



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la participación de la proteína NSP3 de rotavirus en la regulación de la vida media del RNA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Angel Eduardo Salgado Escobar

TUTOR PRINCIPAL

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. José Luis Reyes Taboada
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)
Dr. Juan Miranda Ríos
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Agosto, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo se realizó bajo la tutoría de la Dra. Susana López Charretón en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

Durante la realización del presente trabajo, se contó con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el número de becario 957810. Asimismo, se contó con el financiamiento del CONACyT en el proyecto número A1-S-15356.

Se agradece también al M.C. Marco Antonio Espinoza Torres, al Dr. Carlos Sandoval Jaime, a la Q.F.B. Rafaela Espinosa Organista, y al M.C. Joaquín Moreno Contreras, por sus distintas contribuciones a este trabajo.

A los miembros de mi comité tutor, Dr. José Luis Reyes Taboada y al Dr. Juan Miranda Ríos por las sugerencias y comentarios durante la realización de este trabajo.

A mis sinodales por la revisión del trabajo escrito, Dra. Hilda Lomelí, Dra. Leonor Pérez Martínez, Dra. Viviana Valadez Graham, Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano y al Dr. Juan Ernesto Ludert León.

DEDICATORIA

Para mi abuela Gloria que me dio todo su cariño, cuidado y apoyo, y que hoy me cuida desde el cielo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi madre quien ha sido mi principal motor y ejemplo en la vida. Para mi abuela que me lleno de amor hasta el último día, también un gran ejemplo para mí. A Yami, que además de ser mi compañera de vida se ha vuelto todo para mí. A mis hermanas Ilse y Zuli, y al nuevo integrante de la familia, Gael, pues también la alegría y momentos que compartimos me impulsan a ser mejor persona.

ABREVIATURAS

5'-cap	Caperuza 5'
Blast	Herramienta de búsqueda y alineamiento local básico
cDNA	DNA complementario
DMEM	Medio esencial mínimo Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA de doble cadena
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eIF4A	Factor de inicio de la traducción eucariótica 4A
eIF4E	Factor de inicio de la traducción eucariótica 4E
eIF4F	Factor de inicio de la traducción eucariótica 4F
eIF4G	Factor de inicio de la traducción eucariótica 4G
eIF4H	Factor de inicio de la traducción eucariótica 4H
Ffluc	Luciferasa de luciérnaga
GFP	Proteína verde fluorescente
Gluc	Luciferasa de Gaussia
HDV	Virus de la hepatitis delta
kDa	KiloDalton
MEM	Medio esencial mínimo
mRNA	RNA mensajero
nm	Nanómetro
NSP	Proteína No Estructural
NSP1	Proteína no estructural 1
NSP3	Proteína no estructural 3
ORF	Marco de lectura abierto
PABP	Proteína de unión a poli(A)
pb	Pares de bases
pCMV	Promotor de citomegalovirus

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pT7	Promotor del fago T7
RBD	Dominio de unión al RNA
Rluc	Luciferasa de Renilla
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
RoXaN	Proteína no estructural asociada a rotavirus 'X'
rRNA18S	RNA ribosomal 18S
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
RV	Rotavirus
SARS CoV	Coronavirus del síndrome agudo respiratorio
SFB	Suero fetal bovino
ug	Microgramos
UTR	Región no traducida
VP	Proteína Viral
Xrn1	Exorribonucleasa 1

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	2
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS PERSONALES	3
ABREVIATURAS	4
ÍNDICE GENERAL	6
ÍNDICE DE FIGURAS	8
1.- INTRODUCCIÓN	12
1.1 Generalidades de rotavirus	12
1.2 Fenotipos asociados a la proteína NSP3	15
1.3 Similitudes observadas entre las endonucleasas virales y la proteína NSP3 19	
2.- HIPÓTESIS	22
3.- OBJETIVO GENERAL	22
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4.- MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1 Células y medio de cultivo	23
4.2 Plásmidos	23
4.3 Clonación o modificaciones a los plásmidos	24
4.4 Ensayos de transfección	27
4.5 Cuantificación de la actividad de luciferasa	27
4.6 Ensayos RT-PCR en tiempo real	28
4.7 Análisis estadístico de los datos	30
5.- RESULTADOS	30

6.- DISCUSIÓN	47
7.- CONCLUSIONES	49
8.- PERSPECTIVAS	50
9.- BIBLIOGRAFÍA	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Representación de los segmentos del genoma del rotavirus de simio SA11.....	13
Figura 2 Características estructurales del rotavirus	14
Figura 3 Dominios funcionales de NSP3.....	16
Figura 4 Circularización de los mRNAs celulares.....	16
Figura 5 Elementos importantes de todos los plásmidos utilizados.....	26
Figura 6 Actividad de Gluc codificada por el plásmido Pjet que tiene UTRs tipo celular y de Ffluc codificada por el plásmido vFv que tiene UTRs de tipo viral, cuando se co-transfectan junto con NSP3 de RV o NSP1 de SARS-CoV.	31
Figura 7 Actividad de Gluc codificada por el plásmido Pjet que tiene UTRs tipo celular y de Ffluc codificada por el plásmido vFv que tiene UTRs de tipo viral, cuando se co-transfectan junto con NSP3 de RV o NSP1 de SARS-CoV y se usa GFP como control.	33
Figura 8 Digestión del plásmido pRL-CMV y pRL con la enzima de restricción BsrGI.	35
Figura 9 Representación de los sitios de corte de la enzima BsrGI sobre el plásmido pRL-CMV.	36
Figura 10 Actividad de los plásmidos pRL-CMV, pRL y Pjet.....	37
Figura 11 Actividad de Rluc codificada por el plásmido pRL (tipo celular) y actividad de Ffluc codificada por el plásmido vFv (tipo viral) cuando se co-transfectan al mismo tiempo junto con NSP3 de RV o NSP1 de SARS-CoV. .	38
Figura 12 Producto de PCR para clonar la secuencia poli(A) en el plásmido pRL.	40
Figura 14 Análisis Blast y secuencia del plásmido pRL.....	41

Figura 13 Selección con enzimas de restricción de colonias aisladas resultado de la clonación del poli(A) al plásmido pRL. 41

Figura 15 Secuencia del plásmido vFv y colonia con la ribozima del HDV adyacente a la secuencia consenso GACC..... 43

Figura 16 Actividad de Rluc codificada por el plásmido pRL que tiene UTRs tipo celular y de Ffluc codificada por el plásmido vFv que tiene UTRs tipo viral, resultado de una triple transfección; muestra el efecto de NSP3 de RV y NSP1 de SARS-CoV en la actividad de ambos reporteros..... 44

Figura 17 Abundancia del mRNA transcrito por el plásmido pRL que tiene UTRs tipo celular y del mRNA transcrito por el plásmido vFv que tiene UTRs tipo viral, resultado de una triple transfección; muestra el efecto de NSP3 de RV y NSP1 del SARS-CoV en la abundancia del mRNA de ambos reporteros. 46

RESUMEN

Rotavirus es el agente etiológico más importante de gastroenteritis en niños menores de cinco años. La partícula viral mide 100 nm de diámetro, la cápside está formada por tres capas concéntricas de proteínas y el genoma viral es dsRNA segmentado. Entre las proteínas no estructurales del virus se encuentra NSP3. La función de la proteína NSP3 ha sido ampliamente debatida, sin embargo, es destacable que algunos de los fenotipos asociados a NSP3, se correlacionan en proteínas virales con función de endonucleasa, algunos ejemplos son: la interacción con los factores del inicio de la traducción, el apagado de la síntesis de proteínas celulares y la relocalización de la proteína de unión a poli(A) (PABP) del citoplasma al núcleo. En este trabajo, estudiamos la probable función de la proteína NSP3 como endonucleasa viral. La estrategia experimental que utilizamos está basada en ensayos de transfección en los cuales, mediante el uso de dos plásmidos reporteros, uno con UTRs de tipo celular y el otro con UTRs de tipo viral, estudiamos el efecto de NSP3 sobre la traducción y transcripción de estos. Los resultados muestran una disminución en la actividad del plásmido con UTRs tipo celular, de más del 90% cuando se co-transfectó con NSP3 y con la proteína NSP1 del SARS-CoV, que fungió como nuestro control positivo. La actividad del plásmido con UTRs tipo viral, mostro el efecto contrario, se observó un aumento en su actividad de más del 60% cuando se co-transfectó con NSP3, y cuando se co-transfectó con NSP1 la actividad fue semejante al basal. Cuando se estudió la abundancia de los mRNAs, se observó que el mRNA del reportero con UTRs tipo celular, disminuyó su abundancia en 50% cuando se co-transfectó con NSP3 y lo mismo con NSP1. El mRNA del reportero con UTRs tipo viral mostró un aumento de su abundancia de más de 40% cuando se co-transfectó con NSP3, y una disminución de 20% cuando se co-transfectó con NSP1. Este trabajo sugiere un fenotipo semejante entre la proteína NSP3 y la NSP1 sobre la traducción y la abundancia de los transcritos, de los reporteros con UTRs tipo viral y celular, y una probable participación de los UTRs en el fenotipo distinto que mostro la NSP3 sobre los plásmidos reporteros.

ABSTRACT

Rotavirus is the most important etiologic agent of gastroenteritis in children under five years of age. The viral particle measures 100 nm in diameter, the capsid consists of three concentric layers of proteins and the viral genome is segmented dsRNA. Among the non-structural proteins of the virus is NSP3. The function of the NSP3 protein has been widely debated, however, it is noteworthy that some of the NSP3-associated phenotypes correlate to viral proteins with endonuclease function, examples include: interaction with translation initiation factors, shutdown of cellular protein synthesis, and relocalization of poly(A)-binding protein (PABP) from the cytoplasm to the nucleus. In this work, we studied the probable function of the NSP3 protein as a viral endonuclease. The experimental strategy we used is based on transfection assays in which, by using two reporter plasmids, one with cell-type UTRs and the other with viral-type UTRs, we studied the effect of NSP3 on the translation and transcription of these plasmids. The results show a decrease in the activity of the plasmid with cell-type UTRs of more than 90% when co-transfected with NSP3 and with the SARS-CoV NSP1 protein, which served as our positive control. The activity of the plasmid with viral-type UTRs showed the opposite effect, an increase in activity of more than 60% was observed when co-transfected with NSP3, and when co-transfected with NSP1 the activity was similar to basal. When the abundance of mRNAs was studied, it was observed that the reporter mRNA with cell-type UTRs decreased in abundance by 50% when co-transfected with NSP3 and the same with NSP1. The reporter mRNA with viral-type UTRs showed an increase in abundance of more than 40% when co-transfected with NSP3, and a decrease of 20% when co-transfected with NSP1. This work suggests a similar phenotype between NSP3 and NSP1 protein on translation and transcript abundance, of reporters with viral- and cell-type UTRs, and a probable involvement of UTRs in the distinct phenotype that NSP3 showed on reporter plasmids.

1.- INTRODUCCIÓN

Rotavirus (RV) es el agente etiológico más importante de gastroenteritis en infantes menores a 5 años, infecciones causadas por este virus se han reportado prácticamente en todo el mundo, siendo los países en desarrollo los más afectados, llegando a ser entre el 30 al 50 % de la causa de diarrea en niños menores de dos años (Estes MK, 2013). A partir del año 2006 se inició la aplicación de la vacuna para prevenir las infecciones por este virus. Dos versiones ampliamente usadas en el mundo son Rotarix (GlaxoSmithKline, Bélgica) y Rotateq (Merck, EE. UU.), la primera es una vacuna monovalente de una cepa de rotavirus humano atenuada y la segunda está constituida por virus rearreglantes entre cepa de bovino y el gene que codifica por la glicoproteína de los principales serotipos de las cepas humanas (Marcy & Partridge, 2011). A pesar del éxito que han tenido estas vacunas, las infecciones por este virus siguen siendo responsables de aproximadamente 200,000 muertes anualmente, en todo el mundo (López *et al.*, 2016) por lo que sigue siendo muy pertinente la investigación acerca de la biología de este virus.

1.1 Generalidades de rotavirus

Los rotavirus son miembros de la familia *Reoviridae*. Mediante técnicas de microscopía electrónica y crio-microscopía, se ha estimado que el virión tiene un tamaño de 100 nm de diámetro, y está formado de tres capas concéntricas de proteínas virales que componen la cápside. Dentro de la cápside se encuentra el genoma viral, compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) de una longitud aproximada de 3302 pb en el segmento más grande y aproximadamente 667 pb en el segmento más pequeño, estos 11 segmentos codifican cada uno para una proteína a excepción del segmento 11 el cual tiene dos marcos de lectura abiertos (Estes MK, 2013).

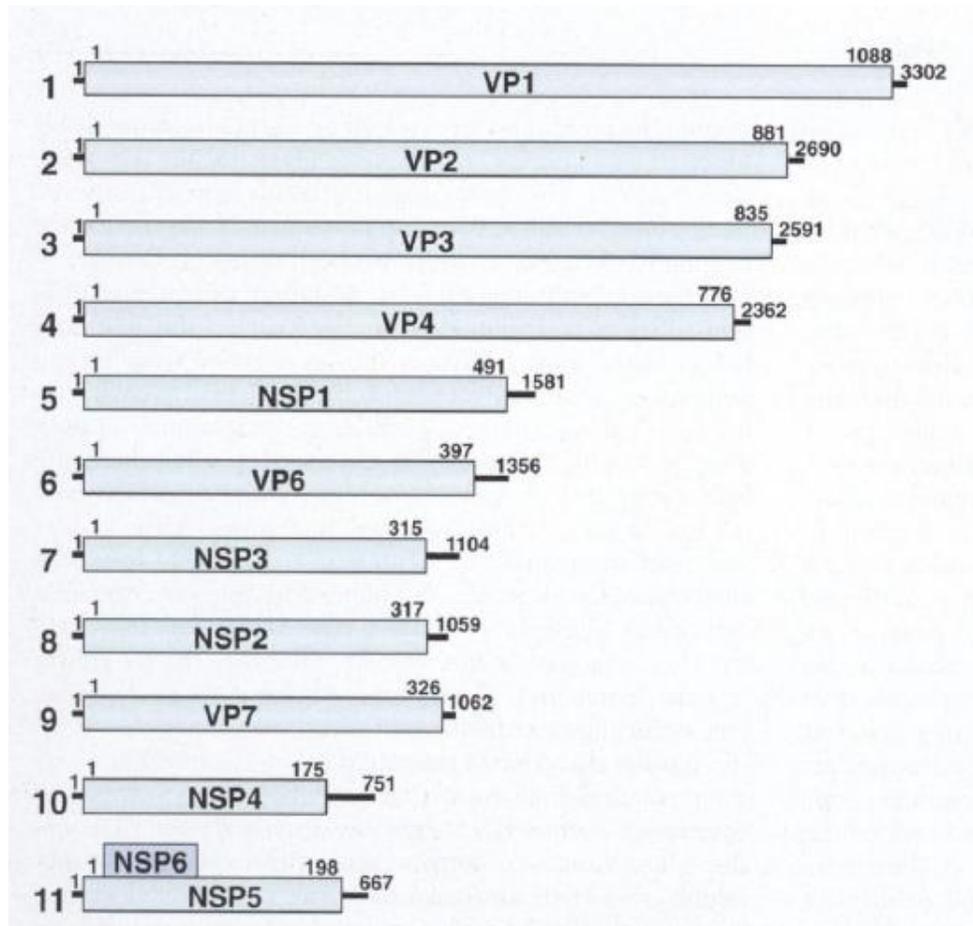


Figura 1 Representación de los segmentos del genoma del rotavirus de simio SA11. Se muestra la proteína viral que codifica cada segmento y el número de aminoácidos y nucleótidos que compone cada uno. Tomada de Estes MK & Greenberg HB, 2013.

El genoma del virus codifica para seis proteínas estructurales nombradas por la nomenclatura VP (viral protein) VP1, 2, 3, 4, 6 y 7 y seis proteínas no estructurales con nomenclatura NSP (non structural protein) desde la NSP1 hasta NSP6. Las proteínas estructurales del virus tienen distintas funciones, entre las cuales podemos mencionar: la proteína VP2 forma la capa más interna de la cápside, esta proteína interactúa de manera directa con el genoma viral y además con las proteínas VP1 y VP3. VP1 tiene la función de RNA polimerasa dependiente de RNA, por lo tanto, transcribe los mRNAs virales que serán traducidos y también es la proteína responsable de la replicación del genoma. VP3 tiene función de guanililmetiltransferasa, una vez que interactúa con la proteína VP1, coloca el 5'-cap a

los mRNAs virales de cadena positiva. La capa intermedia de la cápside está formada por la VP6 y la más externa es formada por la glicoproteína VP7, y por VP4, conocida también como proteína espícula o de reconocimiento de receptor.

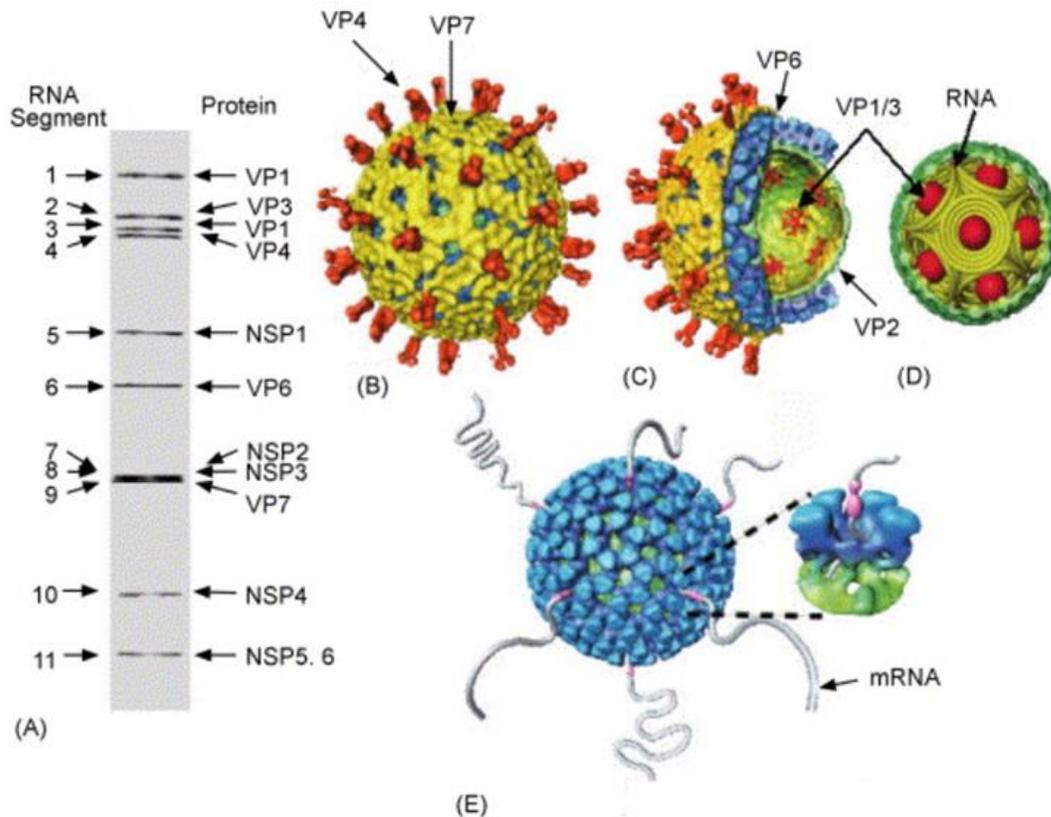


Figura 2 Características estructurales del rotavirus. (A) Electroforesis en gel de acrilamida que muestra los 11 segmentos del virus, del lado izquierdo el número de segmento y de lado derecho la proteína que codifica (proteínas en el caso del segmento 11). (B) Reconstrucción de la partícula viral por criomicroscopía electrónica, muestra la proteína VP4 (rojo) y la VP7 (amarillo). (C) Vista en corte que muestra la triple cápside, se observa la VP6 (azul) y la VP2 (verde) y las enzimas transcripcionales mostradas en rojo. (D) Corte transversal que muestra la organización del genoma viral, las enzimas transcripcionales se muestran como bolas rojas. (E) Reconstrucción por criomicroscopía electrónica de la partícula de doble capa, transcripcionalmente activa. Tomado de (Jayaram et al., 2004).

Las proteínas no estructurales no forman parte de la partícula viral y tienen distintas funciones durante el ciclo replicativo; NSP1 funciona como un antagonista al interferón, las proteínas NSP2 y NSP5 se encargan de la formación de los viroplasmatas (estructuras en el citoplasma en donde se lleva a cabo el ensamble y replicación del virus), NSP4 es la enterotoxina viral señalada como la causante de la diarrea durante la infección y NSP6 se asocia a NSP5 durante la formación de los

viroplasmos (Estes MK, 2013). La proteína NSP3 se encuentra distribuida en el citoplasma de la célula, se han mostrado distintos fenotipos que la involucran en la traducción viral, esta proteína es el tema central de este proyecto, por lo que ahondaremos en su descripción.

1.2 Fenotipos asociados a la proteína NSP3

La proteína no estructural NSP3 tiene una participación importante en el control de la traducción de los mRNAs celulares y en la regulación de la traducción de los mRNAs virales. De un peso molecular de 36 kDa aproximadamente, está compuesta de 313 aminoácidos, y es funcional en forma de homodímero. Su estructura se ha dividido en tres dominios. En el extremo amino o N-terminal, que comprende los residuos 1 al 149, NSP3 se une al extremo 3' de los RNAs virales, específicamente en la secuencia consenso GACC 3', presente en todos los RNAs de rotavirus (Piron *et al.*, 1999; Poncet *et al.*, 1994). En la parte central de la proteína, entre los aminoácidos 150 al 241, se encuentra el dominio de dimerización, también en esta región, se encuentra el sitio de interacción con una proteína celular llamada RoXaN (Rotavirus X protein associated with NSP3), la función de esta interacción aún se investiga (Vitour *et al.*, 2004). En el extremo carboxilo o C-terminal, que comprende los residuos 206 al 313, la NSP3 interacciona con el factor eIF4G, proteína celular que participa en el complejo de inicio de la traducción celular eIF4F (López *et al.*, 2016; Piron *et al.*, 1999; Piron *et al.*, 1998b).

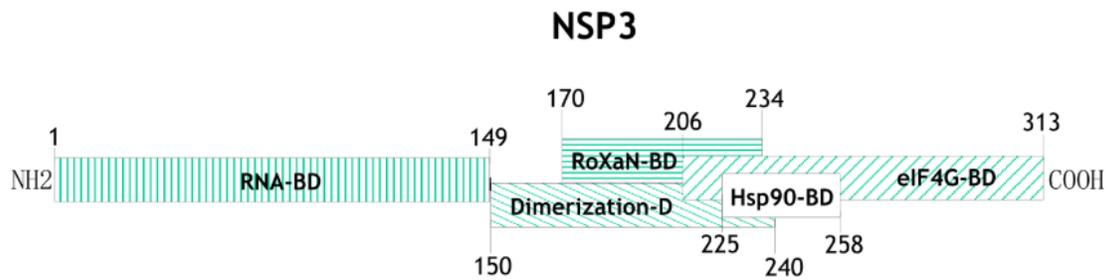


Figura 3 Dominios funcionales de NSP3. El esquema representa los diferentes dominios funcionales mapeados en la proteína NSP3 de RV. Los números indican la posición de los aminoácidos en el cual empieza y termina cada dominio. (BD=dominio de unión por sus siglas en inglés). Tomado de (López et al., 2016).

El complejo de inicio de la traducción celular eIF4F está integrado principalmente por las proteínas eIF4E, eIF4A y eIF4G. Dentro de este complejo, el factor eIF4E reconoce y se une a la estructura 5'-cap de los mRNAs celulares y eIF4A desenrolla estructuras secundarias que se forman en la cadena sencilla del RNA mientras se está traduciendo. La proteína eIF4G tiene una función de andamiaje para la interacción con el complejo de preiniciación. Además, eIF4G se encuentra unida a eIF4E y al mismo tiempo a la proteína de unión a la cola de poli A (PABP). PABP se encuentra unida a la cola de poli(A) del extremo 3' de los mRNAs y le brinda estabilidad al transcrito, por lo tanto, eIF4G al interactuar con las dos proteínas unidas a cada uno de los extremos del transcrito los acerca, generando lo que se conoce como circularización del mRNA (Figura 4, Piron et al., 1998a).

La proteína NSP3 de rotavirus es reconocida ampliamente por su interacción con el factor eIF4G, se sabe que NSP3 se une a esta proteína en la misma región que se une PABP (Vende et al., 2000). Cabe destacar que NSP3 y PABP estructuralmente no son parecidas, sin embargo, los aminoácidos de la región que se une a eIF4G son similares. Se ha postulado

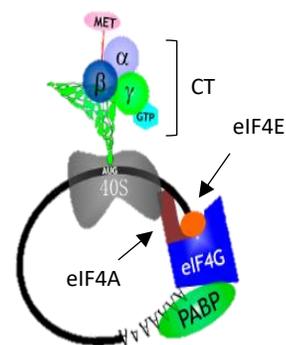


Figura 4 Circularización de los mRNAs celulares. Muestra la base de la circularización de los mRNAs celulares durante la traducción. CT: complejo ternario.

que NSP3 es funcionalmente homóloga a PABP debido a las funciones de ésta (Gratia *et al.*, 2015). Lo que se ha postulado es que los mRNAs de rotavirus están modificados en su extremo 5' con cap, pero el extremo 3' no está poliadenilado, a diferencia de los mRNAs celulares, en su lugar en los transcritos virales se encuentra una secuencia consenso de 4 nucleótidos (GACC) que comparten todos los segmentos del genoma viral, esta secuencia es reconocida por la NSP3 y también interacciona con eIF4G, que a su vez se une a eIF4E que lleva unido el 5'-cap del transcrito viral. Basados en estas interacciones se propuso que los mRNAs de rotavirus se traducen de forma semejante a los mRNAs celulares (Groft & Burley, 2002; Piron *et al.*, 1998b; Vende *et al.*, 2000). Esta idea fue ampliamente aceptada en la literatura, sin embargo, Montero y cols. mostraron que al silenciar la proteína NSP3 mediante interferencia de RNA (RNAi), no se inhibe la síntesis de las proteínas virales, esta observación compromete la idea de que NSP3 participa en la circularización de los mRNAs virales y que este mecanismo es necesario para su traducción (Montero *et al.*, 2006).

Uno de los fenotipos que resalta durante la infección de rotavirus es la disminución en la traducción de las proteínas celulares. Se ha demostrado que la proteína responsable de este fenotipo es NSP3, ya que el silenciamiento de esta proteína permite el restablecimiento en la traducción de las proteínas celulares. Debido a este fenotipo se ha nombrado a NSP3 como el factor de apagado de la síntesis de proteínas celulares (Padilla-Noriega *et al.*, 2002). El mecanismo por el cual apaga esta síntesis aún no es conocido. Se ha propuesto que la unión de NSP3 con eIF4G desplaza la unión de PABP previniendo la circularización de los mRNAs celulares. Esta propuesta está respaldada por el hecho de que la afinidad que existe entre NSP3-eIF4G es mayor a la que existe entre PABP-eIF4G, por lo tanto, la idea de que NSP3 pueda desplazar a PABP de su sitio de unión es factible (Groft & Burley, 2002). Es interesante señalar que el efecto en la inhibición de la traducción por parte de NSP3 parece afectar exclusivamente a los mRNAs celulares, ya que la síntesis de proteínas virales no se afecta en ausencia de NSP3. Además, resalta que durante el silenciamiento de NSP3 el rendimiento o progenie viral aumenta hasta

tres veces, y esto se ha relacionado con el aumento en los niveles de mRNA y dsRNA virales (Montero et al., 2006).

Otro fenotipo relacionado con NSP3 es la relocalización de la proteína PABP del citoplasma al núcleo. Rubio y cols. mostraron que durante la infección con rotavirus se observa que la proteína PABP que se encuentra en el citoplasma, se concentra en el núcleo. Al silenciar NSP3 se encontró que la PABP mantuvo su localización citoplásmica en las células infectadas, sugiriendo que NSP3 es responsable de esta relocalización. La función de PABP en la célula incluye su participación en la maquinaria que exporta los mRNAs recién transcritos del núcleo al citoplasma, por lo que es capaz de traslocarse del núcleo al citoplasma, permaneciendo la mayoría del tiempo en este compartimiento, unida a la secuencia poli(A) de los mRNAs celulares. Se ha observado que, durante la infección con rotavirus, la PABP es retenida en el núcleo, aún no se conoce el mecanismo que causa esta retención. Una hipótesis que se ha propuesto es que al desplazar a la PABP de su unión con eIF4G, esta proteína es reconocida por la maquinaria de importación nuclear. Sin embargo, Rubio y cols. mostraron que el silenciamiento de los factores eIF4G1/II no causa la relocalización de la PABP al núcleo. Con lo que se puede descartar la hipótesis, de que al no poder unirse PABP a los factores eIF4G se libera de la cola de poli(A). En el trabajo de Rubio y cols. se encontró que al relocalizarse la PABP durante la infección, también se concentran los mRNAs recién transcritos en el núcleo y además se hiperpoliadenilan. Se ha postulado que los mRNAs hiperpoliadenilados son reconocidos como aberrantes por la maquinaria de exportación de mRNAs y por lo tanto se acumulan en el núcleo. Durante la infección varios de los genes que se transcriben incluyen genes de la respuesta inmune, que, al no poder llegar al citoplasma, no son traducidos, por lo que se ha sugerido que la relocalización de la PABP es un mecanismo viral importante en la inhibición de la expresión de las proteínas celulares (Rubio et al., 2013).

1.3 Similitudes observadas entre las endonucleasas virales y la proteína NSP3

La interacción virus-hospedero es un proceso constante de evolución entre ambos sistemas, se podría considerar incluso como una carrera armamentista. En esta carrera la célula ha diseñado mecanismos antivirales para contender con las infecciones y los virus han encontrado mecanismos para evadir la respuesta inmune. Uno de los mecanismos por los cuales los virus han logrado evadir esta respuesta es la expresión de proteínas con función endonucleasa. Estas proteínas han logrado controlar la expresión de las proteínas celulares con éxito, degradando los mRNAs que las codifican, por supuesto incluyendo muchas de las proteínas relacionadas con la respuesta inmune. Existen algunos ejemplos de virus donde se han caracterizado proteínas con función endonucleasa, cabe resaltar que, aunque estas proteínas no son homólogas entre las diferentes familias virales en las que se han identificado, comparten los fenotipos que causan durante la infección.

Como ejemplos de estas proteínas con función de endonucleasa se pueden mencionar las siguientes: la proteína SOX del virus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV); la proteína muSOX del herpes virus murino 68 (MHV-68); la proteína BGLF5 del virus Epstein-Barr (EBV); la proteína VHS del virus del herpes simple (VHS-1) y la proteína NSP1 del virus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV).

Estas proteínas tienen en común su interacción con factores de inicio de la traducción. VHS tiene la capacidad de unirse a los factores eIF4H y eIF4A/II, al unirse la proteína viral a estos factores se observa una disminución en la traducción de los mRNAs celulares, por lo cual se ha nombrado a VHS como el factor de apagado de la síntesis de proteína celular. Esto se demostró silenciando los factores eIF4H y eIF4A/II, o a la proteína VHS, se observó en ambos casos una restauración en la producción de proteínas celulares. Se sabe que la proteína VHS es una RNAsa (Everly, et al., 2002) y que la interacción con los factores de inicio de traducción es importante para que la proteína realice cortes endonucleolíticos. Se mostró que al silenciar eIF4H y eIF4A/II, pero estando presente VHS en el medio, no se observa

el fenotipo de apagado de síntesis proteica celular, lo que sugiere que la interacción con los factores de inicio de la traducción es importante para inducir la actividad RNAsa de VHS (Feng *et al.*, 2005; Sarma *et al.*, 2008). En el SARS-CoV, se observó que la proteína NSP1 también induce el apagado de la síntesis de proteínas celulares, aunque con un mecanismo distinto (Kamitani *et al.*, 2006). NSP1 interactúa con la subunidad 40S del ribosoma y no se ha observado que posea actividad intrínseca de endonucleasa (Huang *et al.*, 2011; Kamitani *et al.*, 2009). Se sabe que la proteína NSP1 induce el estancamiento de los ribosomas 80S cargados con los complejos para traducir mRNAs celulares, por lo que sugiere que la maquinaria de degradación mediada por antisentido sería la encargada de aliviar el estancamiento de los ribosomas, degradando los mRNAs celulares durante esta acción (Schubert *et al.*, 2020; Tidu *et al.*, 2021). Investigación sobre una posible interacción entre SOX, muSOX o BGLF5 con el complejo de inicio de la traducción se encuentra en proceso. Existe una probabilidad muy grande de que también estas tres proteínas virales interactúen con algún factor, ya que en experimentos de inmunoprecipitación, se han logrado precipitar junto con el complejo eIF4F, sin embargo, no se ha elucidado la interacción específica (Abernathy & Glaunsinger, 2015).

Una de las consecuencias de la degradación de los mRNAs celulares es una fuerte relocalización de la proteína PABP del citoplasma al núcleo celular (Kumar *et al.*, 2011). Este fenotipo se ha relacionado con las proteínas SOX, muSOX, BGLF5, VHS y NSP1. El mecanismo propuesto para este fenotipo es que una vez que las endonucleasas virales generan un corte en el extremo 5' del mRNA, el transcrito es degradado por la maquinaria celular que los reconoce como aberrantes al no tener 5'-cap. Al degradarse el mRNA la PABP se libera de su unión al poli(A), y se expone una secuencia de localización nuclear que normalmente se encuentra enmascarada al estar unida al poli(A). La secuencia de localización nuclear es reconocida por la maquinaria de las alfa-importinas celulares, que la llevan hasta el núcleo. Dentro del núcleo, PABP se une a las colas poli(A) de los nuevos transcritos, lo que induce a la poli(A) polimerasa, activándola y haciendo más largas las secuencias poli(A). La hiperpoliadenilación producida es la responsable del secuestro de los nuevos

mRNAs celulares en el núcleo, puesto que son reconocidos como aberrantes y esto impide su exportación al citoplasma. Este mecanismo, al restringir la salida de los nuevos mRNAs incrementa la inhibición de la síntesis de proteínas del huésped, por lo que se sugiere que estos virus controlan la expresión de proteínas con dos mecanismos distintos, mediante la degradación de los mRNAs asociados al complejo de traducción y a través de inhibir la salida de mRNAs recién transcritos debido a su hiperpoliadenilación (Abernathy & Glaunsinger, 2015).

Tabla 1 Comparación entre las endonucleasas virales, muestra la superfamilia a la que pertenecen, su mecanismo de acción y si los mRNAs virales son susceptibles o no al corte de éstas (Tomada y modificada de Abernathy & Glaunsinger, 2015).

Virus	Factor de apagado de la traducción	Superfamilia de nucleasas	Mecanismo de acción	mRNAs virales
HSV-1	VHS	FEN-1	Unión a los factores eIF4H y eIF4A/II	Susceptibles (solo los tempranos)
KSHV	SOX	PD(D/E)XK	Desconocido	Susceptibles
MHV-68	muSOX	PD(D/E)XK	Desconocido	Susceptibles
EBV	BGLF5	PD(D/E)XK	Desconocido	Susceptibles
SARS-CoV	NSP1	No aplica	Unión a la sub-unidad 40S del ribosoma	Protegidos por la secuencia 5' líder

Es interesante notar que las endonucleasas virales mencionadas anteriormente, reclutan a la exorribonucleasa 1 o Xrn1 para degradar al mRNA celular. Xrn1 es una proteína celular que de manera general, participa en la degradación de los mRNAs sin 5'-cap, durante el proceso celular llamado degradación mediada por antisentido (NMD; por sus siglas en inglés) y en la degradación de los microRNAs, donde su

función es esencial durante procesos del desarrollo embrionario (Ho Chang, 2010). Gaglia y cols. mostraron que las endonucleasas virales necesitan de Xrn1 para la degradación de los mRNAs. Se mostró que durante el silenciamiento de la proteína Xrn1, no se observa la degradación de los mRNAs, a pesar de existir concentraciones crecientes de las proteínas SOX, muSOX, BGLF5, VHS, o NSP1. Se concluyó que el fenotipo del apagado de la síntesis del huésped ocurre en dos pasos, 1) un corte endonucleolítico efectuado por cualquiera de las proteínas anteriores y 2) el reconocimiento del extremo 5' monofosfato, producto del corte anterior, por la proteína Xrn1. De esta forma, estos virus promueven la degradación de los mRNAs en el citoplasma celular (Gaglia *et al.*, 2012).

En resumen, existen similitudes entre los fenotipos observados para NSP3 y para las endonucleasas virales. Estas son: 1) Tanto NSP3 como las endonucleasas virales actúan como factores de apagado de las síntesis de proteínas del huésped, a través de su interacción con factores del inicio de la traducción, y, 2) Inducir la relocalización de la PABP al núcleo.

Con base en estas similitudes es que se propone la siguiente hipótesis.

2.- HIPÓTESIS

La proteína NSP3 posee actividad de endonucleasa sobre los mRNAs virales y celulares que conlleva a la degradación por exonucleasas celulares.

3.- OBJETIVO GENERAL

Caracterizar si la proteína NSP3 de rotavirus posee la actividad de endonucleasa del RNA.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar el efecto de la proteína NSP3 en la actividad de proteínas reporteras que contienen en sus mRNAs elementos UTR 5' y 3' de tipo celular o de tipo viral.
- Estudiar el efecto de la proteína NSP3 sobre la estabilidad del mRNA de genes reporteros que contienen en sus mRNAs elementos UTR 5' y 3' de tipo celular o de tipo viral.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Células y medio de cultivo

Para todos los ensayos utilizamos células de riñón embrionario humano HEK293T7, esta línea celular fue modificada para expresar constitutivamente la RNA polimerasa del fago T7. Al estudiar endonucleasas virales, el transporte núcleo-citoplasma es inhibido y el expresar una polimerasa en el citoplasma de la célula resuelve la posibilidad de que los transcritos del gen reportero se acumulen en el núcleo celular (Sandoval-Jaime *et al.*, 2015). Las células se crecen en presencia de puromicina 2 µg/mL de medio de cultivo, para mantener la selección del gene de la polimerasa. Y se cultivan en DMEM Advance (Dulbecco's modified Eagle's medium-reducido en suero) (HyClone, Logan; UT), suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB). Para las reacciones de transfección se utilizó MEM (Eagle's minimal essential medium) sin SFB.

4.2 Plásmidos

Los plásmidos que se utilizaron para expresar mRNAs con elementos de tipo celular, son el Pjet que expresa la *Gaussia* luciferasa (Gluc), y el pRL-CMV el cual

expresa la *Renilla* luciferasa (Rluc), ambos plásmidos originalmente obtenidos de Promega, dirigen la síntesis de los genes de luciferasa que están bajo el promotor T7 y en el caso de Rluc, también bajo el promotor CMV, cuentan con una pequeña secuencia UTR 5' antes del codón de inicio, y 30 adeninas en el extremo 3', que imitan una cola de poli(A). Para expresar mRNAs reporteros flanqueados por elementos virales, utilizamos el plásmido vFv (pGEM-vFv-VP6), previamente construido por Rubio y cols. en el laboratorio (Rubio et al., 2013). Este plásmido dirige la expresión de la luciferasa de luciérnaga (Ffluc), el transcrito está flanqueado por los extremos UTRs 5' y 3' del segmento 6 (que expresa VP6) de rotavirus RRV. Para evaluar el efecto de la proteína NSP3 de rotavirus RRV sobre los mRNAs y las proteínas reporteras, el gene que codifica para esta proteína se clonó en el plásmido pT7-S7RRV clonado por C. Sandoval y M. Espinoza (Sánchez-Tacuba et al., 2020) que tiene las siguientes características: la transcripción del gene está regulada bajo el promotor T7, se clonó la secuencia completa del segmento 7 de RRV y además la secuencia de la ribozima del HDV. Como control negativo utilizamos un plásmido derivado de pT7-S7RRV, que tiene una delección que remueve la secuencia de NSP3 del nucleótido 232 al nucleótido 1016, en este plásmido (NSP3 Δ NSP3T2AGFP) el ORF de la proteína GFP está flanqueado por parte de la secuencia de NSP3 (nucleótidos 1-202 y 1016-1126) clonado por C. Sandoval y M. Espinoza.

Como control positivo de una proteína con actividad de endonucleasa, utilizamos a la proteína NSP1 de SARS CoV (pCAGGS-nsp1), este plásmido fue donado por la Dra. Britt Glaunsinger (Kamitani et al., 2006).

4.3 Clonación o modificaciones a los plásmidos

Algunos plásmidos fueron modificados con la finalidad de que los ensayos se hicieran lo más controlado posible. El pRL-CMV es un plásmido comercial, utilizado para expresar la luciferasa de *Renilla* bajo dos promotores, pCMV y pT7. Para expresar el transcrito de la luciferasa de *Renilla* en el citoplasma a partir de pT7, y evitar la transcripción a partir del promotor de CMV, se eliminó la secuencia de este

promotor utilizando los sitios de restricción PstI y NdeI (ambos sitios únicos) que lo flanquean. PstI produce un corte cohesivo, en el nucleótido 836 en este plásmido, las bases no apareadas generadas por el corte se eliminaron usando T4 DNA polimerasa y posteriormente se limpió el DNA de enzimas por la técnica de extracción fenol-cloroformo. El DNA resultante se trató con la enzima NdeI. Esta enzima produce también un corte cohesivo, en el nucleótido 393, con la diferencia de que el extremo 3' de este corte es sobresaliente. Por lo tanto, en este extremo hicimos un relleno utilizando la polimerasa Klenow. El plásmido resultante se religó con T4 DNA ligasa incubando toda la noche a 14°C.

Además de la eliminación del promotor CMV, también se añadió una cola de poli(A). Para esto utilizamos los siguientes oligos:

Sentido: 5'- TATCTACGTGCAAGTGATGATTTACC -3'

Anti-sentido:

5'TCATCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATTGTTTCATTTTTG
AGAACTCG -3'

Aprovechamos los sitios de restricción para BsaI y XbaI que eran únicos en el plásmido y se incluyeron en los oligos. Realizamos un PCR con estos oligonucleótidos y obtuvimos un producto de 230 pb, el cual tratamos con las dos enzimas de restricción, primero BsaI y luego XbaI. El plásmido receptor, ya sin el promotor de CMV se trató con estas dos enzimas y se ligó con el producto de PCR purificado. Para la ligación se usó una relación 1:3 molar de plásmido e inserto, respectivamente. La reacción se incubó a 14°C, toda la noche para posteriormente limpiar la reacción por fenol-cloroformo y transformar en células *E. coli*, electrocompetentes de la cepa JM101.

El plásmido vFv que codifica Ffluc también fue modificado, puesto que a pesar de tener codificada la ribozima del virus de hepatitis delta (HDV), presentaba 7 nucleótidos extra entre la secuencia GACC y la ribozima. Por lo tanto, retiramos esos nucleótidos con la ayuda de los sitios de restricción SacII y SmaI. Primero cortamos el plásmido con SacII, que dejó un corte cohesivo, el cual tratamos con la

enzima T4 DNA polimerasa para dejar los extremos romos. Posteriormente se limpió la reacción de las enzimas anteriores, con el método fenol-cloroformo y se trató esta vez con SmaI, que deja un corte romo, se volvió a tratar con fenol-cloroformo y se re-ligó. Así, la secuencia de la ribozima quedó justo después de la secuencia GACC. La ligación se dejó toda la noche a 14°C, y se transformó en células *E. coli* de la cepa JM101.

En la figura 5 se observan los elementos importantes de cada plásmido.

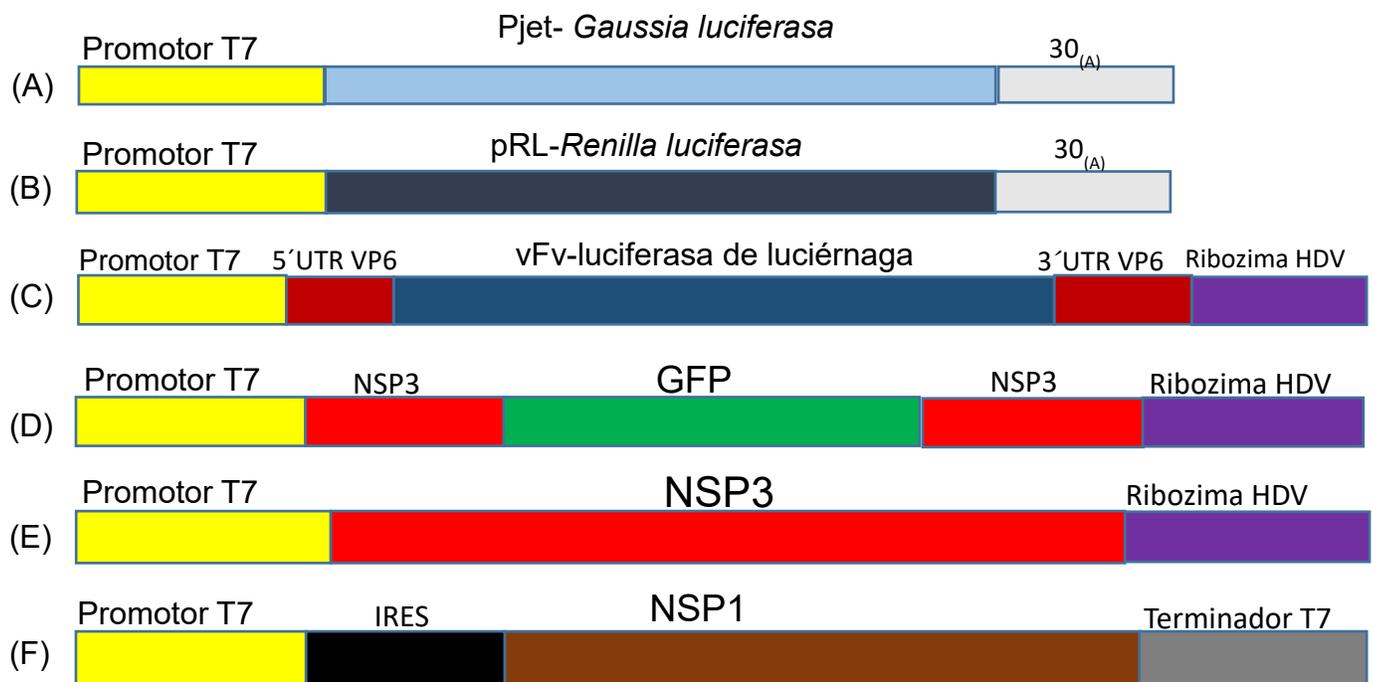


Figura 5 Elementos importantes de todos los plásmidos utilizados. Todos los plásmidos utilizados están regulados bajo el promotor T7, (A) y (B) expresan la *Gaussia* y *Renilla* luciferasa respectivamente, clonadas las secuencias completas de cada gene de luciferasa con sus UTRs propios, cada ORF termina con una secuencia de 30 adeninas en su extremo 3' que simula la cola de poli(A), (C) expresa la proteína luciferasa de luciérnaga, su secuencia está flanqueada por los UTRs del gen 6 de RRV, para terminar la transcripción tiene la ribozima HDV (D) expresa la proteína GFP, su ORF esta flanqueado por parte de la secuencia de NSP3, termina la transcripción con la ribozima HDV (E) expresa la proteína NSP3 de RRV, clonada también la ribozima del HDV (F) expresa la proteína NSP1, su traducción depende de un IRES, tiene 30 adeninas que simulan una cola de poli(A) y una secuencia terminadora T7.

4.4 Ensayos de transfección

Las reacciones de transfección se llevaron a cabo en placas de 48 pozos, en cultivos celular con una confluencia del 70 al 90%. Una hora antes de hacer la transfección se cambió el medio de las células por medio fresco DMEM-Advanced. Se usaron 2 μ l de Lipofectamina 3000 (Invitrogen) por 1 μ g de DNA. Se transfectaron 500 ng de cada plásmido a excepción de pRL del cual se transfectaron 200 ng. La reacción se preparó en dos tubos eppendorf de 1.5 mL, en el primero se colocan 23 μ l de medio MEM sin suero y 2 μ l de lipofectamina 3000, en el segundo tubo se colocan 2 μ l de reactivo agente 3000, más el volumen equivalente a la concentración de cada plásmido y se llevó a un volumen final de 25 μ l con MEM sin suero. Posteriormente se mezcló la reacción en un solo tubo suavemente y se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente. Por último, se aplicó la mezcla de transfección por goteo en el pozo de células y se revisaron 24 horas post-transfección.

4.5 Cuantificación de la actividad de luciferasa

Para cuantificar Rluc y Ffluc se utilizó el kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Gluc se cuantificó del medio de cultivo utilizando el kit BioLux Gaussia Luciferase Assay (New England Biolabs, Ipswich, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación se realizó 24 horas post-transfección y los datos fueron obtenidos usando un luminómetro Monolight 2010 (Analytical Luminiscence Laboratory, Ann Arbor, MI). Las veces de inducción que se señala en el eje “y” de las gráficas de resultados se calculó de la siguiente manera: mediante una regla de proporcionalidad directa (regla de tres), las unidades relativas de luz (URL) que se obtuvieron cuando se transfectó el gen reportero + GFP representan el valor igual a 1 (o 100% de la actividad), para hacer la comparación, las URL obtenidas en la transfección del reportero junto con NSP3 o NSP1 se multiplicaron por 1 y se dividieron entre las URL obtenidas en la transfección con GFP.

4.6 Ensayos RT-PCR en tiempo real

Después de transfectar las células, se retira el medio y la monocapa fue lisada con el buffer de lisis pasiva (PLB) incluido en el kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para extraer en RNA de los lisados se añadió Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) a una porción del lisado (300 μ L/1-3*10⁵ células) y el RNA se purificó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El RNA total purificado se trató con DNAsa libre de RNAsas (Roche, Basel, Suiza) para eliminar la posible contaminación con DNA celular o plasmídico. Los oligonucleótidos utilizados en el ensayo de PCR tiempo real se diseñaron basados en la plataforma Integrated DNA Technologies (IDT) <https://www.idtdna.com/pages> en la sección “herramientas” podemos encontrar la opción “diseño de oligos”. La auto complementaridad de los oligos se revisó con la herramienta Oligo calculator <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>, y se verificó que los oligos diseñados no hibridaran con secuencias de genes celulares, realizando un Blast <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Las secuencias se encuentran en la tabla 1.

Tabla 2 Muestra los oligonucleótidos utilizados en el ensayo de PCR tiempo real, y su secuencia.

Oligonucleótido	Secuencia 5' ->3'
<i>Renluc-Fw</i>	GTGCCACATATTGAGCCAGT
<i>Renluc-Rv</i>	CCATTACCAGATTTGCCTGA
RT-Ffluc-Fw	GTCCTATGATTATGTCCGGTTATGT
RT-Ffluc-Rv	GTCTTCGTCCCAGTAAGCTATG
rRNA 18Sfw	CGAAAGCATTGCCAAGAAT
rRNA 18Srv	GCATCGTTTATGGTCGGAAC

Reacción de transcriptasa reversa:

Cada tubo contenía en el inicio:

RNA total (100 ng)	1 ul
Oligo reverso (40 pmol/ul)	1 ul
H ₂ O	4 ul

La mezcla inicial se incubó a 95°C durante 5 minutos y al terminar el tiempo se colocó en hielo. Posteriormente se añadió a cada tubo los siguientes reactivos:

Amortiguador 2X	2 uL
Ditiotreitol (dTT)	1 uL
Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)	0.5 uL
Transcriptasa reversa (MMLV)	0.5 uL

Finalmente, para obtener el cDNA la mezcla anterior se incubó 1 hora a 37°C y posteriormente 15 minutos a 70°C para desactivar la enzima.

Reacción de qPCR:

SyBr Green master mix (Applied Biosystems)	12.5 uL
Oligo sentido (10 pmol/ul)	0.5 uL
Oligo antisentido (10 pmol/ul)	0.5 uL
H ₂ O	4 uL
cDNA	2.5 uL

Los cDNAs obtenidos con los oligos del rRNA 18S se diluyeron a concentración 1:100, y de esta dilución se tomaron 2.5 µL para la reacción de qPCR. El volumen final de la reacción de qPCR fueron 20 µL, este volumen se dividió en dos tubos ópticos, en partes iguales (9 µL cada uno), antes de llevarlos al termociclador. El equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies,

Carlsbad, CA) se programó de la siguiente manera: 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y a 60°C por 30 segundos; fase de disociación de 60°C a 95°C por 30 minutos. Los resultados se normalizaron con los niveles de RNA ribosomal 18S en cada muestra. Las veces de aumento o disminución se calcularon utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.7 Análisis estadístico de los datos

Los análisis estadísticos se evaluaron mediante la prueba Man-Whitney no paramétrica, utilizando el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.)

5.- RESULTADOS

Para caracterizar si la proteína NSP3 tiene función de endonucleasa, como primer acercamiento exploramos el efecto de esta proteína sobre la actividad de proteínas reporteras. Se ha reportado que de manera general, las proteínas virales con función de endonucleasa degradan mRNAs sin diferenciar si estos son virales o celulares. Por lo tanto, con esta idea determinamos la actividad de dos proteínas luciferasas, codificadas por plásmidos donde sus transcritos están flanqueados por distintos elementos UTRs en los extremos 5' y 3', mimetizando, en un caso, un mRNA de tipo celular y en el otro, uno tipo viral. El primer experimento que se realizó fue analizar la actividad de las proteínas reporteras expresadas a partir del plásmido Pjet, como referencia de un mRNA celular y el plásmido vFv, como referencia de un mRNA viral; que expresan Gaussia luciferasa (Gluc) y a la luciferasa de luciérnaga (Ffluc), respectivamente. Estos plásmidos fueron co-transfectados con los plásmidos que dirigen la expresión de NSP3 de rotavirus RRV, o de la proteína NSP1 del SARS-CoV. Con este experimento comparamos el efecto en la traducción registrado por la actividad de estas proteínas reporteras, cuando se co-expresan con NSP3 de RV o NSP1 de SARS-CoV. Los plásmidos mencionados se co-transfectaron en células HEK293T7 (que expresan de manera constitutiva la

polimerasa del fago T7). La actividad de cada proteína (sin co-transfectar con otro plásmido) fue el control para comparar el efecto que pudieran tener NSP3 o NSP1.

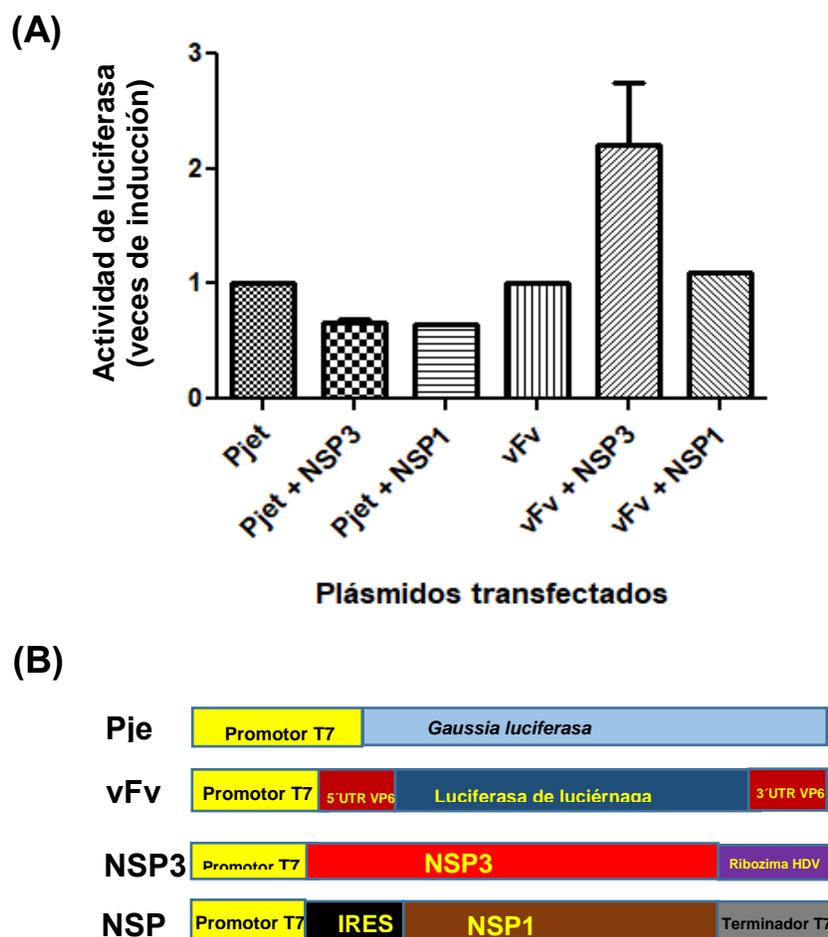


Figura 6 Actividad de *Gluc* codificada por el plásmido *Pjet* que tiene UTRs tipo celular y de *Ffluc* codificada por el plásmido *vFv* que tiene UTRs de tipo viral, cuando se co-transfectan junto con *NSP3* de RV o *NSP1* de SARS-CoV. (A) Resultado de la actividad de los plásmidos reporteros *Pjet* (*Gluc*; carril 1-3) o *vFv* (*Ffluc*; carril 4-6) cuando se co-transfectan con *NSP3* o *NSP1* ($n=2$), (B) esquema de los elementos relevantes de los plásmidos usados en 6A.

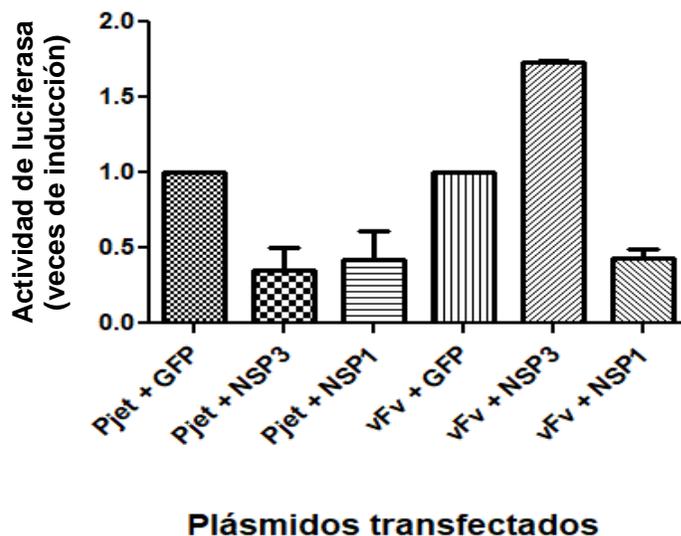
Para estudiar el efecto de las proteínas virales sobre la actividad de los reporteros, se hicieron las co-transfecciones. En un pozo de células (aproximadamente 200 mil células/pozo) se transfectaron ambos plásmidos Pjet-NSP3 o NSP1 y vFv-NSP3 o NSP1. Los resultados de dos experimentos independientes se muestran en la figura 6A. Se observó una disminución de cerca del 40% en la actividad de la Gluc codificada por el plásmido Pjet (con elementos UTRs tipo celular) al co-transfectarlo con la NSP3, y de la misma manera se observó una disminución en la actividad de esta luciferasa al co-transfectar el plásmido Pjet el plásmido que expresa la proteína NSP1 del SARS-CoV, que fungió como nuestro control positivo. En contraste, cuando se co-transfectó el plásmido vFv (que tiene UTRs tipo virales) con NSP3, se observó un aumento de la actividad de este reportero de casi dos veces, lo que no sucedió cuando se co-transfectó con NSP1 de SARS-CoV, en donde la actividad de la luciferasa de luciérnaga no disminuyó ni aumentó, se observó semejante al basal.

En el experimento anterior resalta el hecho de que durante la co-transfección de Pjet con NSP3 o NSP1, la actividad de la Gluc fue semejante en presencia de ambas proteínas. Sin embargo, la actividad del reportero Ffluc (vFv) aumentó al ser co-transfectado con NSP3 y su actividad no cambió en la co-transfección con NSP1. Una explicación a esta observación, es que quizás, al no ser la misma cantidad de DNA transfectado en cada pocito de células esto pudiera alterar los resultados observados. Por lo tanto, se integró al ensayo un plásmido control que fue GFP (NSP3 Δ NSP3T2AGFP), este plásmido se construyó de tal manera que el ORF de la proteína GFP, esta flanqueado por los primeros 200 nucleótidos de la proteína NSP3 en su extremo 5' y los últimos 100 nucleótidos en el extremo 3'. La expresión de la GFP no se cuantifica, lo que se esperaba del uso de este plásmido fue tener los mismos elementos transcripcionales, sea en la co-transfección que sirve para registrar la actividad basal del reportero y en la comparación en presencia del plásmido que expresa la NSP3.

Realizamos nuevamente el experimento mostrado en la figura 6A, con la diferencia de que ahora se tomó como actividad basal la lectura obtenida en la co-transfección de Pjet-GFP y vFv-GFP. Cada pozo de células fue transfectado con 1 μ g de DNA,

los resultados obtenidos de dos experimentos independientes se muestran en la figura 7A.

(A)



(B)



Figura 7 Actividad de *Gluc* codificada por el plásmido *Pjet* que tiene UTRs tipo celular y de *Ffluc* codificada por el plásmido *vFv* que tiene UTRs de tipo viral, cuando se co-transfectan junto con *NSP3* de RV o *NSP1* de SARS-CoV y se usa *GFP* como control. (A) Resultado de la actividad de los plásmidos reporteros *Pjet* (*Gluc*; carril 1-3) o (*vFv*; carril 4-6) cuando se co-transfectan con *NSP3* o *NSP1*, *GFP* se utilizó como control normal ($n=2$), (B) esquema de los elementos relevantes de los plásmidos usados en 6A.

Se puede observar que la actividad de Pjet (con UTRs tipo celulares), es similar al mostrado en la figura 6A al co-transfectarse con NSP3, la actividad disminuyó aproximadamente 60% y al co-transfectarse con NSP1 la actividad se redujo poco más del 50%. Cuando analizamos la actividad de vFv (con UTRs tipo virales), se observó un aumento del 80% en la actividad de la Ffluc, al co-transfectarse con NSP3 y una disminución del 50% cuando se co-transfectó con NSP1, corroborando los resultados mostrados en la figura 6A.

Para descartar la hipótesis de que hubiese una cantidad diferente de los mRNAs reporteros, por algún error durante la cuantificación o por la eficiencia de transfección de cada plásmido en las células, se diseñó un experimento en el que la actividad de ambos reporteros (similar a celular y similar a viral) se detectaran en la misma célula mediante una triple co-transfección, con la idea de que el efecto de NSP3 o NSP1, sería el mismo sobre la actividad y los transcritos de los plásmidos Pjet o vFv, en las mismas condiciones celulares. Esto haría más detallado nuestro análisis y evitaría sesgar la cuantificación de la actividad de las proteínas reporteras. Al intentar la triple co-transfección, nos encontramos con que la actividad de Pjet fue muy variable durante los distintos ensayos, muy posiblemente debido a la estrategia que se utilizó para cuantificar los distintos reporteros (datos no mostrados). La Gluc de Pjet, se secreta al medio de cultivo celular y se detecta la actividad de esta proteína en el medio de cultivo. Mientras la Ffluc se cuantifica en el lisado de las células transfectadas. Dadas las variaciones que se observaron en la actividad de la luciferasa de *Gaussia* y pensando que su secreción al medio de cultivo celular, que es un paso más y diferente al de la luciferasa de luciérnaga que no requiere de secretarse, podría verse afectada por la co-expresión de otros reporteros. Por lo tanto decidimos sustituir a Pjet por un plásmido que tuviera elementos UTRs que imitaran un mRNA de tipo celular, pero que dirigieran la expresión de un reportero no secretable y que se pudiese medir al mismo tiempo que la Ffluc. Se eligió al plásmido pRL-CMV, un plásmido comercial que expresa la *Renilla* luciferasa (Rluc). La expresión del reportero está bajo el control de la polimerasa del fago T7, la actividad de la Rluc se puede cuantificar utilizando un kit comercial que permite cuantificar en el mismo lisado celular la actividad tanto de

Rluc como de Ffluc (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega).

Como el plásmido pRL-CMV contiene además del promotor de T7, el promotor de citomegalovirus (pCMV), el cual es reconocido por las RNA polimerasas del núcleo celular y para hacer el ensayo lo más comparativo posible, se diseñó una estrategia para remover la secuencia del pCMV del plásmido de modo que el reportero de Rluc solo se puede transcribir a partir del promotor pT7 (a partir de aquí se refiere al plásmido como pRL). Se utilizaron las enzimas de restricción PstI y NdeI, con las que se escindió un fragmento de 443 pb que contenía la secuencia del pCMV, el plásmido se re-ligó y tres colonias resultantes se analizaron por restricción con la enzima BsrGI, esta enzima cuenta con dos sitios de restricción dentro del plásmido pRL.

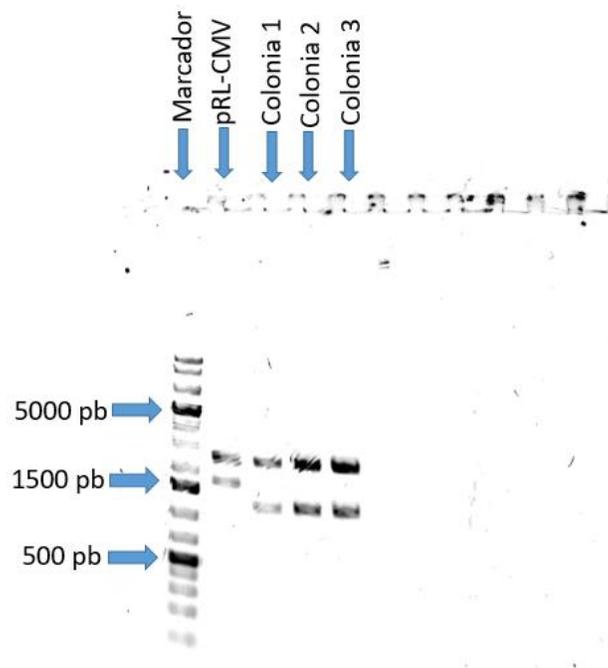


Figura 8 Digestión del plásmido pRL-CMV y pRL con la enzima de restricción BsrGI. Se observa en un gel de electroforesis el resultado de la digestión con BsrGI. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: plásmido pRL-CMV, carriles 3-5: colonias resultantes de la modificación para eliminar el pCMV.

El plásmido parental pRL-CMV es de un poco más de 4 Kb y al digerirlo con la enzima BsrGI se esperan dos fragmentos, uno de 2.4 Kb y el otro de 1.6 Kb. Al realizar el mismo tratamiento sobre las colonias aisladas, se esperaba que de resultar exitosa la delección de la secuencia del pCMV, en lugar del fragmento de 1.6 Kb del plásmido parental, se obtuviese un fragmento de 1.2 Kb, lo cual se observó para las tres colonias aisladas. El resultado de la electroforesis en gel de agarosa se muestra en la figura 8.

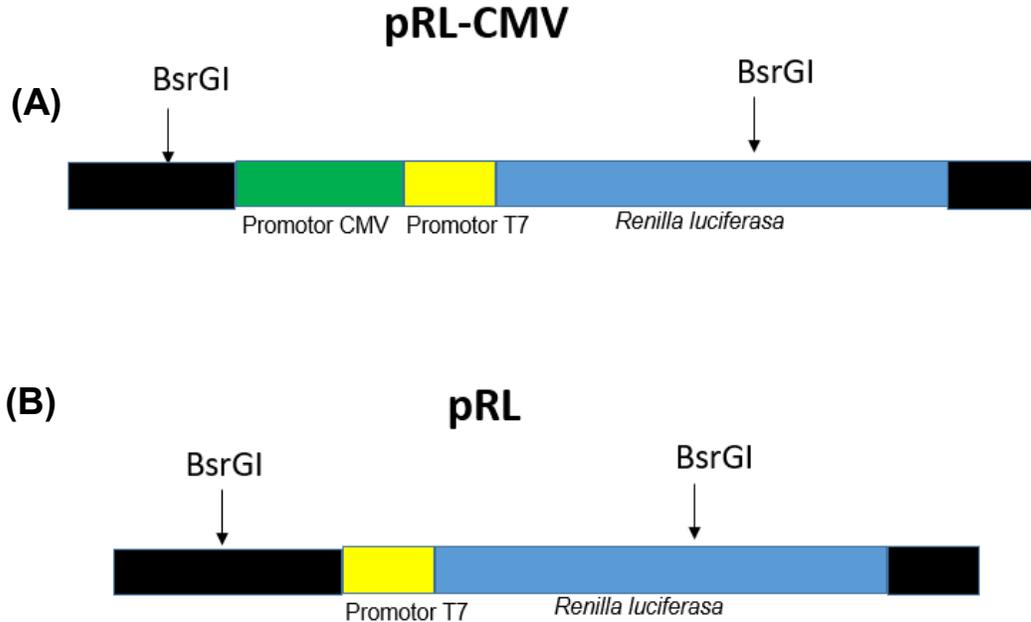


Figura 9 Representación de los sitios de corte de la enzima BsrGI sobre el plásmido pRL-CMV. (A) Muestra el plásmido pRL-CMV con el pCMV (400 pb), el fragmento digerido por BsrGI comprende 1.6 Kb, (B) se muestra el plásmido pRL ya sin el pCMV, el fragmento digerido por BsrGI comprende 1.2 Kb.

Posteriormente se evaluó la eficiencia del plásmido pRL comparado con el plásmido pRL-CMV, con la finalidad de caracterizar si la delección del pCMV comprometía la actividad de la Rluc. Se observó que la actividad de pRL disminuyó casi 10 veces, comparado con la actividad de pRL-CMV, lo que era de esperarse ya que se eliminó la actividad de este reportero a partir de su transcripción nuclear. Sin embargo, las unidades relativas de luz de la Rluc expresada por el plásmido pRL y la Gluc, expresada por el plásmido Pjet, presentan valores semejantes (se muestran en la figura 10). Por lo que se concluyó que era posible utilizar el plásmido pRL, en sustitución de Pjet.

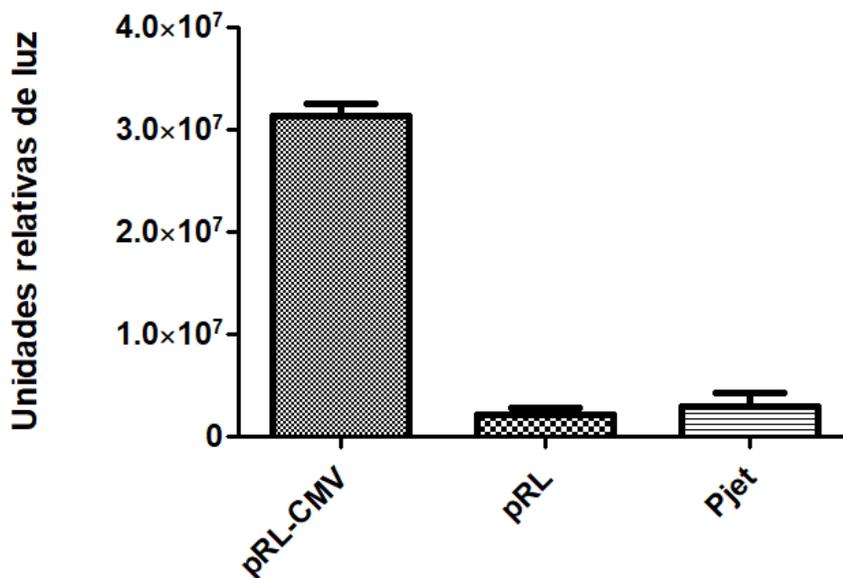


Figura 10 Actividad de los plásmidos pRL-CMV, pRL y Pjet. Muestra en unidades relativas de luz (obtenidas en luminómetro), la actividad de la proteína luciferasa (carril 1 y 2: Renilla luciferasa, carril 3: Gaussia luciferasa) que se expresó en células transfectadas con los plásmidos señalados.

Como ensayo exploratorio, se realizó la triple co-transfección evaluando el efecto de las proteínas NSP3 o NSP1 sobre la actividad de las luciferasas Rluc (mRNA tipo celular) y Ffluc (mRNA tipo viral) en un mismo pozo de células. Los resultados se observan en la figura 11, se encontró una reducción del 80% en la actividad de

Rluc cuando se co-transfectó con NSP3 y una reducción de 60% de la actividad del mismo, cuando se co-transfectó con NSP1 (figura 11A). Al evaluar la actividad de la Ffluc en el mismo lisado, se observó nuevamente el aumento de dos veces la actividad de ésta proteína cuando se co-transfectó con NSP3 y una reducción del 30% en su actividad cuando se co-transfectó con NSP1 (figura 11B).

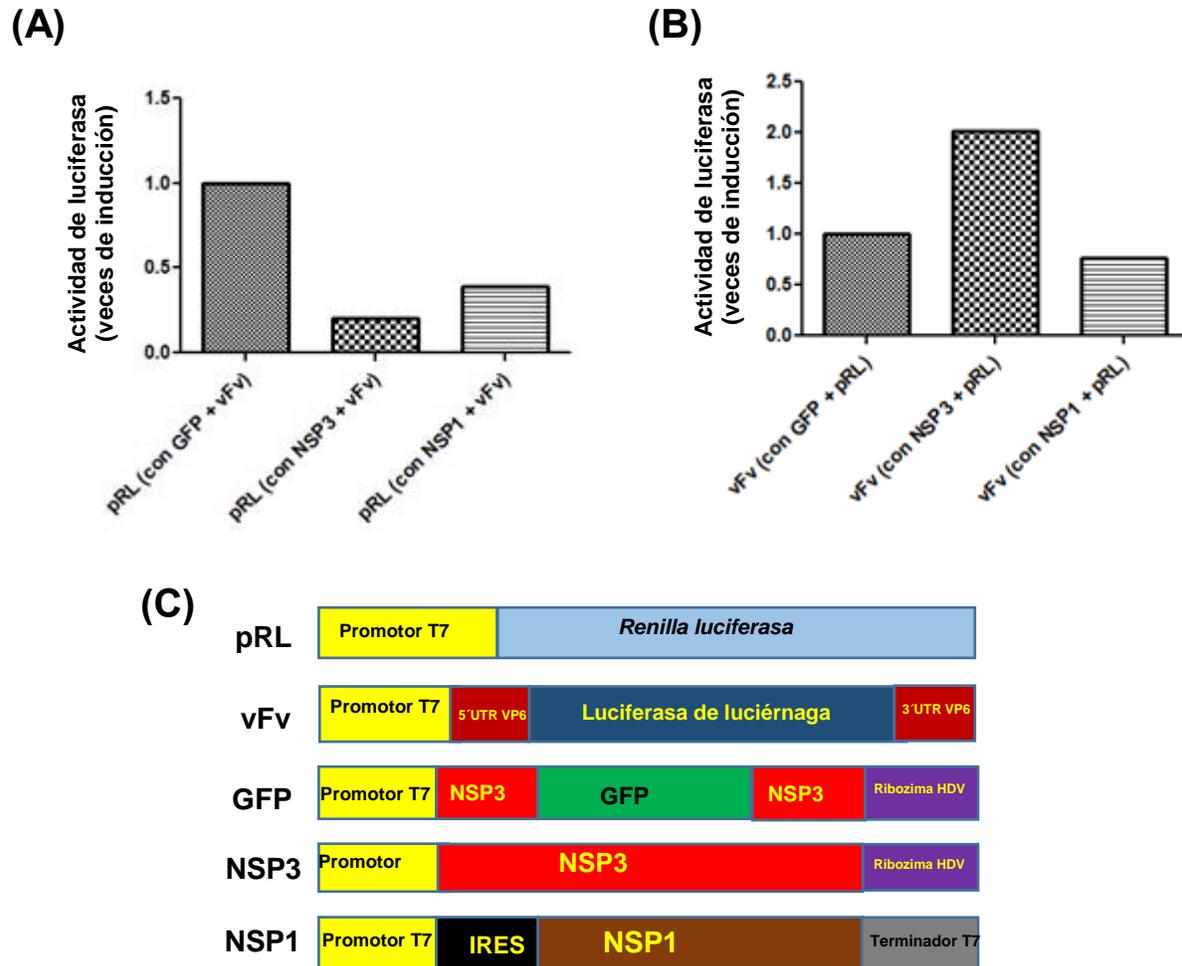


Figura 11 Actividad de Rluc codificada por el plásmido pRL (tipo celular) y actividad de Ffluc codificada por el plásmido vFv (tipo viral) cuando se co-transfectan al mismo tiempo junto con NSP3 de RV o NSP1 de SARS-CoV. (A) Muestra la actividad del plásmido reportero pRL (Rluc), en (B) se muestra la actividad del plásmido vFv (Ffluc) cuando se triple co-transfectan con NSP3 o NSP1 (n=1), (C) esquema de los elementos relevantes de los plásmidos usados en 11A y 11B.

Los resultados mostrados en la figura 11 son interesantes, sin embargo, hay dos elementos en los plásmidos reporteros que se necesitaban modificar para perfeccionar esta comparación. Los reporteros expresados en el plásmido original pRL-CMV están diseñados para poliadenilarse en el núcleo, ya que son transcritos bajo el promotor de CMV. Al eliminar este promotor, el transcrito que se produce en el citoplasma bajo el promotor de la polimerasa de T7 no se poliadenila, lo que puede alterar la actividad de este reportero. Para remediar esto, se clonó una secuencia de 30 adeninas en el extremo 3', que también estaba presente en el plásmido Pjet.

Para clonar la secuencia de 30 adeninas que simularía la cola de poli(A) en el mRNA del plásmido pRL, diseñamos dos oligonucleótidos. Un oligonucleótido sentido con secuencia 5'- TATCTACGTGCAAGTGATGATTTACC-3' el cual empalma aproximadamente 200 nucleótidos río arriba del codón de paro del ORF de la Rluc. Y un oligonucleótido antisentido 5'- TCATCTAGATTATTGTTTCATTTTGA GAACTCG-3', el cual empalma en los últimos 22 nucleótidos (resaltados) del ORF de la Rluc en el extremo 3'. La estrategia se diseñó de tal manera que, durante la primera ronda de polimerización, los nucleótidos no resaltados del oligonucleótido antisentido quedarían colgados, pero serían copiados e integrados al producto en las siguientes rondas de polimerización. Al realizar el ensayo de PCR, se obtuvo un producto de un poco más de 230 nucleótidos, mostrado en la figura 12. El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa, se cortó la banda del gel y se purificó mediante un kit. Para clonar el producto de PCR purificado de banda dentro del plásmido pRL, se utilizaron dos sitios de restricción únicos en el plásmido, BsaAI y XbaI. BsaAI deja un corte romo justo en la misma región que empalma el oligonucleótido sentido, XbaI deja un corte cohesivo, justo después del codón de paro, de la secuencia de la Rluc. Para que el producto se ligara en fase, se trató el plásmido y el producto de PCR con la enzima BsaAI. De la misma manera se trató con XbaI el plásmido y el producto de PCR. Dentro del plásmido, el sitio de restricción para la enzima XbaI, se encuentra justo después de la secuencia de paro del ORF de Rluc, en el producto de PCR el sitio de restricción de la misma

enzima se encuentra justo después de la secuencia de 30 adeninas, esto se consiguió debido al diseño del oligonucleótido antisentido. El plásmido y el producto de PCR purificados se ligaron y se transformó el producto de ligasa. Se caracterizaron 5 colonias digiriendo el DNA con las enzimas BsaI y XbaI, de ser exitosa la estrategia de clonación, los sitios de corte para ambas enzimas debían recuperarse, de manera que descartamos las colonias que no tuvieron alguno o ambos sitios de restricción, los resultados de este tamiz se muestran en la figura 13. Con este tamiz, se descartó la colonia 2, y de las posibles colonias positivas, los plásmidos de las colonias 1 y 4 se confirmaron por secuenciación (figura 14), encontramos la secuencia de 30 adeninas en los plásmidos extraídos de ambas colonias.

Sin embargo, cuando se realizó el Blast, la identidad del plásmido 4 comparado contra la del vector pRL-CMV fue de 99% y el plásmido 1 tuvo una identidad del 100% en la secuencia, por lo que se seleccionó éste para los ensayos de transfección.

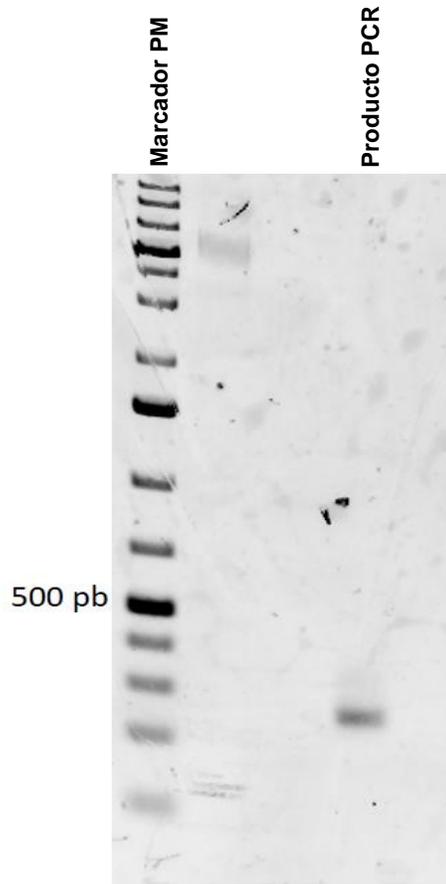


Figura 12 Producto de PCR para clonar la secuencia poli(A) en el plásmido pRL.

Por otra parte en los ensayos anteriores, el plásmido vFv se transfectaba después de linearizarlo para que la transcripción del reportero terminara justo después de los nucleótidos GACC. Para homogenizar la actividad de todos los reporteros se decidió clonar en este plásmido la ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV), secuencia que se encuentra también en el plásmido que expresa a la proteína NSP3. Las ribozimas son RNAs catalíticos que hidrolizan sus propios enlaces fosfodiéster y la ribozima de HDV, dependiendo de la posición en la que se encuentre, permite que los mRNAs en los que esta clonada terminen en los nucleótidos GACC que son los últimos 4 nucleótidos presentes en los UTR 3' de todos los mRNAs de rotavirus RRV. Revisando la secuencia del plásmido, se observó que el plásmido ya tenía la ribozima sin embargo, la posición de esta en el plásmido original, no da lugar a que los últimos nucleótidos de la secuencia consenso GACC estén en la posición adecuada para el corte endonucleolítico. Para que la ribozima corte el transcrito exactamente en los nucleótidos de interés, se eliminaron 7 nucleótidos entre la secuencia consenso GACC y la de la ribozima, utilizando los sitios únicos de las enzimas de restricción SacII y SmaI que flanquean exactamente la región de interés. Como primer paso, se trató el plásmido vFv con la enzima SmaI, la cual reconoce la secuencia CCCGGG. Se puede identificar el sitio de corte en la figura 15A, si se observan los nucleótidos que hay entre el GACC y la ribozima mostrada en color amarillo, se encuentra la secuencia GCGGCC y justo estas tres últimas C, que siguen a tres G en color amarillo son el sitio de corte de SmaI. El corte es de tipo romo, después de esta digestión se procedió al tratamiento con SacII. El sitio de corte para SacII reconoce la secuencia de nucleótidos CCGCGG, las dos primeras CC del sitio de reconocimiento de la enzima pertenecen a la secuencia GACC. Después de realizar el tratamiento con SacII, el resultado del sitio de reconocimiento se corta de la siguiente manera: CCGC-GG, lo que significa que el extremo GACC que buscamos le sobran aún los nucleótidos GC, los cuales se eliminaron con el tratamiento de la enzima T4 DNA polimerasa, lo que permite tener la secuencia GACC adyacente a la secuencia de la ribozima HDV. El plásmido así procesado se re-ligó y se aislaron colonias para realizar un tamiz, con las enzimas de restricción SmaI y SacII. Se buscaron plásmidos que no tuvieran los sitios de corte para estas

enzimas y se descartaron aquellos plásmidos que se linearizaron con alguna de las enzimas probadas. Dos de los plásmidos seleccionados se enviaron a secuenciación, utilizando el oligonucleótido 5' TCCCGATCTAGGACCAAGCT 3', además se secuenció el plásmido parental. El resultado de esta secuenciación se muestra en la figura 15, en la figura 15A se observa el resultado de la secuencia parental, resaltando en color azul la secuencia GACC y en amarillo la ribozima del HDV, en la figura 15B se observa que se ligó correctamente la secuencia consenso GACC a la ribozima del HDV, esto sucedió en ambas colonias secuenciadas, con lo cual, ya no se necesitaría linearizar el vFv al transfectar.

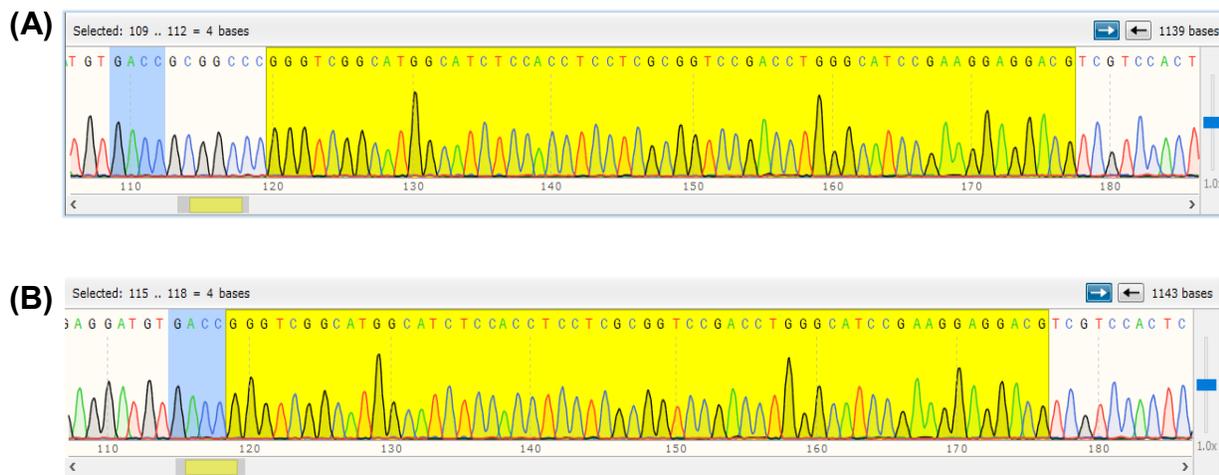


Figura 15 Secuencia del plásmido vFv y colonia con la ribozima del HDV adyacente a la secuencia consenso GACC. Muestra los resultados de la secuenciación del vector parental (A) y la colonia 1 (B) de la cual se removieron 7 nucleótidos sobrantes del UTR 3' de VP6, en el plásmido vFv. En azul resaltan la secuencia consenso GACC de los UTRs 3' viral, importante para el reconocimiento de NSP3 y en amarillo resalta la secuencia de la ribozima del HDV.

Una vez modificados los plásmidos reporteros de modo que no tuviesen diferencias en las señales de inicio y término de la transcripción entre sí, se realizó la triple co-transfección de los plásmidos. De manera general, se cultivaron células HEK293T7 en placas de 48 pozos, y una vez que estuvieron a una confluencia de 90% se co-transfectaron como se indica en los materiales y métodos. En la figura 16 se

observan los resultados de 5 experimentos independientes. En estos experimentos se utilizaron tres pozos de células, en el primero se co-transfectaron los plásmidos pRL + vFv + GFP, en el segundo pRL + vFv + NSP3 y el en tercero pRL + vFv + NSP1 y en cada uno se midió la actividad de Rluc y Ffluc, con la finalidad de estudiar el efecto que pudiera tener las proteínas NSP3, NSP1 sobre la actividad de los plásmidos reporteros.

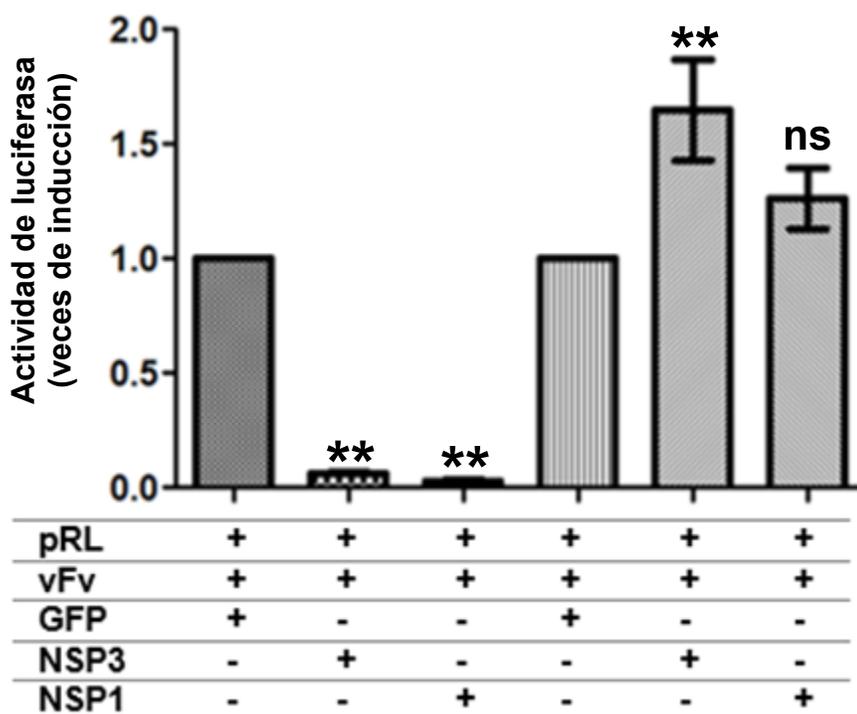


Figura 16 Actividad de Rluc codificada por el plásmido pRL que tiene UTRs tipo celular y de Ffluc codificada por el plásmido vFv que tiene UTRs tipo viral, resultado de una triple transfección; muestra el efecto de NSP3 de RV y NSP1 de SARS-CoV en la actividad de ambos reporteros. Se utilizaron tres pozos de células y en cada una se transfectaron los plásmidos señalados con una “+”. En los carriles 1-3 se muestra la actividad de Rluc y en los carriles 4-6 la actividad de Ffluc, n=5. Los resultados estadísticamente significativos se muestran con un “**” ($p > 0.05$).

Los resultados que se observaron son muy interesantes, mostraron como la actividad de Rluc, el reportero flanqueado por elementos UTRs tipo celular, disminuyó hasta en 94% al co-transfectarse con NSP3 y en un 97% cuando se co-transfectó con NSP1. En contraste, la actividad de Ffluc (en la que el reportero esta

flanqueado por los UTRs virales) se observó un aumento de la actividad de *Ffluc* de un 60% en promedio, cuando se co-transfectó con NSP3, y un ligero aumento del 20% cuando se co-transfectó con NSP1. Cabe destacar que el efecto que ha mostrado NSP3 sobre la actividad del reportero tipo celular y tipo viral, es similar al mostrado en los ensayos de las figuras 6A y 7A.

Dado que la actividad de la proteína reportera no indica si los cambios observados son debidos a la eficiencia de traducción de estas proteínas o a la abundancia del mRNAs que codifican los reporteros, se planteó el análisis de los niveles de los mRNAs mediante experimentos de RT-PCR en tiempo real (qPCR). Los resultados de estos experimentos se observan en la figura 17. De manera general, lo que se hizo para obtener estos datos en primer lugar fue extraer el RNA total de las células transfectadas y con este se realizó el cDNA de los genes de interés, es decir, de *Rluc*, *Ffluc* y como control basal, del rRNA 18S. Una vez que se obtuvieron los cDNAs se realizó el qPCR tal como se explica en los materiales y métodos. El análisis de los resultados se hizo de acuerdo al método de Livak, también conocido como $2^{-\Delta\Delta Ct}$, con este método, se compara de manera relativa la abundancia del mRNA presente en una muestra normal contra una muestra tratada, normalizado a un RNA calibrador (Livak & Schmittgen, 2001). En este análisis, la muestra normal corresponde a las células co-transfectadas con los plásmidos reporteros pRL y vFv, más el plásmido que expresa GFP, las muestras tratadas corresponden a las células co-transfectadas con los plásmidos reporteros pRL y vFv más los plásmidos que expresan las proteínas NSP3 o NSP1 y el mRNA calibrador que se utilizó fue el del rRNA 18S. Los datos presentados en la figura 13 corresponden a tres experimentos independientes. Se observó que la cantidad de mRNA que codifica por *Rluc*, el reportero con UTRs tipo celular, disminuyó 50% en su abundancia en las muestras que se co-transfectaron con la proteína NSP3 y en las muestras que se co-transfectaron con NSP1, se observó también una disminución del 50% en su abundancia. Al estudiar la abundancia del mRNA de *Ffluc*, reportero con UTRs tipo virales, se observó que contrario a lo que sucedió con el mRNA de *Rluc*, la abundancia del mRNA de *Ffluc* aumento del 30 hasta un 50% cuando se co-transfectó con NSP3, cuando se estudió la abundancia del mRNA de *Ffluc*, cuando

se co-transfectó con NSP1, los resultados mostraron que la cantidad de mRNA de Ffluc fue similar entre el control transfectado con el plásmido GFP y la que se co-transfectó con NSP1. Estos resultados sugieren que el efecto de las proteínas NSP3 y NSP1 depende de los elementos UTRs presentes en los reporteros.

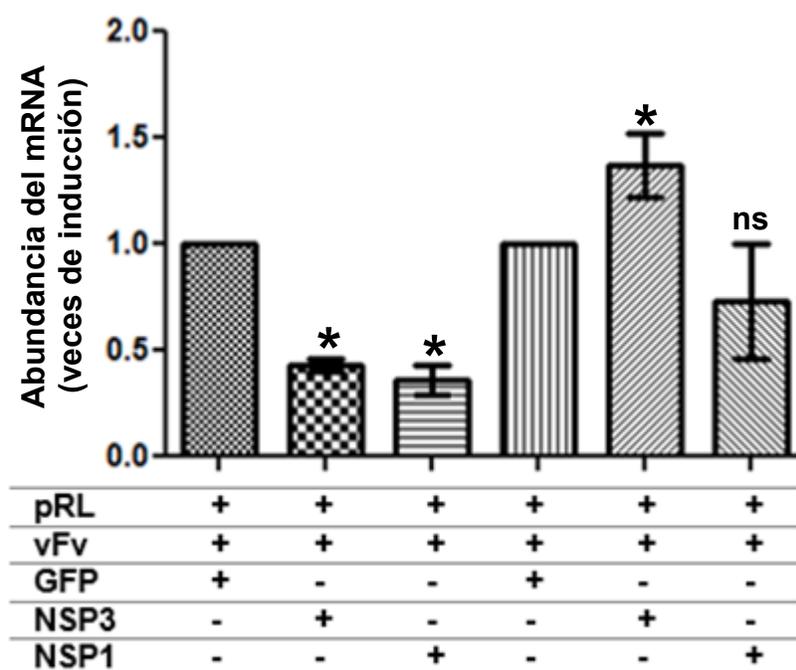


Figura 17 Abundancia del mRNA transcrito por el plásmido pRL que tiene UTRs tipo celular y del mRNA transcrito por el plásmido vFv que tiene UTRs tipo viral, resultado de una triple transfección; muestra el efecto de NSP3 de RV y NSP1 del SARS-CoV en la abundancia del mRNA de ambos reporteros. Se utilizaron tres pozos de células y en cada una se transfectaron los plásmidos señalados con una “+”. En los carriles 1-3 se muestra la abundancia del mRNA de Rluc y en los carriles 4-6 la abundancia del mRNA de Ffluc, n=3. Los resultados estadísticamente significativos se muestran con un “*” ($p > 0.05$).

6.- DISCUSIÓN

La finalidad de este trabajo fue estudiar la probable función de la proteína NSP3 de rotavirus como endonucleasa viral. Se evaluó la actividad y la abundancia del mRNA de dos proteínas reporteras, Rluc, expresada por el plásmido pRL, que tiene UTRs que simulan un transcrito de tipo celular y Ffluc, expresada por el plásmido vFv, que tiene UTRs que simulan un transcrito de tipo viral.

En el primer enfoque, estudiamos el efecto de la proteína NSP3 sobre la actividad de dos plásmidos reporteros con UTRs tipo celulares o virales, y se comparó el efecto con respecto a GFP (control basal) o NSP1 del SARS-CoV (control positivo), por medio de ensayos de transfección. Observamos que la actividad del gen reportero tipo celular disminuyó un 95% cuando se co-transfectó con NSP3 y lo mismo cuando se co-transfectó con NSP1. Al estudiar el gen reportero tipo viral, observamos que aumentó su actividad un 60% cuando se co-transfectó con NSP3 y aumentó 20% cuando se co-transfectó con NSP1 (figura 16). De este primer ensayo surgen algunas hipótesis, la primera es que, ya que la disminución en la actividad del gen tipo celular es tan semejante con ambas proteínas, NSP3 podría tener una función semejante a la que tiene NSP1 y eso explicaría también el fenómeno observado en la actividad del gen tipo viral. Según la literatura, la proteína NSP1 del SARS-CoV no tiene función endonucleasa *per se*, sin embargo, induce el corte de los mRNAs celulares y algunos mRNAs que contienen IRES (Kamitani *et al.*, 2009). Se ha reportado que la asociación de la proteína NSP1 con la sub-unidad 40S del ribosoma, induce el estancamiento de los mRNAs celulares unidos al ribosoma, lo que activa a la maquinaria de degradación de la célula al degradar los transcritos estancados (TIDU *et al.*, 2020). Pero también se sabe, que los mRNAs del SARS-CoV no son susceptibles a este corte endonucleolítico, y se ha propuesto que la secuencia líder presente en la región UTR 5' viral, presente en todos los mRNAs virales, es capaz de formar una estructura tallo-burbuja (Huang *et al.*, 2011) que induce un cambio conformacional en la sub-unidad 40S del ribosoma de tal manera que “abre un surco” en el ribosoma, que se encontraba bloqueado con la interacción de la proteína NSP1, permitiendo la traducción selectiva de los mRNAs

virales (TIDU *et al.*, 2020). Probablemente los UTRs virales de rotavirus tengan un papel similar al de la secuencia líder de los mRNAs del SARS-CoV, de tal manera que protejan a los mRNAs de rotavirus, de la degradación mediada por diferentes endonucleasas virales tales como NSP3 o NSP1.

Los ensayos para cuantificar la abundancia de los mRNAs de los genes reporteros, mostraron una reducción del 50% en la abundancia del mRNA tipo celular, cuando se co-transfectó con NSP3 y lo mismo con NSP1. La abundancia del mRNA tipo viral aumentó 30% cuando se co-transfectó con NSP3 y disminuyó 20% cuando se co-transfectó con NSP1 (figura 17). La disminución en la abundancia del mRNA tipo celular fue similar en la co-transfección con ambas proteínas virales, sugiriendo que probablemente NSP3 si induce la degradación del mRNA celular, ya que suponer que la disminución de la abundancia tiene que ver con una disminución en la síntesis de mRNAs por parte de la polimerasa T7 entra en conflicto ya que se observa en el mismo pozo de células un aumento en la abundancia del mRNA tipo viral. El aumento de la abundancia del mRNA de tipo viral, podría sugerir la participación de los UTRs, probablemente brindando estabilidad al mRNA. Destaca que las secuencias UTRs virales podrían evitar la degradación del mRNA inducida por la proteína NSP1, al menos de manera parcial, ya que la abundancia del mRNA tipo celular disminuye 50% y del mRNA tipo viral solo disminuye 20%.

Después de los ensayos realizados, llama la atención la similitud de los resultados que se observaron cuando el reportero tipo celular se co-transfectó con NSP3 y con NSP1, probablemente, este efecto tenga relación con la inducción de alguna endonucleasa o debido a una función de endonucleasa por parte de la proteína NSP3. Para sugerir con certeza la propuesta anterior, aún hace falta estudiar la relación que existe entre NSP3 y la proteína Xrn1. Se sabe que las endonucleasas virales (incluso NSP1 que no es endonucleasa *per se*) inician el proceso de degradación del mRNA que es seguida por la exonucleasa Xrn1 para que los mRNAs que cortan sean degradados (Covarrubias *et al.*, 2011), por lo tanto, si NSP3 tiene actividad endonucleolítica y corta los mRNAs, podría utilizarse a Xrn1 para continuar la degradación. Si la función de NSP3 fuera de endonucleasa, al

silenciar a la proteína Xrn1, se debería observar la misma cantidad de mRNA (o semejante) del gen tipo celular (*Rluc*) al co-transfectarse con NSP3 y la co-transfección basal.

Por otra parte, el efecto diferencial que ejerce la proteína NSP3 sobre el reportero tipo celular y el tipo viral sugiere la participación de los UTRs en este fenotipo. Esto conlleva a la pregunta de: ¿cómo hace NSP3 para reconocer a los transcritos celulares de los virales?, muy probablemente tenga que ver con la presencia de la secuencia poli(A), o de las secuencias consenso presentes en los UTRs virales, tal como GGCUAUAAA presente en el UTR 5' y GACC presente en el UTR 3'. Gratia y cols. mostraron que modificaciones a las secuencias consenso disminuyen la eficiencia de traducción de genes reporteros donde se han fusionado (Gratia et al., 2016). El análisis de los UTRs podría aportar mayor información con la finalidad de entender cómo es que NSP3 lleva a cabo el fenotipo aquí mostrado.

7.- CONCLUSIONES

Ya que los resultados de actividad y abundancia del mRNA del reportero tipo celular, al co-transfectarse con NSP3 o la NSP1 son similares, podemos sugerir que NSP3 ejerce o induce la función de endonucleasa viral sobre los genes tipo celulares más no sobre los virales, aunque se requiere estudiar la participación de la proteína Xrn1 para corroborar o descartar la función.

Se puede sugerir que los UTRs que flanquean a los reporteros son los responsables del fenotipo distinto que ejerce la NSP3 y la NSP1 del SARS-CoV sobre el mRNA tipo celular o tipo viral.

Es necesario determinar si los dominios amino y carboxilo terminal de la proteína NSP3 están involucrados en determinar la vida media de los respectivos reporteros.

8.- PERSPECTIVAS

- Evaluar el papel de la proteína Xrn1 y su relación con la abundancia del mRNA tipo celular y el tipo viral.
- Estudiar el efecto de la ausencia o modificaciones a los UTRs celulares y virales en la expresión de proteínas y la abundancia del mRNA cuando está presente NSP3.
- Estudiar el papel de los distintos dominios de la proteína NSP3 sobre los UTRs celulares y virales en la expresión de proteínas y la abundancia del mRNA.

9.- BIBLIOGRAFÍA

- Abernathy, E., & Glaunsinger, B. (2015). *Emerging roles for RNA degradation in viral replication and antiviral defense*. 480, 600–608.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.007>
- Covarrubias, S., Gaglia, M. M., Kumar, G. R., Wong, W., Jackson, A. O., & Glaunsinger, B. A. (2011). Coordinated destruction of cellular messages in translation complexes by the gammaherpesvirus host shutoff factor and the Mammalian Exonuclease Xrn1. *PLoS Pathogens*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002339>
- Estes MK, G. H. (2013). Rotaviruses. *Fields Virology*. *Fields Virology*.
<https://doi.org/9781451105636>
- Everly, D. N., Feng, P., Mian, I. S., & Read, G. S. (2002). mRNA Degradation by the Virion Host Shutoff (Vhs) Protein of Herpes Simplex Virus: Genetic and Biochemical Evidence that Vhs Is a Nuclease. *Journal of Virology*, 76(17), 8560–8571.
<https://doi.org/10.1128/jvi.76.17.8560-8571.2002>
- Feng, P., Everly, D. N., & Read, G. S. (2005). *mRNA Decay during Herpes Simplex Virus (HSV) Infections : Protein-Protein Interactions Involving the HSV Virion Host Shutoff*

Protein and Translation Factors eIF4H and eIF4A. 79(15), 9651–9664.

<https://doi.org/10.1128/JVI.79.15.9651>

Gaglia, M. M., Covarrubias, S., Wong, W., & Glaunsinger, B. A. (2012). A Common Strategy for Host RNA Degradation by Divergent Viruses. *Journal of Virology*, 86(17), 9527–9530. <https://doi.org/10.1128/jvi.01230-12>

Gratia, M., Sarot, E., Vende, P., Charpilienne, A., Baron, C. H., Duarte, M., Pyronnet, S., & Poncet, D. (2015). Rotavirus NSP3 Is a Translational Surrogate of the Poly(A) Binding Protein-Poly(A) Complex. *Journal of Virology*, 89(17). <https://doi.org/10.1128/jvi.01402-15>

Gratia, M., Vende, P., Charpilienne, A., Carolina Baron, H., Laroche, C., Sarot, E., Pyronnet, S., Duarte, M., & Poncet, D. (2016). Challenging the roles of nsp3 and untranslated regions in rotavirus mRNA translation. *PLoS ONE*, 11(1), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145998>

Groft, C. M., & Burley, S. K. (2002). Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Molecular Cell*, 9(6), 1273–1283. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00555-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00555-5)

Ho Chang, J. (2010). *Structural and biochemical studies of the 5'→3'_Xrn1.pdf*. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1984>

Huang, C., Lokugamage, K. G., Rozovics, J. M., Narayanan, K., & Semler, B. L. (2011). SARS Coronavirus nsp1 Protein Induces Template- Dependent Endonucleolytic Cleavage of mRNAs: Viral mRNAs Are Resistant to nsp1-Induced RNA Cleavage. 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002433>

Kamitani, W., Huang, C., Narayanan, K., Lokugamage, K. G., & Makino, S. (2009). A two-pronged strategy to suppress host protein synthesis by SARS coronavirus Nsp1 protein. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(11), 1134–1141. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1680>

Kamitani, W., Narayanan, K., Huang, C., Lokugamage, K., Ikegami, T., Ito, N., Kubo, H., & Makino, S. (2006). Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 protein suppresses host gene expression by promoting host mRNA degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(34), 12885–12890. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603144103>

- Kumar, G. R., Shum, L., & Glaunsinger, B. A. (2011). Importin β -Mediated Nuclear Import of Cytoplasmic Poly(A) Binding Protein Occurs as a Direct Consequence of Cytoplasmic mRNA Depletion. *Molecular and Cellular Biology*, 31(15), 3113–3125. <https://doi.org/10.1128/mcb.05402-11>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- López, S., Oceguera, A., & Sandoval-Jaime, C. (2016). Stress response and translation control in rotavirus infection. *Viruses*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/v8060162>
- Marcy, S. M., & Partridge, S. (2011). Rotavirus Infection. *Netter's Infectious Disease*, 39–41. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0126-5.00009-4>
- Montero, H., Arias, C. F., & Lopez, S. (2006). Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 Is Not Required for Viral Protein Synthesis. *Journal of Virology*, 80(18), 9031–9038. <https://doi.org/10.1128/jvi.00437-06>
- Padilla-Noriega, L., Paniagua, O., & Guzmán-León, S. (2002). Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis. *Virology*, 298(1), 1–7. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1477>
- Piron, M, Delaunay, T., Grosclaude, J., & Poncet, D. (1999). Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *Journal of Virology*, 73(7), 5411–5421. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364288><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC112597>
- Piron, Maria, Vende, P., Cohen, J., & Poncet, D. (1998a). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO Journal*, 17(19), 5811–5821. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5811>
- Piron, Maria, Vende, P., Cohen, J., & Poncet, D. (1998b). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO Journal*, 17(19), 5811–5821. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5811>
- Poncet, D., Laurent, S., & Cohen, J. (1994). Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *EMBO Journal*, 13(17),

4165–4173. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06734.x>

- Rubio, R. M., Mora, S. I., Romero, P., Arias, C. F., & Lopez, S. (2013). Rotavirus Prevents the Expression of Host Responses by Blocking the Nucleocytoplasmic Transport of Polyadenylated mRNAs. *Journal of Virology*, *87*(11), 6336–6345. <https://doi.org/10.1128/jvi.00361-13>
- Sánchez-Tacuba, L., Feng, N., Meade, N. J., Mellits, K. H., Jais, P. H., Yasukawa, L. L., Resch, T. K., Jaing, B., Lopez, S., Ding, S., & Greenberg, H. B. (2020). An Optimized Reverse Genetics System Suitable for Efficient. *Journal of Virology*, *94*(18), 1–14.
- Sandoval-Jaime, C., Green, K. Y., & Sosnovtsev, S. V. (2015). Recovery of murine norovirus and feline calicivirus from plasmids encoding EMCV IRES in stable cell lines expressing T7 polymerase. *Journal of Virological Methods*, *217*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.02.003>
- Sarma, N., Agarwal, D., Shiflett, L. A., & Read, G. S. (2008). *Small Interfering RNAs That Deplete the Cellular Translation Factor eIF4H Impede mRNA Degradation by the Virion Host Shutoff Protein of Herpes Simplex Virus* □. *82*(13), 6600–6609. <https://doi.org/10.1128/JVI.00137-08>
- Schubert, K., Karousis, E. D., Jomaa, A., Scaiola, A., Echeverria, B., Gurzeler, L. A., Leibundgut, M., Thiel, V., Mühlemann, O., & Ban, N. (2020). SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. *Nature Structural and Molecular Biology*, *27*(10), 959–966. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0511-8>
- Tidu, A., Janvier, A., Schaeffer, L., Sosnowski, P., Kuhn, L., Hammann, P., Westhof, E., Eriani, G., & Martin, F. (2021). The viral protein NSP1 acts as a ribosome gatekeeper for shutting down host translation and fostering SARS-CoV-2 translation. *Rna*, *27*(3), 253–264. <https://doi.org/10.1261/rna.078121.120>
- TIDU, A., JANVIER, A., SCHAEFFER, L., SOSNOWSKI, P., KUHN, L., HAMMANN, P., WESTHOF, E., ERIANI, G., & MARTIN, F. (2020). The viral protein NSP1 acts as a ribosome gatekeeper for shutting down host translation and fostering SARS-CoV-2 translation. *Rna*, rna.078121.120. <https://doi.org/10.1261/rna.078121.120>
- Vende, P., Piron, M., Castagne, N., & Poncet, D. (2000). Efficient Translation of Rotavirus mRNA Requires Simultaneous Interaction of NSP3 with the Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4G and the mRNA 3' End. *Journal of Virology*, *74*(15), 7064–7071.

<https://doi.org/10.1128/jvi.74.15.7064-7071.2000>

Vende, Patrice, Piron, M., Castagné, N., & Poncet, D. (2000). Efficient Translation of Rotavirus mRNA Requires Simultaneous Interaction of NSP3 with the Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4G and the mRNA 3' End. *Journal of Virology*, 74(15), 7064–7071. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.15.7064-7071.2000>

Vitour, D., Lindenbaum, P., Vende, P., Becker, M. M., & Poncet, D. (2004). RoXaN, a Novel Cellular Protein Containing TPR, LD, and Zinc Finger Motifs, Forms a Ternary Complex with Eukaryotic Initiation Factor 4G and Rotavirus NSP3. *Journal of Virology*, 78(8), 3851–3862. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.8.3851-3862.2004>