



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL DESARROLLO Y FISIOLÓGIA
MOLECULAR**

**“CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS
COMPONENTES DE LOS SGs DURANTE
LA INFECCIÓN CON ROTAVIRUS”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A :

Diana Luz Escobar Zárate

DIRECTOR DE TESIS: Dra. Susana López Charreton



CUERNAVACA, MORELOS

SEPTIEMBRE, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

Esta tesis está dedicada a mis padres Luz María y José Luis, quienes me han dado todo su amor y apoyo en cada una de las etapas de mi vida.

A mis hermanas Adela y Luisa, quienes han llenado mi vida de grandes alegrías.

Por todo su amor y apoyo incondicional

Gracias.

Agradecimientos

- *A mi tutora Susana López Charreton*

- *A mi comité tutorial:*
 - *Dr. Ramón González García-Conde*
 - *Dr. Jean Louis Charli*

- *A mi jurado de examen:*
 - *Dra. Helena Porta Ducoing*
 - *Dr. José Luis Reyes Taboada*
 - *Dra. Rosa Navarro González*
 - *Dra. Leonor Pérez Martínez*

- *A mis Compañeros y amigos del laboratorio*

INDICE

Resumen	1
I. Introducción	2
1.1. Traducción celular en eucariotes	3
1.1.1. Etapa de inicio de la traducción	3
1.2. El factor eIF2 α , los sensores de estrés celular y la formación de SGs	5
1.3. Composición de los SGs	7
1.3.1. Ensamblaje de los SGs	9
1.4. Virus y SGs	13
1.5. Generalidades de los Rotavirus	14
1.5.1. Genoma Viral	15
1.5.2. Ciclo replicativo de Rotavirus	15
II. Antecedentes	18
III. Hipótesis	20
IV. Objetivo General	20
4.1. Objetivos Particulares	20
V. Metodología	21
VI. Resultados	29
VII. Discusión	66
VIII. Conclusiones	74
IX. Perspectivas	76
X. Referencias	77
Abreviaturas	80

Resumen

Cuando una célula se encuentra en condiciones de estrés, como es, la irradiación UV, la ausencia de nutrientes, choque térmico, estrés oxidativo e infecciones virales, dentro de ella ocurren una serie de cambios que le permiten reparar el daño inducido por el estrés y sobrevivir a las diferentes condiciones ambientales. En mamíferos, existen principalmente 4 cinasas (HRI, PKR, PERK y GCN2), que monitorean las condiciones de estrés y modulan directamente la maquinaria de traducción de la célula. Estas cinasas, fosforilan el residuo de serina 51 de la subunidad α del factor eIF2. La fosforilación del factor eIF2, inhibe la formación del complejo ternario eIF2-GTP-tRNA^{iMet}, y esto promueve una inhibición de la traducción. Durante esta inhibición, los ribosomas se separan de los RNAs mensajeros y estos son dirigidos hacia unas estructuras citoplásmicas conocidas como gránulos de estrés (SGs). Hasta ahora, se ha descrito, que además de RNAs mensajeros, los SGs están compuestos, por los factores de inicio de la traducción eIF3b y eIF4G, y varias proteínas que además de tener diversas funciones tienen propiedades de unión a RNA, como TIA-1, G3BP y PABP. Por otra parte, los virus, como parásitos intracelulares, han desarrollado diversas estrategias para evadir el mecanismo de defensa celular y realizar la síntesis de sus proteínas, llevando a cabo su ciclo replicativo. Tal es el caso de rotavirus, que durante su infección, se lleva a cabo la fosforilación del factor eIF2 y la inhibición de síntesis de proteínas celulares, sin embargo, a pesar de estos dos factores importantes para la formación de SGs, no se observa la formación de estas estructuras. En el presente trabajo, se estudió la distribución de algunas de las proteínas componentes de los SGs (eIF3b, caprina-1, RI y G3BP) durante la infección con RRV y el efecto del RNA de doble cadena (RNAdc) en la formación de SGs como una posible herramienta para la determinación del mecanismo de inhibición de estas estructuras durante la infección. Mediante ensayos de inmunofluorescencia, se demostró en células U2OS, que la distribución de las proteínas eIF3b, caprina-1 y RI, no cambia durante la infección con RRV. También, se encontró que durante la infección, la proteína G3BP forma una agregados citoplásmicos parecidos a los SGs descritos con arsenito. Sin embargo, con tratamientos de cicloheximida, se demostró que estos agregados no eran SGs. También, con ensayos de inmunofluorescencia, se observó, que los SGs formados por efecto del RNAdc, a diferencia de los SGs formados con arsenito, se mantienen por largo tiempo y varían tanto en composición como en estabilidad. Por otro lado, se demostró, que al igual que rotavirus, el estrés de RNAdc distribuye a la proteína PABP en núcleo. Por último, se encontró que el efecto del RNAdc en células MA104 inhibe la infección con RRV. En conclusión, estos resultados, nos permiten sugerir, que la agregación de la proteína G3BP durante la infección con RRV, pudiera ser el mecanismo por el cual se inhibe la formación de SGs durante la infección. Además, la caracterización de los SGs formados por RNAdc, nos permiten sugerir, que hay diferentes tipos de SGs y que estos dependen del tipo de estrés que recibe la célula.

I. Introducción

El entendimiento de cómo las células responden a múltiples señales ambientales para llevar a cabo el crecimiento celular y su desarrollo, así como la adaptación a su entorno, ha sido uno de los principales objetivos de la biología. A lo largo de la evolución, la adaptación celular requirió de la reparación eficiente del daño molecular causado por la radiación, las temperaturas extremas y los altos niveles de oxígeno atmosférico. Esta presión adaptativa permitió que las células desarrollaran la habilidad de responder a diversas condiciones ambientales a través de la activación de una respuesta integrada al estrés con el objetivo de reprogramar el metabolismo celular y adaptarse a las nuevas condiciones. Esta reprogramación principalmente es llevada a cabo por la modificación de los componentes de la maquinaria de traducción (proteínas, RNA) y por el direccionamiento de RNAs mensajeros (mRNAs) específicos a los sitios de traducción, almacenaje o degradación ^[1, 2, 3, 4]. Este direccionamiento, permite la traducción selectiva de mRNAs que codifiquen para proteínas de reparación y en conjunto la capacidad para sobrellevar el estrés ^[3, 5, 6]. De esta manera, una célula está evolutivamente adaptada para responder eficientemente a diferentes condiciones de estrés como son la oxidación, la radiación, la ausencia de nutrientes y las infecciones virales. A su vez, los virus, como parásitos intracelulares, han desarrollado una variedad de estrategias que les permiten evadir esta respuesta celular e incluso utilizarla para llevar a cabo su replicación.

Para entender el mecanismo de cómo es que se lleva a cabo la respuesta a estrés en una célula y la manera en que los virus evaden este mecanismo, primero se hablará de cómo se lleva a cabo el proceso de traducción celular.

1.1. Síntesis de proteínas en eucariontes

La síntesis de proteínas celulares es realizada por los ribosomas que actúan junto con un gran número de factores accesorios para traducir la información genética contenida en el mRNA. El proceso de traducción, se divide en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. En la etapa de iniciación se lleva a cabo el ensamblaje del ribosoma sobre el codón de inicio (AUG) del mRNA. En la etapa de elongación se lleva a cabo la síntesis del polipéptido. Y en la etapa de terminación se lleva a cabo la liberación del polipéptido y el desensamblaje del ribosoma del mRNA ^[4, 16, 31].

1.1.1. Etapa de inicio de la traducción

La iniciación es la etapa más regulada de la traducción; en ella participan proteínas celulares conocidas como factores de inicio de la traducción o eIFs (del inglés ekaryote Initiation Factor), los ribosomas y tRNAs sintetasas ^[4, 31, 33].

El mecanismo de traducción de la mayoría de los mRNA celulares es un proceso que involucra a los extremos 3' y 5' del mRNA. En general, los mRNAs celulares se caracterizan por tener una estructura llamada cap (m^7GpppX) en el extremo 5' y una secuencia poliadenilada (poli A) en el extremo 3' ^[16]. El inicio de la traducción comienza con el reclutamiento del mRNA a través del cap por el complejo eIF4F; este complejo proteico está formado por 3 factores de inicio: la proteína de unión al cap (eIF4E), una helicasa de RNA (eIF4A) y el factor eIF4G que establece una interacción entre los factores eIF4E y eIF4A ^[4, 16, 31]. eIF4G interactúa también con la proteína de unión al poli A conocida como PABP (del

inglés Poly-A Binding Protein) que se encuentra unida al extremo 3' poli-A del mRNA dando lugar a la circularización del mRNA vía interacción 3'-poli-A del mRNA-PABP-eIF4G-eIF4E-cap del extremo 5' del mRNA; en estudios *in vitro* se demostró, que esta circularización del mRNA hace más eficiente la traducción [16, 31, 33, 38] (Fig. 1).

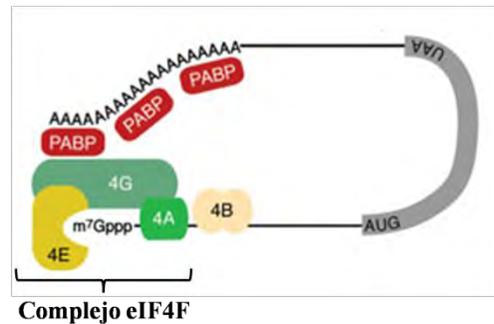


Fig. 1. Circularización del mRNA en el inicio de la traducción a través de la interacción del complejo eIF4F y PABP [31].

Por otra parte, eIF4G interactúa también con el factor de inicio eIF3, el cual recluta a la subunidad ribosomal 40S y al complejo ternario eIF2-GTP-tRNA_i^{Met} dando como resultado el complejo de pre-iniciación conocido como 43S, que está listo para interactuar con el mRNA y recorrerlo hasta encontrar el primer codón de inicio (AUG) [Fig. 2] [31,38]. Una vez reconocido el codón de inicio, el complejo ternario deposita el tRNA_i^{Met} a su anticodón, esto promueve la hidrólisis de GTP del factor eIF2-GTP, lo que favorece la interacción de la subunidad ribosomal 40S y la subunidad 60S, dando como resultado la formación del complejo 80S y el inicio de la síntesis del péptido [31, 38]. El factor eIF2 es liberado como complejo binario eIF2-GDP; y finalmente, el GDP del complejo binario es reciclado a GTP por el factor eIF2B (proteína intercambiadora de nucleótido), lo que permite, que este pueda ser utilizado en una siguiente ronda de inicio de traducción [31, 33, 38].

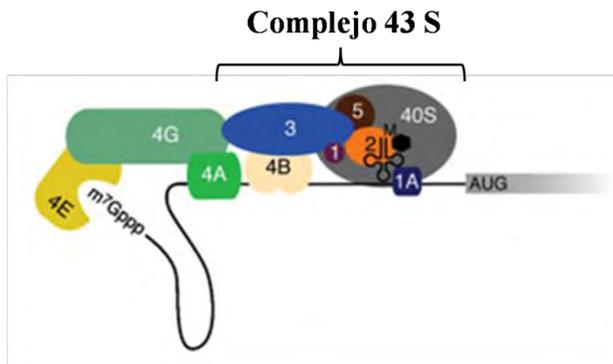


Fig. 2. Interacción del complejo eIF4F con el complejo de pre-iniciación 43S. El complejo 43S está formado por eIF3 (3), eIF5 (5), la subunidad ribosomal 40S, eIF2 (2), eIF1 (1), tRNA iniciador (M), y eIF1A (1A) [31].

1.2. El factor eIF2 α , los sensores de estrés celular y la formación SGs

Una respuesta integrada a estrés comprende una serie de cambios en el metabolismo celular que le permite a la célula reparar el daño inducido por el estrés y sobrevivir a diferentes condiciones ambientales. El arresto traduccional que acompaña un estrés ambiental es altamente selectivo e implica la reprogramación del proceso de traducción en la célula, favoreciendo principalmente la traducción de aquellas proteínas que le permitan sobrevivir al estrés [38]. Durante el estrés, los mRNAs que codifican para proteínas expresadas constitutivamente son dirigidos a estructuras formadas por agregados citoplasmáticos conocidos como gránulos de estrés (SG del inglés Stress Granules) [2, 3, 4, 19], inhibiéndose de esta manera su traducción.

En mamíferos existen principalmente 4 cinasas que monitorean las condiciones de estrés y modulan directamente la maquinaria de la traducción [2, 3, 4, 5, 19, 14]. Estas cinasas (Tabla 1): HRI (del inglés heme-regulated inhibitor kinase), PKR (del inglés Protein Kinase RNA), PERK (del inglés PKR-like endoplasmic reticulum) y GCN2 (del inglés General Control Non-derepressible-2), fosforilan el residuo de serina 51 de la subunidad α del factor eIF2 [14].

La fosforilación del factor eIF2, aumenta la afinidad de este factor por la proteína intercambiadora de nucleótido, eIF2B. La unión del factor eIF2 con la proteína eIF2B inhibe el intercambio GDP por GTP en el complejo binario eIF2-GDP, reduciéndose de esta manera la disponibilidad del complejo eIF2-GTP-tRNA^{iMet} y dando lugar a una inhibición de la traducción [3,4].

Durante esta inhibición de la traducción, los ribosomas se separan de los mRNAs, lo cual resulta en el desensamblaje de los polisomas (estructuras donde se lleva a cabo la traducción). La mayoría del mRNA que se libera por el desensamblaje de los polisomas se relocaliza en los SGs [3, 4, 18, 40]. La composición de las proteínas y los mRNAs que forman a los SGs es muy dinámica y sus componentes principales se mantienen en equilibrio con los polisomas y PBs (sitios de degradación del mRNA) [5, 18]. En base a este equilibrio de coexistencia entre polisomas y SGs se ha visto que las drogas que inhiben la elongación de la traducción (como la cicloheximida) inhiben el ensamblaje de los SGs, mientras que las drogas que promueven la terminación prematura de la traducción (como la puromicina) promueven el ensamblaje de los SGs [18, 21]. Para demostrar este equilibrio entre polisomas y SGs, Kedersha N. et al. 2000, expuso células COS7 a un tratamiento con arsenito (Ars) durante 30 min, para promover la formación de SGs. Posteriormente, estas células se trataron con cicloheximida. La cicloheximida, es un inhibidor de la síntesis proteica y actúa inhibiendo la actividad peptidil transferasa de la subunidad ribosomal 60S, de esta manera bloquea la elongación traduccional del péptido, lo que permite que los mRNAs queden atrapados en los polisomas desplazando el equilibrio de los mRNAs hacia estas estructuras [18]. Con estos tratamientos, se observó que los SGs formados previamente con Ars se desensamblaban, sugiriendo que el equilibrio entre SGs y polisomas se había desplazado hacia los polisomas por efecto de la cicloheximida [18].

Se ha descrito, que aunque la fosforilación del factor eIF2 α es importante para la formación de los SGs, esta no es absolutamente necesaria para que dicha formación se lleve a cabo [5, 10]. Por ejemplo, se ha visto que drogas, como la pateamina A y el hipuristanol, inhiben el inicio de la traducción por que impiden la formación del complejo eIF4F a través de la unión a la proteína eIF4A, resultando en la formación de SGs independientemente de la fosforilación del factor eIF2 α [10]. De esta manera, se ha llegado a la conclusión de que la formación de SGs no solo se debe a la fosforilación del factor eIF2 α , sino incluso cualquier evento que bloquee el inicio de la traducción favorecería la formación de estas estructuras [5, 10].

Cinasa	Función
HRI	Balancea la síntesis de las cadenas de globina y hemo durante la maduración del eritrocito y sensa el estrés oxidativo producido por arsenito.
GCN2	Regula los niveles de aminoácidos en la célula y se activa cuando hay ausencia de los mismos.
PKR	Es una cinasa dependiente de RNAdc, que se activa por infección viral, calor o radiación de UV.
PERK	Proteína de retículo endoplásmico que se activa cuando las proteínas mal plegadas se acumulan en el lumen del RE.

Tabla 1. Cinasas moduladoras de estrés que llevan a cabo la fosforilación del factor eIF2 α [4, 14].

1.3. Composición de los SGs

Los SGs están constituidos por un diverso grupo de proteínas, llamadas mRNPs (ribonucleoproteínas de unión a mRNA), cuyas funciones están relacionadas con el metabolismo del mRNA (Tabla 2) [3, 10, 40]. Estas proteínas se han dividido en varias clases, definidas de acuerdo a la función que desempeñan.

La primera clase de proteínas que forman a los SGs incluye los complejos de iniciación de la traducción unidos al mRNA. En esta clase, como se mencionó anteriormente, se incluyen los factores de iniciación, eIF3, el complejo eIF4F (formado por los factores eIF4E, eIF4A, eIF4G), las subunidades ribosomales pequeñas y PABP-1 ^[3, 4]. La segunda clase, consiste en las proteínas de unión a mRNA cuya función esta asociada con el silenciamiento o la estabilidad del mismo (Tabla 2). Entre estas proteínas se encuentran TIA-1 (del ingles T cell Internal Antigen-1) y TIAR (del ingles TIA-1 Related) (Tabla 2) ^[3, 4, 18, 17, 19]. La tercera clase, incluye a las proteínas de unión a RNA que regulan el metabolismo, la traducción, la degradación, la edición y la localización del RNA. Estas proteínas, tienen como característica especial que cuando se sobre expresan llevan a cabo el inicio del ensamblaje de los SGs. Entre estas se encuentran: G3BP (del inglés Ras-GTPasa-activating protein SH3 -domain-Binding Protein) ^[3, 13, 15], SMN (del inglés Survival Motor Neurons), entre otras ^[3]. Otros componentes de los SGs, son las proteínas que se reclutan a estas estructuras a través de interacción con las proteínas que llevan a cabo el inicio del ensamblaje de los SGs. Como por ejemplo, FAST, que se une a TIA-1, TRAF2, que se une a eIF4G o plakofilina 3, que interactúa con G3BP y PABP-1 ^[3, 4, 15, 18, 17, 19, 20].

Por último, un componente importante de los SGs son los mRNAs, hasta el momento se sabe muy poco acerca de cuales de estos son específicamente reclutados o excluidos de estas estructuras. Algunos de los mRNAs que se ha visto que se encuentran formando los SGs son los que codifican para la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), α -actina, c-MYC, IGF-II (del ingles Insulin-like Growth Factor) y H19. De los mRNAs que son excluidos de los SGs se encuentran los que codifican para proteínas de choque térmico como HSP70 y HSP90 ^[3, 20].

Proteína	Localización Celular	Proteínas de unión	¿Nucleadoras de SGs?	Funciones conocidas
Ago 2	PBs, SGs, polisomas	FXR1, RISC	Si	RNAi slicer
APOBEC3G	SGs y PBs	?	No	Respuesta Antiviral
Ataxin-2	SGs	PABP-1	No	Traducción
Caprin-1	SGs	G3BP	Si	Crecimiento celular
CPEB	SGs y PBs	RCK, eIF4E, FXR1	Si	Silenciamiento mRNA
DIS1	SGs	eIF3h	Si	Desconocido
eIF3	SGs, polisomas	40S, eIF4G	?	Traducción
eIF4E	SGs, PBs, Polisomas	CPEB, smaug, eIF4G, 4ET	No	Traducción
eIF4G	SGs, polisomas	eIF4E, eIF3, PABP-1	?	Traducción
FAST	PBs, Gs	TIA-1	Si	Traducción
FMRP y FXR1	SGs, PBs, polisomas	Ago2, RISC	Si	Traducción
FBP y KSRP	SGs	TIA-1	No	Degradación RNA
G3BP	SGs	Caprin	Si	Señalización Ras
HuR	SGs, PBs	?	No	Estabilidad RNA
IPSK	SGs	?	Yes	Señalización
Lin28	SGs, PBs, polisomas	?	?	Desarrollo
LINE 1 ORF1p	SGs	?	Yes	Transposon
MLN51	SGs	Unión a exón	No	Splicing
PABP-1	Polisomas, SGs	eIF4G, eIF3, ataxin-2	No	Traducción, estabilidad
RCK (p54)	SGs, PBs, polisomas	Hedls (GE-1, TTP)	Si	Degradación mRNA
Plakophilin	SGs	G3BP, FXR1	No	Adhesión
PMR1	SGs, PBs, polisomas	TIA-1	No	Degradación mRNA
Pumilio 2	SGs	?	Si	Silenciamiento mRNA
Rap55	SGs y PBs	?	?	Silenciamiento mRNA
Rpb4	SGs y PBs	?	?	Transcripción
SRC3	SGs	TIA-1	No	Transcripción
Staufen	SGs	?	No	Silenciamiento mRNA
SMN	SGs	Complejo SMN	Si	Ensamblaje RNP
TIA-1 y TIAR	SGs o PBs	FAST, SRC3, PMR1, FBP	Si	Silenciamiento mRNA
TRAF2	SGs	eIF4G	No	Señalización
TTP y BRF-1	SGs y PBs	RCK (p54)	Si	Degradación mRNA
YB-1	SGs, PBs, polisomas	?	?	Proteína de unión a RNA de choque frío
ZBP1	SGs	?	No	Localización

Tabla 2. Proteínas que componen a los SGs ^[3].

1.3.1. Ensamblaje de los SGs

El ensamblaje de los SGs implica una serie de pasos que inicia con el arresto de los complejos de iniciación, el desensamblaje de los polisomas y la agregación de mRNPs ^[3, 4, 19].

Etapa 1. Esta etapa, implica la fosforilación del factor eIF2 α en respuesta a la activación

de alguna de las cinasas moduladoras del estrés; o el bloqueo del inicio de la traducción generado por la inhibición de la formación del complejo eIF4F ^[3, 10]. Ambos casos resultan en la formación de complejos de iniciación 48S; de esta manera los transcritos afectados se convierten en mRNPs-48S, y los ribosomas que se encontraban unidos a ellos se liberan (Fig. 3) ^[3, 4, 5, 10]. Se ha observado que en condiciones donde se inhibe la elongación de los ribosomas y su liberación (como la cicloheximida, mitosis, y la presencia de algunos mRNAs virales) se inhibe el ensamblaje de los SGs ^[3, 10, 23, 35].

Etapas 2. En esta etapa los mRNPs-48S libres se agregan para formar los SGs. Esta agregación es regulada por proteínas que llevan a cabo el ensamblaje de los SGs (Ver Esq. 1) ^[3]. Como por ejemplo TIA-1, G3BP, entre otras, (ver Tabla 2) ^[3, 4, 39]. Una vez que se inicia dicha agregación, los SGs se ensamblan para tener una composición uniforme de proteínas, teniendo como base las proteínas que forman el centro de los SGs como eIF3, eIF4F, PABP-1 y las subunidades pequeñas ribosomales ^[3].

Etapas 3. En esta etapa cada transcrito de mRNA se une a múltiples proteínas que son capaces de formar interacciones homotípicas y en algunos casos heterotípicas (entre las proteínas). Estas interacciones proteína-proteína promueven la agregación secundaria de los mRNPs, y a través de esta interacción poco a poco se ensamblan los SGs ^[3] (Ver Esq. 1). Estudios de microscopía de fluorescencia muestran que el ensamblaje de los SGs comienza con la formación simultánea de pequeños SGs, los cuales progresivamente se fusionan en estructuras grandes y poco abundantes. Muchos componentes de los SGs [TIA-1 y TIAR, HUR (del inglés Hu antigen R), FAST, SRC3], son predominantemente proteínas nucleares ^[3].

^{5]}. El ensamblaje de los SGs requiere de su translocación del núcleo al citoplasma celular, de esta manera, la regulación de la exportación nuclear puede contribuir al ensamblaje de los SGs ^[3, 5, 1].

Etapa 4. En esta etapa, ciertas proteínas que carecen de las propiedades de unión a RNA son reclutadas a los SGs a través de interacciones con proteínas iniciadoras del ensamblaje de los SGs o con componentes de los SGs asociados a los 48S-mRNPs. Varias proteínas de unión a TIA-1 (SRC3, FAST, PMR1) son reclutadas a los SGs a través de esta interacción (ver tabla 2 y Esq. 1). Así, las proteínas que son reclutadas a los SGs pueden integrar parte del metabolismo celular con una respuesta traduccional al estrés ^[3].

Etapa 5. Por último, en esta etapa se lleva a cabo el desensamblaje de los SGs cuando las células se recuperan del estrés ^[3, 4]. Antes de desensamblarse completamente, los SGs son poco abundantes y grandes. Estos se van desagregando sincronizadamente, dando la impresión de disolverse más que de fragmentarse ^[3, 20]. Aún no se sabe que mecanismo sigue este proceso, ni las proteínas que están involucradas ^[3, 20].

Una vez entendido como se lleva a cabo la formación de los SGs y las proteínas que están involucradas en este proceso, describiremos como algunos virus son capaces de inhibir la formación de SGs durante su ciclo replicativo.

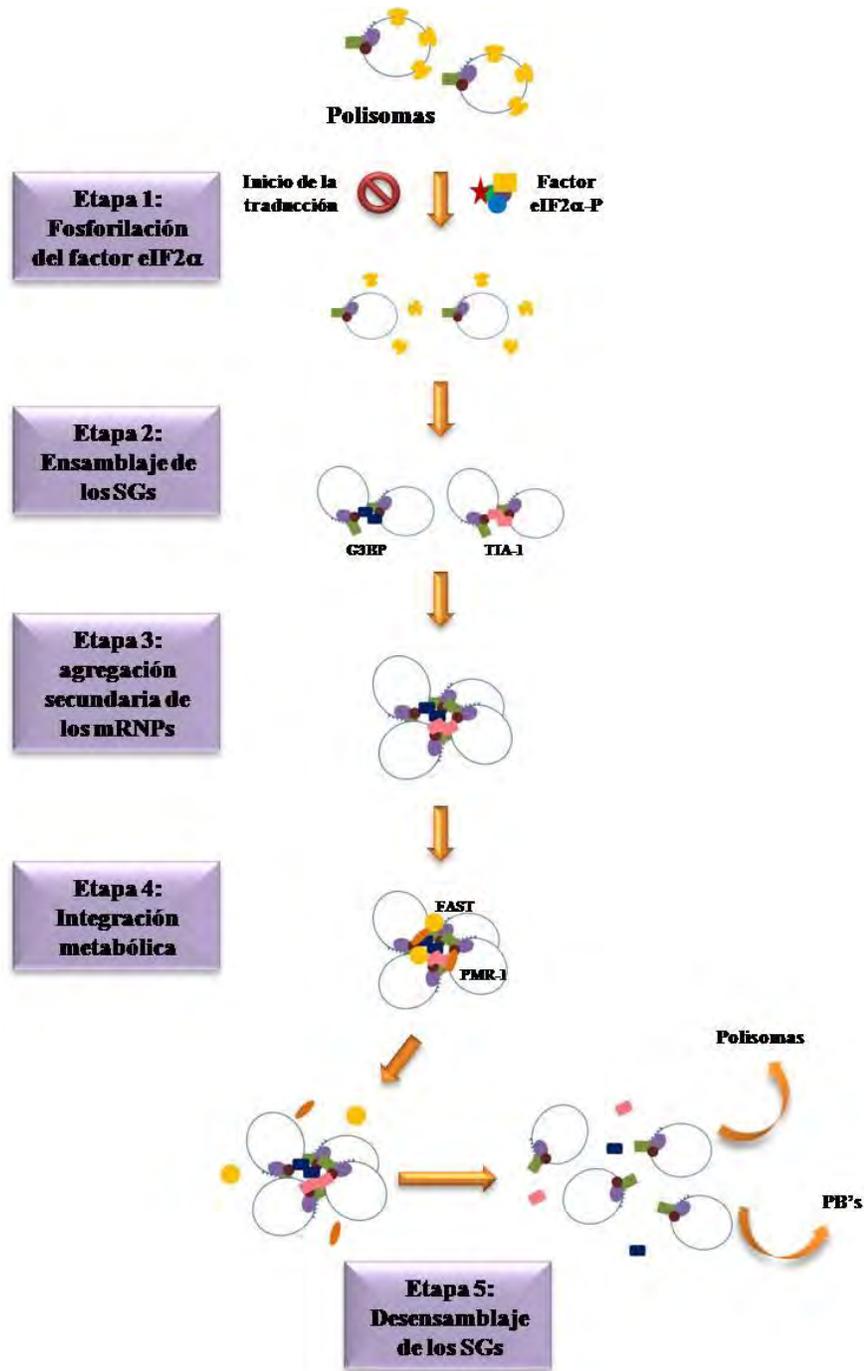


Fig. 3. Ensamblaje de los SGs. La formación de los SGs esta dividida en 5 etapas que comienzan con la fosforilación del factor eIF2α (etapa 1). Posteriormente, se lleva a cabo el inicio del ensamblaje de los SGs a partir de la interacción de proteínas de unión a RNA, como G3BP (etapa 2). Después, ocurre la agregación secundaria en donde se unen las proteínas que interactúan con las proteínas que llevan a cabo el inicio del ensamblaje de los SGs de unión a RNA (etapa 3). Posteriormente, se unen las proteínas que específicamente no tienen dominios de unión a mRNA y que pueden unirse a los SGs a través de interacciones con otras proteínas (etapa 4). Y finalmente, se lleva a cabo el desensamble de los SGs (etapa 5).^[3]

1.4. Virus y SGs

Como parásitos intracelulares, los virus requieren de la maquinaria de la traducción de la célula para sintetizar sus proteínas y poder completar su ciclo replicativo. Diferentes clases de virus han desarrollado diversas estrategias para inhibir el mecanismo de formación de SGs y poder utilizar la maquinaria de traducción de la célula ^[7, 9, 34]. A continuación se describen algunos ejemplos:

- **West Nile Virus (WNV).** La cadena (-) de RNA de este virus, contiene una estructura de tallo-asa que se une a la proteína TIAR. Durante la infección, TIAR es secuestrada en los puntos de replicación viral de manera que se inhibe el ensamblaje de los SGs ^[11, 21].
- **Virus Sendai.** Este virus codifica para un RNA que secuestra a la proteína TIAR e inhibe el ensamblaje de los SGs ^[3]. Estos resultados indican la importancia de TIAR en el ensamblaje de los SGs.
- **Poliovirus.** La infección por este virus, resulta en el ensamblaje de SGs de vida media corta. El corte proteolítico de G3BP por la proteasa 3C del virus resulta en el desensamblaje de los SGs ^[39]. La expresión de una G3BP resistente a este corte proteolítico, permite que los SGs no se disuelvan, resultando en una inhibición de la replicación viral ^[39].
- **Semliki Forest Virus (SFV).** Durante la infección con este virus, primero se forman los SGs, lo que promueve la inhibición de síntesis de proteínas celulares, mientras se sintetizan los mRNAs virales; posteriormente se desensamblan los SGs para llevar a cabo la traducción de los mRNAs virales ^[24].

Otros virus utilizan algunas de las proteínas nucleadoras de los SGs, como TIA-1 o TIAR, para favorecer su ciclo replicativo. Por ejemplo, la replicación de HSV-1 (herpes simplex virus 1) se ve incrementada en fibroblastos (MEFs) que carecen de TIA-1 o TIAR ^[12], durante la infección TIA-1 y TIAR se acumulan en citoplasma, donde pueden modular la replicación viral ^[12]. Finalmente, la replicación del virus de estomatitis vesicular, el virus sindbis y el virus de vaccinia también se ve incrementada en MEFs que carecen de TIA-1^[3].

1.5. Generalidades de rotavirus

1.5.1. Estructura Viral

Los rotavirus son la principal causa de gastroenteritis aguda en niños menores de 5 años en países en proceso de desarrollo, con alrededor de mil millones de episodios diarreicos y entre cuatro y cinco millones de muertes por año ^[27, 28, 30]. Estos virus, son miembros de la familia *Reoviridae*, y se caracterizan por su estructura icosaédrica sin envoltura de aproximadamente 75 nm de diámetro. El virión está compuesto por tres capas de proteína que rodean al genoma del virus. La capa externa del virión está formada por la glicoproteína VP7 ^[30]. De esta capa lisa se proyectan 60 espículas constituidas por dímeros de la proteína VP4 ^[30]. La base de estos dímeros de VP4 interaccionan con la capa intermedia del virión. Esta capa intermedia, está constituida por trímeros de la proteína VP6 (proteína más abundante). La capa interna del virión está formada por dímeros de la proteína VP2, la cual envuelve al genoma viral. Por otro lado, las proteínas VP1 y VP3 están asociadas con la cara interna de la capa de VP2. Se ha propuesto que estas dos proteínas llevan a cabo la función de replicar los genes del virus.

Dentro de la capa interna se encuentra el genoma del virus, compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena ^[27, 28, 30](Fig. 5).

1.5.2. Genoma Viral

Como se ha mencionado, el genoma del rotavirus consiste de once segmentos de RNA de doble cadena, que tienen los extremos 5' y 3' conservados. El tamaño de los segmentos varía, desde 667 pb (segmento 11), hasta 3,302pb (segmento 1); el tamaño total del genoma es de aproximadamente 6,120 kDa (18.5 kpb) ^[27, 28, 30]. Cada segmento codifica para una proteína (Fig. 5), con la excepción del segmento 11 que tiene dos marcos de lectura y codifica para dos polipéptidos. Los segmentos 1, 2, 3, 4, 6 y 9 codifican para las proteínas estructurales de la partícula viral, que se denominan VPs (Viral Proteins). Los fragmentos restantes codifican para seis proteínas no estructurales (NSPs del Inglés Non-Structural Proteins) ^[28, 30]. Las proteínas NSP1 a NSP6 son sintetizadas en el citoplasma de la célula hospedera durante el ciclo replicativo del virus. Estas proteínas están involucradas en el control de síntesis de proteínas tanto celulares como virales, en la replicación del genoma y en el empaquetamiento y maduración de la partícula viral ^[28] (Fig. 5).

1.5.3. Ciclo replicativo de Rotavirus

Durante el proceso de infección, la partícula viral completa, también llamada TLP (del inglés triple-layered particle), penetra la membrana plasmática de la célula. Durante el proceso de entrada, se pierde la capa externa y queda la partícula en forma de DLP (del inglés

double-layered particle), la cual es transcripcionalmente activa. En el citoplasma de la célula, la polimerasa viral VP1 sintetiza los trascritos primarios, que dirigen la síntesis de proteínas virales y también sirven como templado para la síntesis de RNA de cadena negativa para formar el RNAdc (RNA de doble cadena) genómico [27].

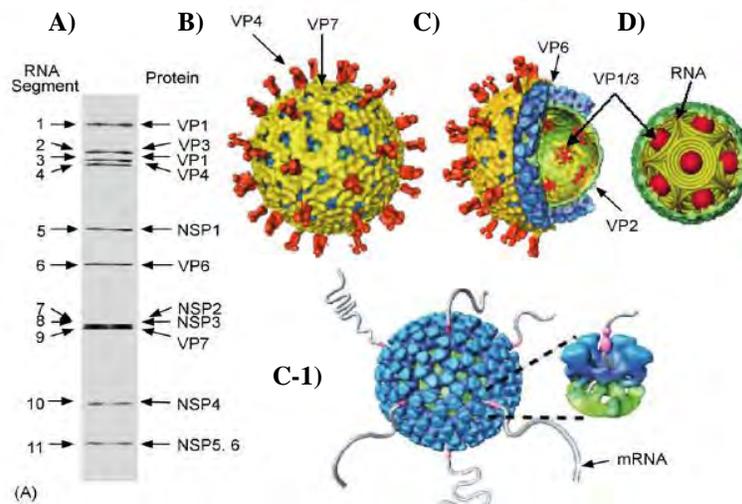


Fig. 4. Generalidades de Rotavirus. (A) Proteínas del genoma viral; (B) Capa externa del virión o TLP formada por las proteínas VP4 (rojo) y VP7 (azul); (C) Capa Intermedia del virión o DLP formada por las proteínas VP6 (azul) y VP2 (verde); (C-1) DLP completa y el mRNA expuesto del virus; (D) Capa interna del virus y estructura del genoma viral.

Una vez que se sintetiza una masa crítica de proteínas virales, los polipéptidos NSP2, NSP5, NSP6, VP1, VP2, VP3 y VP6 se acumulan en inclusiones citoplasmáticas electrodensas, llamadas viroplasmatas. La formación de estas estructuras es coordinada por las proteínas virales NSP2 y NSP5 y es el punto clave en la replicación de Rotavirus, ya que se ha propuesto que es aquí donde se lleva a cabo la síntesis del dsRNA e inicia la morfogénesis viral [27]. Una vez formadas, las DLPs abandonan el viroplasma, y adquieren la capa externa al

gemar a través de la membrana del retículo endoplásmico modificada por proteínas virales, finalmente los viriones maduros son liberados de la célula por lisis [27, 30].

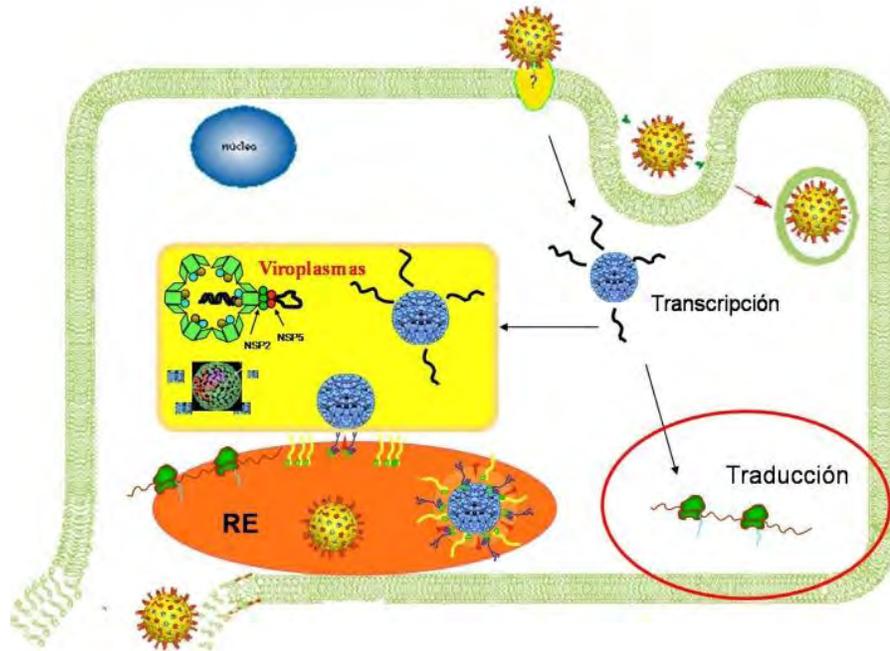


Fig. 5. Ciclo replicativo de rotavirus. Se muestran las principales etapas del ciclo: la penetración a través de la membrana celular, la transcripción (que hipotéticamente puede llevarse a cabo en el citoplasma o en el interior de los viroplasmos), la replicación y la morfogénesis viral en los viroplasmos y retículo endoplásmico. Por último, se muestra la salida del virus por lisis celular.

II. Antecedentes

De manera general, sabemos que cuando una célula se encuentra en condiciones de estrés, esta reprograma la maquinaria de traducción mediante una serie de eventos que involucran la fosforilación del factor eIF2 α , la formación de SGs y la inhibición de la síntesis de la mayoría de las proteínas celulares. De esta manera se favorece la síntesis de proteínas que ayudaran a la célula a sobrevivir durante el estrés.

Recientemente en el laboratorio se observó que durante la infección con rotavirus se promueve la inhibición de la síntesis de proteínas celulares mientras que se incrementa la síntesis de proteínas virales. También se observó que hay un incremento en la fosforilación del factor eIF2 α [28]. Sin embargo, a pesar de la inhibición de síntesis de proteínas y de la fosforilación del factor eIF2 α , no hay una formación de SGs [28]. Estos resultados nos indican, que posiblemente el virus tiene un mecanismo a través del cual se inhibe la formación de SGs.

Interesantemente, se observó que en células infectadas con rotavirus y expuestas a un segundo estrés con Ars a las 8 horas post infección (h.p.i), no se observaba la formación de SGs, a pesar de que el factor eIF2 se mantenía fosforilado. Estos resultados podrían indicar, que el mecanismo por el cual el virus inhibe la formación de SGs también inhibe la formación de los SGs producidos en respuesta a un segundo estrés.

Es importante señalar, que durante la infección por rotavirus, algunas de las proteínas que son consideradas como “marcadores” de los SGs: PABP, S6, eIF4E y TIA-1, sufren cambios en su distribución dentro de la célula [28]. En una célula normal (sin ningún tipo de estrés), PABP y S6 se encuentran distribuidos en todo el citoplasma y ligeramente concentrados en una región perinuclear. eIF4E se puede observar distribuida en forma de puntilleo en todo el

citoplasma. Y finalmente, TIA-1 se encuentra preferencialmente en el núcleo. Cuando una célula se expone a un estrés (Ars), una fracción de PABP, S6, eIF4E y TIA-1 aparecen en los SGs. Cuando las células, son infectadas con rotavirus, se ha observado, que TIA-1 se transloca de núcleo a citoplasma y se mantiene distribuida de manera homogénea en todo el citoplasma, sin agregarse en los SGs ^[28]. Por otro lado, eIF4E mantiene su distribución punteada, sin embargo esta se ve disminuida durante la infección, observándose una distribución más uniforme a lo largo del citoplasma. S6 se observa distribuida uniformemente en el citoplasma, perdiendo su distribución perinuclear. Y finalmente, PABP cambia completamente su distribución, ya que durante la infección esta proteína acumula en el núcleo ^[28]. En base a estos resultados y al hecho de que muchos virus utilizan proteínas que están involucradas en el ensamblaje de los SGs (como TIA-1) para inhibir la formación de SGs, pensamos que posiblemente estos cambios de distribución de proteínas sean los que estén involucrados en la inhibición de la formación de los SGs.

Para estudiar el mecanismo de inhibición de la formación de SGs durante la infección con RRV es importante encontrar un tipo de estrés que nos sirva de herramienta para estudiar dicho mecanismo. El estrés de RNAdc, es un estrés que se ha descrito promueve la fosforilación del factor eIF2 y la inhibición de síntesis de proteína ^[32], por lo que lo hace muy similar a lo que ocurre con la infección con rotavirus. Parece interesante, estudiar este tipo de estrés en cuanto a la formación de SGs y utilizarlo como herramienta para encontrar el mecanismo de inhibición de SGs durante la infección.

Este trabajo se centra en estudiar la distribución de proteínas marcadoras de SGs, que hasta ahora no se habían estudiado durante la infección con RRV y el efecto del RNA de doble cadena viral (RNAdc) sobre la formación de SGs y en la infección con rotavirus.

III. Hipótesis

La distribución de diferentes proteínas marcadoras de gránulos de estrés durante la infección con RRV y el efecto del RNAdc viral están involucrados en el mecanismo de inhibición de la formación de gránulos de estrés durante la infección.

IV. Objetivo general.

- Determinar la distribución de las proteínas marcadoras de los SGs durante la infección con RRV.
- Determinar el efecto de RNAdc en la formación de SGs y en la infección con RRV

4.1. Objetivos particulares

1. Determinar si a tiempos tempranos durante la infección con RRV se lleva a cabo la formación de SGs en respuesta a un segundo estrés con arsenito.
2. Determinar si la entrada del virus a la célula despierta un mecanismo de inhibición de formación de SGs.
3. Identificar si alguna de las proteínas caprina, RI, eIF3b y G3BP sufren algún cambio de distribución durante la infección.
4. Identificar si existen diferencias entre los SGs generados por efecto del RNAdc y los SGs formados por arsenito.
5. Estudiar el efecto del RNAdc durante la infección con RRV.

VI. Metodología.

6.1. Líneas Celulares, virus e inductores de estrés

Se utilizó la línea celular MA104, derivada de células de riñón de mono verde, y la línea celular U2OS, derivada de células de osteosarcoma humano transformadas que expresan de manera estable las proteínas fusionadas a proteínas fluorescentes las cuales se muestran en la tabla 4. Esta línea celular fue donada por la Dra. Nancy Kedersha de la universidad de medicina de Harvard, Boston, MA, USA. Ambas líneas celulares son permisivas a la infección con rotavirus. Se utilizó la cepa viral de rotavirus de simio RRV. Como inductores de estrés se utilizaron Arsenito de sodio (Ars) en una concentración de 0.5 µg/ml, RNAdc viral (RNAdc-V, proveniente de RRV) en una concentración de 1 µg por pozo de 48 y poli I:C a una concentración de 0.25 µg por pozo de 48.

6.3. Determinación del título viral

Para determinar el título viral, monocapas confluentes de células MA104 o U2OS en frascos F160 se infectaron con RRV a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 por 1 h. Posteriormente las células se lavaron una vez con medio de cultivo MEM y se dejaron con el medio entre 13 y 14 horas post infección (h.p.i). Al término de este tiempo, las células se congelaron y descongelaron 3 veces para obtener un **lisado viral**. Para activar el virus, el lisado viral fue incubado durante 30 min a 37 °C con 10 µl de tripsina al 1%. Posteriormente, para inhibir el efecto de la tripsina, el lisado fue incubado durante 15 min a 37 °C con un

inhibidor de tripsina al 1%. Una vez activado el virus, las células MA104 o U2OS previamente sembradas en cajas de 96 pozos y formando una monocapa confluyente, se infectaron con distintas diluciones del virus activado durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, las células se lavaron con MEM, y se dejaron con MEM entre 13 y 14 h.p.i. Al término de este tiempo, las células se fijaron durante 30 min con acetona al 80%. Se lavaron con PBS durante 5 min y se incubaron con un suero de conejo α -TLPs durante 1 h a 37 °C. Se hicieron 3 lavados con PBS durante 5 min, cada uno a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa durante 1 h a 37 °C. Se hicieron los mismos lavados que el paso anterior. Para revelar las células infectadas, se utilizó 3-amino-9-etil-carbazole (SIGMA CHEMICALS), como sustrato para la peroxidasa, la cual produce un precipitado café rojizo. Para la determinación del título viral, se determinó el número de células teñidas (focos infecciosos) en cada pozo correspondiente a cada dilución. El título viral se determinó aplicando la siguiente formula: (No. de focos) X (dilución) X (4.5) X (20) = unidades formadoras de focos infecciosos por mililitro (uff/ml).

6.4. Tratamientos celulares

6.4.1. Infección con RRV

Para la infección con RRV, monocapas confluentes de células MA104 o U2OS en cajas de 48 pozos, se infectaron con RRV a una MOI (multiplicidad de infección) de 3 (en MA104) y una MOI de 1 (en U2OS) durante 1 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron 1 vez con medio 2/3 (2/3 partes de medio MEM y 1/3 parte de medio DMEM) y se

dejaron en este medio diferentes tiempos post infección. Posteriormente las células se trataron para diferentes tipos análisis.

6.4.2. Transfección de RNAdc-V y poli I:C

Para la transfección de RNAdc-V o poli I:C, primero se preparó una mezcla de lipofectamina y RNAdc-V o poli I:C. Utilizando 1 μg de RNAdc-V o 0.25 μg de poli I:C por pozo de 48 en células MA104, o 1 mg de RNAdc-V y 0.5 μg de poli I:C en células U2OS. Estas cantidades se incubaron durante 25 min a temperatura ambiente con una mezcla de lipofectamina que consistía en 2 μl de lipofectamina, y 10 μl de MEM. Transcurrido este tiempo, se les agregó 75 μl de MEM. De esta mezcla se tomaron 100 μl por pozo de 48 y se le agregaron a monocapas confluentes de MA104 o U2OS. Se dejaron transfectar con esta mezcla durante 1 h a 37 °C. Al termino de este tiempo, las células se lavaron una vez y se dejaron en medio MEM/DMEM (2/3) durante diferentes tiempos post transfección. Posteriormente las células se trataron para diferentes tipos de análisis.

6.4.3. Inducción de estrés con Ars

Monocapas confluentes de células MA104 o U2OS en cajas de 48 pozos, antes de ser cosechadas se incubaron con Ars [0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$] durante 30 min a 37 °C, para inducir estrés. El Ars se diluyó en medio MEM/DMEM 2/3.

6.5. Inmunofluorescencia

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos estériles de 10 mm puestos en cajas de 48 pozos. Al término del tratamiento (apartado 6.4), se fijaron con para-formaldehído al 2% en PBS durante 15 min. Inmediatamente después se permeabilizaron con metanol absoluto frío (almacenado a -70 °C) durante 10 min. Se hizo un lavado con 1 ml de PBS durante 5 min. Posteriormente, se realizó el bloqueo utilizando BSA al 5% en PBS con 0.25% de azida de sodio, durante toda la noche a 4 °C. Los cubreobjetos se incubaron con el anticuerpo primario (tabla 3) durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se realizaron 4 lavados de 1 ml cada uno, dejando 5 min entre cada lavado. Después se incubaron con el anticuerpo secundario (tabla 3) durante 1 hora a temperatura ambiente y al término de este tiempo, se realizaron los mismos lavados que en el paso anterior. Finalmente, los cubreobjetos fueron colocados en un portaobjetos utilizando fluoKeep (BioMérieux) y se analizaron por microscopía de epifluorescencia.

Anticuerpo 1°	Tipo	Dilución	Tinción	Anticuerpo 2°	Dilución
Proteínas Celulares					
α -PABP	Monoclonal	1/50	SGs	α -raton-488	1/500
α -TIA-1	Monoclonal	1/100	SGs	α -raton-488	1/500
α -eIF4G	Policlonal	1/150	SGs	α -conejo-568	1/500
Proteínas Virales					
α -NSP2	Policlonal	1/500	Viroplasma	α -conejo-647	1/700
α -NSP5	Policlonal	1/500	Viroplasma	α -conejo-647	1/700
*DAPI	-----	1/1000	Núcleos		

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para ensayos de inmunofluorescencia. Los anticuerpos fueron diluidos en la solución de bloqueo BSA 5%, PBS, 0.25% de azida de sodio.

Las proteínas caprina-1, RI, eIF3b, G3BP y dcp1 están fusionadas a proteínas fluorescentes y se expresan establemente en las células U2OS (tabla 4) por lo que se pueden observar directamente sin necesidad de tinción.

Células U2OS que expresan:	Fusionadas a:
G3BP	GFP
eIF3b	YFP
Caprina-1	GFP
RI	GFP
Dcp1	RFP

Tabla 4. Líneas celulares y las proteínas que expresan fusionadas a una proteína fluorescente. GFP: Green Fluorescent Protein; YFP: Yellow Fluorescent protein; RFP: Red Fluorescent Protein.

6.6. Marcaje metabólico de proteínas

Para el marcaje metabólico de proteínas, la células MA104 y U2OS fueron sembradas en cajas de 48 pozos, antes de ser cosechadas se les aplicó un pulso de marca radioactiva utilizando 25 $\mu\text{Ci/ml}$ de Easy Tag Express- ^{35}S] labeling mix (Dupon NEN) durante 30 min a 37 °C. Para el análisis de proteínas, las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida SDS 10%-PAGE y se analizaron por autoradiografía.

6.7. Western Blot

Para los ensayos de western blot, se obtuvieron lisados celulares a partir de células sembradas en cajas de 48 pozos que fueron previamente tratadas. Para la obtención de estos lisados, antes de ser cosechadas la células, se les retiró el medio y se lisaron con 100 μl de

Laemli sample buffer (SDS 10%, glicerol, Tris pH 8.8, azul de bromofenol y β -mercapto-etanol). Las proteínas en estos lisados celulares se separaron en un gel de poliacrilamida-SDS 10% y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Esta membrana se bloqueó durante toda la noche a 4 °C con PBS, 0.1% Tween-20, 5% leche descremada. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario (tabla 5) durante 1 h a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, se hicieron 3 lavados con PBS, 0.1% Tween-20 durante 10 min. a temperatura ambiente. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario (tabla 5) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se hicieron los mismos lavados que en el paso anterior. La detección de proteínas se hizo con quimioiluminescencia.

Anticuerpo 1°	Tipo	Dilución	Tinción	Anticuerpo 2°	Dilución
α -TLPs	Policlonal	1/3000	TLPs	α -conejo-peroxidasa	1/3000
α -eIF2 α -P	Policlonal	1/1000	eIF2-P	α -conejo-peroxidasa	1/3000

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para western blot.

6.8. Análisis de fosforilación del factor eIF2 α

Para el análisis de la fosforilación del factor eIF2 α , las células U2OS se sembraron en cajas de 48 pozos. Posteriormente, las células se lisaron con un buffer de lisis compuesto por 25 mM de NaF, 1 mM de ortovanadato de sodio, 50 mM de Tris (pH 7.4), 100 mM de KCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de ditiotritol, 10 % glicerol y 1% de Tritón X-100, suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, EDTA-free; Roche). Los lisados se centrifugaron durante 5 min a 10, 000 X g, y se recuperaron los sobrenadantes. Las muestras en buffer de carga se hirvieron durante 5 min., esto último para desnaturalizar a las proteínas.

Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida SDS 10%-PAGE. Posteriormente se transfirieron en una membrana de nitrocelulosa y se procesaron para western blot como se describe en el apartado 6.5.

6.9. Inactivación de virus con psoralen

Para la inactivación del virus RRV, los lisados virales se inactivaron agregando 40 µg/ml de psoralen por cada 100 µl de lisado viral. Se agitó brevemente y se expuso durante 1 h a luz UV de longitud de onda larga. Posteriormente se puso en hielo durante 1 h. Se determinó el título viral (apartado 6.3) y se hicieron ensayos de hemaglutinación para comprobar que las partículas virales mantuvieran su estructura.

6.10. Extracción RNAdc

Para la extracción del RNAdc, primero se obtuvieron lisados virales tal como se indica en el apartado 6.3. A partir de estos lisados se purificaron partículas virales centrifugando a 28 000 rpm durante 1 h. Transcurrido este tiempo, el pellet se resuspendió en 750 µl de buffer TNC [Tris pH 7.5 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl 10 mM]. Se colocó en hielo y se extrajo con un volumen igual de Freón. Se agitó en el vortex y se centrifugó a 6000 rpm durante 5 min. Se recuperó la fase acuosa y al resto se le agregó de nuevo 750 µl de freón y se centrifugó como el paso anterior. Se hizo lo mismo al menos 4 veces más. La fase acuosa que se recuperó, se pasó por un colchón de sacarosa al 45% en TNC centrifugando a 40 000 rpm durante 1 h. Al

término de este tiempo, el pellet (conteniendo partículas virales) se resuspendió en 500 μ l de TNC.

6.7.1 Extracción del RNA viral con buffer disruptor

Para la extracción el RNA viral, se utilizaron partículas virales resuspendidas en TNC. Por cada 200 μ l de partículas se agregaron 40 μ l de buffer disruptor 5X (Tris Base 2.6 M, EDTA 750 mM, SDS 450 mM, NaCl 6.8 M, β -mercapto-etanol 1.8 M). Posteriormente, se adicionó 200 μ l de fenol saturado y se agitó en vortex durante 2 min, después, se adicionaron 200 μ l de cloroformo y se agitó en vortex durante 2 min. Esta mezcla se centrifugó a 12, 000 rpm durante 5 min, se recuperó el sobrenadante y se agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 50 μ l de acetato de sodio, se dejó precipitar toda la noche. Por último, la mezcla se agitó en un vortex y se centrifugó a 12, 000 rpm durante 5 min. El pellet se resuspendió en 200 μ l de agua estéril libre de RNAsas.

VII. Resultados

7.1. A tiempos tempranos de infección con RRV en células MA104 no hay formación de SGs

Resultados recientes en el laboratorio demostraron que durante la infección con rotavirus (RRV) no hay formación de SGs a tiempos tardíos de la infección (8 horas post-infección: h.p.i). Decidimos explorar la posibilidad de que RRV promoviera la formación de SGs a tiempos tempranos de la infección, tal como es el caso de poliovirus o SFV [24, 39]. Para probar esto, se infectaron células MA104 y se fijaron cada 30 minutos después de la infección en un periodo de 0-3 horas. Como marcador de SGs utilizamos a la proteína PABP (Tabla 2) y como marcador de la infección a la proteína NSP5. Como control positivo para la formación de SGs, tratamos a las células con Ars. En la figura 6, se observa que durante la infección con RRV no hay formación de SGs, ni aún a tiempos tempranos de la infección. En el laboratorio, se ha descrito que la fosforilación del factor eIF2 α durante la infección, se empieza a detectar aproximadamente desde las 2 h.p.i [28]. En base a esto, esperaríamos que a partir de este tiempo se empezaran a formar SGs, sin embargo esto no ocurre (Fig. 6). Estos resultados, nos permiten sugerir que la señal de inhibición de la formación de SGs pudiera estar regulada a nivel de entrada del virus, o una vez que entra el virus a la célula, se regulé al iniciarse la síntesis de proteínas o RNA mensajero viral, de manera que sea alguno de estos dos o ambos los que inhiban la formación de SGs.

Recientemente, se ha demostrado que algunos virus inhiben la formación de SGs en respuesta a una segunda inducción de estrés durante la infección viral [39].

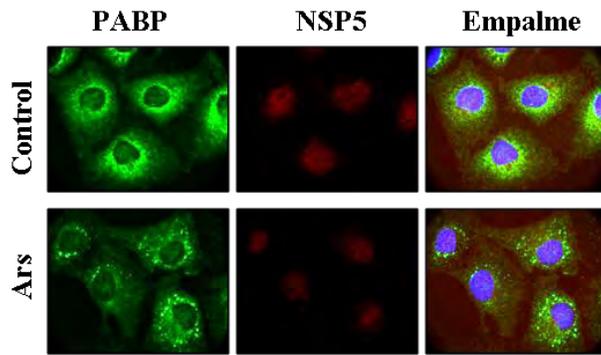
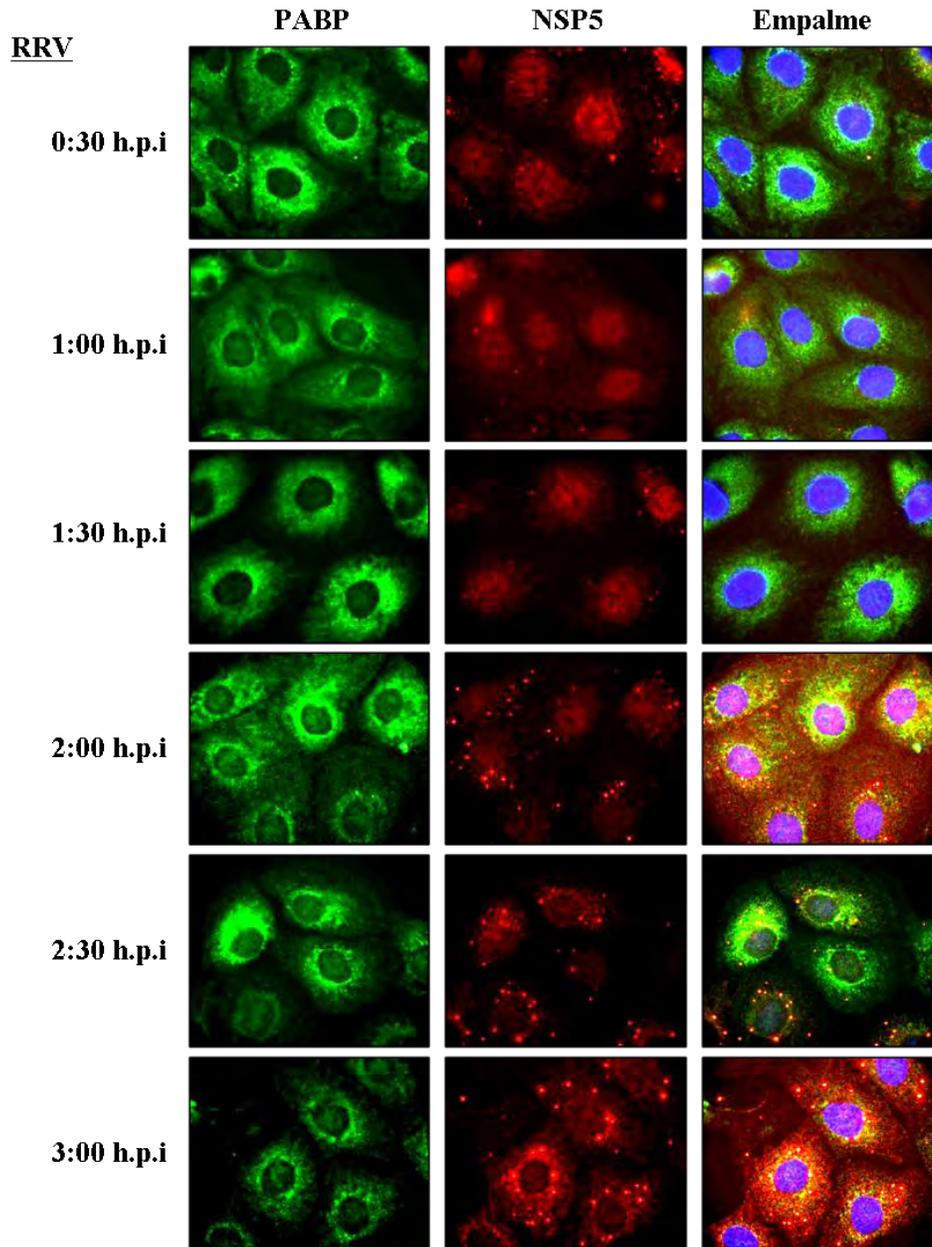


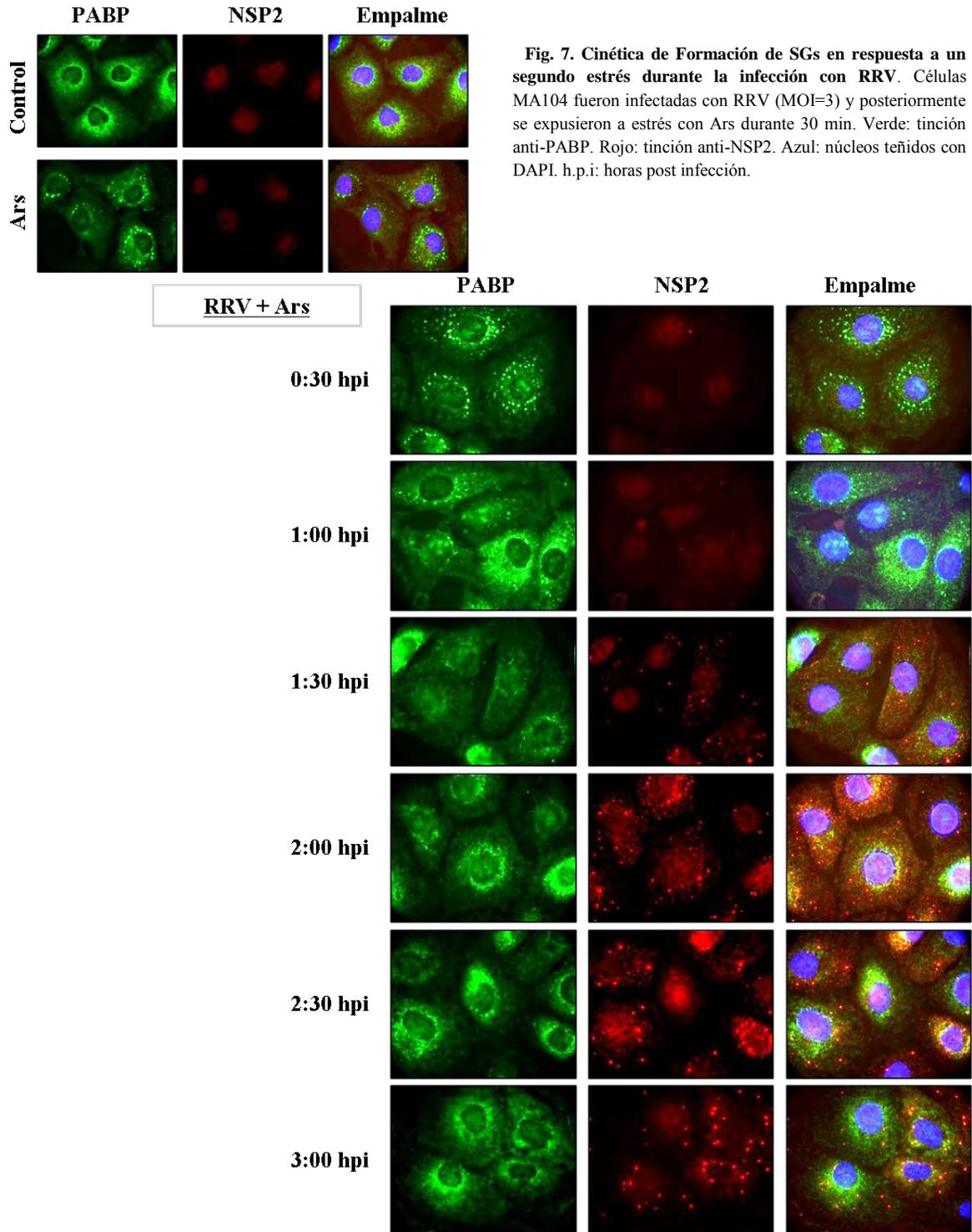
Fig. 6. Cinética de Formación de SGs a tiempos tempranos de la infección con RRV. Células MA104 se infectaron con RRV (MOI=3) y se fijaron a distintos tiempos de la infección. Verde: tinción con anti-PABP como marcador de SGs. Rojo: tinción con anti-NSP5 como marcador de infección. Azul: núcleos teñidos con DAPI. h.p.i: horas post infección. Ars: arsenito.



En el caso de poliovirus, por ejemplo, se ha descrito, que a tiempos tempranos de la infección las células son capaces de responder a un segundo estrés llevando a cabo la formación de SGs, mientras que a tiempos largos post infección, el virus inhibe que se formen los SGs ^[39]. Para determinar si en presencia de un segundo estrés a tiempos tempranos durante la infección con RRV las células eran capaces de formar SGs, células MA104 se infectaron con RRV y a diferentes tiempos post infección se les indujo un segundo estrés añadiendo Ars durante 30 min. En la figura 7, se observa que durante la infección con RRV y la inducción simultánea de un segundo estrés (Ars) durante las primeras h.p.i, la proteína PABP se distribuye en los SGs (30 min y 1 h.p.i), lo que nos indica que la célula es capaz de responder a un segundo estrés. Sin embargo, esta capacidad se va perdiendo conforme avanza la infección, lo cual va de acuerdo con el hecho de que la inhibición de la formación de SGs durante la infección posiblemente se deba a la acumulación de ciertas proteínas o mRNAs del virus, que de alguna manera impidan que se lleve a cabo la formación de los SGs generada en respuesta a un segundo estrés.

Como se mencionó anteriormente, existe la posibilidad de que la inhibición de la formación de SGs durante la infección con RRV sea inducida durante la entrada del virus. Para probar esta posibilidad, decidimos llevar a cabo el proceso de infección utilizando virus RRV inactivado con psoralen (apartado 6.9). El virus inactivado es capaz de entrar a la célula, pero no de iniciar una infección, lo que nos permitiría determinar si la entrada del virus a la célula es suficiente para prevenir la formación de SGs ante un segundo estrés. Primero, se inactivó el virus RRV utilizando psoralen, que es una molécula con gran afinidad por el RNA, al unirse a este se forman estructuras secundarias muy estables, de manera que, el RNA viral no puede replicarse ni traducirse. En estos ensayos, las células fueron infectadas con RRV

inactivado y a diferentes tiempos de la infección se les expuso a un segundo estrés con Arsenito durante 30 min.



Posteriormente, las células fueron fijadas y teñidas del mismo modo que en los ensayos anteriores. En la figura 8, podemos observar que las células infectadas con RRV inhiben la formación de SGs en respuesta a un segundo estrés con Ars, excepto a horas tempranas de la infección, debido a que podemos observar que a las 2 h.p.i algunas células si son capaces de formar SGs, y que esta capacidad se va inhibiendo conforme avanza la infección (4 y 6 h.p.i). Por otra parte, las células infectadas con RRV inactivado, tampoco son capaces de formar SGs y tampoco se observa la formación de viroplasmos (tinción NSP2) como se observa cuando las células son infectadas con RRV, lo que indica que efectivamente el virus no está llevando a cabo su ciclo replicativo (Fig. 8). En cambio, cuando las células infectadas con RRV inactivado son expuestas a un segundo estrés con Ars, estas células si son capaces de formar SGs hasta las 6 h.p.i, indicándonos que la entrada del virus no regula el mecanismo de inhibición de la formación de SGs (Fig. 8). Se ha demostrado que en una infección con RRV inactivado no se lleva a cabo la fosforilación del factor eIF2 α (dato no publicado), y posiblemente esta sea la razón por la cual no observamos la formación de SGs cuando infectamos las células con este virus. Por otro lado, esto podría ser también una de las razones por la cual cuando las células son infectadas con el virus inactivado y expuestas a un segundo estrés, sea este último estrés el que induzca la fosforilación del factor eIF2 α y como no hay una acumulación de proteínas o mRNA virales que posiblemente inhiban esta respuesta entonces si se puedan formar los SGs. Estos resultados, sugieren que la inhibición de la formación de SGs no es regulada a nivel de entrada del virus y favorece la posibilidad de que sea la acumulación de proteínas o mRNA virales, las que induzcan la fosforilación del factor eIF2 α y por otro lado, la inhibición de la formación de SGs.

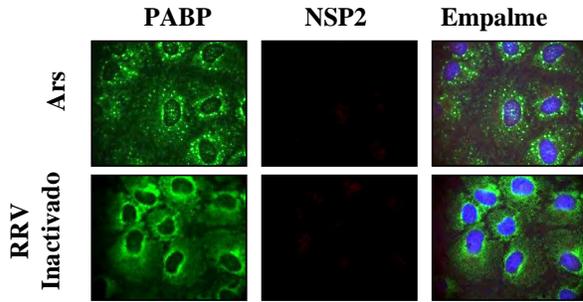
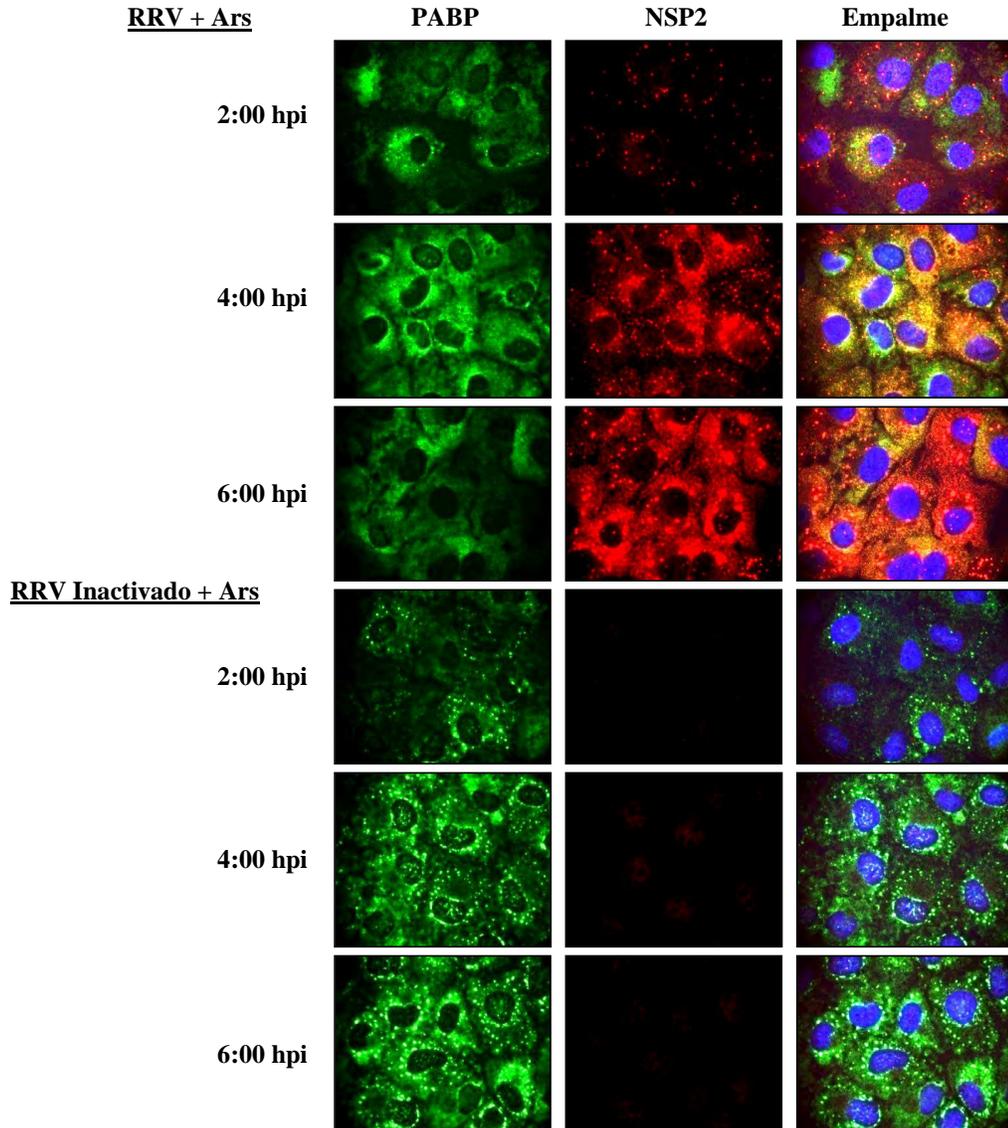


Fig. 8. Formación de SGs durante la infección con RRV inactivado en respuesta a un segundo estrés. Células MA104 se infectaron con RRV (MOI=3) y se expusieron a estrés con Ars durante 30 min a diferentes tiempos post-infección. Verde: tinción anti-PABP. Rojo: tinción anti-NSP2. Azul: núcleos teñidos con DAPI. h.p.i: horas post infección. Ars: arsenito.



7.2. RRV infecta a las células U2OS

Como se mencionó anteriormente, existen varios virus que previenen la formación de SGs a través de modificaciones a las proteínas que los SGs, tal es el caso de poliovirus, en donde el corte proteolítico de la proteína G3BP a través de la proteasa C del virus inhibe la formación de los SGs. En nuestro laboratorio, Montero et al. 2008, reportaron la distribución de diferentes proteínas que conforman a los SGs durante la infección. La proteína TIA-1, por ejemplo, de tener una distribución nuclear en condiciones normales, cambia durante la infección a una distribución citoplásmica y la proteína PABP de tener una distribución citoplásmica, durante la infección cambia a una distribución principalmente nuclear. Uno de los problemas que se ha tenido para estudiar la distribución de los SGs durante la infección con RRV, es que no es fácil encontrar anticuerpos comerciales que no estén contaminados con anticuerpos contra proteínas de rotavirus, lo cual hace difícil visualizar a algunas proteínas celulares. Para resolver este problema, la Dra. Kedersha nos donó una serie de líneas celulares derivadas de la línea celular U2OS que expresan establemente algunas de las proteínas que componen a los SGs, fusionadas a proteínas fluorescentes (Tabla 4). Para observar la distribución de las proteínas componentes de los SGs que expresaban estas líneas celulares durante la infección con RRV, primero determinamos si esta línea podría ser infectada con RRV tal como ocurre en MA104. Para esto, hicimos un análisis de infectividad donde determinamos el título viral. La línea celular U2OS, de la cual se derivaron las 4 líneas que expresan cada una, una proteína diferente, fueron infectadas con diferentes diluciones de virus a partir de un lisado total de RRV durante 1 hora, posteriormente se lavaron y se dejaron un lapso de tiempo entre 14 y 16 horas post infección, que es el tiempo aproximado que dura el

ciclo de infección de rotavirus.

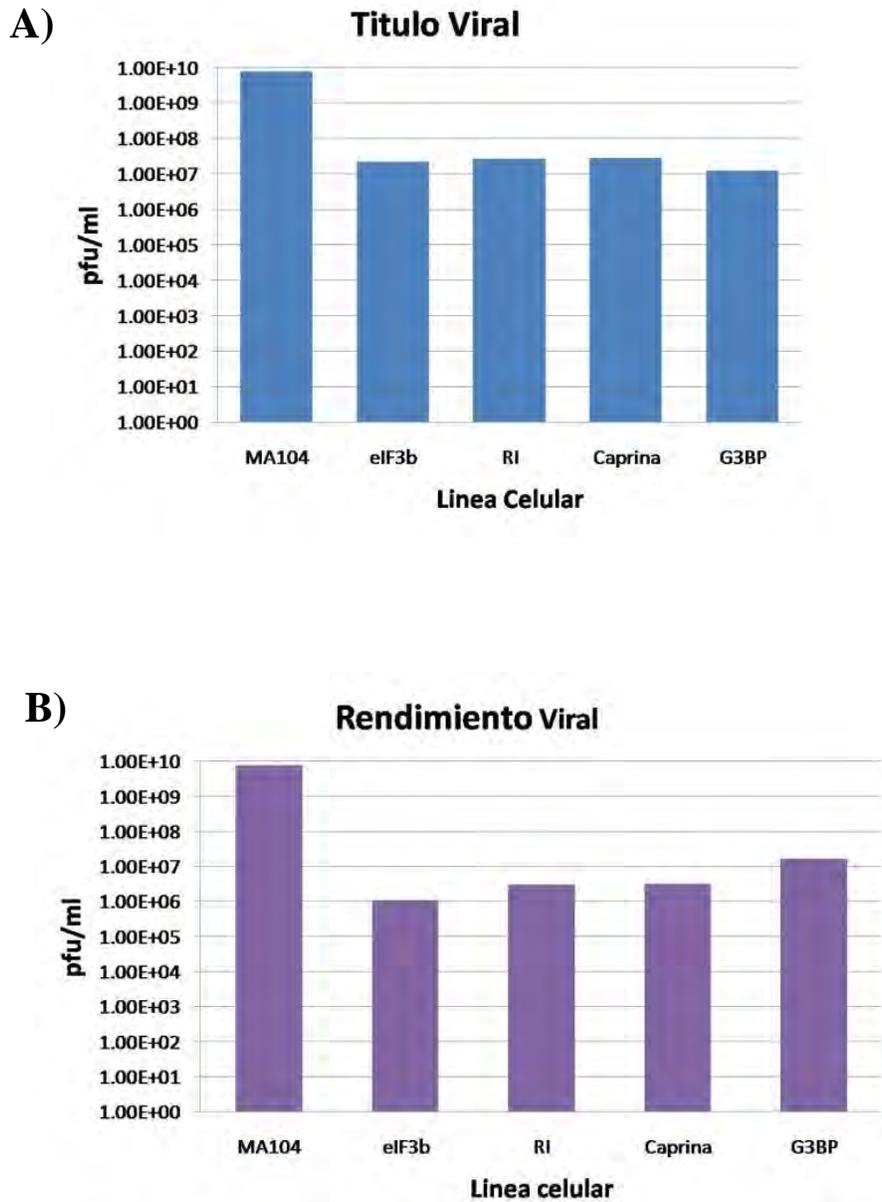


Fig. 9. Título y rendimiento viral de la línea celular U2OS con RRV. Las líneas celulares derivadas de las células U2OS (tabla 6), fueron infectadas con diluciones seriadas de RRV y se determinó el título y el rendimiento viral, como se indica en la metodología (apartado 6.3) Como control se utilizaron las células MA104 en las mismas condiciones. pfu/ml: unidades formadoras de focos infecciosos por mililitro

A este tiempo, las células se fijaron y se tiñeron con un anticuerpo contra las proteínas estructurales del virus (α -TLPs) para determinar el título viral (apartado 6.3). En la figura 9-A, podemos observar que las células son infectadas por RRV, obteniendo un título viral de aproximadamente dos logaritmos menor a los títulos virales obtenidos en células MA104. De igual manera, se determinó el rendimiento viral en las células U2OS. Estas células se infectaron con RRV a una MOI de 1 y se dejaron un tiempo de infección entre 14-16 horas. Al término de este tiempo, se hizo un lisado viral, para el cual las células se congelaron y descongelaron. Este lisado, fue activado con 1% tripsina (30 min). Posteriormente, el virus resultante se utilizó para infectar a las células U2OS y determinar su título viral (apartado 6.3). La figura 9-B, muestra que en las células U2OS el rendimiento viral (la cantidad de virus que se produce en estas células) baja aproximadamente tres logaritmos en comparación con las células MA104.

7.2.1. La infección de RRV en células U2OS promueve la fosforilación del factor eIF2 α y la inhibición de la síntesis de proteínas celulares

Durante la infección con RRV en células MA104 se induce la fosforilación del factor eIF2 α y como consecuencia la inhibición de la síntesis de proteínas celulares [28]. Para estudiar si en la línea celular U2OS ocurría el mismo fenómeno durante la infección con RRV, caracterizamos la fosforilación del factor eIF2 α y la inhibición de síntesis de proteínas celulares por ensayos de marcaje metabólico, a diferentes tiempos durante la infección. En la figura 10-A, se muestra que la inhibición de síntesis de proteínas celulares durante la infección con RRV se completa hasta las 9:30 h.p.i, a diferencia de las células MA104 que ocurre aproximadamente a las 2 h.p.i [28].

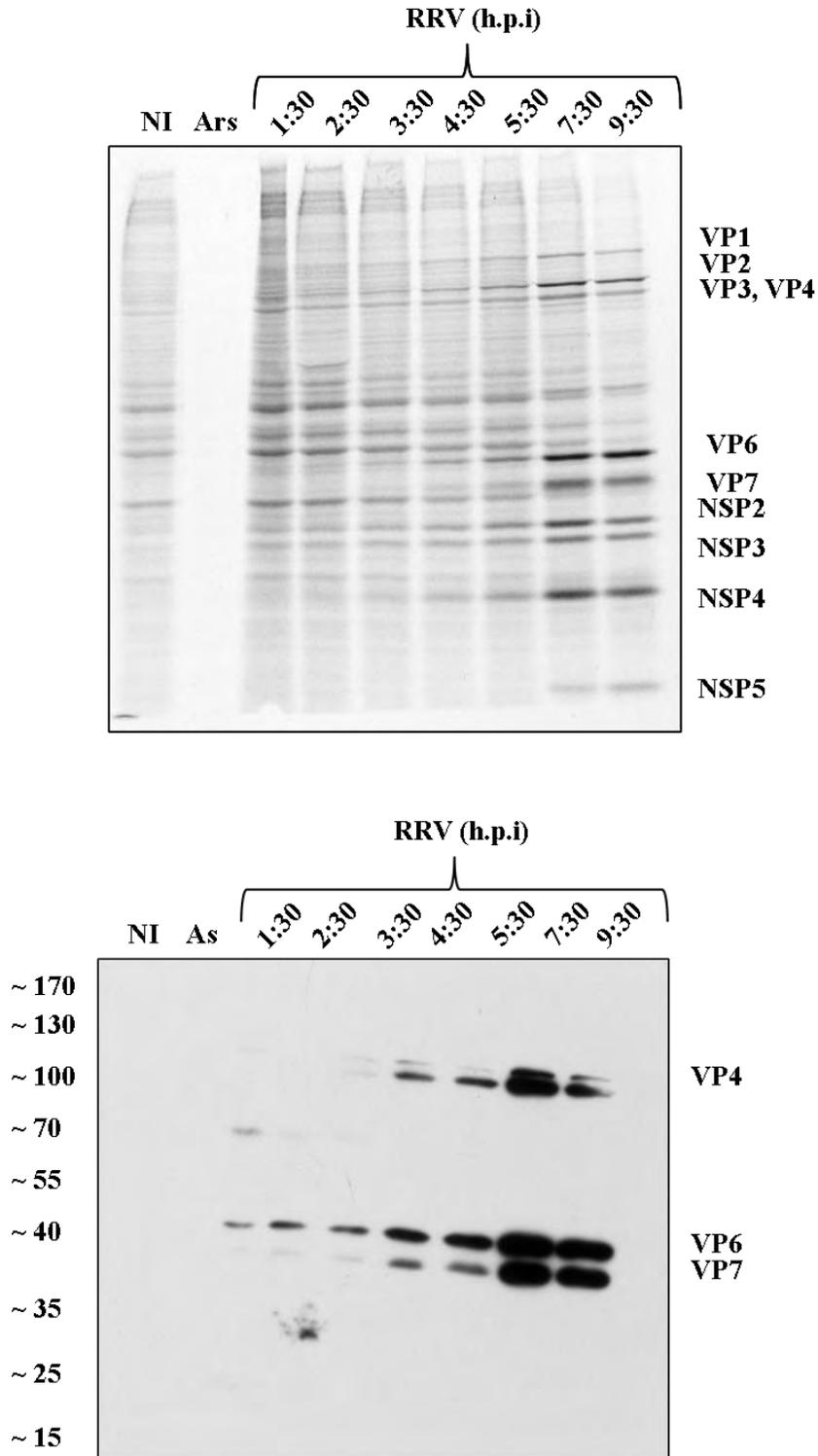


Fig. 10. Inhibición de la síntesis de proteínas durante la infección con RRV en la línea celular U2OS y síntesis de proteínas virales. las células se infectaron con RRV y las proteínas se marcaron radioactivamente como se indica en la metodología. Las proteínas obtenidas, se analizaron por gel de acrilamida al 10% SDS y se detectaron por autoradiografía. La síntesis de proteínas virales se detectaron por western blot utilizando anticuerpos anti-TLPs. NI: Lisado celular no infectado; Ars: arsenito.

Esto pudiera ser debido a que las células U2OS se infectan en menor grado que las células MA104 (Fig. 9-A), de manera que al analizar en células U2OS la inhibición de la síntesis de proteínas celulares a tiempos tempranos de la infección hay muy pocas células infectadas y por eso el efecto de inhibición de síntesis es poco notorio. Conforme avanza el tiempo de la infección la cantidad de proteína viral sintetizada se incrementa y por eso es más claro que a las 9:30 h.p.i observemos una inhibición de síntesis de proteínas celulares por el efecto del virus.

Para observar la acumulación de proteínas virales a lo largo de la infección, se hizo un western blot utilizando un anticuerpo contra TLPs con los mismos lisados celulares. En la figura 10-B, se puede observar claramente el incremento de las proteínas virales VP4, VP6 y VP7 conforme transcurre el tiempo de la infección, siendo a las 9:30 h.p.i el tiempo donde se puede observar una mayor cantidad de proteína viral acumulada. Posteriormente para evaluar el estado de la fosforilación del factor eIF2 α se infectaron las células y se cosecharon a diferentes tiempos hasta las 10 h.p.i. En la figura 11, se muestra un western blot en donde utilizando un anticuerpo específico que reconoce la forma fosforilada del factor eIF2 α podemos observar que durante la infección este factor se encuentra fosforilado, de la misma manera se puede observar que este factor es fosforilado cuando las células son expuestas con Ars. Esto no ocurre en las células control, ya que no se encuentran infectadas ni expuestas a ningún estrés (Fig. 10-B, NI). Estos datos coinciden con los observados en las células MA104^[28], y nos indican que la infección con RRV ocurre de manera similar tanto en las células U2OS como en las de MA104.

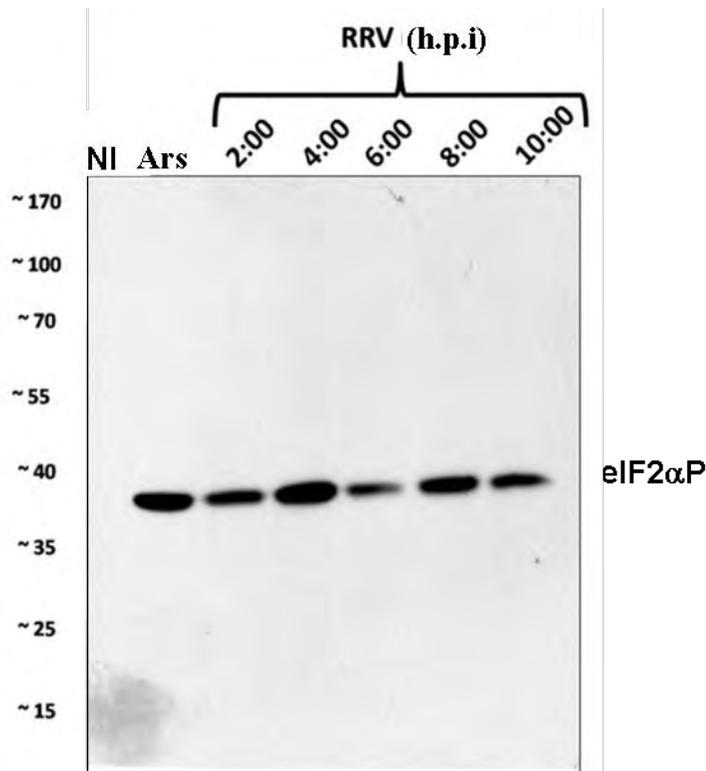


Fig. 11. Fosforilación del factor eIF2α durante la infección con RRV en la línea celular U2OS. Las células se infectaron con RRV y se cosecharon a diferentes tiempos durante la infección. las proteínas obtenidas, se analizaron por gel de acrilamida 10% SDS-PAGE y se detectaron por western blot utilizando un anticuerpo anti eIF2α-P que reconoce específicamente a la forma fosforilada del factor eIF2α. NI: lisado celular no infectado; Ars: arsenito; h.p.i: horas post-infección.

7.2. La proteína G3BP forma agregados citoplásmicos durante la infección con RRV

Una vez determinado que RRV puede reproducirse en las células U2OS, procedimos a evaluar la distribución de las proteínas que forman parte de los SGs y que están fusionadas a proteínas fluorescentes durante la infección con el virus. Las células U2OS, a las que les asignamos el nombre en función de la proteína que expresaban; eIF3b, caprina, RI y G3BP, fueron infectadas con RRV a una MOI de 1 y se fijaron a diferentes tiempos post-infección (hasta las 7:30 h.p.i). Las células infectadas se tiñeron con un anticuerpo contra la proteína

viral NSP2. Como control de formación de SGs utilizamos Ars. En la figura 12, podemos observar que la distribución de la proteína eIF3b en células control es citoplásmica, mientras que en respuesta a estrés con Ars una fracción de esta proteína se distribuye hacia los SGs. En células infectadas con RRV, la distribución de eIF3b no cambia manteniéndose en el citoplasma a lo largo de la infección (Fig. 12, RRV). De la misma manera, la distribución de las proteínas caprina y RI en células control es citoplásmica, y una fracción de ambas proteínas se distribuye hacia los SGs cuando las células se exponen con Ars (Fig. 13 y 14, control y Ars). Durante la infección con RRV observamos que mantienen su distribución citoplásmica (Fig. 13 y 14, RRV).

Previamente, se demostró que células MA104 infectadas con RRV y expuestas a un segundo estrés con Ars a tiempos tempranos de la infección (30 min, 1 y 2 h.p.i), eran capaces de formar SGs, observándose que la proteína PABP se distribuía hacia estas estructuras (Fig. 7). Para determinar hasta que tiempo las proteínas eIF3b, caprina y RI podían formar SGs durante la infección en respuesta a un segundo estrés, decidimos infectar las células U2OS con RRV a una MOI de 1 y exponerlas a un segundo estrés con Ars a diferentes tiempos post-infección. Posteriormente, las células fueron tratadas para ensayos de inmunofluorescencia. En las figuras 12, 13 y 14 (RRV + Ars) podemos observar que las proteínas eIF3b, Caprina y RI (respectivamente) son capaces de formar SGs en las primeras horas post-infección, tal como lo habíamos observado anteriormente en las células MA104 (Fig. 7), y conforme pasa el tiempo de infección se observó que las células van perdiendo la capacidad de formar SGs en respuesta al segundo estrés. De igual manera, observamos que las células no infectadas (las que no muestran tinción con NSP2) son capaces de formar SGs, demostrando lo observado por Montero et al. 2008, que RRV tiene un mecanismo de inhibición de formación de SGs

cuando las células son expuestas a un segundo estrés (Fig. 12, 12 y 14, RRV + As).

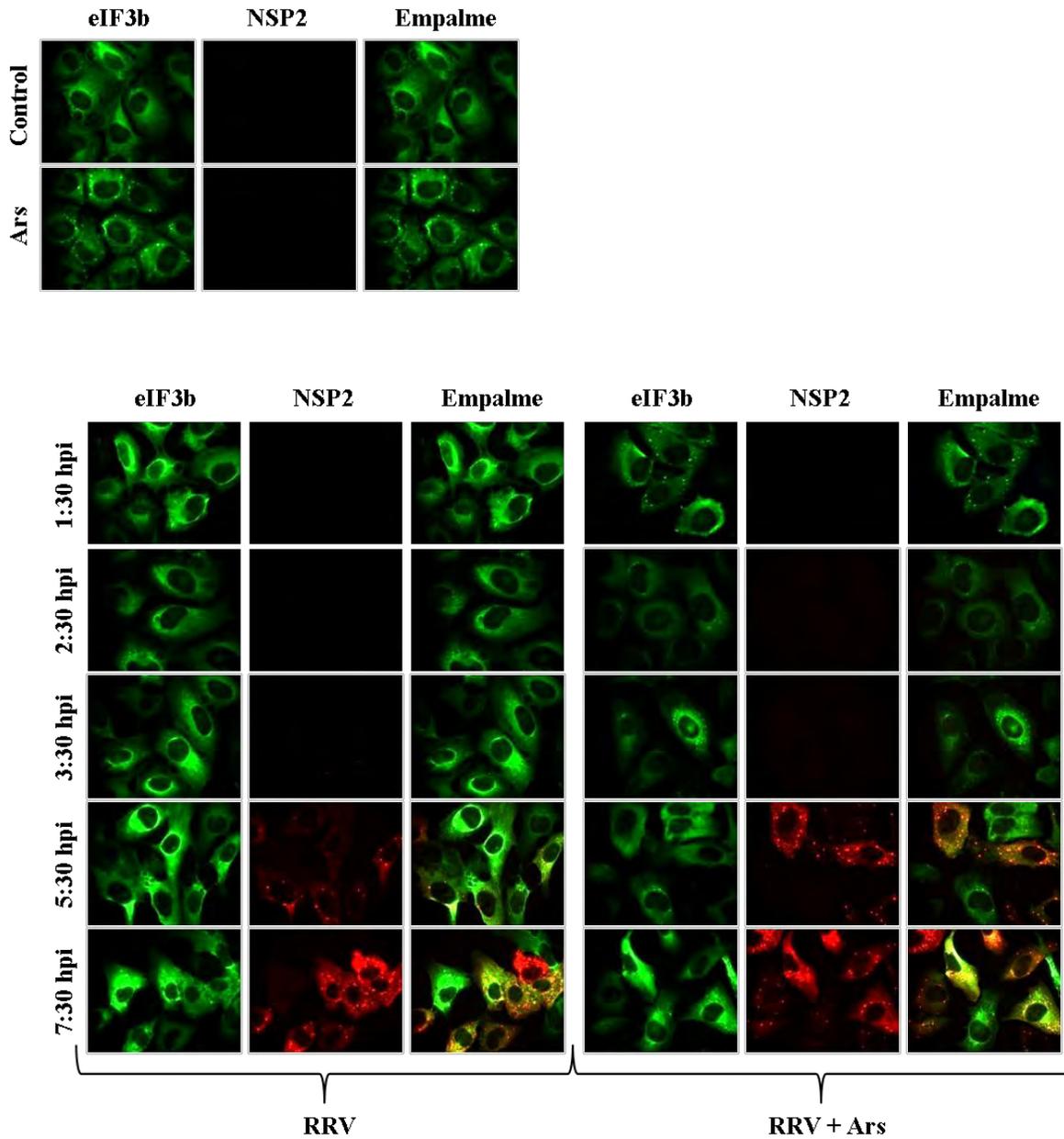


Fig. 12. Distribución de la proteína eIF3b durante la infección con RRV. La línea celular U2OS que expresa a la proteína eIF3b se infectó con RRV (MOI=1) y se fijó a diferentes tiempos de la infección. RRV: infección con RRV; RRV + Ars: células infectadas + Ars (apartado 6.5). Verde: proteína eIF3b fusionada a YFP. Rojo: tinción con anti-NSP2.

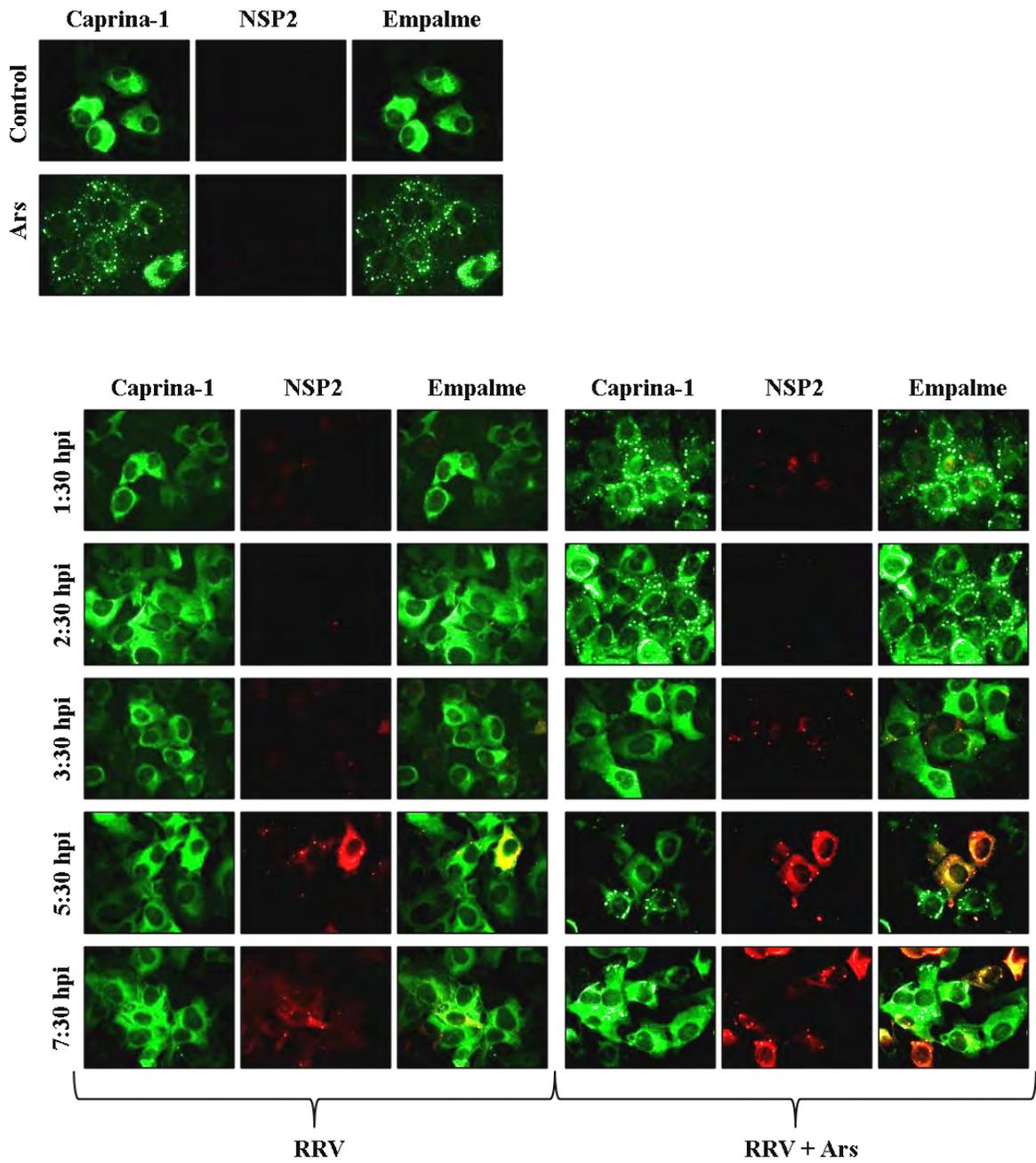


Fig. 13. Distribución de la proteína caprina-1 durante la infección con RRV. La línea celular U2OS que expresa a la proteína caprina-1 se infectó con RRV (MOI=1) y se fijó a diferentes tiempos de la infección. RRV: infección con RRV; RRV + Ars: células infectadas + Ars (apartado 6.5). Verde: proteína caprina-1 fusionada a YFP. Rojo: tinción con anti-NSP2.

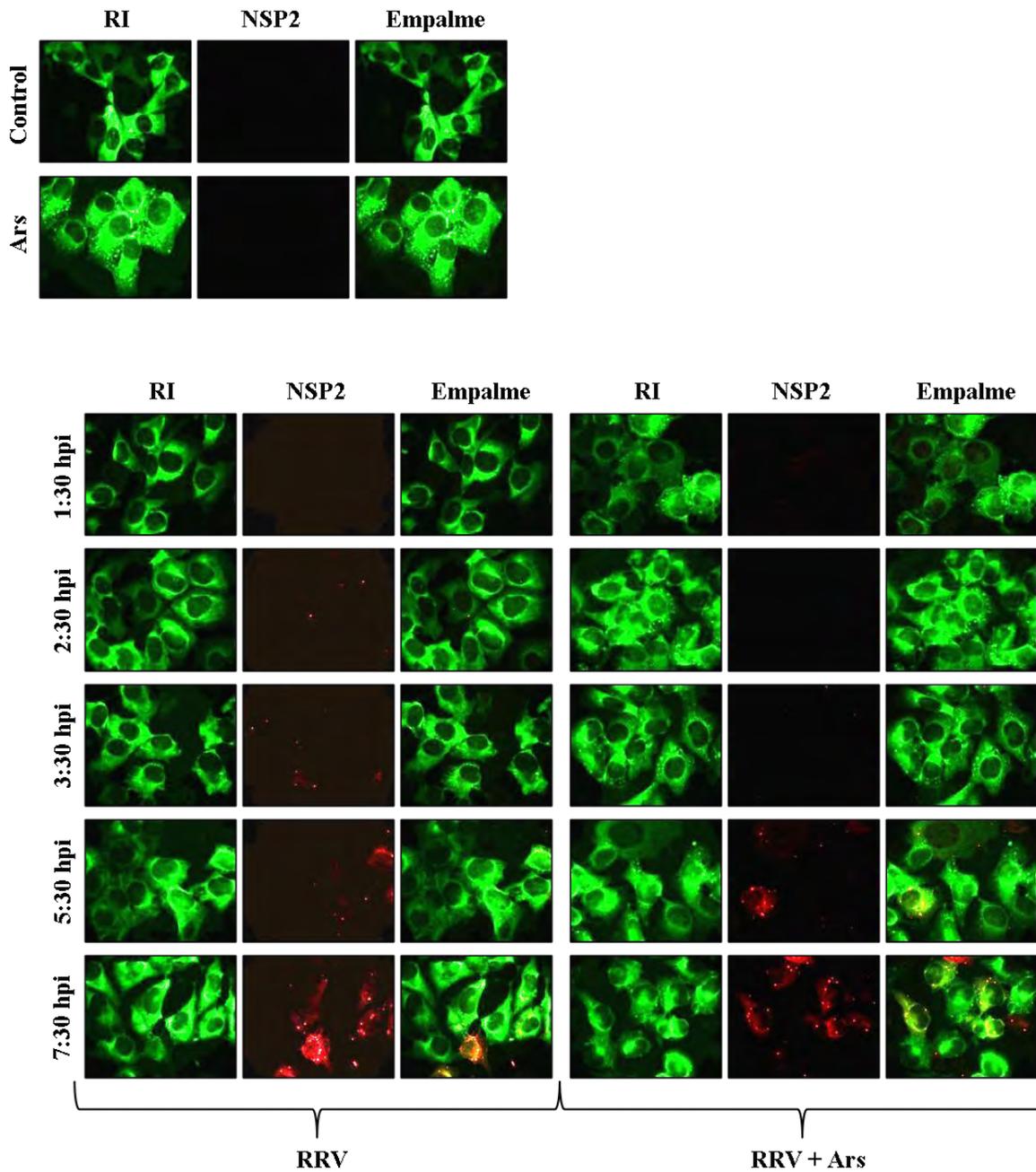


Fig. 14. Distribución de la proteína RI durante la infección con RRV. La línea celular U2OS que expresa a la proteína RI se infectó con RRV (MOI=1) y se fijó a diferentes tiempos de la infección. RRV: infección con RRV; RRV + Ars: células infectadas + Ars (apartado 6.5). Verde: proteína RI fusionada a GFP. Rojo: tinción con anti-NSP2.

Hasta ahora hemos mostrado, que la distribución de las proteínas eIF3b, caprina y RI, no cambia durante la infección con RRV. Por otro lado, cuando analizamos la distribución de la

proteína G3BP durante la infección con RRV, observamos que conforme transcurre el tiempo de infección esta proteína forma unos agregados citoplásmicos muy similares a los SGs que se observan cuando las células son expuestas a estrés con As (Fig. 15).

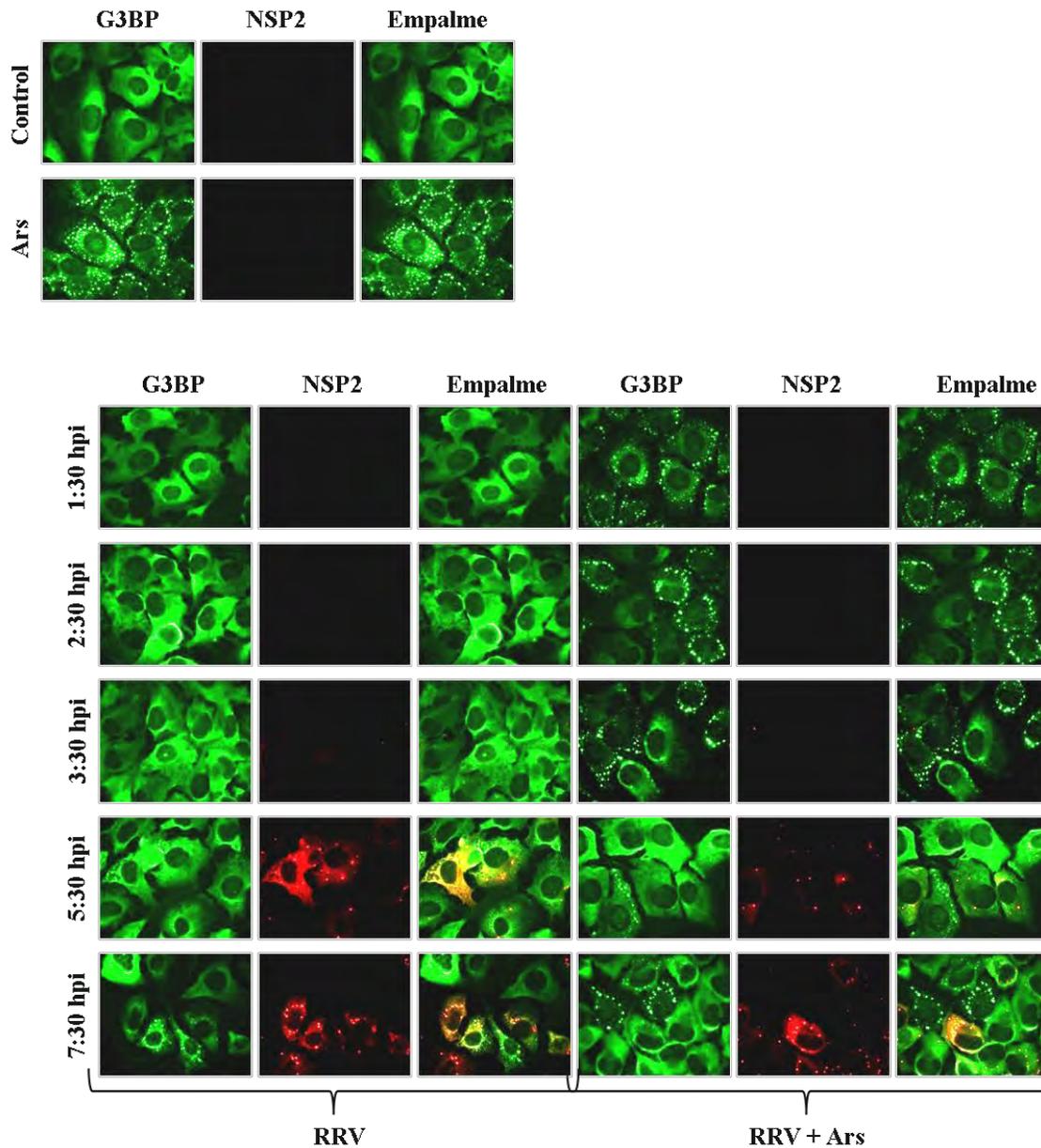


Fig. 15. Distribución de la proteína G3BP durante la infección con RRV. La línea celular U2OS que expresa a la proteína G3BP se infectó con RRV (MOI=1) y se fijó a diferentes tiempos de la infección. RRV: infección con RRV; RRV + Ars: células infectadas + Ars (apartado 6.5). Verde: proteína G3BP fusionada a GFP. Rojo: tinción con anti-NSP2.

Se ha descrito que algunos virus (como los SFV o Poliovirus), forman SGs y conforme pasa el tiempo de infección estos se desensamblan favoreciendo el ciclo replicativo del virus [24, 39]. Para estudiar si los agregados citoplásmicos de G3BP que se forman durante la infección se desensamblan a tiempos tardíos, las células U2OS se infectaron con RRV y se fijaron a las 10, 12 y 14 h.p.i. En la figura 16, podemos observar que a tiempos tardíos de la infección la distribución de G3BP se mantiene como agregados citoplásmicos, mientras que en células que no están infectadas G3BP mantiene su distribución citoplásmica. Por otro lado, cuando las células G3BP son infectadas e inducidas a un segundo estrés con Ars, se puede observar que durante de la infección, las células que están infectadas no forman SGs en respuesta al segundo estrés, sin embargo, a partir de las 7:30 h.p.i, se empiezan a formar agregados citoplásmicos de G3BP que visualmente son similares a los SGs de Ars (Fig. 15 y 16, RRV + As).

7.4. Los Agregados de G3BP formados durante la infección con RRV parecieran no ser los SGs convencionales caracterizados con Ars

En la figura 16, observamos que durante la infección con RRV la proteína G3BP se agrega para formar unas estructuras citoplásmicas similares a los SGs formados en respuesta a Ars. De manera que, no es claro si los agregados de G3BP durante la infección, son SGs o agregados citoplasmáticos (AC) cuya función por el momento se desconoce. Hasta ahora solo se ha descrito detalladamente la composición de SGs formados con Ars, sin embargo, existen otros tipos de estrés, los cuales dentro de una célula activan respuestas diferentes y estas respuestas deberían verse reflejadas en la composición de SGs que forman.

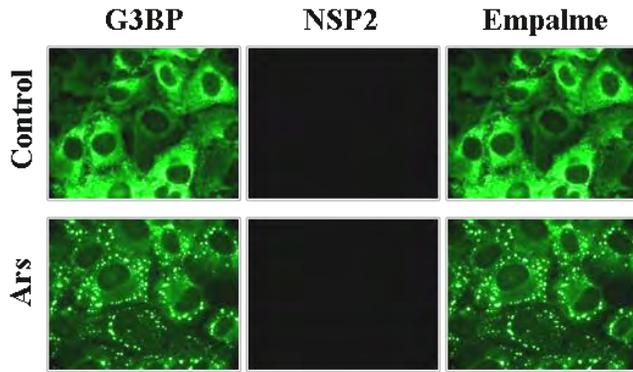
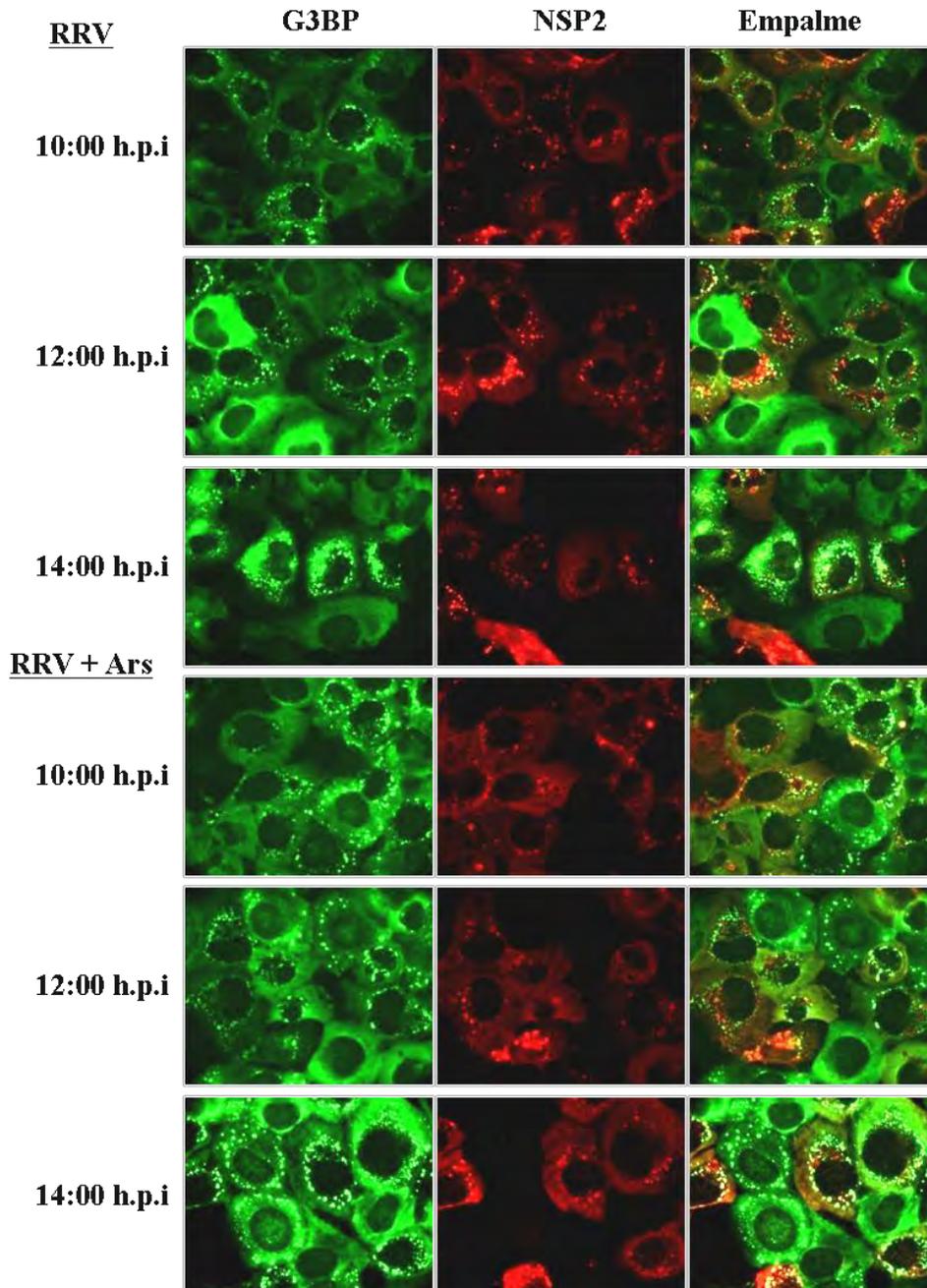


Fig. 16. Distribución de la proteína G3BP a tiempos tardíos de la infección con RRV. La línea celular U2OS que expresa a la proteína G3BP se infectó con RRV (MOI=1) y se fijó a diferentes tiempos tardíos de la infección. RRV: infección con RRV; RRV + Ars: células infectadas + Ars (apartado 6.5). Verde: proteína G3BP fusionada a GFP. Rojo: tinción con anti-NSP2.



Se ha descrito, que los componentes de los SGs (mRNPs y mRNAs) están en equilibrio dinámico con otras estructuras citoplasmáticas conocidas como polisomas y cuerpos P (PBs, estructuras citoplasmáticas donde se lleva a cabo la degradación del mRNA). Para demostrar este equilibrio dinámico, Kedersha N. et al. 2000, promovió la formación de SGs exponiendo a las células COS7 a un tratamiento con Ars durante 30 min. Posteriormente, estas células las expuso a un tratamiento con cicloheximida durante 1 hora. De esta manera observó que los SGs formados previamente con Ars, se desagregaban, indicando que el equilibrio de componentes, por efecto de la cicloheximida se había desplazado hacia la formación de polisomas ^[18]. En base a esto, decidimos comprobar si los agregados que observamos con G3BP durante la infección con RRV se comportaban igual que los SGs formados con Ars en presencia de cicloheximida. Primero, se infectaron con RRV las células U2OS a una MOI de 1. A las 9 h.p.i, cuando ya se observaban agregados de G3BP (Fig. 16), las células se trataron con cicloheximida (250 µg/ml) durante 1, 2 y 3 h. Posteriormente, las células se fijaron y se tiñeron con α -NSP2 como control de infección. Como control positivo para evaluar el efecto de la cicloheximida, se indujo la formación previa de SGs en células U2OS exponiéndolas con Ars durante 30 min. Posteriormente las células se trataron con cicloheximida por 1 h, tal y como se describe en Kedersha et al. 2000 ^[18]. Se contaron 200 células y se determinó que porcentaje de estas tenían SGs, estaban infectadas (RRV), y estaban infectadas y tenían AC (RRV/AC), antes y después de los tratamientos con cicloheximida. En la figura 17, se muestra que el efecto de la cicloheximida (Ch) por si sola, como ya se había demostrado no induce la formación de SGs ^[18]. También se puede observar que los SGs formados previamente con Ars por efecto de la cicloheximida se disuelven, aunque no por completo, y cambian de una forma redonda y abundante, a pequeños agregados no uniformes de G3BP (Fig. 17, Ars, Ars + Ch).

Debido al efecto de la cicloheximida se determinó que hay una reducción del 36% de células que tienen SGs (Fig. 17, Ars, Ars + Ch), lo que nos indica que la cicloheximida si tiene un efecto en los SGs formados previamente con Ars. Por otro lado, podemos observar que la infección con RRV promueve la formación de AC de la proteína G3BP (Fig. 17, RRV). También observamos que estos AC de G3BP, al ser tratados con cicloheximida durante 1, 2 y 3 horas, tienen una reducción del 10 % de células que no tienen AC, esto si los comparamos con los agregados de G3BP formados durante la infección (Fig. 17, RRV + Ch 1, 2, 3 h). Sin embargo, se observó que los agregados de G3BP a lo largo del tratamiento con cicloheximida (2 y 3 h) no tienen ningún cambio notable en abundancia ni en forma como se observa con los SGs de Ars (Fig. 17, RRV + Ch 1, 2, 3 h). Es importante indicar que el porcentaje de células que tienen agregados de G3BP se mantiene hasta las 3 h de tratamiento con cicloheximida, presentándose solo la reducción de estos agregados a la primera hora de tratamiento (Fig. 17, RRV + cicloheximida 1 [53.5%], 2 [44.5%], 3 h [54.5%]). La proteína G3BP, es considerada una de las proteínas iniciadoras en el ensamblaje de los SGs y es esencial para que estos se formen [3, 39]. El hecho de que durante la infección esta proteína se agregue, siendo tan importante para la formación de SGs, parecería indicar que estos agregados fueran SGs, sin embargo al no disolverse tan drásticamente con cicloheximida y mantenerse durante tanto tiempo con esta droga, pareciera indicar que estos agregados, al menos en composición, son más estables que los SGs formados por Ars. Finalmente, otra posibilidad sería que la agregación de G3BP durante la infección, fuese la responsable de llevar a cabo la inhibición de la formación de SGs. De manera que, durante la infección G3BP no este disponible y por eso los SGs no pueden ser ensamblados y se inhiba su formación. Recordemos que las células durante la infección, en tiempos tempranos son capaces de formar SGs en respuesta a un

segundo estrés con Ars, pero a partir de las 3-4 h.p.i, estas células ya no los forman aún en presencia de un segundo estrés.

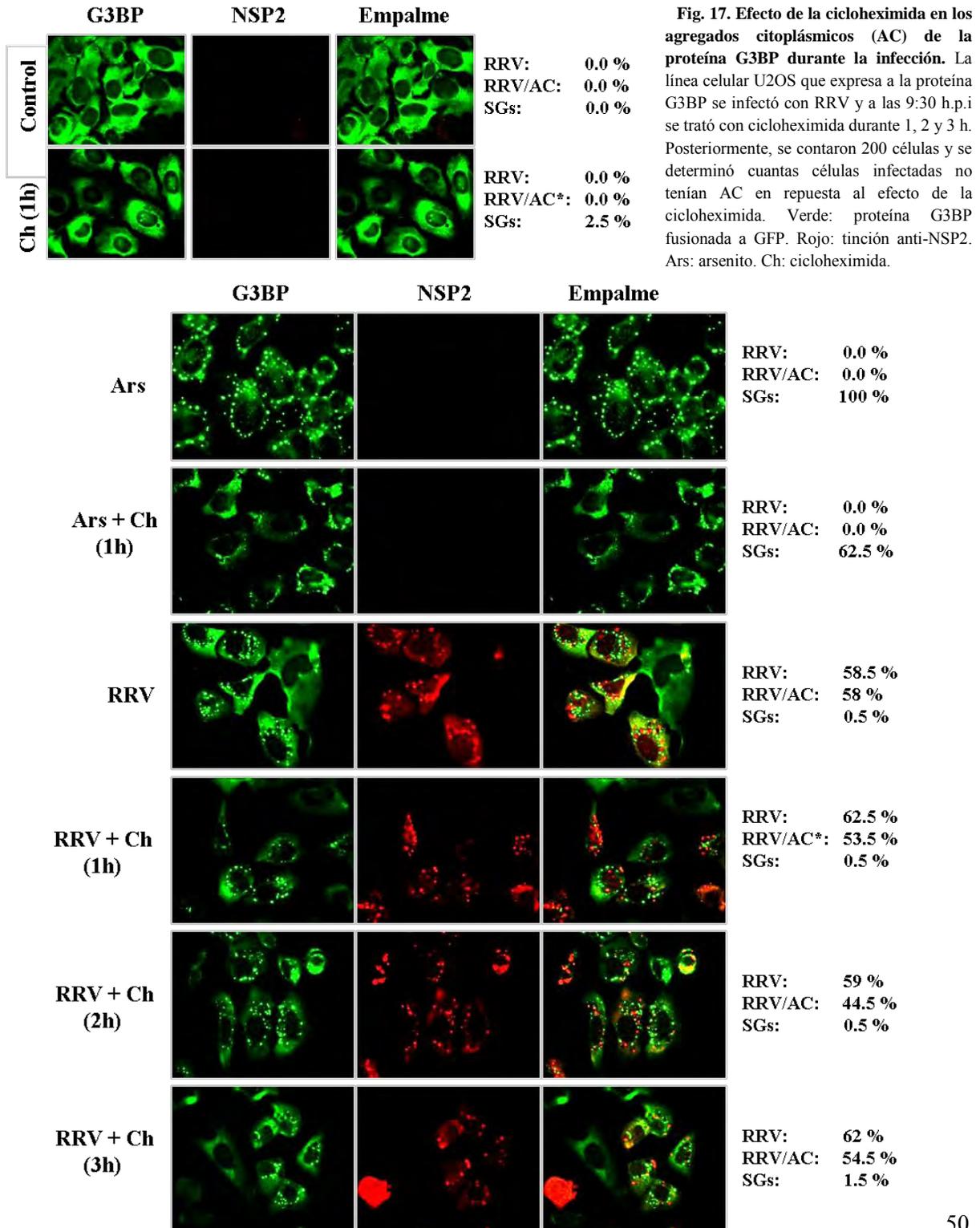


Fig. 17. Efecto de la cicloheximida en los agregados citoplásmicos (AC) de la proteína G3BP durante la infección. La línea celular U2OS que expresa a la proteína G3BP se infectó con RRV y a las 9:30 h.p.i se trató con cicloheximida durante 1, 2 y 3 h. Posteriormente, se contaron 200 células y se determinó cuantas células infectadas no tenían AC en respuesta al efecto de la cicloheximida. Verde: proteína G3BP fusionada a GFP. Rojo: tinción anti-NSP2. Ars: arsenito. Ch: cicloheximida.

Esto coincide con la agregación de G3BP, la cual se empieza a observar a partir de las 3-4 h.p.i (Fig. 15, RRV). Esta agregación pareciera que se da en forma gradual ya que a lo largo de la infección (Fig. 15 y 16), primero se empiezan a observar puntos pequeños distribuidos en todo el citoplasma (3-4 h.p.i), después se observan unos agregados de G3BP no uniformes (5-7 h.p.i) y por último estos agregados se vuelven estructuras mas grandes y se distribuyen alrededor de los viroplasmas (8-14 h.p.i). Llama la atención que no se forman gránulos de caprina, la cual es una proteína que se ha visto que se une a G3BP^[37], lo que sugiere que estas estructuras posiblemente no serian los típicos SGs de Ars descritos hasta ahora.

7.5. El RNAdc en células U2OS causa una inhibición en la síntesis de proteínas celulares y promueve la formación de SGs durante largo tiempo.

El RNA de doble cadena (RNAdc) es considerado un agente causante de estrés en la célula. Este, lleva a cabo la activación de la cinasa PKR, que a su vez fosforila al factor eIF2 α , inhibiéndose así la síntesis de proteínas y generándose una respuesta inmunológica^[32]. La fosforilación del factor eIF2 α es una de las señales para la formación de SGs, por consiguiente se daba por hecho que el estrés provocado por esta molécula inducía la formación de SGs. Sin embargo, hasta ahora la formación de SGs en respuesta a este tipo de estrés no se ha caracterizado en detalle. Recientemente en el laboratorio, se ha observado que a diferencia de otros tipos de estrés, el estrés por RNAdc mantiene la fosforilación de factor eIF2 α y la inhibición de la síntesis de proteínas al menos 8 horas post transfección (h.p.t). Decidimos evaluar si el RNAdc era capaz de formar SGs y si estos se mantenían por más tiempo que los inducidos con otro tipo de estrés. Utilizamos la línea celular U2OS, que

expresa simultáneamente dos proteínas, G3BP (marcadora de SGs) y dcp1 (marcadora de PBs), fusionadas a una GFP y RFP, respectivamente. Dado que muchos otros tipos de estrés intervienen en la inhibición o formación de PBs [6, 29, 19], esta línea nos permitiría determinar el efecto del RNAdc tanto en la formación de SGs como en la formación de PBs. Primero, se determinó la concentración óptima de RNAdc a la cual se promueve la inhibición de síntesis de proteína y la formación de SGs. El RNAdc viral (RNAdc-V) fué introducido a la célula mediante transfección con lipofectamina a diferentes concentraciones. El tiempo de transfección fue de 1 hora, posteriormente las células se lavaron y se fijaron 8 h.p.t para inmunofluorescencia y se lisaron para análisis de síntesis de proteínas por marcaje metabólico. En la figura 18-A, podemos observar, al comparar con el control, que hay una disminución de síntesis de proteínas a partir de los 0.25 µg de RNAdc y que ésta se da por completo a partir de 1 y 2 µg de concentración. De igual manera, podemos observar el efecto de la formación de SGs en respuesta al RNAdc, este efecto se observa a partir de 0.5 µg de RNAdc (Fig. 18-B). Además, podemos observar que los SGs formados en respuesta al tratamiento con Ars son morfológicamente diferentes a los SGs formados en respuesta al RNAdc-V, estos últimos se observan como pequeños agregados distribuidos en todo el citoplasma de manera poco abundante, mientras que los SGs de Ars se observan como agregados citoplasmáticos grandes distribuidos abundantemente en toda la célula (Fig. 18-B, Ars y RNAdc). Por otro lado, en cuanto a la formación de PBs, siguiendo la proteína dcp1 como marcador de estas estructuras, se puede observar que en condiciones normales estas estructuras se encuentran de manera poco abundante distribuidas en toda la célula, mientras que cuando las células son expuestas a un estrés con Ars, la formación de PBs aumenta (Fig. 18-B, Control y Ars, dcp1).

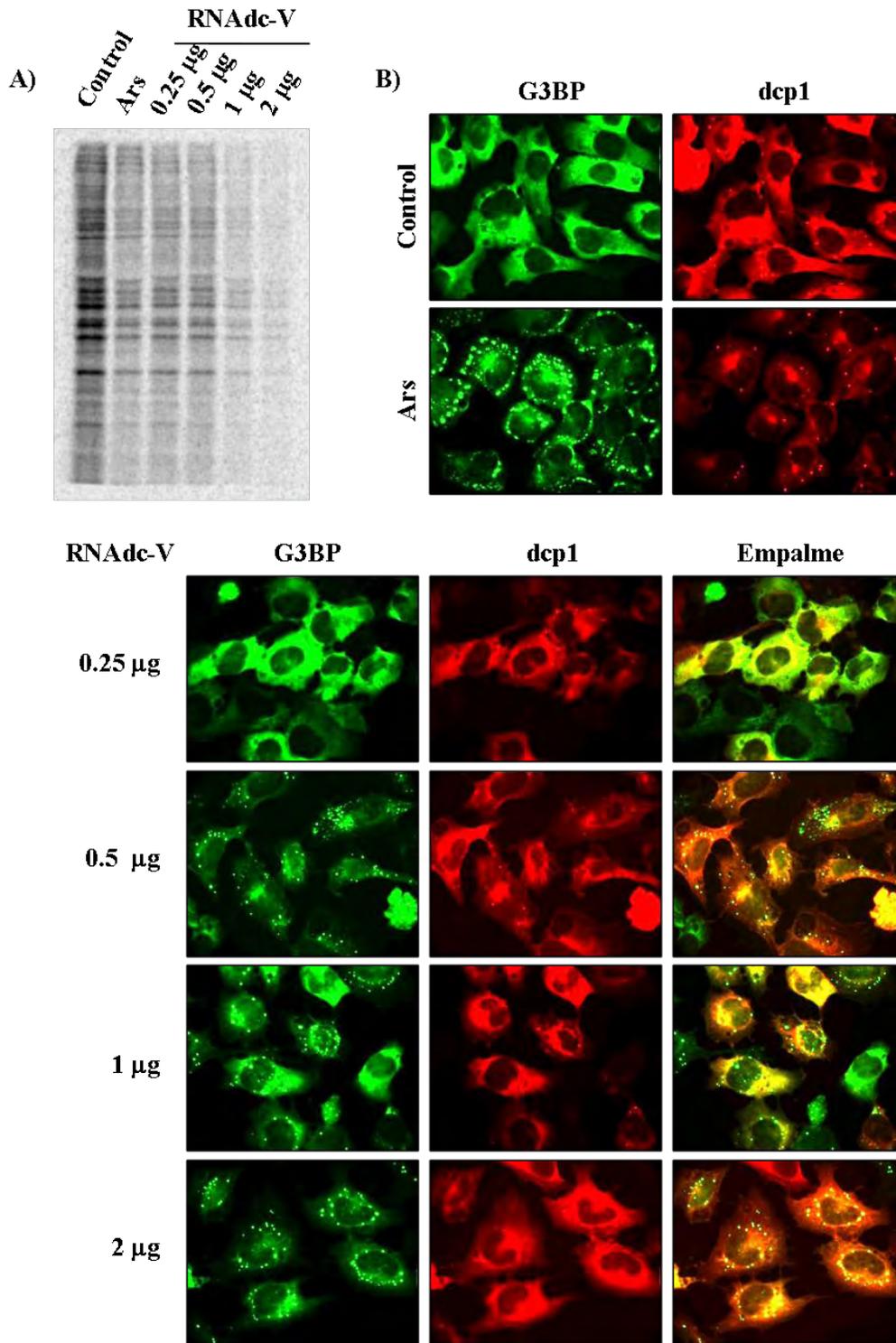


Fig. 18. Efecto del RNAdc-V en la inhibición de síntesis de proteínas y formación de SGs en células U2OS. La línea celular U2OS que expresa a la proteína G3BP se transfirió con distintas concentraciones de RNAdc-V durante 1 h y se fijó a las 8 h.p.t. A) Se muestra una autoradiografía de proteínas marcadas radioactivamente. B) Se muestra una inmunofluorescencia donde se observa la formación de SGs en células transfectadas con RNAdc. Verde: G3BP-GFP. Rojo: dcp1-RFP. Ars: arsenito.

En respuesta al RNAdc, se puede observar que el número de PBs disminuye completamente (Fig.18-B, RNAdc). En base a estos resultados podemos decir que el estrés de RNAdc promueve la formación de SGs hasta las 8 h.p.t, pero inhibe completamente la formación de PBs.

Para descartar la posibilidad de que el efecto observado con el RNAdc-V se deba a una contaminación con el virus RRV infeccioso, decidimos evaluar el efecto con un análogo de RNAdc sintético, llamado poli I:C, este es un homopolímero formado por 200-600 pares de bases, derivados del ácido inosínico y el ácido citidílico [Poly I:C; poli (ácido Inosínico)-poli (ácido Citidílico)], los cuales forman una estructura muy similar a un RNAdc ^[32]. Para esto, primero se determinó la concentración óptima a la cual el poli I:C inhibía la síntesis de proteínas y llevaba a cabo la formación de SGs. Las células U2OS, fueron transfectadas con poli I:C a una concentración de 0.25 µg y 0.5 µg utilizando lipofectamina durante 1h. Posteriormente, las células se lavaron y a las 8 h.p.t se trataron para ensayos de inmunofluorescencia y marcaje metabólico. En la figura 19-A, se muestran las concentraciones de poli I:C a la cual se lleva a cabo la inhibición de síntesis de proteínas. De igual manera, podemos observar la correlación que existe entre la inhibición de síntesis de proteínas y la formación de SGs debida al efecto del poli I:C (Fig. 19-B). Por otro lado, se observa, que el número de PBs decrece tal y como ocurre con el RNAdc (Fig.19-B). En base a estos resultados, podemos afirmar, que el RNAdc viral y el poli I:C tienen el mismo efecto sobre las células U2OS y que el efecto que observamos con el RNAdc no es debido a alguna contaminación con virus o algún reactivo utilizado durante su purificación.

Por otro lado, se ha descrito que eIF3b es uno de los componentes principales de los SGs y se ha observado que en células que no expresan esta proteína no hay una formación de SGs en

respuesta con Ars y tapsigargina [3].

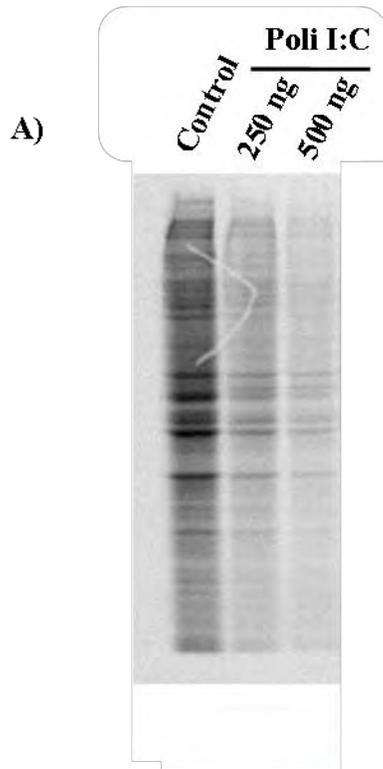
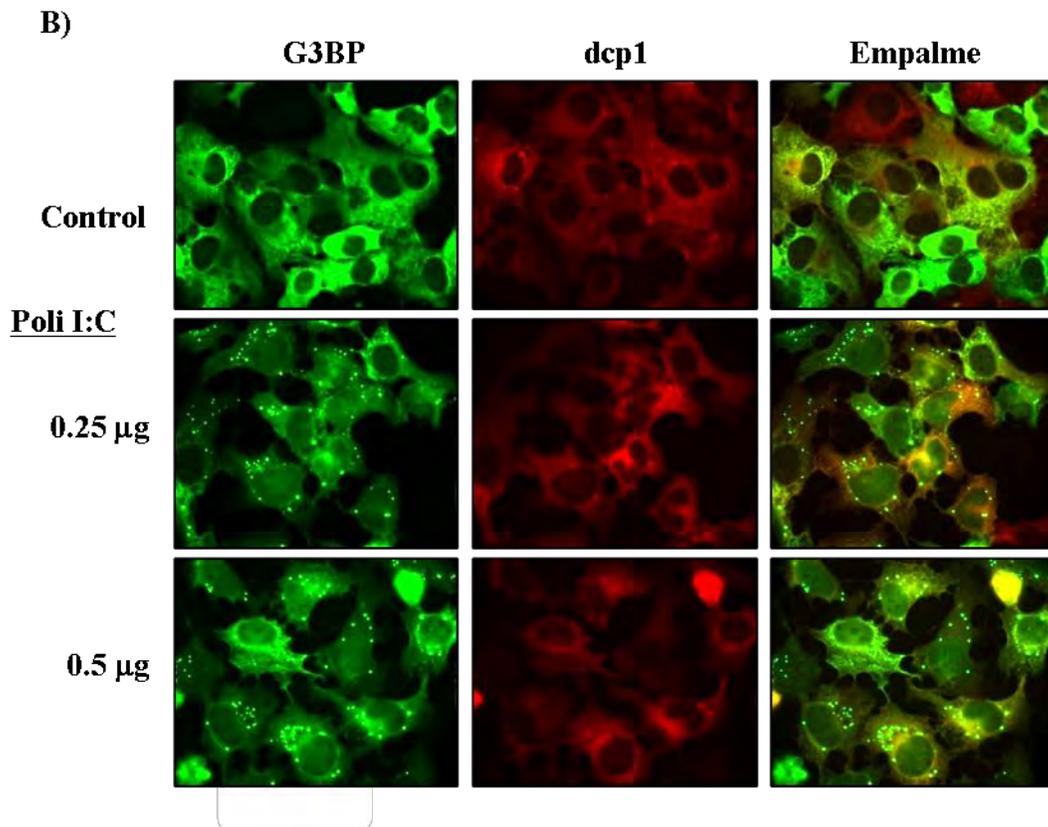


Fig. 19. Efecto del poli I:C en células U2OS. La línea celular U2OS que expresa a la proteína G3BP se transfeció con distintas concentraciones de RNAdc sintético (poli I:C) durante 1 h y se fijó a las 8 h.p.t. A) Se muestra una autoradiografía de proteínas marcadas radioactivamente y se observa el efecto del poli I:C. B) Se muestra una inmunofluorescencia donde se observa la formación de SGs en células transfectadas con poli I:C. Verde: G3BP-GFP. Rojo: dcp1-RFP.



En base a esto, decidimos evaluar la distribución de la proteína eIF3b en respuesta al tratamiento con poli I:C. Las células eIF3b se transfectaron con 0.25 y 0.5 μg de poli I:C durante 1 h. Posteriormente, se lavaron y a las 8 h.p.t se trataron para ensayos de inmunofluorescencia y marcaje metabólico (apartado 6.5 y 6.6). En la figura 20-A, podemos observar que hay una inhibición en la síntesis de proteínas en respuesta al poli I:C, sin embargo no observamos un distribución de la proteína eIF3b hacia los SGs (Fig. 20-B). Es importante recordar que el estrés del poli I:C mantiene la fosforilación del factor eIF2 α por un tiempo mas largo y como consecuencia la síntesis de proteínas celulares se mantiene inhibida hasta las 8 h.p.t, lo que no sucede con otros tipos estrés. Por ejemplo, en el estrés de Ars tanto la inhibición de síntesis de proteínas como la fosforilación del factor eIF2 α duran aproximadamente 1 hora y posteriormente, se observa un tiempo de recuperación en la célula que conlleva a la desfosforilación del factor eIF2 α y a la recuperación de la síntesis de proteínas. El hecho de que el estrés de RNAdc mantenga todo el tiempo la fosforilación del factor eIF2 α , la inhibición de síntesis de proteínas y la formación de SGs, sugiere que posiblemente la composición de SGs bajo este tipo de estrés pudiese no ser la misma que la del estrés con Ars e incluso podría darse el caso que las proteínas que normalmente forman los SGs en respuesta a Ars, participen en la formación de SGs por efecto del RNAdc sólo por un período corto de tiempo. Para comprobar si eIF3b se encontraba en los SGs por lapsos cortos de tiempo en respuesta al poli I:C, decidimos hacer cinéticas a diferentes tiempos post-transfección del poli I:C. Las células U2OS, que expresaban a la proteína eIF3b, se transfectaron con poli I:C (0.25 μg) durante 1 hora. Posteriormente se lavaron y se fijaron a diferentes tiempos (1, 3 y 6 h.p.t). En la figura 21, podemos observar que la distribución de eIF3b en los SGs por efecto del poli I:C es dependiente del tiempo, ya que podemos observar

que a la primera hora de tratamiento con poli I:C, la proteína eIF3b se encuentra distribuida en los SGs y que esta distribución co-localiza con la proteína eIF4G, que también se distribuye en los SGs.

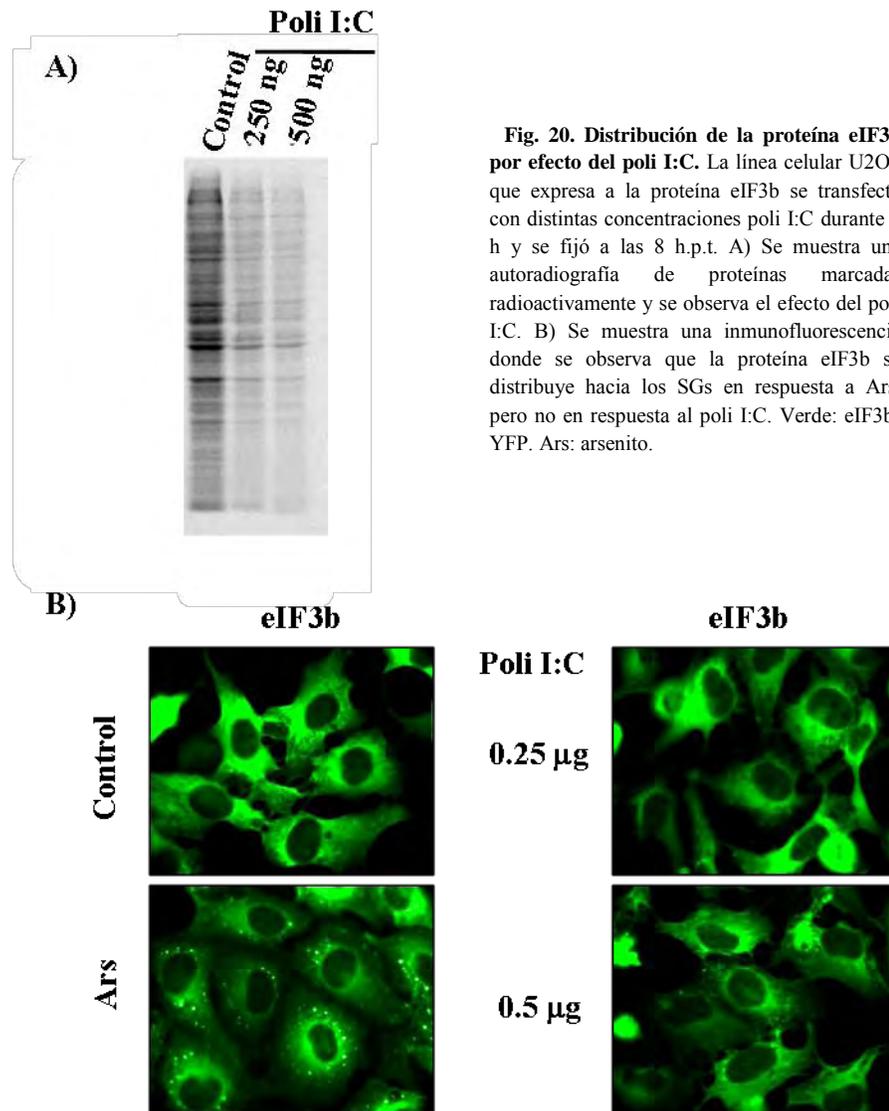


Fig. 20. Distribución de la proteína eIF3b por efecto del poli I:C. La línea celular U2OS que expresa a la proteína eIF3b se transfectó con distintas concentraciones poli I:C durante 1 h y se fijó a las 8 h.p.t. A) Se muestra una autoradiografía de proteínas marcadas radioactivamente y se observa el efecto del poli I:C. B) Se muestra una inmunofluorescencia donde se observa que la proteína eIF3b se distribuye hacia los SGs en respuesta a Ars, pero no en respuesta al poli I:C. Verde: eIF3b-YFP. Ars: arsenito.

Sin embargo, a tiempos posteriores del tratamiento con el poli I:C (3 y 6 h.p.t), se observa que la proteína eIF3b pierde su distribución en los SGs, y por consiguiente ya no se observa una colocación con la proteína eIF4G, la cual se mantiene distribuida en los SGs (Fig. 21, 3 y 6 h.p.t).

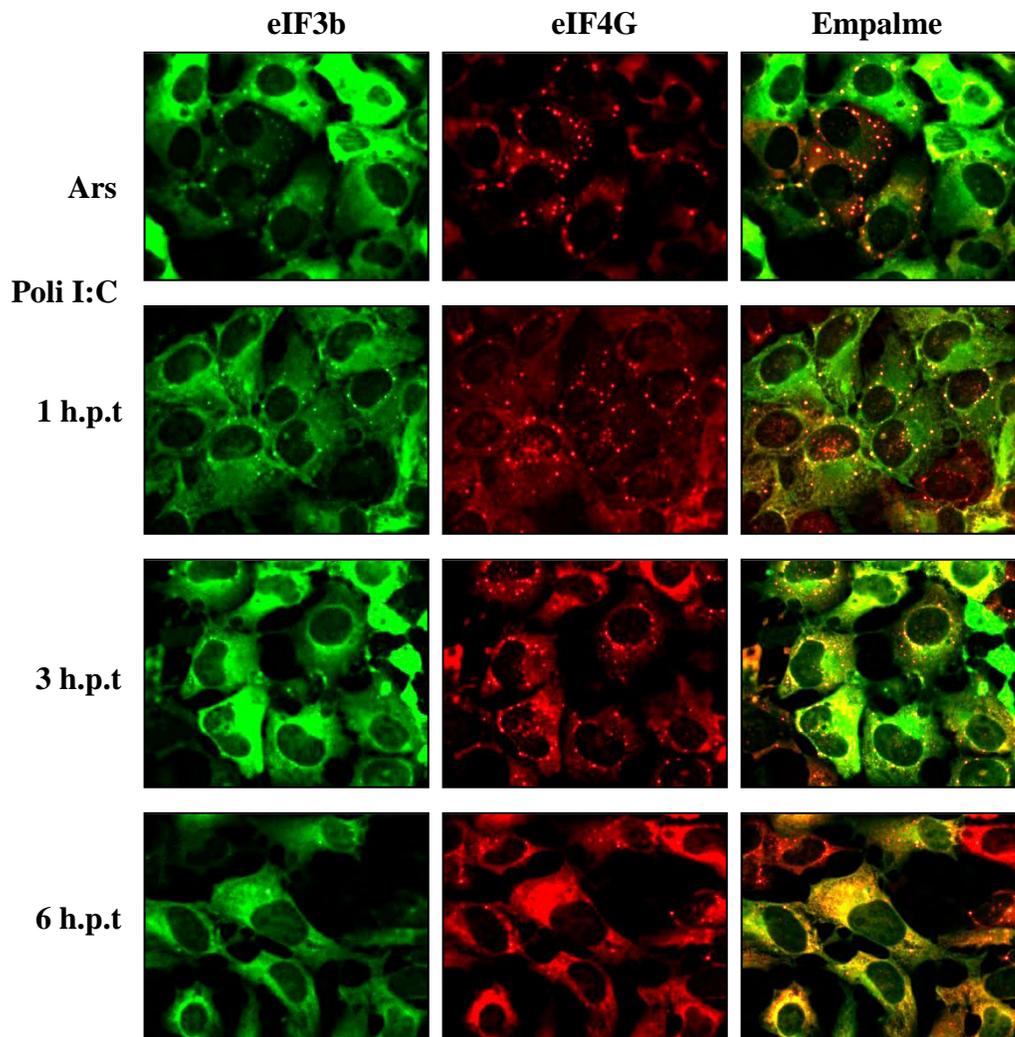


Fig. 21. Distribución de la proteína eIF3b a diferentes tiempos durante el estrés con poli I:C. La línea celular U2OS que expresa a la proteína eIF3b se transfectó con 0.5 mg de poli I:C durante 1 h y se fijó a diferentes tiempos post-transfección. Verde: eIF3b-YFP. Rojo: tinción anti-eIF4G. Ars: arsenito.

Este resultado nos indica que la proteína eIF3b se encuentra momentáneamente en los SGs formados por poli I:C y nos sugiere que posiblemente el papel de eIF3b en este tipo de estrés, sea el de llevar acabo el inicio del ensamblaje de estas estructuras, por lo que la proteína eIF3b solo se encuentra durante la primera hora de tratamiento. De igual manera, estos resultados nos permiten sugerir que la composición de proteínas que forman a los SGs depende del tipo de estrés y del tiempo que este dure, sugiriéndonos también que para llevar a

cabo la caracterización de formación y composición de SGs se deberían tomar en cuenta el tipo de estrés y la duración del mismo.

7.5. Los SGs formados en respuesta al RNAdc no son los típicos SGs caracterizados en respuesta a Ars

Como se mencionó anteriormente, en base a la caracterización de los SGs formados en respuesta a Ars (descrito por Kedersha et al. 2000) a través del tratamiento con cicloheximida en células COS7 ^[18], decidimos determinar si los SGs formados en respuesta al RNAdc también se disolvían con esta droga. Primero, las células U2OS se transfectaron con poli I:C (0.5 µg) durante 1 hora, y a las 7:30 h.p.t, las células fueron tratadas con cicloheximida (250 µg/ml) durante 1, 2 y 3 horas. Al término de estos tiempos, las células se trataron para ensayos de inmunofluorescencia. A partir de 200 células, se cuantificó que porcentaje de estas tenían SGs, antes y después de los tratamientos con cicloheximida. En la figura 22 (Ars), podemos observar que en respuesta al Ars, el 100% de las células forma SGs y que en efecto, los SGs formados previamente con Ars se disuelven bajo el efecto de la cicloheximida hasta alcanzar una reducción del 46.5 % de células que no presentan SGs (Fig. 22, Ars + Ch). Los resultados muestran que el 94.5 % de las células forman SGs en respuesta al poli I:C y cuando los SGs formados con poli I:C son tratados con cicloheximida se muestra una reducción del 15.16 % de células que no presentan SGs (Fig. 22, Poli I:C + Ch). Es importante mencionar que la reducción de células que no tienen SGs por efecto de la cicloheximida se mantiene durante las 3 horas de tratamiento (Fig. 22, 1, 2, 3 con Ch). Estos resultados, nos permiten sugerir que los SGs formados en respuesta al poli I:C difieren en

composición, duración y estabilidad con respecto a los SGs que hasta ahora han sido descritos en respuesta al Ars.

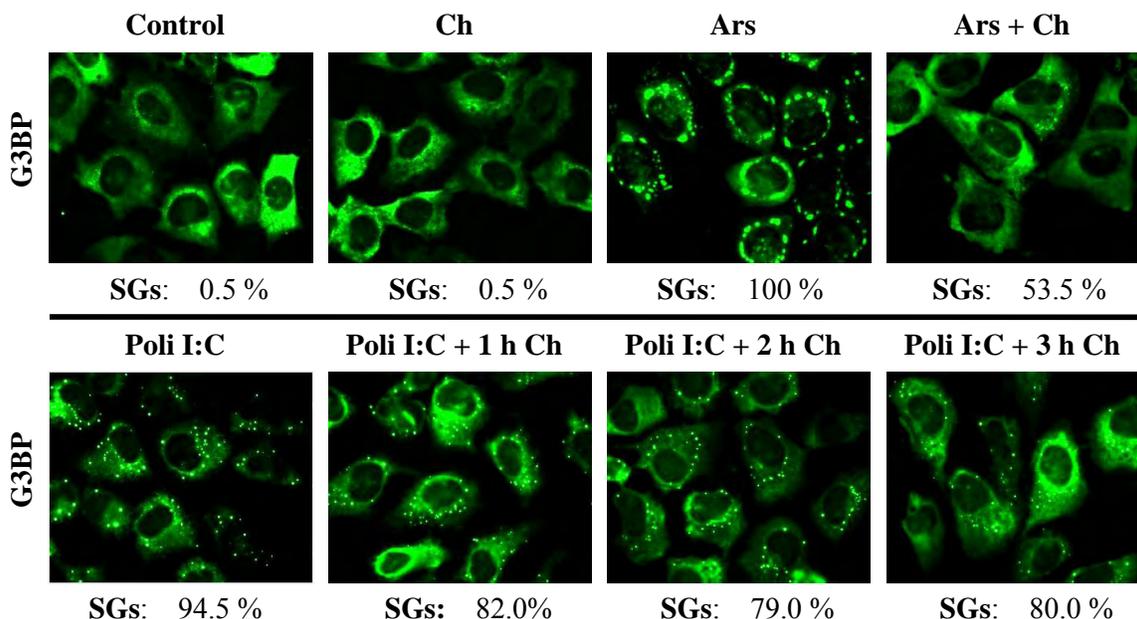


Fig. 22. Efecto de la cicloheximida en los SGs formados en respuesta al poli I:C. La línea celular U2OS que expresa a la proteína G3BP se transfeció con 0.5 mg de poli I:C durante 1 h y a partir de las 7:30 h.p.t se trataron con Ch durante 1, 2, 3 h. A partir de 200 células, se cuantificó cuantas de estas tenían SGs posterior al efecto con la cicloheximida. Verde: G3BP-GFP. Ars: arsenito. Ch: cicloheximida. SGs: gránulos de estrés.

Para evaluar la distribución de otras proteínas que se encuentran en los SGs, decidimos observar el efecto del poli I:C en células MA104 y utilizar anticuerpos contra las proteínas S6, eIF4G y PABP como marcadoras de SGs. Primero, determinamos la concentración óptima de poli I:C en la cual se promovía una inhibición en la síntesis de proteínas y formación de SGs en MA104. Las células MA104 se transfectaron con diferentes concentraciones de poli I:C durante 1 hora y a las 8 h.p.t las células se trataron para inmunofluorescencia y marcaje metabólico. En la figura 23-A, se muestra una autoradiografía en donde se puede observar que a 0.25 μ g es la concentración óptima de poli I:C en donde se promueve una inhibición en

la síntesis de proteínas. Además, utilizando a la proteína S6 como marcador de SGs, podemos observar que a esta concentración se promueve una formación de SGs (Fig. 23-B). Por otro lado, podemos observar que a concentraciones mayores de poli I:C no hay formación de SGs (Fig. 23-B). Nosotros sugerimos que posiblemente sea debido al mecanismo de activación de la cinasa PKR, ya que se ha descrito que para que esta se active, se tienen que unir 2 cinasas de PKR a una molécula de RNAdc, esto promueve que las 2 cinasas se dimericen y se lleve a cabo su activación ^[9]. De tal manera, que al existir mas moléculas que RNAdc que de PKR, cada cinasa se una solo a una molécula de RNAdc impidiendo que estas se puedan dimerizar y por lo tanto activar. Por esto, a mayor concentración de poli I:C no se observa un efecto ni en la inhibición de síntesis de proteínas ni en la formación de SGs (Fig. 23).

Una vez establecida la concentración a la cual el poli I:C inhibía la síntesis de proteínas y formaba SGs en las células MA104, decidimos evaluar la distribución de las proteínas PABP y eIF4G en la formación de los SGs. Las células MA104 fueron transfectadas con 0.25 µg de poli I:C durante 1 hora, y a las 8 h.p.t las células fueron tratadas para ensayos de inmunofluorescencia. En la figura 24, podemos observar que las proteínas PABP y eIF4G en células control se encuentran distribuidas en el citoplasma.

Cuando las células son expuestas a estrés con Ars, se observa que ambas proteínas se distribuyen hacia los SGs e incluso se puede observar que estas colocalizan (Fig. 24). Por otro lado, cuando las células son tratadas con poli I:C se observa que una pequeña porción de la proteína PABP se distribuye en los SGs, mientras que la mayor parte se distribuye hacia el núcleo (Fig. 24).

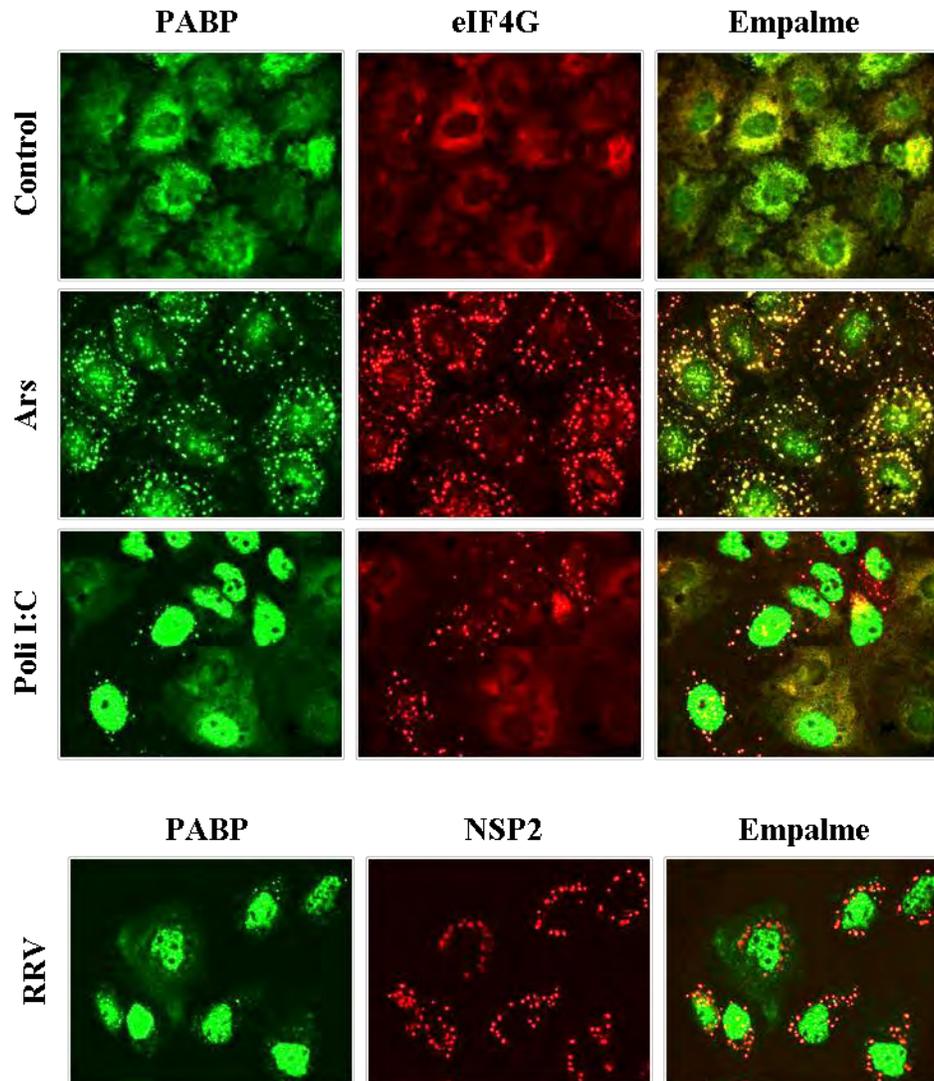


Fig. 24. Distribución de la proteína PABP durante el estrés con poli I:C. Las células MA104 se transfectaron con 0.25 mg de poli I:C y se infectaron con RRV durante 1 h. Posteriormente, se fijaron 8 h.p.t y 8 h.p.i, respectivamente. Verde: tinción anti-PABP. Rojo: tinción anti-NSP2 para células infectadas con RRV.

Sin embargo estos resultados, nos permiten sugerir que la señalización generada por el reconocimiento del RNAdc (poli I:C) puede ser otro mecanismo por el cual PABP se distribuya en el núcleo.

7.7. El RNAdc (poli I:C) inhibe la infección con RRV en células MA104

Resultados recientes en el laboratorio y los mostrados anteriormente en este trabajo, nos indican que el efecto que observamos con el poli I:C es muy similar a lo que ocurre durante la infección con RRV. En ambos casos, se lleva a cabo la fosforilación del factor eIF2 α acompañada de la inhibición de la síntesis de proteínas, y estas dos se mantienen por un tiempo largo, de igual manera, en ambos casos se observa un cambio de distribución nuclear de la proteína PABP. Sin embargo, a diferencia del efecto de la infección con RRV, el efecto del poli I:C si promueve la formación de SGs, lo que nos podría servir como una herramienta para determinar el mecanismo de inhibición de SGs durante la infección con RRV. En base a esto, decidimos preformar los SGs con el poli I:C, y una vez formados infectar a las células con RRV y determinar si el virus era capaz de deshacer los SGs preformados con el poli I:C. De esta manera, si el virus era capaz de deshacer los SGs, entonces podríamos determinar que proteínas virales están involucradas en el mecanismo de inhibición de los SGs durante la infección con RRV. Primero, las células MA104 se transfectaron con poli I:C [0.25 μ g] durante 1 hora, para formar los SGs. Posteriormente las células se lavaron y a las 2 h.p.t se infectaron durante 1 h con RRV (MOI=10). A las 4 h.p.i las células se fijaron y se trataron para ensayos de inmunofluorescencia. Se contaron 200 célula y se cuantificó que porcentaje de estas tenían SGs (SGs), que porcentaje estaban infectadas (RRV) y que porcentaje estaban infectadas y tenían SGs (RRV/SGs) antes y después del tratamiento con el poli I:C. En la figura 25 (poli I:C), tiñendo a la proteína TIA-1 (marcador de SGs), se determinó que el porcentaje de células que forman SGs en respuesta al poli I:C es del 32.5 %.

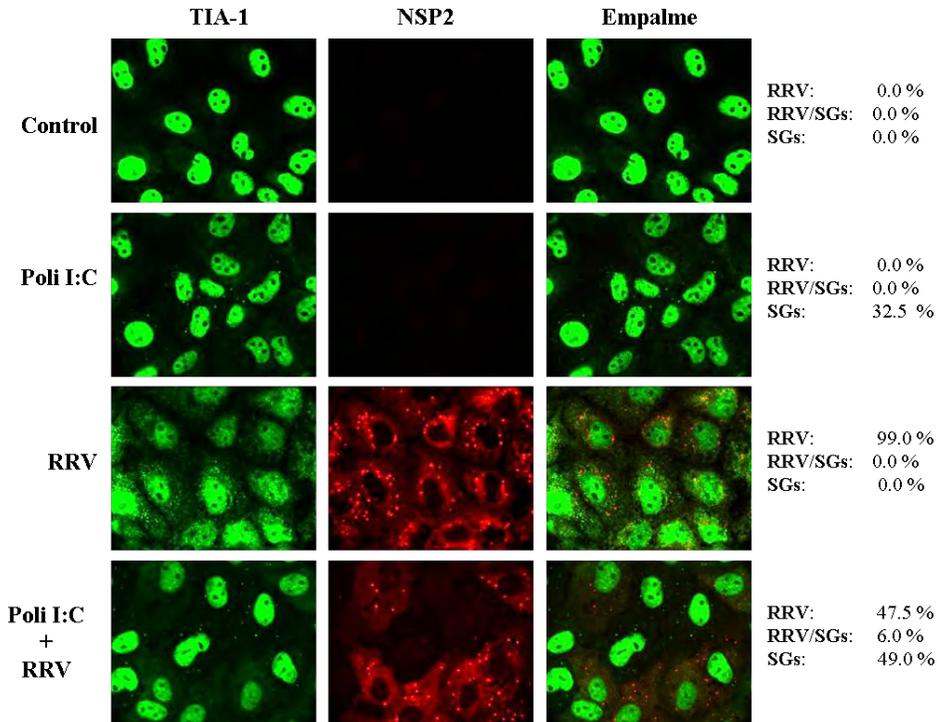


Fig. 25. Efecto del poli I:C durante la infección con RRV. Las células MA104 se transfectaron con 0.25 µg de poli I:C. A las 2 h.p.t se infectaron con RRV (MOI=10). Posteriormente, se fijaron a las 8 h.p.i. Contando un total de 200 células, se determinó cuantas células se infectaban en respuesta al poli I:C Verde: tinción anti-PABP. Rojo: tinción anti-NSP2 para células infectadas con RRV.

Por otro lado, observando a la proteína NSP2, se determinó que el porcentaje de células infectadas fue del 99 % (Fig. 25, RRV). Sin embargo, cuando las células son tratadas con el poli I:C antes de ser infectadas, observamos que el número de células infectadas disminuyó un 51.5 % (Fig. 25, Poli I:C + RRV). Este resultado podría deberse a la respuesta de IFN que genera el reconocimiento del RNAdc y que previene a las células de una infección viral [9]. Por tanto, dado este resultado, se nos hizo imposible poder determinar si el virus era capaz de deshacer los SGs formados previamente con poli I:C.

VIII. Discusión.

Cuando las células se exponen a diferentes condiciones de estrés son capaces de activar un mecanismo que consiste en reprogramar su maquinaria de traducción permitiendo la expresión selectiva de proteínas que les confieran la capacidad de adaptarse a las condiciones de cambio e incluso impedir un daño celular. Dicho mecanismo, consiste en dirigir los mRNAs que codifican para proteínas expresadas constitutivamente a unas estructuras citoplasmáticas denominadas gránulos de estrés (SGs del inglés Stress Granules)^[3,4]. Por otro lado, los virus como parásitos intracelulares, requieren de la maquinaria de la traducción de la célula para llevar a cabo la traducción de sus proteínas, esto permite que los mRNAs virales compitan con los mRNAs celulares por la maquinaria de traducción del hospedero, y para evitar esto, los virus han desarrollado una gran variedad de estrategias asegurando así la eficiente traducción de sus mRNAs mientras que simultáneamente inhiben la síntesis de proteínas de la célula hospedera^[6, 7, 9, 25]. Tal es el caso de rotavirus, que durante su infección, a pesar de que se fosforila el factor eIF2 α y se inhibe la síntesis de proteínas celulares no se observa formación de SGs^[28]. En este trabajo, mostramos que cuando las células infectadas con rotavirus son expuestas a un segundo estrés con Ars, estas son capaces de formar SGs solo a las primeras de la infección (aproximadamente 1-2 h.p.i), mientras que en horas posteriores se inhibe la capacidad de la formación de estas estructuras. Cuando las células son infectadas con el virus inactivado y expuestas a un segundo estrés, éstas si son capaces de formar SGs. Estos resultados, nos permiten sugerir que el mecanismo por el cual se lleva a cabo la inhibición de la formación de SGs durante la infección, este relacionado con los mecanismos de síntesis de proteínas o replicación del mRNA viral.

Por otro lado, es importante recordar que la composición de SGs es muy compleja y muy variable. Hasta ahora se han identificado diferentes proteínas involucradas en el mecanismo de formación de los SGs (Tabla 1) ^[3]. Sin embargo, hasta ahora no se sabe como es que dicho mecanismo ocurre. El estudiar la distribución de las proteínas que componen a los SGs durante la infección con rotavirus, nos podría dar una idea sobre cómo es que ocurre su inhibición. En el presente trabajo, mostramos que las proteínas eIF3b, caprina, y RI no sufren cambios en su distribución durante la infección con RRV. Interesantemente, se observó que la proteína G3BP, conforme transcurre la infección, forma unos agregados citoplásmicos muy similares a los SGs formados en respuesta a Ars y que incluso estos agregados, a tiempos tardíos de la infección se encuentran distribuidos alrededor de los viroplasmos. Es importante mencionar, que se ha descrito que la proteína G3BP tiene múltiples funciones, entre las cuales se encuentra la participación en la señalización de Ras, replicación, traducción, ciclo celular, entre otras ^[3, 13, 15]. Resultados recientes muestran que la proteína G3BP, es muy importante para la formación de SGs y es considerada como una proteína iniciadora del ensamblaje de los de estas estructuras ^[3, 39]. Además, se ha demostrado que en células donde se sobre expresa la proteína G3BP se forman SGs, mientras que en células en donde esta proteína está silenciada, aún en presencia de estrés con Ars, no hay formación de SGs ^[3, 39]. El hecho de que la proteína G3BP sea tan importante para la formación de los SGs y que durante la infección con RRV se agregue en estructuras parecidas a los SGs, nos permiten sugerir que sea a partir de la agregación citoplásmica de esta proteína por la cual los SGs no se forman durante la infección. Consideremos, que la proteína G3BP no es la única proteína que lleva a cabo el inicio del ensamblaje de los SGs, también se encuentra la proteína TIA-1, que al igual que G3BP, se ha descrito que la sobre expresión de esta proteína promueve la formación de SGs,

mientras que su silenciamiento inhibe que estas estructuras se formen [3, 5, 10, 18]. También, se ha descrito que en células que son expuestas a un estrés con Ars, la proteína TIA-1, se transloca del núcleo al citoplasma para distribuirse a los SGs [4, 5]. Montero et al. 2008, mostraron que durante la infección con RRV la proteína TIA-1 se transloca del núcleo al citoplasma, indicándonos que existe una respuesta de la célula a la infección, tal y como ocurre con el estrés provocado con Ars. Sin embargo, durante la infección esta proteína no se distribuye hacia los SGs. Este resultado, nos permite sugerir que la proteína TIA-1 posiblemente también esté involucrada en el mecanismo de inhibición de la formación de SGs durante la infección con RRV, y que posiblemente tanto esta proteína como la proteína G3BP tengan un papel importante en el ciclo replicativo de RRV. Es importante tener presente, que para entender el mecanismo por el cual se lleva a cabo la inhibición de la formación de SGs durante la infección, es importante considerar el cambio de distribución que sufren las proteínas que son consideradas importantes para llevar a cabo la formación de SGs, ya que se ha demostrado, que varios virus que también inhiben la formación de SGs durante su proceso de infección, lo hacen a través de modificar estas dos proteínas (TIA-1 y G3BP), tal es el caso de los virus de West-Nile y Poliovirus, respectivamente (apartado 1.4) [11, 21, 39]. Por otro lado, nos llama la atención que de las proteínas que analizamos en este trabajo, la proteína G3BP sea la única que se agregue durante la infección con RRV, y no caprina-1, la cual recientemente se ha demostrado que se une a la proteína G3BP, y que es a través de esta interacción por la cual la proteína caprina-1 se distribuye a los SGs en condiciones de estrés [34]. El hecho de que la proteína caprina-1, y las demás proteínas analizadas en este trabajo, no se agreguen junto con la proteína G3BP durante la infección con RRV, y el hecho de que los agregados de G3BP no se disuelven con cicloheximida, tal como ocurre con los SGs

formados con Ars, nos permitió sugerir que quizás estos agregados no son los típicos SGs descritos hasta ahora con Ars y que posiblemente pudieran ser otro tipo de estructuras citoplásmicas que se forman en la célula en respuesta a la infección con RRV. En base a esto, sería interesante estudiar la función de los agregados de G3BP y las proteínas que los forman durante la infección con RRV y determinar la importancia de estas estructuras en el ciclo replicativo del virus.

Hasta ahora no se había caracterizado la formación de SGs por efecto del RNAdc. En este trabajo, se mostró que los SGs formados en respuesta a este tipo de estrés, se mantienen por largos periodos de tiempo, y que esto correlaciona con datos obtenidos en el laboratorio, en donde se mostró que el efecto del RNAdc promueve la fosforilación del factor eIF2 α y la inhibición de síntesis de proteínas por periodos largos de tiempo ^[28]. Estos resultados, nos permiten sugerir que el estrés provocado por el RNAdc difiere de otros tipos de estrés, como el estrés de Ars o de tapsigargina, en donde tanto la fosforilación del factor eIF2 α , como la inhibición de síntesis de proteína y la formación de SGs duran aproximadamente 1 hora y posteriormente, se observa un período de recuperación en la célula, en donde se desfosforila el factor eIF2 α , se desensamblan los SGs y se recupera la síntesis de proteínas celulares. De esta manera, pareciera que en el estrés provocado por efecto del RNAdc no hubiera este período de recuperación, al menos en las condiciones marcadas en este trabajo.

También se mostró que a diferencia del estrés provocado con Ars, el estrés generado por el RNAdc (ya sea viral o sintético; poli I:C), promueve una inhibición en la formación de PBs, que son las estructuras donde se lleva a cabo la formación de los mRNAs. De igual manera, se mostró que en la formación de SGs por efecto de RNAdc, la proteína eIF3b solo se encuentra

distribuida estas estructuras durante la primera hora de tratamiento. Este último resultado, nos permite sugerir, que la proteína eIF3b, una de las proteínas que se ha descrito es importante para la formación de SGs ^[28], solo sea necesaria para llevar a cabo el inicio de ensamblaje de los SGs durante el estrés de RNAdc, y una vez llevado esto a cabo, esta proteína se excluya de los SGs para desempeñar otras funciones que le permitan a la célula sobrellevar este estrés. Además, se mostró que los SGs de RNAdc, no se disuelven por completo después del tratamiento con cicloheximida, tal y como ocurre con los SGs de Ars. Este resultado nos indica, que a diferencia de los SGs generados por Ars, estos SGs son más estables y más resistentes al efecto de la cicloheximida. En conjunto, estos resultados nos permiten sugerir que los SGs formados por RNAdc no sean los típicos SGs descritos con Ars, y que posiblemente existan otros tipos de gránulos de estrés cuya composición, estructura y estabilidad dependerá del tipo de estrés que la célula reciba.

La caracterización de los SGs formados por estrés de RNAdc, nos permitió observar que la infección con RRV y el RNAdc (viral o poli I:C), posiblemente desencadenan las mismas respuestas en la célula. Como se mencionó anteriormente, en ambos casos se promueve la fosforilación del factor eIF2 α y la inhibición de la síntesis de proteínas, sólo difieren que con el RNAdc si se forman SGs y durante la infección con RRV no. Sin embargo, la proteína PABP, que es un componente de los SGs, sufre el mismo cambio de distribución en ambos casos. Se ha sugerido, que durante la infección con RRV, la responsable del cambio de distribución de la proteína PABP es la proteína viral NSP3, la cual se ha visto que tiene un dominio de unión al poli A de los mRNAs y se cree que a través de este dominio la proteína NSP3 desplaza a PABP, y por consiguiente esta proteína se distribuye hacia el núcleo. Esta observación, también se apoya en el hecho de que en ausencia de la proteína viral NSP3, no se

observa una distribución nuclear de la proteína PABP durante la infección [28, 9]. Con el RNAdc, se observa este mismo cambio de distribución de la proteína PABP, solo que en este caso, no está la proteína viral NSP3. Este resultado, nos permite sugerir que posiblemente exista otro mecanismo por el cual la proteína PABP se este distribuyendo en el núcleo, ya sea por translocación de esta proteína de citoplasma a núcleo o por acumulación de esta proteína en el núcleo, debida quizá a un impedimento en el proceso de exportación de dicha proteína. Parece interesante estudiar a detalle este mecanismo de distribución de la proteína PABP, tanto para determinar como es que participa esta proteína en ciclo replicativo del virus, como para determinar su papel en proceso de formación de los SGs por el RNAdc y en el proceso de inhibición de los SGs durante la infección con RRV.

Por otro lado, el efecto que tiene el RNAdc durante la infección es muy claro. De manera general, se ha descrito que una célula genera una respuesta, principalmente de INF, debida al reconocimiento de RNAdc, y es esta respuesta junto con la expresión de otras citocinas involucradas en el sistema inmune, la que despierta un mecanismo de prevención en las demás células para impedir una posible infección viral [9, 32]. Cuando las células son transfectadas con RNAdc y posteriormente infectadas con RRV, se observó que las células que estaban transfectadas no pueden ser infectadas con RRV. Este resultado nos permitió sugerir que la respuesta a INF generada por las células transfectadas con RNAdc, impide que estas sean posteriormente, susceptibles a la infección, y por lo tanto observamos una disminución de células infectadas del 51.5 %. Dado el efecto que este tipo de estrés genera en la célula, nos impide utilizarlo como herramienta para estudiar el mecanismo de inhibición de la formación de SGs durante la infección con RRV. Encontrar un tipo de estrés, que nos permita llevar a cabo la formación previa de los SGs, para posteriormente infectar a las

células con RRV y ver si el virus es capaz de inhibir la formación de estos, parece ser una herramienta muy útil. Existen otras formas de llevar a cabo la formación previa de SGs, por ejemplo la sobreexpresión a través de plásmidos de las proteínas iniciadoras del ensamblaje de los SGs, como las proteínas G3BP y TIA-1, o incluso la utilización de drogas que forman SGs independientemente de la fosforilación de eIF2 α , como pateamina A, que nos podrían ayudar a determinar que proteínas del virus están involucradas en la inhibición de la formación de SGs durante la infección.

Finalmente, en la figura 26, se muestra un esquema en donde se resume de manera general los resultados obtenidos en este trabajo. En este esquema, se muestran las diferentes señales que recibe una célula para llevar a cabo la formación de SGs, basándose principalmente en el hecho de que diferentes tipos de estrés son capaces de formar diferentes tipos de gránulos de estrés, y que estos, pueden variar tanto en tamaño, forma, composición, estabilidad y duración. También, se muestran las similitudes que existen entre el estrés generado por efecto del RNAdc y estrés generado por efecto de la infección RRV, y se indican algunos puntos clave en donde posiblemente sea regulado el proceso de inhibición de la formación de SGs durante la infección con RRV.

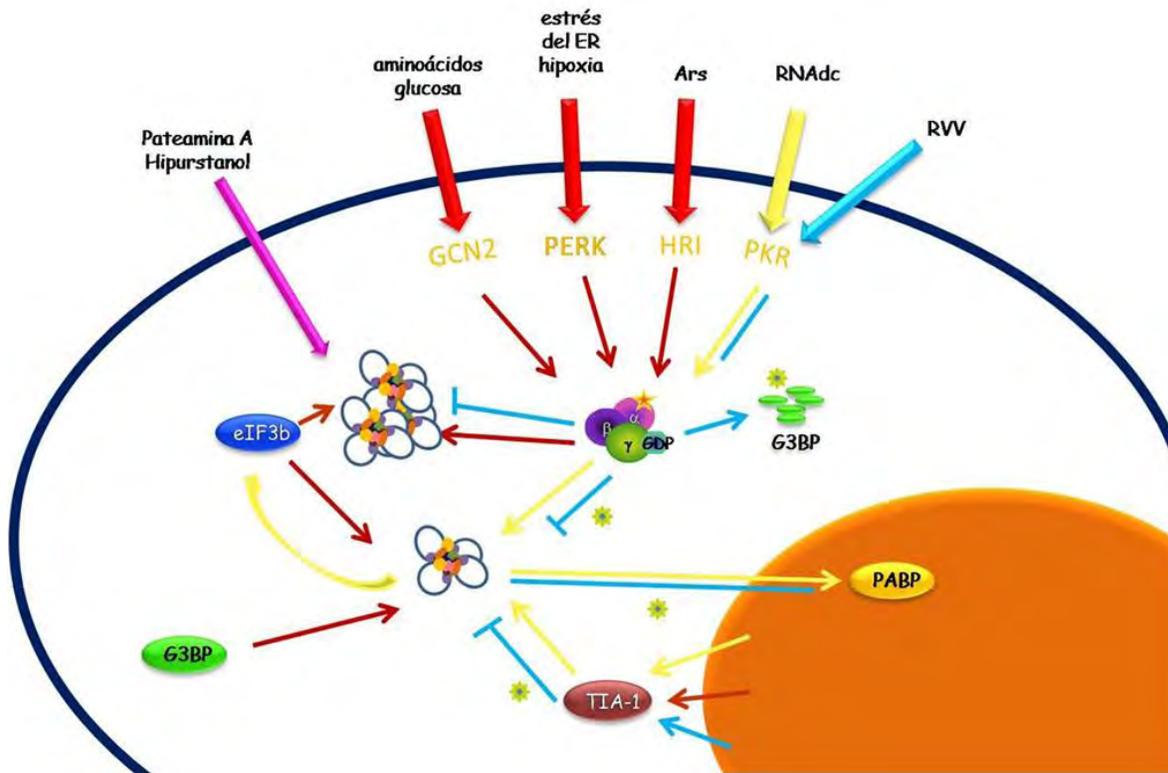


Fig. 26. Integración de las señales de estrés que llevan a cabo la formación de SGs y las señales generadas con RRV. Existen dos vías por las cuales se puede llevar a cabo la formación de los SGs. La vía dependiente de la fosforilación de eIF2 α , la cual se lleva a cabo a través de la activación de 4 cinasas: GCN2, PERK, HRI y PKR. Y la vía independiente de la fosforilación de este factor (flecha color morado) que involucra cualquier bloqueo en la etapa de inicio de la traducción, por ejemplo el corte proteolítico de la proteína eIF4A por la droga pateamina A. Los SGs descritos a detalle hasta ahora en la literatura, involucran la vía dependiente de la fosforilación de eIF2 α (flechas color rojo). La activación de las cinasas GCN2, PERK y HRI, fosforilan al factor eIF2 α y como consecuencia, se forman los SGs y se inhibe la síntesis de proteínas. El estrés de RNAdc (flechas color amarillo), por su parte, involucra también esta vía a través de la activación de la cinasa PKR, pero a diferencia del estrés con Ars, este estrés forma un tipo diferente de SG, que dura largo tiempo y varía en composición y estabilidad. Por lo que se caracterizó en este trabajo, los SGs de RNAdc, son pequeños, la proteína eIF3b solo participa en su ensamble y la proteína PABP se distribuye en el núcleo. Por último, el estrés de RRV (flechas color azul) es muy similar al estrés de RNAdc, solo que a diferencia de este, no forma ninguno de los dos tipos de SGs, si no que forma unos agregados citoplásmicos de la proteína G3BP. Sin embargo, también distribuye a la proteína PABP al núcleo y en comparación a las tres vías (flechas color rojo, amarillo y azul), también transloca de núcleo a citoplasma a la proteína TIA-1. En la figura, se indican con asteriscos los posibles puntos de regulación que posiblemente estén involucrados en el mecanismo de inhibición de la formación de SGs durante la infección.

IX. Conclusiones

1) A tiempos tempranos de la infección con RRV, las células MA104 son capaces de responder a un segundo estrés con As, llevando a cabo la formación de SGs. De igual manera, células MA104 infectadas con virus RRV inactivado son capaces de formar SGs en presencia de un segundo estrés con As hasta las 6 h.p.i. Estos dos resultados, sugieren que es la acumulación de proteína o mRNA viral lo que inhibe la formación de SGs durante la infección.

2) Las proteínas eIF3b, caprina y RI, no sufren ningún cambio de distribución durante la infección con RRV y mantienen su distribución citoplásmicos.

3) La proteína G3BP, considerada como marcador de los SGs, se agrega durante la infección con RRV en agregados citoplasmáticos muy similares a los SGs formados en respuesta a As, sin embargo, estos no se desagregan en presencia de cicloheximida. Además, estos agregados de G3BP, se distribuyen alrededor de los viroplasmas y esto podría indicar que posiblemente sean importantes para la replicación del virus.

4) El RNAdc (viral o sintético [poli I:C]) promueve la formación de SGs por largos periodos de tiempo y además inhibe la formación de PBs. Por otra parte, los SGs formados por RNAdc, parecieran no disolverse en presencia de cicloheximida. Estas tres características los hacen diferentes a los SGs generados en respuesta a As, por lo que estos SGs podrían formar parte de otro tipo de gránulos de estrés.

5) La proteína eIF3b forma parte de los SGs formados en respuesta al RNAdc, sólo la primera hora de tratamiento, lo que permite sugerir que esta proteína se requiera para que se lleve a cabo el ensamblaje de los SGs, y que posteriormente se excluya de estas estructuras para permitir a la célula sobrellevar el estrés.

6) La distribución nuclear de la proteína PABP por efecto del RNAdc, nos permite sugerir que posiblemente exista otro mecanismo por el cual PABP se distribuya hacia núcleo, y que no solo sea la proteína viral NSP3 la que esté involucrada en dicho mecanismo.

7) Nosotros sugerimos que la respuesta de IFN- γ que genera el efecto de RNAdc impide que las células se vuelvan susceptibles a la infección con RRV.

X. Perspectivas

- 1) Estudiar la distribución de otras proteínas marcadoras de SGs durante la infección con RRV, posiblemente nos ayudaría a encontrar el mecanismo de inhibición de la formación de SGs durante la infección.

- 2) Estudiar el papel de los agregados de G3BP, así como la composición de los mismos, proteína, mRNA viral o celular, RNAdc, etc. Para determinar si son importantes para el ciclo replicativo de RRV.

- 3) Encontrar otro mecanismo para llevar a cabo la preformación de los SGs, y posteriormente infectar a las células con RRV, podría ayudar a identificar que proteínas virales están involucradas en el mecanismo de inhibición de la formación de SGs durante la infección.

- 4) Estudiar las similitudes que generan el estrés generado con el RNAdc (viral o sintético; poli I:C) y la infección con RRV.

XI. Referencias

1. Afonina, E., Stauber, R. & Pavlakis, G.N. The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 273, 13015-21(1998).
2. Anderson, P. & Kedersha, N. RNA granules. *J. Cell Biol.* 172, 803-8(2006).
3. Anderson, P. & Kedersha, N. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem. Sci.* 33, 141-50(2008).
4. Anderson, P. & Kedersha, N. Stressful initiations. *J. Cell. Sci.* 115, 3227-34(2002).
5. Anderson, P. & Kedersha, N. Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones* 7, 213-21(2002).
6. Beckham, C.J. & Parker, R. P bodies, stress granules, and viral life cycles. *Cell Host Microbe* 3, 206-12(2008).
7. Bushell, M. & Sarnow, P. Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. *J. Cell Biol.* 158, 395-9(2002).
8. Candé, C., Vahsen, N., Métivier, D., Tourrière, H., Chebli, K., Garrido, C. et al. Regulation of cytoplasmic stress granules by apoptosis-inducing factor. *J. Cell. Sci.* 117, 4461-8(2004).
9. Clemens, M.J. Translational control in virus-infected cells: models for cellular stress responses. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 13-20(2005).
10. Dang, Y., Kedersha, N., Low, W., Romo, D., Gorospe, M., Kaufman, R. et al. Eukaryotic initiation factor 2alpha-independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A. *J. Biol. Chem.* 281, 32870-8(2006).
11. Emara, M.M. & Brinton, M.A. Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 9041-6(2007).
12. Esclatine, A., Taddeo, B. & Roizman, B. Herpes simplex virus 1 induces cytoplasmic accumulation of TIA-1/TIAR and both synthesis and cytoplasmic accumulation of tristetraprolin, two cellular proteins that bind and destabilize AU-rich RNAs. *J. Virol.* 78, 8582-92(2004).
13. Gallouzi, I.E., Parker, F., Chebli, K., Maurier, F., Labourier, E., Barlat, I. et al. A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3956-65(1998).
14. Holcik, M. & Sonenberg, N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 318-27(2005).
15. Irvine, K., Stirling, R., Hume, D. & Kennedy, D. Rasputin, more promiscuous than ever: a review of G3BP. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 1065-77(2004).

16. Kapp, L.D. & Lorsch, J.R. The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 657-704(2004).
17. Kawai, T., Lal, A., Yang, X., Galban, S., Mazan-Mamczarz, K. & Gorospe, M. Translational control of cytochrome c by RNA-binding proteins TIA-1 and HuR. *Mol. Cell Biol.* 26, 3295-307(2006).
18. Kedersha, N., Cho, M.R., Li, W., Yacono, P.W., Chen, S., Gilks, N. et al. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 151, 1257-68(2000).
19. Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M.J. et al. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* 169, 871-84(2005).
20. Kedersha, N., Tisdale, S., Hickman, T. & Anderson, P. Real-time and quantitative imaging of mammalian stress granules and processing bodies. *Meth. Enzymol.* 448, 521-52(2008).
21. Li, W., Li, Y., Kedersha, N., Anderson, P., Emará, M., Swiderek, K.M. et al. Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-loop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication. *J. Virol.* 76, 11989-2000(2002).
22. Mazroui, R., Di Marco, S., Kaufman, R.J. & Gallouzi, I. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system induces stress granule formation. *Mol. Biol. Cell* 18, 2603-18(2007).
23. Mazroui, R., Sukarieh, R., Bordeleau, M., Kaufman, R.J., Northcote, P., Tanaka, J. et al. Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 17, 4212-9(2006).
24. McInerney, G.M., Kedersha, N.L., Kaufman, R.J., Anderson, P. & Liljeström, P. Importance of eIF2alpha phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation. *Mol. Biol. Cell* 16, 3753-63(2005).
25. Mohr, I. Phosphorylation and dephosphorylation events that regulate viral mRNA translation. *Virus Res.* 119, 89-99(2006).
26. Mollet, S., Cougot, N., Wilczynska, A., Dautry, F., Kress, M., Bertrand, E. et al. Translationally repressed mRNA transiently cycles through stress granules during stress. *Mol. Biol. Cell* 19, 4469-79(2008).
27. Montero, H., Arias, C.F. & Lopez, S. Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J. Virol.* 80, 9031-8(2006).
28. Montero, H., Rojas, M., Arias, C.F. & López, S. Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *J. Virol.* 82, 1496-504(2008).
29. Parker, R. & Sheth, U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol. Cell* 25, 635-46(2007).

30. Patton, J.T. Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 11), 2633-44(1995).
31. Preiss, T. & Hentze, M. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays* 25, 1201-11(2003).
32. Raven, J.F. & Koromilas, A.E. PERK and PKR: old kinases learn new tricks. *Cell Cycle* 7, 1146-50(2008).
33. Sachs, A.B., Sarnow, P. & Hentze, M.W. Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell* 89, 831-8(1997).
34. Schneider, R.J. & Mohr, I. Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem. Sci.* 28, 130-6(2003).
35. Sivan, G., Kedersha, N. & Elroy-Stein, O. Ribosomal slowdown mediates translational arrest during cellular division. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6639-46(2007).
36. Smith, J.A., Schmechel, S.C., Raghavan, A., Abelson, M., Reilly, C., Katze, M.G. et al. Reovirus induces and benefits from an integrated cellular stress response. *J. Virol.* 80, 2019-33(2006).
37. Solomon, S., Xu, Y., Wang, B., David, M.D., Schubert, P., Kennedy, D. et al. Distinct structural features of caprin-1 mediate its interaction with G3BP-1 and its induction of phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2alpha, entry to cytoplasmic stress granules, and selective interaction with a subset of mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 27, 2324-42(2007).
38. Sonenberg, N. & Dever, T.E. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 56-63(2003).
39. White, J.P., Cardenas, A.M., Marissen, W.E. & Lloyd, R.E. Inhibition of cytoplasmic mRNA stress granule formation by a viral proteinase. *Cell Host Microbe* 2, 295-305(2007).
40. Yamasaki, S. & Anderson, P. Reprogramming mRNA translation during stress. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 222-6(2008).

Abreviaturas

AC. Agregados citoplásmicos de G3BP.

Ars. Arsenito

Ch. Cicloheximida

eIFs. Factores de inicio de la traducción (del inglés ekaryote Initiation Factor)

GFP. Proteína verde fluorescente.

h.p.i. Horas post-infección.

h.p.t. Horas post transfección.

MOI. Multiplicidad de infección.

mRNA. RNA mensajero.

mRNPs. Ribonucleoproteínas de unión a mRNA.

PABP. Proteína de unión a poli A.

PBs. Cuerpos P; estructuras citoplásmicas donde se lleva a cabo la degradación del mRNA.

Poli I:C. RNAdc sintético.

RFP. Proteína rojo fluorescente.

RI. Proteína ribosomal S10 que forma parte de la subunidad pequeña del ribosoma.

RNAdc. RNA de doble cadena

RNAdc-V. RNA de doble cadena viral.

RRV. Cepa de rotavirus RRV

S6. Proteína ribosomal componente de la subunidad pequeña del ribosoma

SFV. Semliki Forest Virus

SGs. Gránulos de estrés; del inglés Stress Granules.

YFP. Proteína amarillo fluorescente.