vT7lacOI and after induction for 16 h with 12.5  $\mu$ M IPTG, the cells were harvested and analyzed by coimmunoprecipitation of NSP3 with Hsp90. Cells infected with vNSP3 and blotted with a monoclonal anti-Hsp90 antibody showed high amounts of Hsp90 and small amounts of an 80 kDa protein, which was possibly a degradation product of Hsp90, absent in cells infected with vT7lacOI (Figure 3A, left panel). Anti-NSP3 antibody precipitated NSP3 and failed to coimmunoprecipitate detectable amounts of Hsp90fl but rather gave rise to an 80 kDa protein detectable with anti-Hsp90 antibody (Figure 3A, right panel) and both proteins were absent upon immunoprecipitation with preimmune serum (Figure 3A, central panel). On the other hand, monoclonal antibody against Hsp90fl immunoprecipitated Hsp90 in mock-infected cells or cells infected with vT7lacOI but failed to immunoprecipitate detectable Hsp90 in cells infected with vNSP3 (Figure 3B, right panel); therefore, the coimmunoprecipitation of Hsp90 with NSP3 could not be confirmed using this protocol. After our failure to immunoprecipitate Hsp90 with a monoclonal antibody against Hsp90fl we decided to use a second monoclonal antibody against the Hsp90ct (anti-Hsp90ct). The monoclonal anti-Hsp90ct detected Hsp90fl in mock-infected cells and cells infected with both vaccinia viruses and immunoprecipitated a 55 kDa protein in cells infected with vNSP3 (Figure 3C, right panel), which was absent upon immunoprecipitation with normal ascites fluid (Figure 3C, central panel). These results demonstrate that expression of NSP3 alters the susceptibility of Hsp90 to proteolytic cleavage, possibly as a direct consequence of the interaction of NSP3 with Hsp90.

### Discussion

The following two hypotheses explain RVA NSP3 host cell translation inhibition. One hypothesis proposes that mature NSP3 dimers remove PABP from eIF4G1 to disrupt the 5'-to-3' interaction of capped and polyadenylated mRNAs that participate in translation initiation and the second hypothesis proposes that NSP3 dimerization intermediates sequester eIF4G1 prior to its involvement in translation initiation. In this study, we expressed NSP3 using an inducible vaccinia virus system under conditions likely to affect the ratio of the putative functional forms of NSP3, NSP3 dimers and dimerization intermediates.

We first determined the association between the kinetics of host cell translation inhibition and the accumulation of NSP3 dimers and dimerization intermediates. The expression of RRV NSP3 led to a slow linear kinetics of host cell translation inhibition, which correlated well with the linear increase in the sum of accumulated NSP3 dimerization intermediates and dimers, a finding that is consistent with the presumed functionalities of both forms of the protein. Clearly, the slow kinetics of host cell translation inhibition in the VOTE system was not limited by the rate of NSP3 synthesis, based on evidence that the protein was exponentially synthesized and consequently accumulated at a high rate early after induction, presumably reaching a plateau phase when the remarkably high rates of synthesis and degradation were balanced. Moreover, although the VOTE system yields up to 2 mg of  $\beta$ -galactosidase per  $10^8$  cells in 24 h [17], we estimated that the maximum yield of NSP3 produced by the VOTE



**Figure 3. Coimmunoprecipitation of NSP3 with a putative cleavage product of Hsp90 in HeLa cells.** Identical numbers of HeLa cells were mock infected, infected with vT7lacOI (vT7) or infected with vNSP3 at an MOI of 10, and at 2 h postinfection, the cells were induced with 12.5  $\mu$ M IPTG. At 18 h postinfection, the cells were harvested, lysed and immunoprecipitated with antibody against NSP3 (A), Hsp90fl (B) or the Hsp90ct (C). As controls, the cell lysates were also immunoprecipitated with preimmune serum (A) or normal ascites fluid (B & C). The presence of Hsp90 or NSP3 in the immunoprecipitates was detected by WB with anti-Hsp90ct (A, B & C) and anti-NSP3 antibodies (A & B), respectively.

Hsp90ct: Carboxy terminus of Hsp90; Hsp90fl: Full-length Hsp90; IPTG: Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside; MOI: Multiplicity of infection; WB: Western blotting.

system in our hands was 100-fold lower (data not shown). The finding in this study that a fraction of the total NSP3 detected early after induction was not detectable by WB-ND, a poor method to detect the unstable monomeric form of this protein [6,9], suggests that even before NSP3 accumulation plateaued, a major fraction of the protein was degraded. We do not know why the level of NSP3 accumulation remained remarkably constant during the long plateau phase, a finding that suggests that degradation of this protein is somehow regulated. Notably, in one prior study, BS-C-1 cells infected with RRV, the same cell line infected with the same RVA strain from which the NSP3 gene used in this study was sourced, showed much faster host cell translation inhibition that reached 70% at 6 hpi [21], compared with the 20 hpi it took to reach that level of inhibition in cells infected with vNSP3, possibly as a consequence of the absence of RVA mRNAs and proteins in our recombinant NSP3 expression system. Gene expression in RVA-infected cells is widely affected at the transcriptional level [22] and apoptosis is increasingly induced with increasing MOI and time after infection [23]. Our recombinant NSP3 expression system did not reproduce the conditions in RVA-infected cells; hence, our results cannot be directly extrapolated to what occurs in these cells.

Previous studies suggest that NSP3 sequesters eIF4G1 in a ternary complex with Hsp90 prior to the involvement of this initiation factor in ribonucleoprotein complexes during translation initiation [9]. In this study, we failed to confirm the interaction of NSP3 with Hsp90 by coimmunoprecipitation assays in HeLa cells, in contrast to prior studies that demonstrated coimmunoprecipitation of NSP3 with Hsp90 in MA-104 cells infected with SA11 [6]. Based on our findings, in the presence of NSP3 Hsp90 is cleaved into at least an 80 kDa polypeptide

that coimmunoprecipitates with NSP3 and a 55 kDa polypeptide that does not coimmunoprecipitate with NSP3. These results suggest that Hsp90 bound to NSP3 is susceptible to cleavage by an unidentified protease. Hsp90 is a flexible dimeric protein which adopts structurally distinct conformations, as shown for example by *in vitro* proteolytic footprinting studies revealing that (-)-epigallocatechin-3-gallate binds and modulates the conformation of this chaperone [24].

We also tested the effect of the Hsp90 inhibitor 17-DMAG on NSP3 dimerization and the ability of NSP3 to inhibit host cell translation. Previous studies demonstrated that 17-DMAG inhibits NSP3 dimerization *in vitro*, induces NSP3 degradation in transfected cells and reduces the translation of viral proteins in RVA-infected cells [6]. Moreover, a related Hsp90 inhibitor, 17-allylamino-demethoxygeldanamycin, attenuated RVA replication in MA-104 cells [25]. Surprisingly, treatment with 17-DMAG in cells expressing NSP3 failed to revert host cell translation inhibition but instead potentiated host cell translation inhibition up to threefold and reduced the accumulation of NSP3 dimers up to threefold, while the accumulation of dimerization intermediates was not affected. These findings demonstrate that the level of NSP3 dimer accumulation does not correlate with the level of host cell translation inhibition, at least in the presence of 17-DMAG. The most striking effect of treatment with 17-DMAG was the increase in the level of high molecular weight forms of NSP3 with the drug at a low dose and the disappearance of NSP3 dimers with the drug at a high dose. Previous studies demonstrated that NSP3 dimers are highly susceptible to proteasomal degradation [9] and 17-DMAG enhanced polyubiquitination and degradation of numerous Hsp90-client proteins [26]. Hence, 17-DMAG likely has a dual effect and simultaneously inhibits Hsp90-assisted NSP3 dimerization and enhances NSP3 modification and degradation. It is tempting to speculate that NSP3 dimers and the target to which NSP3 dimers are bound in binary NSP3-eIF4G1 complexes are codegraded via the proteasome, thus explaining the observed potentiation of host cell translation inhibition. Further studies are needed to determine the possible role of the proteasomal degradation of NSP3 dimers in its functionality to inhibit host cell translation.

## Conclusion

In this study, we determined the level of host cell translation under conditions that affect the ratio of NSP3 dimers versus dimerization intermediates. Our results demonstrated slow host cell translation inhibition and showed that the level of accumulated NSP3 dimers does not necessarily correlate with the extent of host cell translation inhibition.

### Summary points

- Species A rotavirus NSP3 cause a slow linear progression of protein synthesis inhibition in mammalian cells.
- Overexpression of NSP3 in mammalian cells leads to differing lengths of linear accumulation of dimers and dimerization intermediates.
- The length of time of the linear progression of protein synthesis inhibition caused by NSP3 correlates better with the progression of the sum of the accumulated dimers and dimerization intermediates than that of dimers alone.
- Inhibition of NSP3 dimerization with 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin reduces the accumulation of NSP3 dimers and potentiates host cell translation inhibition.
- The level of accumulated NSP3 dimers does not correlate with the level of protein synthesis inhibition.
- Overexpression of NSP3 in mammalian cells leads to the emergence of two putative cleavage products of the chaperone Hsp90, an 80 kDa polypeptide that coimmunoprecipitates with NSP3 and a 55 kDa polypeptide that does not.

### Author contributions

Conceptualization was done by L Padilla-Noriega; E Reyna-Rosas, H I Contreras-Treviño and R León-Rodríguez assisted in methodology; E Reyna-Rosas, H I Contreras-Treviño, T D Dinkova, L Rocha-Zavaleta and L Padilla-Noriega did the formal analysis; L Rocha-Zavaleta helped with the resources; L Padilla-Noriega and E Reyna-Rosas performed writing-original draft preparation; T D Dinkova, L Rocha-Zavaleta, E Reyna-Rosas and L Padilla-Noriega did writing-review and editing; supervision was done by L Rocha-Zavaleta; L Padilla-Noriega assisted in funding acquisition.

## Acknowledgments

This study is part of the PhD thesis of E Reyna-Rosas, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México. We thank B Moss from the National Institutes of Health for providing the vaccinia virus vT7lacOI and the plasmid p.VOTE.1, formerly used to produce the vaccinia virus vNSP3. We thank C Aguilar for technical assistance.

## Financial & competing interests disclosure

This work was supported by two grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), CB2011/168046 and I0012/264230, and one grant from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, IN201212. Financial support was also obtained from Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. E Reyna-Rosas and H I Contreras-Treviño were recipients of scholarships from CONACyT. The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

## References

Papers of special note have been highlighted as: ● of interest; ●● of considerable interest

- Estes MK, Greenberg HB. Rotaviruses. In: *Fields Virology (6th Edition)* Knipe DM, Howley PM, Cohen JI *et al.* (Eds). Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, PA, USA, 1347–1401 (2013).
- 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(7), 5411–5421 (1999).
- Hinnebusch AG, Lorsch JR. The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4(10), 1–25 (2012).
- Vitour D, Lindenbaum P, Vende P, Becker MM, Poncet D. RoXaN, a novel cellular protein containing TPR, LD, and zinc finger motifs, forms a ternary complex with eukaryotic initiation factor 4G and rotavirus NSP3. *J. Virol.* 78(8), 3851–3862 (2004).
- Leppek K, Stoecklin G. An optimized streptavidin-binding RNA aptamer for purification of ribonucleoprotein complexes identifies novel ARE-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 42(2), e13 (2014).
- Dutta D, Chattopadhyay S, Bagchi P *et al.* Active participation of cellular chaperone Hsp90 in regulating the function of rotavirus nonstructural protein 3 (NSP3). *J. Biol. Chem.* 286(22), 20065–20077 (2011).
- **Highlights the pivotal role of the chaperone Hsp90 in the structure and function of species A rotavirus NSP3.**
- Deo RC, Groft CM, Rajashankar KR, Burley SK. Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. *Cell* 108(1), 71–81 (2002).
- Groft CM, Burley SK. Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol. Cell* 9(6), 1273–1283 (2002).
- Contreras-Treviño HI, Reyna-Rosas E, Leon-Rodríguez R *et al.* Species A rotavirus NSP3 acquires its translation inhibitory function prior to stable dimer formation. *PLoS ONE* 12(7), e0181871 (2017).
- **Demonstrates that species A rotavirus NSP3 mutants severely impaired in the formation of stable dimers are functional.**
- Harb M, Becker MM, Vitour D *et al.* Nuclear localization of cytoplasmic poly(A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN. *J. Virol.* 82(22), 11283–11293 (2008).
- Padilla-Noriega L, Paniagua O, Guzman-Leon S. Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis. *Virology* 298(1), 1–7 (2002).
- Gratia M, Sarot E, Vende P *et al.* Rotavirus NSP3 is a translational surrogate of the poly(A) binding protein-poly(A) complex. *J. Virol.* 89(17), 8773–8782 (2015).
- Gratia M, Vende P, Charpilienne A *et al.* Challenging the roles of NSP3 and untranslated regions in rotavirus mRNA translation. *PLoS ONE* 11(1), e0145998 (2016).
- 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' end. *J. Virol.* 74(15), 7064–7071 (2000).
- Piron M, Vende P, Cohen J, Poncet D. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* 17(19), 5811–5821 (1998).
- Montero H, Arias CF, Lopez S. Rotavirus nonstructural protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J. Virol.* 80(18), 9031–9038 (2006).

17. Ward GA, Stover CK, Moss B, Fuerst TR. Stringent chemical and thermal regulation of recombinant gene expression by vaccinia virus vectors in mammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92(15), 6773–6777 (1995).
- **Developed the first eukaryotic system that uses the *Escherichia coli lac* repressor to stringently regulate the expression of a target gene in mammalian cells.**
18. Black EP, Condit RC. Phenotypic characterization of mutants in vaccinia virus gene G2R, a putative transcription elongation factor. *J. Virol.* 70(1), 47–54 (1996).
19. Jez JM, Chen JC, Rastelli G, Stroud RM, Santi DV. Crystal structure and molecular modeling of 17-DMAG in complex with human Hsp90. *Chem. Biol.* 10(4), 361–368 (2003).
20. Duncan R, Milburn SC, Hershey JW. Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. *J. Biol. Chem.* 262(1), 380–388 (1987).
- **Correlates the abundance and phosphorylation status of the subunits of the initiation factor eIF-4F with translational control in HeLa cells.**
21. Pina-Vazquez C, De Nova-Ocampo M, Guzman-Leon S, Padilla-Noriega L. Post-translational regulation of rotavirus protein NSP1 expression in mammalian cells. *Arch. Virol.* 152(2), 345–368 (2007).
22. Cuadras MA, Feigelstock DA, An S, Greenberg HB. Gene expression pattern in Caco-2 cells following rotavirus infection. *J. Virol.* 76(9), 4467–4482 (2002).
23. Chaibi C, Cotte-Laffitte J, Sandre C *et al.* Rotavirus induces apoptosis in fully differentiated human intestinal Caco-2 cells. *Virology* 332(2), 480–490 (2005).
24. Yin Z, Henry EC, Gasiewicz TA. (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a novel Hsp90 inhibitor. *Biochemistry* 48(2), 336–345 (2009).
25. Dutta D, Bagchi P, Chatterjee A *et al.* The molecular chaperone heat shock protein-90 positively regulates rotavirus infection. *Virology* 391(2), 325–333 (2009).
26. Quadroni M, Potts A, Waridel P. Hsp90 inhibition induces both protein-specific and global changes in the ubiquitinome. *J. Proteomics* 120, 215–229 (2015).