



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE TRADUCCIÓN
DURANTE LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS

Tesis

Que para optar por el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta

YERLI MARÍN TOVAR

Tutor Principal

Dra. Susana López

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular

....."kukwq"fg"Dkqgepqqi "c"

Miembros del Comité Tutoral

Dr. Ramón González

Rtqi tco c"fg'O cgut"fc
["F qevtcf q"gp"Elgpeku"
Dkqs wfp lecu

Dr. Takuya Nishigaki

Departamento de Genética del Desarrollo y
Fisiología Molecular
Instituto de Biotecnología

MÉXICO, D.F.

Mayo de 2015



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE TRADUCCIÓN
DURANTE LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS

Tesis

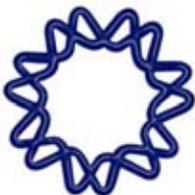
Que para optar al grado de
Maestro en Ciencias

Presenta

YERLI MARÍN TOVAR

Directora de Tesis

Dra. Susana López



MÉXICO, D.F.

Mayo de 2015

Este trabajo contó con el apoyo de la beca 512866/289069 otorgada por el CONACyT, y los donativos 153639 del CONACyT e IG200114 del PAPIIT-DGAPA, y se realizó bajo la dirección de la Dra. Susana López, en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dedico este trabajo a mi amada esposa Angie, a mis queridos padres Inés y Jaime, y a la gran Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Virología Molecular liderado por el Dr. Carlos Arias y la Dra. Susana López, a los investigadores, técnicos y todos sus integrantes en general por su calidad humana y por el exquisito conocimiento que me han legado.

A la QBP. Rafaela Espinosa por su valiosa instrucción en todas las técnicas relacionadas con el cultivo de células y manejo de virus.

A la Dra. Rosa Rubio por su estricta orientación en el fraccionamiento, manipulación y análisis de los complejos ribosomales.

Al Dr. Pedro Romero, un investigador de gran calidad humana que antes de fallecer me dejó las primeras bacterias transformadas para mis ensayos iniciales con proteínas recombinantes.

Al M.C. Alfonso Ocegüera por todo el conocimiento y experiencia compartida con el cultivo de bacterias transformadas y la purificación de proteínas recombinantes.

Al M.C. Marco Antonio Espinoza por su colaboración con la transformación de bacterias para obtener proteínas recombinantes y a la M.C. Cinthia Martínez por su ayuda para obtener GST.

A la Dra. Martha Pedraza que tuvo la amabilidad de brindarme valiosas sugerencias para lograr purificar y renaturalizar la proteína PP1 recombinante.

A la Dra. Daniela Silva por las TLPs purificadas y porque las ocasiones en las que trabajé con ella fueron experiencias agradables y enriquecedoras que me fomentaron confianza.

A la M.C. Liliana Sánchez, probablemente la persona más rigurosa del laboratorio, por sus oportunas sugerencias y su constante disposición para ayudarme a resolver mis dudas.

A mi estimado amigo, el Dr. Hugo Serrano, y a su esposa la Dra. Sara Centeno, por todo el apoyo que me han brindado y especialmente por su maravillosa amistad.

Al Dr. Ramón González y al Dr. Takuya Nishigaki, los miembros de mi Comité Tutorial, por sus críticas y sugerencias para orientar mi trabajo teórico y experimental.

Al Dr. Baltazar Becerril, Dr. José Luis Puente, Dra. Liliana Pardo, Dra. Martha Pedraza y Dra. Lorena Gutiérrez, los miembros de mi Comité Evaluador, por sus sugerencias, comentarios y las revisiones del contenido y forma de esta tesis.

Definitivamente, a la persona que me ha brindado la maravillosa oportunidad de trabajar en su grupo, una mujer de admirable liderazgo cuya gestión ha sido fundamental en la realización de este trabajo, a la Dra. Susana López.

Y finalmente, agradezco a las infinitas y extrañas casualidades de un universo en caos.

LISTA DE SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

Generales

4E-BP	eIF4E-binding protein Proteína de unión a eIF4E
ASFV	African swine fever virus Virus de la fiebre porcina africana
CAPS	<i>N</i> -cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid buffer Buffer de ácido <i>N</i> -ciclohexil-3-aminopropanosulfónico
CReP	Constitutive repressor of eIF2 α phosphorylation Represor constitutivo de la fosforilación de eIF2 α
DEPC	Diethylpyrocarbonate Dietilpirocarbonato
DLP	Double-layered particle Partícula de doble capa
DTT	Dithiothreitol Ditiotreitól
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid Ácido etilendiaminotetracético
eIF	Eukaryotic initiation factor Factor de iniciación eucariótico
ELM	Eukaryotic linear motif Motivo lineal eucariótico
GADD34	Growth arrest and DNA damage-inducible protein 34 Proteína de arresto del crecimiento e inducible por daño en DNA 34
GCN2	General control non-derepressible 2 Control general no desreprimible 2
GST	Glutathione S-transferase Glutación S-transferasa

HRI	Heme-regulated inhibitor Inhibidor hemo-regulado
HSV-1	Herpes simplex virus 1 Virus herpes simple tipo 1
ICP34.5	Infected Cell Protein 34.5 Proteína de célula infectada 34.5
IGR	Intergenic region Región intergénica
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IRES	Internal ribosome entry site Sitio interno de entrada al ribosoma
ITAF	IRES <i>trans</i> -acting factor Factor IRES que actúa en <i>trans</i>
MDA5	Melanoma differentiation-associated protein 5 Proteína asociada a la diferenciación de melanoma 5
MOI	Multiplicity of infection Multiplicidad de infección
mTOR	Mammalian target of rapamycin kinase Cinasa mamífera objetivo de rapamicina
MV	Measles virus Virus del sarampión
MV-V	Measles virus V protein Proteína V del virus del sarampión
NSP	Non-structural protein Proteína no estructural
ORF	Open reading frame Marco abierto de lectura

PABP	PolyA-binding protein Proteína de unión a poliA
PBS	Phosphate buffered saline Buffer fosfato salino
PBS-T	Phosphate buffered saline with Tween 20 Buffer fosfato salino con Tween 20
PERK	PKR-like endoplasmic reticulum kinase Cinasa de retículo endoplásmico tipo PKR
PKR	Protein kinase dsRNA-activated Proteína cinasa activada por dsRNA
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PP1	Protein phosphatase 1 Proteína fosfatasa 1
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene I protein Proteína del gen inducible por ácido retinoico I
RLR	RIG-I-like receptor Receptor tipo RIG-I
rpL	Ribosomal protein large subunit Proteína ribosomal de la subunidad grande
rpS	Ribosomal protein small subunit Proteína ribosomal de la subunidad pequeña
RRV	Rhesus rotavirus Rotavirus de mono Rhesus
SDS	Sodium dodecylsulfate Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

SLP	Single-layered particle Partícula de simple capa
TAE	Tris-acetate-EDTA buffer Buffer de tris-acetato-EDTA
TLP	Triple-layered particle Partícula de triple capa
UTR	Untranslated region Región no traducida
VP	Viral protein Proteína viral

Ácidos Nucleicos

DNA	Deoxyribonucleic acid Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	Double-stranded DNA DNA doble cadena (DNA bicatenario)
dsRNA	Double-stranded RNA RNA doble cadena (RNA bicatenario)
mRNA	Messenger RNA RNA mensajero
RNA	Ribonucleic acid Ácido ribonucleico
rRNA	Ribosomal RNA RNA ribosomal
siRNA	Small interfering RNA RNA interferente pequeño
ssDNA	Single-stranded DNA DNA simple cadena (DNA monocatenario)
ssRNA	Single-stranded RNA RNA simple cadena (RNA monocatenario)

tRNA	Transfer RNA RNA de transferencia
tRNA _i ^{Met}	Initiator methionyl-tRNA Metionil-tRNA iniciador

Ribonucleótidos

ATP	Adenosine 5'-triphosphate Adenosina 5'-trifosfato
ADP	Adenosine 5'-diphosphate Adenosina 5'-difosfato
AMP	Adenosine 5'-monophosphate (adenylate) Adenosina 5'-monofosfato (adenilato)
CTP	Cytidine 5'-triphosphate Citidina 5'-trifosfato
CDP	Cytidine 5'-diphosphate Citidina 5'-difosfato
CMP	Cytidine 5'-monophosphate (cytidylate) Citidina 5'-monofosfato (citidilato)
GTP	Guanosine 5'-triphosphate Guanosina 5'-trifosfato
GDP	Guanosine 5'-diphosphate Guanosina 5'-difosfato
GMP	Guanosine 5'-monophosphate (guanylate) Guanosina monofosfato (guanilato)
UTP	Uridine 5'-triphosphate Uridina 5'-trifosfato
UDP	Uridine 5'-diphosphate Uridina 5'-difosfato

UMP Uridine 5'-monophosphate (uridylate)
 Uridina 5'-monofosfato (uridilato)

Desoxirribonucleótidos

dATP Deoxyadenosine 5'-triphosphate
 Desoxiadenosina 5'-trifosfato

dADP Deoxyadenosine -diphosphate
 Desoxiadenosina 5'-difosfato

dAMP Deoxyadenosine 5'-monophosphate (deoxyadenylate)
 Desoxiadenosina 5'-monofosfato (desoxiadenilato)

dCTP Deoxycytidine 5'-triphosphate
 Desoxicitidina 5'-trifosfato

dCDP Deoxycytidine 5'-diphosphate
 Desoxicitidina 5'-difosfato

dCMP Deoxycytidine 5'-monophosphate (deoxycytidylate)
 Desoxicitidina 5'-monofosfato (desoxicitidilato)

dGTP Deoxyguanosine 5'-triphosphate
 Desoxiguanosina 5'-trifosfato

dGDP Deoxyguanosine 5'-diphosphate
 Desoxiguanosina 5'-difosfato

dGMP Deoxyguanosine 5'-monophosphate (deoxyguanylate)
 Desoxiguanosina monofosfato (desoxiguanilato)

dTTP Deoxythymidine 5'-triphosphate
 Desoxitimidina 5'-trifosfato

dTDP Deoxythymidine 5'-diphosphate
 Desoxitimidina 5'-difosfato

dTMP Deoxythymidine 5'-monophosphate (deoxythymidylate)
 Desoxitimidina 5'-monofosfato (desoxitimidilato)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura de rotavirus	3
Figura 2.	Diagrama esquemático de un ribosoma eucariota	5
Figura 3.	Mecanismo canónico de traducción	6
Figura 4.	Las proteínas 4E-BPs arrestan la traducción cap-dependiente	8
Figura 5.	El complejo ternario es un punto clave en la regulación traduccional	9
Figura 6.	Defosforilación del factor eIF2 α	11
Figura 7.	Defosforilación de eIF2 α por ICP34.5	13
Figura 8.	Aislamiento de los complejos de inicio 48S	27
Figura 9.	Perfiles ribosomales de lisados celulares mock e infectados	28
Figura 10.	Perfiles ribosomales y de RNA de fracciones mock e infectadas	29
Figura 11.	Perfiles de proteína en los complejos ribosomales mock e infectados	30
Figura 12.	Western blot contra proteínas estructurales de rotavirus en las fracciones de los complejos ribosomales	31
Figura 13.	Western blot contra proteínas estructurales de rotavirus en las fracciones de los complejos ribosomales	32
Figura 14.	Perfiles ribosomales y de RNA de fracciones mock e infectadas	33
Figura 15.	Western blot contra proteínas estructurales de rotavirus en las fracciones de los complejos ribosomales	34
Figura 16.	Western blot contra la proteína no estructural NSP2	34
Figura 17.	Perfiles ribosomales y de RNA de fracciones mock+TLPs e infectadas	36
Figura 18.	Western blot contra las proteínas no estructurales NSP2 y NSP3	37

Figura 19.	Western blot contra las proteínas virales NSP5 y VP2, y la fosfatasa celular PP1	38
Figura 20.	Western blot contra la fosfatasa celular PP1	40
Figura 21.	Western blot contra la subunidad regulatoria GADD34	40
Figura 22.	Motivos de interacción con PP1 en la proteína viral NSP2	42
Figura 23.	Estructura molecular de la proteína viral NSP2 (PDB 1L9V)	43
Figura 24.	Análisis de probables interacciones entre NSP2 y PP1	43
Figura 25.	Perfil de purificación de GST-PP1	44
Figura 26.	La proteína purificada es GST-PP1	45
Figura 27.	Perfil de probables interacciones entre proteínas virales y GST-PP1	46
Figura 28.	Western blot contra la subunidad regulatoria GADD34	46
Figura 29.	Western blot contra la proteína no estructural NSP2	47
Figura 30.	Perfil de purificación de GST y GST-PP1	48
Figura 31.	La proteína purificada es PP1-H ₆	49
Figura 32.	Perfil de purificación de PP1-H ₆ en condiciones desnaturalizantes	50
Figura 33.	Perfil de purificación y renaturalización parcial de PP1-H ₆	51
Figura 34.	Perfil de purificación y renaturalización completa de PP1-H ₆	51
Figura 35.	Perfil de probables interacciones entre proteínas virales y PP1-H ₆	52
Figura 36.	Western blot contra la proteína no estructural NSP2	53
Figura 37.	Western blot contra la subunidad regulatoria GADD34	53

Figura 38.	La proteína PP1-H ₆ no eluye en ausencia de urea	55
Figura 39.	La proteína PP1-H ₆ eluye escasamente en urea 1 M	55
Figura 40.	La proteína PP1-H ₆ se puede eluir en urea 6 M para proceder a su diálisis	56
Figura 41.	La proteína PP1-H ₆ se mantiene soluble poco tiempo	57
Figura 42.	Perfil de probables interacciones entre proteínas virales y PP1-H ₆	58
Figura 43.	Western blot contra la proteína no estructural NSP2	60
Figura 44.	Western blot contra la subunidad reguladora GADD34	60
Figura 45.	Perfil de purificación de NSP2-H ₆	61
Figura 46.	Perfil de probables interacciones entre NSP2-H ₆ y PP1	62
Figura 47.	Western blot contra la fosfatasa celular PP1	62
Figura 48.	Perfil de probables interacciones entre NSP2-H ₆ y PP1	64
Figura 49.	Western blot contra la fosfatasa celular PP1	64
Figura 50.	Activación de los sensores de RNA viral RIG-I y MDA5	70

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Principales características del ribosoma eucariota	6
Tabla 2.	Anticuerpos primarios utilizados en las pruebas de Western blot	18
Tabla 3	Plásmidos usados en la transformación de bacterias <i>E. coli</i> BL21(DE3)	20
Tabla 4.	Propiedades fundamentales de las proteínas de rotavirus RRV	21
Tabla 5.	Clasificación general, códigos y probabilidad de los aminoácidos	22
Tabla 6.	Probabilidad de los dos tipos de motivo relacionados con el proceso de traducción	23
Tabla 7.	Proteínas virales que presentan motivo de unión a eIF4E	24
Tabla 8.	Proteínas virales que presentan motivo de interacción con PP1	24
Tabla 9.	Proteínas celulares que presentan motivo de unión a eIF4E	25
Tabla 10.	Proteínas analizadas que presentan motivo de interacción con PP1	26
Tabla 11.	Presencia de partículas infecciosas en las fracciones de los complejos ribosomales	32
Tabla 12.	Presencia de partículas infecciosas en las fracciones de los complejos ribosomales	35
Tabla 13.	Presencia de partículas infecciosas en las fracciones de los complejos ribosomales	36
Tabla 14	Estrategias de purificación y renaturalización de la proteína recombinante PP1-H ₆	57
Tabla 15.	Resultados de los ensayos de pull-down con proteínas recombinantes	65

CONTENIDO

	ABSTRACT	1
	RESUMEN	2
1.	INTRODUCCIÓN	3
1.1.	Rotavirus	3
1.2.	Traducción	4
1.3.	Ribosomas	5
1.4.	Mecanismo Canónico de Traducción	6
1.5.	Complejo eIF4F	7
1.6.	Proteínas 4E-BPs	8
1.7.	Complejo Ternario	9
1.8.	Fosfatasa Celular PP1	10
1.9.	Mecanismo de Inicio de la Traducción	11
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
3.	HIPÓTESIS	15
4.	OBJETIVOS	15
4.1.	Objetivo General	15
4.2.	Objetivos Específicos	15
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1.	Células, Virus y Bacterias	16
5.2.	Determinación de Título Viral	16
5.3.	Aislamiento de Complejos Ribosomales	16
5.4.	Análisis de Complejos Ribosomales	17
5.5.	Electroforesis en Gel de Agarosa	17
5.6.	Electroforesis SDS-PAGE	18

5.7.	Pruebas de Western blot	19
5.8.	Lisados para Determinar Probables Interacciones con PP1 o NSP2	19
5.9.	Ensayos de Pull-Down con las Proteínas Recombinantes	19
6.	DATOS Y RESULTADOS	21
6.1.	Análisis Bioinformático	21
6.2.	Complejos Ribosomales	27
6.3.	Interacciones entre Proteínas Virales y la Fosfatasa Celular PP1	41
7.	DISCUSIÓN	66
8.	CONCLUSIÓN	73
9.	PERSPECTIVAS	74
10.	BIBLIOGRAFÍA	75
	ANEXOS	78
	Anexo 1. Secuencias de aminoácidos de las proteínas de la cepa RRV de rotavirus	78
	Anexo 2. Propiedades fundamentales de las proteínas de la cepa RRV de rotavirus	81
	Anexo 3. Clasificación general, códigos y probabilidad de los aminoácidos	82
	Anexo 4. Propiedades fundamentales de los factores de inicio de la traducción	83
	Anexo 5. Propiedades fundamentales de proteínas relacionadas con el proceso de traducción y de otras proteínas mencionadas en este trabajo	84
	Anexo 6. Alineamiento múltiple de secuencias de NSP2 de distintas cepas de rotavirus	85

ABSTRACT

Translation is a complex process whose continuous initiation cycle can be regulated depending on the state of phosphorylation of factor eIF2 α . Any of four cellular kinases (PKR, PERK, HRI, GCN2) can interrupt the cycle phosphorylating to eIF2 α , while phosphatase PP1 is recruited by one of two regulatory subunits (GADD34 or CReP) to dephosphorylate to eIF2 α and maintain active the initiation cycle. The catalytic subunit PP1 is the major phosphatase Ser/Thr of the eukaryotic cell, a protein that is involved in the regulation of several functions, but lacking intrinsic specificity, that is associated with over 200 regulatory subunits to form enzymatic complexes where the regulatory subunit can direct or prevent the dephosphorylation of certain substrates. It is known that even viral RNA sensors RIG-I and MDA5 are activated via dephosphorylation by PP1 triggering a series of events leading to the antiviral response.

To study the presumed ability of viral proteins to interact with cellular proteins involved in regulation of protein synthesis during the virus replication cycle, it was carried out the search of motifs related to the translation process by bioinformatic analysis, followed by isolation of ribosomal complexes by sucrose gradient and their corresponding analysis by Western blot tests. Bioinformatic analysis of the amino acid sequences of rotavirus RRV proteins using a probability cutoff of 0.001 yielded two types of motif related with the translation process: eIF4E-binding motif (probability 0.0002) and PP1-interaction motif (probability 0.0008). The eIF4E-binding motif is in four viral proteins: VP1, VP2, VP3 and NSP2; and the PP1-interaction motif is in seven viral proteins: VP1, VP3, VP6, VP7, NSP1, NSP2 and NSP5. Although Western blot tests allowed detect structural proteins in ribosomal fractions obtained by sucrose gradient, quantification of foci revealed the presence of infectious virus throughout the gradient, so that structural proteins detected can be attributed such particles.

The *in silico* analysis of the amino acid sequence of the protein NSP2 identified two highly conserved PP1-interaction motifs, which are located between residues 261-267 (DQRVIWQ) and 284-291 (ICKKLLFQ) of its C-terminal domain, highlighting the motif that lies between residues 261-267 because it is exposed in a β turn of its molecular structure. Western blot tests revealed the presence of NSP2 and PP1 in the fractions corresponding to the 48S and 80S ribosomal complexes of infected cells. Pull-down assays with His-tag recombinant proteins (PP1-H₆ and NSP2-H₆) allowed confirm that NSP2 and PP1 interacting *in vitro*, suggesting that it is very likely that can also interact *in vivo*, an interesting result because it leaves open the possibility that the viral protein NSP2 could be a regulatory subunit of cellular phosphatase PP1 with yet unknown function.

Keywords: translation, rotavirus RRV, bioinformatic analysis, eukaryotic motifs, ribosomal complexes, non-structural protein NSP2, cellular phosphatase PP1.

RESUMEN

La traducción es un proceso complejo cuyo ciclo continuo de inicio se puede regular dependiendo del estado de fosforilación del factor eIF2 α . Cualquiera de cuatro cinasas celulares (PKR, PERK, HRI, GCN2) puede interrumpir el ciclo fosforilando a eIF2 α , en tanto que la fosfatasa PP1 es reclutada por una de dos subunidades regulatorias (GADD34 o CReP) para defosforilar a eIF2 α y mantener activo el ciclo de inicio. La subunidad catalítica PP1 es la principal fosfatasa Ser/Thr de la célula eucariota, una proteína que se encuentra involucrada en la regulación de diversas funciones, pero carente de especificidad intrínseca, que se asocia con más de 200 subunidades regulatorias para formar complejos enzimáticos en los que la subunidad regulatoria puede dirigir o impedir la defosforilación de determinados sustratos. Se sabe incluso que los sensores de RNA viral RIG-I y MDA5 se activan vía defosforilación por PP1 desencadenando una serie de eventos que conducen a la respuesta antiviral.

A fin de estudiar la presunta capacidad de proteínas virales para interactuar con proteínas celulares involucradas en la regulación de la síntesis de proteínas durante el ciclo replicativo del virus, se llevó a cabo la búsqueda de motivos relacionados con el proceso de traducción mediante análisis bioinformático, seguida del aislamiento de complejos ribosomales por gradiente de sacarosa y su análisis correspondiente mediante pruebas de Western blot. El análisis bioinformático de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de rotavirus RRV empleando una probabilidad de corte de 0.001 arrojó dos tipos de motivo relacionados con el proceso de traducción: unión a eIF4E (probabilidad 0.0002) e interacción con PP1 (probabilidad 0.0008). El motivo de unión a eIF4E lo poseen cuatro proteínas virales: VP1, VP2, VP3 y NSP2; y el motivo de interacción con PP1 lo poseen siete proteínas virales: VP1, VP3, VP6, VP7, NSP1, NSP2 y NSP5. Si bien las pruebas de Western blot permitieron detectar proteínas estructurales en fracciones ribosomales obtenidas por gradiente de sacarosa, la cuantificación de focos reveló la presencia de virus infeccioso a lo largo del gradiente, de tal manera que las proteínas estructurales detectadas pueden atribuirse a tales partículas.

El análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la proteína NSP2 permitió identificar dos motivos de interacción con PP1 altamente conservados, los cuales se sitúan entre los residuos 261-267 (DQRVIWQ) y 284-291 (ICKKLLFQ) de su dominio C-terminal, destacando el motivo que yace entre los residuos 261-267 debido a que se encuentra expuesto en un giro β de su estructura molecular. Las pruebas de Western blot revelaron la presencia de NSP2 y PP1 en las fracciones correspondientes a los complejos ribosomales 48S y 80S de células infectadas. Los ensayos de pull-down con proteínas recombinantes His-tag (PP1-H₆ y NSP2-H₆) permitieron confirmar que NSP2 y PP1 interactúan *in vitro*, lo cual sugiere que es muy probable que también puedan interactuar *in vivo*, un resultado muy interesante dado que deja abierta la posibilidad de que la proteína viral NSP2 pudiese ser una subunidad regulatoria de la fosfatasa celular PP1 con función aún desconocida.

Palabras clave: traducción, rotavirus RRV, análisis bioinformático, motivos eucarióticos, complejos ribosomales, proteína no estructural NSP2, fosfatasa celular PP1.

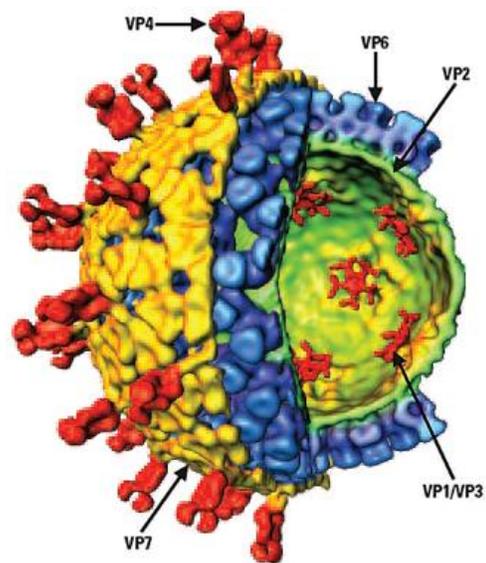
1. INTRODUCCIÓN

1.1. Rotavirus

Los rotavirus (del latín *rota*, “rueda” y *virus*, “veneno”) son la causa más importante de diarrea severa en lactantes y niños pequeños en todo el mundo, representando entre el 30-50% de este tipo de enfermedades. Al margen de la causa, la diarrea es una de las enfermedades más comunes en este grupo de edad a nivel mundial, una de las seis principales causas de 10.6 millones de muertes que se producen anualmente en niños menores de 5 años de edad y representa el 18%, es decir, alrededor de 2 de los 10.6 millones de muertes, cifra que tiene el mayor número de víctimas en los países en vías de desarrollo ¹.

Los rotavirus constituyen al género *Rotavirus* dentro de la familia *Reoviridae*, los cuales son virus que comparten propiedades bioquímicas y morfológicas. Se trata de virus sin envoltura que presentan un genoma formado por 11 segmentos de RNA doble cadena (dsRNA), donde el segmento 11 de la mayoría de cepas virales es bicistrónico, lo que les permite codificar 12 proteínas: 6 estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y 6 no estructurales (NSP1-NSP6). El género *Rotavirus* se encuentra clasificado serológicamente en 7 grupos (A-G), de los cuales únicamente los grupos A, B y C infectan humanos, mientras que todos los grupos se han detectado en animales. El grupo A es el más estudiado, ya que tiene mayor importancia tanto desde la perspectiva médica como veterinaria ^{1,2,3}.

Figura 1. Estructura de rotavirus ^{2,4}. El virión está constituido por tres capas concéntricas de proteína: la capa interna (core) está formada por la proteína VP2 (verde), la cual encierra al genoma (11 segmentos dsRNA), y a las proteínas VP1 y VP3; la capa intermedia se compone de la proteína VP6 (azul); y la capa externa está compuesta por una superficie lisa de proteína VP7 (amarillo) desde la cual se extienden 60 espículas constituidas por trímeros de VP4 (rojo).



El virión presenta simetría icosaédrica, tiene alrededor de 100 nm de diámetro y se encuentra constituido por tres capas concéntricas de proteína (Figura 1). La capa interna o nucleocápside (core) está formada por la proteína VP2 (120 moléculas), la cual encierra al genoma (11 segmentos dsRNA), y a las proteínas VP1 (12 moléculas) y VP3 (12 moléculas), integrando la partícula de simple capa (SLP). La proteína VP1 es una RNA polimerasa RNA-dependiente, en tanto que VP3 es la enzima de capping, la cual posee las actividades guanililtransferasa, metiltransferasa y fosfodiesterasa. La capa intermedia se compone de VP6 (780 moléculas), la cual se ensambla sobre el core de proteína VP2 formando la partícula de doble capa (DLP), que es transcripcionalmente activa. La capa externa está compuesta por una superficie lisa de proteína VP7 (780 moléculas) desde la cual se extienden 60 espigas constituidas por trímeros de VP4 (180 moléculas), integrando así lo que se conoce como partícula de triple capa (TLP), que es la partícula infecciosa completa. Ambas proteínas de capa externa (VP4 y VP7) se encuentran involucradas en las interacciones iniciales del virus con la célula hospedera ^{1,2,4}.

1.2. Traducción

La traducción es el proceso mediante el cual se sintetizan las proteínas, un proceso sumamente complejo llevado a cabo por los ribosomas junto con un gran número de factores accesorios que se encargan en conjunto de decodificar la información genética contenida en el mRNA.

El proceso de traducción suele dividirse en tres fases: **iniciación**, fase que agrupa todos los eventos necesarios para que se lleve a cabo el ensamble del ribosoma sobre el codón de inicio del mRNA; **elongación**, que comprende la síntesis de la cadena polipeptídica; y **terminación**, fase en la que se liberan el polipéptido recién sintetizado y el ribosoma del mRNA.

La iniciación es la fase más regulada del proceso de traducción, fase en la que participan proteínas celulares conocidas como factores de inicio de la traducción (eIFs, *eukaryote Initiation Factors*) que cumplen diversas funciones. Se estima que son al menos 25 eIFs los que participan, sin incluir las proteínas ribosomales y las tRNA sintetetas. Sin embargo, los principales mecanismos de control durante el proceso de traducción involucran la formación del complejo proteico eIF4F y la actividad del complejo ternario eIF2-GTP-tRNA_i^{Met}, donde el factor eIF2 constituye un punto clave en la regulación traduccional ^{5,6,7,8}.

1.3. Ribosomas

Los ribosomas son complejos macromoleculares formados por dos subunidades, una grande y una pequeña, las cuales integran una partícula de entre 20-30 nm de diámetro, cuyo peso molecular, dependiendo del organismo, varía entre los 2.5 MDa (procariontes) y los 4.5 MDa (eucariontes superiores), y en el caso de las células eucariotas se encuentra constituido aproximadamente por un 60% RNA y un 40% proteína ^{9,10,11}.

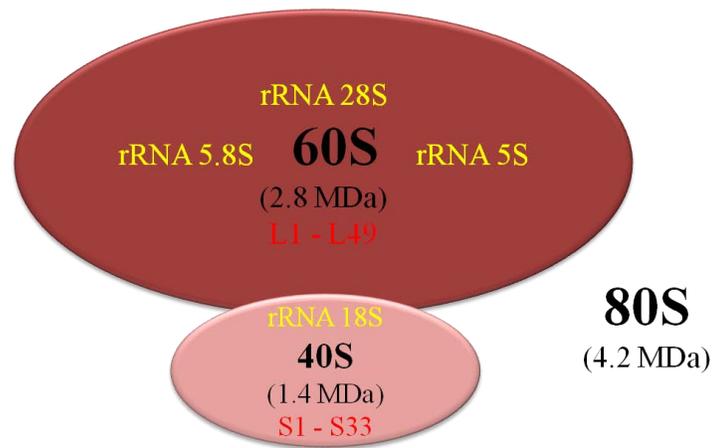


Figura 2. Diagrama esquemático de un ribosoma eucariota. El ribosoma eucariota es un complejo con un peso molecular aproximado de 4.2 MDa que se caracteriza por su coeficiente de sedimentación 80S y se encuentra formado por dos subunidades, una grande (60S) y una pequeña (40S). La subunidad ribosomal 60S se compone de tres moléculas de rRNA (28S, 5.8S, 5S) y alrededor de 49 proteínas (L1-L49), en tanto que la subunidad ribosomal 40S se compone de una molécula de rRNA (18S) y alrededor de 33 proteínas (S1-S33).

El ribosoma eucariota se caracteriza por tener un coeficiente de sedimentación 80S, cuyas dos subunidades, grande y pequeña, se denominan 60S y 40S respectivamente, dados sus coeficientes de sedimentación (Figura 2). La subunidad ribosomal 60S se compone de tres moléculas de rRNA designadas 28S, 5.8S y 5S por sus coeficientes de sedimentación, y alrededor de 49 proteínas cuya nomenclatura es rpL (*ribosomal protein Large subunit*) o simplemente L seguida de un número natural (L1-L49); la subunidad ribosomal 40S se compone de una molécula de rRNA designada 18S por su coeficiente de sedimentación, y alrededor de 33 proteínas cuya nomenclatura es rpS (*ribosomal protein Small subunit*) o simplemente S seguida de un número natural (S1-S33) ^{9,12,13}.

Tabla 1. Principales características del ribosoma eucariota.

Ribosoma eucariota		Coeficiente de sedimentación: 80S			
		Peso molecular: ~4.2 MDa		Diámetro: ~25 nm	
Subunidad ribosomal		PM (MDa)	rRNA	Bases	Proteínas
Subunidad grande	60S	2.8	28S	4718	49
			5.8S	160	
			5S	120	
Subunidad pequeña	40S	1.4	18S	1874	33

Se registran los coeficientes de sedimentación de las subunidades que integran el ribosoma, su peso molecular aproximado, los coeficientes de sedimentación y número de bases de las moléculas de rRNA que componen las subunidades, así como también el número de proteínas de cada subunidad.

1.4. Mecanismo Canónico de Traducción

El mecanismo canónico o mecanismo de traducción convencional de la mayoría de mRNAs celulares involucra sus extremos 5' y 3', los cuales en general se caracterizan por tener una estructura denominada cap (m^7GpppN) en el extremo 5' y un tramo poliadenilado (cola poliA) en el extremo 3' (Figura 3). Ambos extremos permiten la pseudocircularización del mRNA a través del factor eIF4F, un complejo proteico que recluta al cap e interactúa con la proteína de unión a la cola poliA, PABP (*PolyA-Binding Protein*)^{5,6,7,14,15,16}.

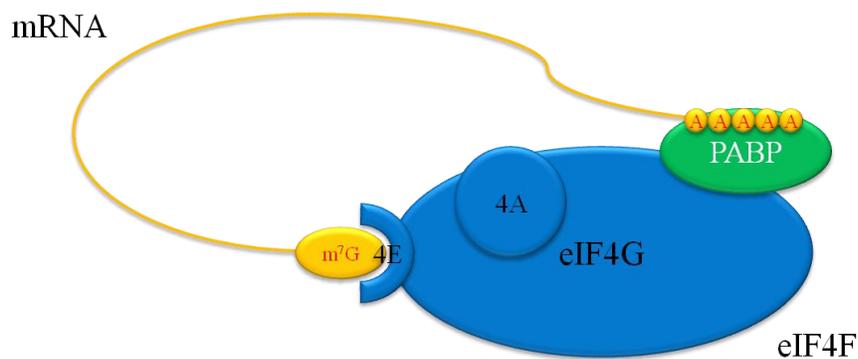


Figura 3. Mecanismo canónico de traducción. El mecanismo de traducción convencional o cap-dependiente involucra ambos extremos del mRNA, los cuales permiten su pseudocircularización a través del complejo eIF4F, el cual recluta al cap vía eIF4E e interactúa con PABP, la proteína de unión a la cola poliA.

Cabe agregar que existe un mecanismo de traducción no convencional (cap-independiente), en el que ciertos mRNAs pueden ser traducidos mediante elementos altamente estructurados que generalmente se encuentran en la región no traducida (UTR) de su extremo 5' denominados IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), con la participación de pocos o ningún factor canónico de iniciación, y en algunas ocasiones con la participación de factores accesorios conocidos como ITAFs (*IRES Trans-Acting Factors*)^{17,18,19}.

1.5. Complejo eIF4F

El factor eIF4F es un complejo formado por tres proteínas: la proteína que reconoce y une la estructura cap (eIF4E), una RNA helicasa ATP-dependiente (eIF4A), y la proteína que sirve de andamiaje o eslabón para la interacción de ambas (eIF4G). Además de promover la pseudocircularización del mRNA mediante su interacción con la proteína PABP unida a su extremo 3', lo que probablemente mejora la eficiencia del inicio de la traducción y restringe el reclutamiento de mRNAs con extremos intactos, eIF4G también interactúa con el factor eIF3, tendiendo de esta manera el puente entre el mRNA y la subunidad ribosomal 40S^{5,6,7,18}.

El factor eIF3 es un complejo formado por 13 subunidades (a-m) que se asocia a la subunidad ribosomal 40S promoviendo el reclutamiento de los factores eIF1 y eIF1A, los cuales son importantes para el reconocimiento del codón de inicio, así como también la unión de eIF5 y del complejo ternario eIF2-GTP-tRNA_i^{Met}, formando todos en conjunto el denominado complejo de preinicio 43S. Este complejo se une al mRNA y sus factores asociados a través de la interacción de eIF3 con eIF4G, integrando el complejo de inicio 48S, el cual se encuentra listo para interactuar con el mRNA y escanearlo para el reconocimiento del codón de inicio, donde la hidrólisis de GTP del complejo ternario por el factor eIF5 permite que se deposite el tRNA_i^{Met}, se comiencen a liberar los factores de inicio y se favorezca la interacción entre las subunidades ribosomales 40S y 60S para ensamblar el ribosoma 80S^{18,20}.

Después de que el complejo ternario deposita tRNA_i^{Met} en el codón de inicio de la traducción, eIF2 se libera como complejo binario inactivo eIF2-GDP, que es reciclado por el factor eIF2B, el cual intercambia GDP por GTP restableciendo el complejo binario activo eIF2-GTP para que se utilice en el siguiente ciclo de inicio de la traducción^{5,6,7,18}.

1.6. Proteínas 4E-BPs

Las proteínas 4E-BPs (*eIF4E-Binding Proteins*) son conocidos reguladores negativos de la traducción cap-dependiente, dado que en su forma activa hipofosforilada se asocian con eIF4E compitiendo con eIF4G, de tal manera que inhiben el ensamble del complejo eIF4F, y por lo tanto arrestan el inicio de la traducción (Figura 4). Estas proteínas se inactivan por hiperfosforilación a través de una compleja cascada de señalización cuya enzima efectora es la cinasa Ser/Thr mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin kinase*), un regulador central del metabolismo celular, el crecimiento y la supervivencia que permite reanudar la traducción cap-dependiente integrando señales en respuesta a disponibilidad de nutrientes, hormonas y factores de crecimiento^{5,21,22,23}.

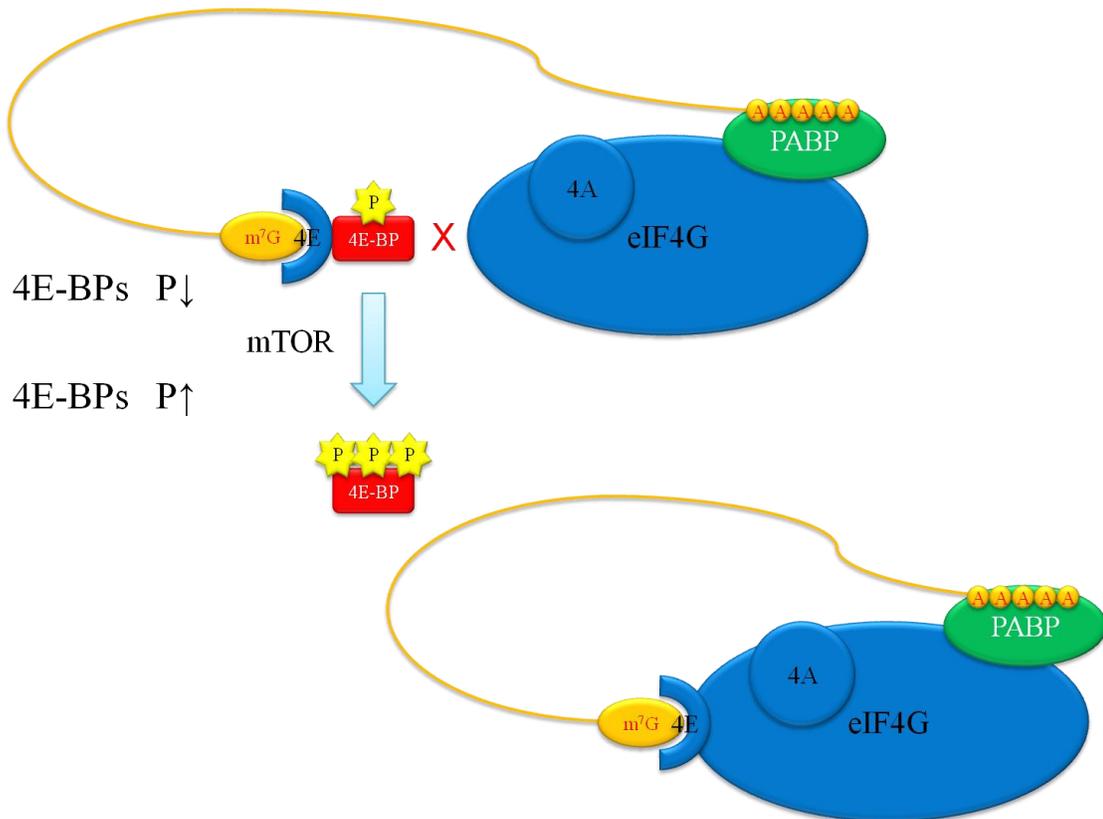


Figura 4. Las proteínas 4E-BPs arrestan la traducción cap-dependiente. La forma hipofosforilada de las proteínas 4E-BPs se asocia al factor eIF4E compitiendo con el factor eIF4G, de tal manera que impiden el ensamblaje del complejo eIF4F y por lo tanto arrestan el inicio de la traducción. Se inactivan por hiperfosforilación mediada por la cinasa mTOR en respuesta a diversas señales que permiten reanudar la traducción cap-dependiente.

1.7. Complejo Ternario

El factor eIF2 es un heterotrímero formado por una subunidad regulatoria (eIF2 α), una subunidad de unión a tRNA (eIF2 β) y una subunidad de unión a GTP (eIF2 γ). Este factor en su forma activa eIF2-GTP une el tRNA iniciador cargado con metionina (tRNA $_i^{Met}$, **initiator Methionyl-tRNA**) formando el complejo ternario eIF2-GTP-tRNA $_i^{Met}$ que se asocia a la subunidad 40S para acarrear el tRNA $_i^{Met}$ al codón de inicio de la traducción (Figura 5) ^{5,6,7,24}.

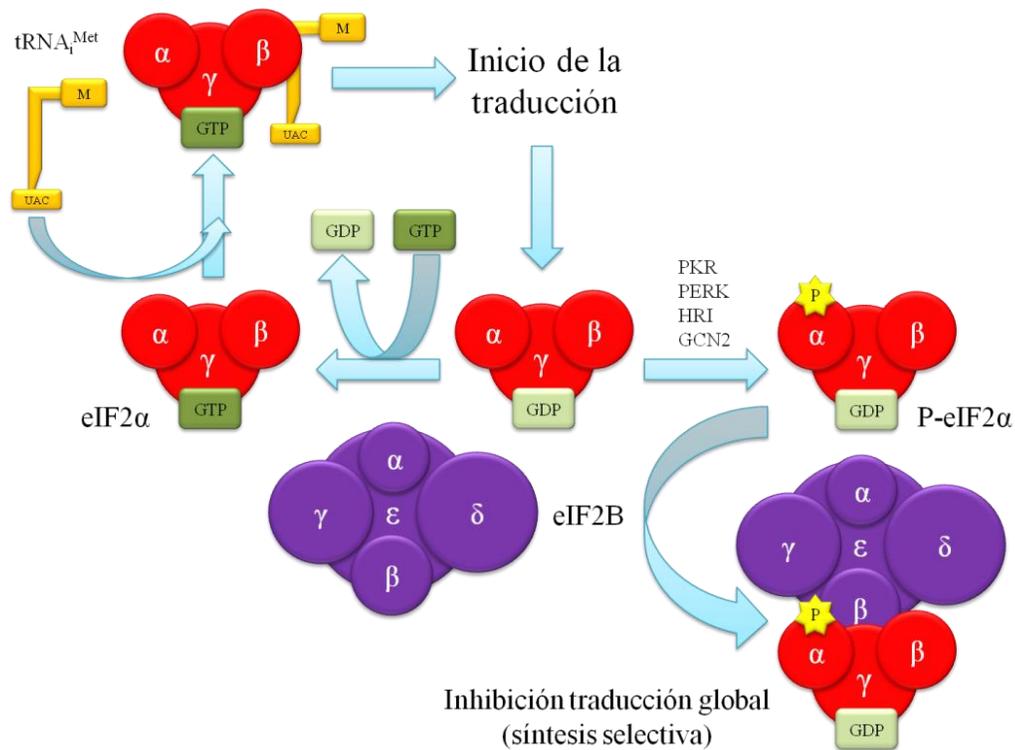


Figura 5. El complejo ternario es un punto clave en la regulación traduccional. El factor eIF2 es un heterotrímero cuya forma activa eIF2-GTP une el tRNA $_i^{Met}$ formando el complejo ternario que se asocia a la subunidad 40S para acarrear el tRNA $_i^{Met}$ al codón de inicio de la traducción. Después de depositar el tRNA $_i^{Met}$, eIF2 se libera como complejo binario inactivo eIF2-GDP, el cual es reciclado por el factor eIF2B, un heteropentámero que intercambia GDP por GTP restableciendo el complejo binario activo eIF2-GTP para el siguiente ciclo de inicio. La fosforilación de la Ser 51 de la subunidad eIF2 α por cualquiera de cuatro cinasas celulares que responden a determinadas condiciones de estrés conduce a la inhibición de la traducción global.

La activación del factor eIF2 se lleva a cabo a través del factor eIF2B, un heteropentámero que cataliza el intercambio de nucleótido (GDP por GTP) en el complejo binario inactivo

eIF2-GDP, restableciendo el complejo binario activo eIF2-GTP para el siguiente ciclo de inicio de la traducción. Sin embargo, la forma fosforilada de eIF2 α posee mayor afinidad por eIF2B que la forma no fosforilada, y dado que el factor intercambiador se encuentra en cantidades limitadas, pequeños cambios en el estado de fosforilación de eIF2 α tienen un pronunciado efecto sobre la síntesis de proteínas^{5,15,16,18,25}.

Se sabe que el factor eIF2 es regulado por fosforilación en la serina 51 de la subunidad eIF2 α por cualquiera de cuatro cinasas celulares, cada una de las cuales responde a determinadas condiciones de estrés: el dsRNA producido durante infecciones virales activa a la cinasa PKR (*Protein Kinase dsRNA-activated*), el exceso de proteínas desplegadas típico del estrés de retículo endoplásmico prende a PERK (*PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase*), la deficiencia de hierro, estrés oxidativo o choque térmico activan a HRI (*Heme-Regulated Inhibitor*) y la cinasa GCN2 (*General Control Non-derepressible 2*) responde a privación de aminoácidos o luz ultravioleta^{5,7,15,16,18}.

La fosforilación de eIF2 α constituye entonces una señal de regulación que inhibe el inicio de la traducción global, dado que ocasiona su unión al factor eIF2B con alta afinidad, lo que impide el intercambio de GDP por GTP en el complejo binario inactivo eIF2-GDP, luego eIF2 no puede unir el tRNA_i^{Met}, no se forma el complejo ternario y por lo tanto no puede llevarse a cabo el inicio de la traducción^{5,15,16,18}.

1.8. Fosfatasa Celular PP1

La subunidad catalítica PP1 (*Protein Phosphatase 1*) es la principal fosfatasa Ser/Thr de la célula eucariota, una proteína que se encuentra involucrada en la regulación de diversas funciones, pero carente de especificidad intrínseca, que se asocia con más de 200 subunidades regulatorias para formar complejos enzimáticos en los que la subunidad regulatoria puede dirigir o impedir la defosforilación de determinados sustratos^{26,27,28,29,30,31}.

La fosfatasa PP1 es reclutada por una de dos subunidades regulatorias para llevar a cabo la defosforilación del factor eIF2 α : GADD34 (*Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 34*) o CREP (*Constitutive Repressor of eIF2 α Phosphorylation*). La primera recluta a

PP1 dirigiéndola a la defosforilación de eIF2 α para reanudar la traducción después de superado el estrés, mientras que la segunda promueve la defosforilación de eIF2 α de manera constitutiva para mantener bajos niveles de la forma fosforilada (Figura 6) ^{18,32,33}.

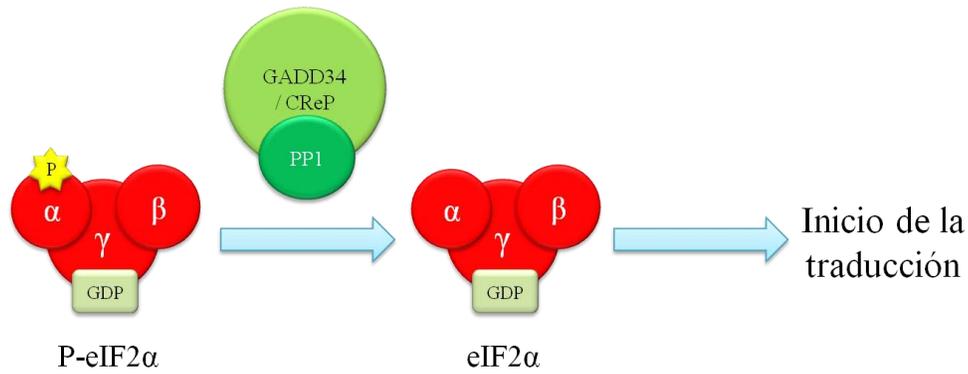


Figura 6. Defosforilación del factor eIF2 α . Una de dos subunidades regulatorias (GADD34 o CReP) reclutan la subunidad catalítica PP1, integrando un complejo enzimático que defosforila a eIF2 α para reanudar la traducción (GADD34) o de manera constitutiva (CReP).

1.9. Mecanismo de Inicio de la Traducción

El factor eIF2 en su forma activa (eIF2-GTP) une el tRNA_i^{Met} formando el complejo ternario eIF2-GTP-tRNA_i^{Met}, el cual se asocia a la subunidad ribosomal 40S en un evento promovido por el factor eIF3, que también promueve la unión de los factores eIF1, eIF1A y eIF5, integrando todos en conjunto el complejo de preinicio 43S. Este complejo se une al mRNA y sus factores asociados a través de la interacción entre eIF3 y eIF4G, ensamblando así el complejo de inicio 48S, el cual está listo para escanear el mRNA en dirección 5'→3' hasta encontrar el primer codón de inicio (generalmente AUG, menos común GUG, CUG o UUG), donde el factor eIF5 cataliza la hidrólisis de GTP del complejo ternario, lo cual permite que se deposite el tRNA_i^{Met}, liberándose eIF2 en su forma inactiva (eIF2-GDP) y comenzándose a liberar los factores de inicio para que subsecuentemente se disocie el factor eIF6 de la subunidad ribosomal 60S y el factor eIF5B catalice su unión a la subunidad 40S a fin de ensamblar un ribosoma 80S listo para proceder a la síntesis de la cadena polipeptídica ^{18,20}.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Mientras un buen número de virus codifica la maquinaria enzimática requerida para la replicación y transcripción de su genoma, ningún virus codifica para la maquinaria de síntesis de proteínas, condición que determina que los virus sean totalmente dependientes de la maquinaria celular para la traducción de sus mRNAs y que ha dado lugar a la evolución de diversos mecanismos para favorecer su proceso de traducción ^{7,18,19,34,35}.

El inicio de la traducción es un ciclo continuo en el que la formación del complejo ternario es uno de los puntos claves de regulación, dado que se puede interrumpir o reanudar dependiendo del estado de fosforilación del factor eIF2 α . Cualquiera de cuatro cinasas celulares que responden a determinadas condiciones de estrés pueden interrumpir el ciclo a través de la fosforilación de eIF2 α , en tanto que la fosfatasa PP1 es reclutada por una de dos subunidades regulatorias que permiten reanudar el ciclo dirigiendo su defosforilación, lo cual puede darse para reactivar la traducción después de superado el estrés (GADD34) o de manera constitutiva para mantener bajos niveles de la forma fosforilada (CReP) ^{5,7,15,16,18}.

Los virus han evolucionado sofisticadas estrategias para usurpar la maquinaria de traducción, y dado el papel preponderante del factor eIF2 α , resulta apenas natural que los virus hayan evolucionado mecanismos para controlar las cinasas que llevan a cabo su fosforilación o la enzima que lo defosforila. Algunos virus incluso tienen la capacidad de desplegar múltiples estrategias para controlar el estado de fosforilación de eIF2 α , combinando mecanismos dirigidos tanto a las cinasas como a la fosfatasa PP1 ¹⁸.

Un ejemplo típico es el virus herpes simple tipo 1 (HSV-1, *Herpes Simplex Virus I*), el cual codifica dos proteínas que contienen la función de dos cinasas: la proteína US11 une el dsRNA y PKR para inhibir su actividad cinasa, mientras que la glicoproteína gB contrarresta a PERK, lo que previene el estrés de retículo endoplásmico. Y como tercer estrategia, codifica una proteína denominada factor de neurovirulencia ICP34.5 (*Infected Cell Protein 34.5*), la cual actúa como subunidad regulatoria asociándose a la fosfatasa PP1 para promover la defosforilación de eIF2 α y mantener activo el proceso de traducción (Figura 7) ^{18,36,37}.

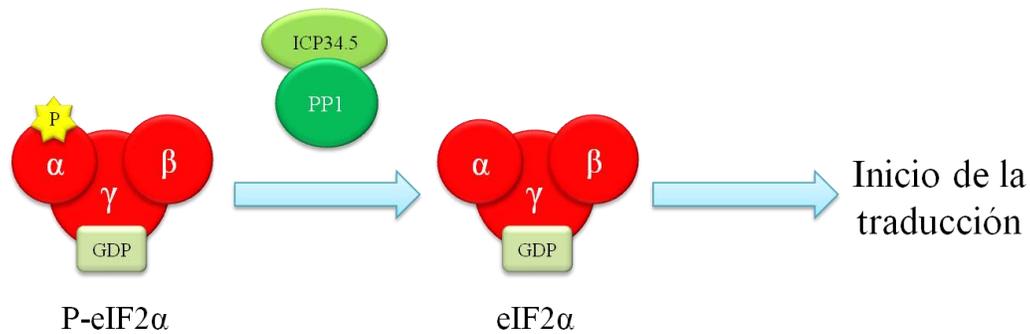


Figura 7. Defosforilación de eIF2 α por ICP34.5. El virus herpes simple tipo 1 (HSV-1) codifica la proteína ICP34.5, la cual actúa como subunidad reguladora reclutando a PP1 para defosforilar a eIF2 α y mantener activo el proceso de traducción.

De la misma manera que ICP34.5, se ha sugerido que la proteína DP71L del virus de la fiebre porcina africana (ASFV, *African Swine Fever Virus*) también podría actuar como subunidad reguladora de PP1, aunque ha sido propuesto que este virus despliega múltiples mecanismos para evitar la fosforilación de eIF2 α y mantener activo el proceso de traducción^{18,38,39}.

Algunos virus tales como adenovirus y Epstein-Barr (EBV) codifican dsRNA señuelos que se unen pero no activan a PKR, mientras que vaccinia (VacV) codifica dos proteínas que inhiben la actividad de dos cinasas: la proteína E3 une al dsRNA enmascarándolo de tal manera que evita su reconocimiento y la subsecuente activación de PKR, en tanto la proteína K3 actúa como pseudosustrato de PKR y PERK, lo que impide la fosforilación de eIF2 α y por lo tanto previene la inhibición de la síntesis de proteínas¹⁸.

Pese a la evidencia de gran diversidad de mecanismos que impiden la función de las cinasas PKR y PERK, así como mecanismos que promueven la actividad de la fosfatasa PP1, también se han descrito casos en los que ciertos mRNAs virales pueden traducirse de manera independiente del estado de fosforilación del factor eIF2 α . Los alfavirus Semliki Forest virus (SFV) y Sindbis virus (SINV), el virus de la hepatitis C (HCV), el virus de la parálisis del grillo (CrPV) y poliovirus se encuentran entre los virus que se benefician induciendo la fosforilación de eIF2 α , ya que bajo estas condiciones los mRNAs virales son eficientemente traducidos mientras se arresta la síntesis de proteína celular¹⁸.

El estudio de la traducción del virus de la parálisis del grillo (CrPV, *Cricket Paralysis Virus*) ha brindado detalles excepcionales sobre lo sorprendentes que pueden llegar a ser los mecanismos de síntesis de proteínas. Este virus tiene un genoma ssRNA de polaridad positiva y bicistrónico, cuyo primer marco abierto de lectura (ORF) está seguido por una región intergénica (IGR) de 189 nt que funciona como un IRES, el cual recluta a las subunidades ribosomales 40S y 60S para ensamblar el ribosoma 80S sin la participación de factores canónicos de iniciación, incluyendo el tRNA_i^{Met}. La IGR del virus presenta una estructura secundaria que mimetiza al tRNA iniciador, de tal manera que se posiciona en el ribosoma y decodifica el segundo codón iniciando la síntesis de proteína viral con alanina y no con metionina como suele ocurrir, lo cual le permite prescindir del complejo ternario^{19,40,41,42}.

Los rotavirus constituyen otro claro ejemplo de virus que pueden llevar a cabo su proceso de traducción cuando el factor eIF2 α se encuentra fosforilado, fosforilación que debería impedir la traducción, pero que aun en tales condiciones se lleva a cabo a través de un mecanismo desconocido. No obstante, se sabe que los virus han logrado permanecer en la carrera evolutiva gracias a su capacidad para desplegar mecanismos alternos a fin de que la maquinaria celular continúe sintetizando sus proteínas^{8,15,16}.

3. HIPÓTESIS

Durante la infección por rotavirus RRV debe existir un mecanismo que permite la traducción de mRNAs celulares y virales pese a que el factor de inicio de traducción eIF2 α se encuentra fosforilado, mecanismo en el que presumiblemente podría estar involucrada una proteína viral.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

- Caracterizar el mecanismo a través del cual se traducen los mRNAs celulares y virales cuando el factor de inicio de traducción eIF2 α se encuentra fosforilado durante la infección por rotavirus RRV.

4.2. Objetivos Específicos

- Identificar mediante métodos bioinformáticos si en las secuencias de aminoácidos de las proteínas virales existen motivos relacionados con el proceso de traducción.
- Determinar experimentalmente si existen proteínas virales asociadas a los complejos de inicio 48S del proceso de traducción.
- Demostrar si existen interacciones directas entre proteínas virales y proteínas celulares involucradas en el proceso de traducción.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Células, Virus y Bacterias

Las células epiteliales MA104 provenientes de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) se cultivaron en DMEM-RS (*Dulbecco's Modified Eagle Medium - Reduced Serum*) suplementado con 5% FBS (*Fetal Bovine Serum*). Los lisados virales de la cepa RRV (*Rhesus Rotavirus*) se activaron incubando con 10 µg/mL tripsina durante 30 min a 37 °C y se propagaron en células MA104 usando MEM (*Minimum Essential Medium*) suplementado con 2 µg/mL glutamina y pH ajustado a 7.0 con solución NaHCO₃ 4.4%, infectando monocapas durante 1 h a 37 °C e incubando durante 14 h a 37 °C, tras lo cual las células se lisaron mediante tres ciclos de congelación-descongelación para luego alicuotar, rotular y almacenar a -70 °C. Las bacterias transformadas de la cepa *Escherichia coli* BL21(DE3) se cultivaron en medio LB (*Luria - Bertani*) con 30 µg/mL kanamicina o 100 µg/mL ampicilina de acuerdo al marcador de resistencia del plásmido.

5.2. Determinación de Título Viral

Monocapas de células confluentes cultivadas en placas de 96 pozos se infectaron con diluciones seriales de rotavirus RRV durante 1 h a 37 °C, luego se incubaron durante 14 h a 37 °C y se fijaron incubando durante 30 min a T_{amb} con acetona 80% en buffer PBS. Las células fijadas se incubaron con una dilución 1:2000 del anticuerpo primario (α-TLPs) en PBS durante 1 h a 37 °C y se lavaron con PBS, tras lo cual se incubaron con una dilución 1:3000 del anticuerpo secundario (proteína A peroxidasa, GE Healthcare) en PBS durante 1 h a 37 °C y se lavaron de nuevo 2 veces con PBS. Finalmente se agregó el sustrato carbazol para teñir las células infectadas, se lavó con agua corriente y se dejó secar a T_{amb} a fin de proceder a contar en el microscopio los focos infecciosos para determinar el título viral.

5.3. Aislamiento de Complejos Ribosomales

Monocapas de células confluentes MA104 cultivadas en platos de 150 mm (~1.8x10⁷ cel) se infectaron, o no, con rotavirus RRV (MOI 5) durante 1 h a 37 °C y luego se incubaron durante 6 h a 37 °C. Antes de cosechar, las células se incubaron con 0.1 mg/mL cicloheximida durante

5 min a 37 °C, luego se lavaron 2 veces con buffer A (Tris 20 mM pH 8.0, KCl 140 mM, MgCl₂ 5 mM, cicloheximida 0.1 mg/mL) y se lisaron con 500 µL buffer de lisis (Tris 20 mM pH 8.0, KCl 140 mM, MgCl₂ 5 mM, NaF 25 mM, Na₃VO₄ 1 mM, Complete EDTA-free 1X, heparina 1 mg/mL, cicloheximida 0.1 mg/mL, DTT 0.5 mM, Tritón X-100 0.5%, RNasin 0.2%). Los lisados se colectaron e incubaron en hielo durante 20 min, agitando cada 5 min por 30 seg, tras lo cual se centrifugaron a 3500 rpm / 4 °C durante 5 min. Los sobrenadantes se recuperaron, se centrifugaron a 9500 rpm / 4 °C durante 10 min y se almacenaron a -70 °C (lisados depurados o extractos celulares). Finalmente, los extractos celulares (sin infectar o infectados) se cargaron en gradientes discontinuos elaborados con soluciones de sacarosa (10-50%) en buffer B (Tris 20 mM pH 8.0, KCl 140 mM, MgCl₂ 5 mM, cicloheximida 0.1 mg/mL, DTT 0.5 mM) y se sometieron a una velocidad de centrifugación de 36000 rpm / 4 °C durante 2 h empleando un rotor Beckman SW 40Ti.

5.4. Análisis de Complejos Ribosomales

Los gradientes discontinuos de sacarosa se fraccionaron colectando ~500 µL/fracción, de tal manera que se obtuvieron alrededor de 25 fracciones por gradiente, a cada una de las cuales se le cuantificó el RNA en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific) para después graficar la concentración de RNA en función de los números de fracción a fin de obtener el perfil ribosomal correspondiente a cada condición. El RNA total presente en determinadas fracciones se aisló mediante extracción con fenol-cloroformo, se resuspendió en 10 µL agua DEPC y se le agregó buffer de carga (glicerol 30%, naranja G) para someter a electroforesis en gel de agarosa. La proteína total presente en determinadas fracciones se concentró mediante precipitación con metanol-cloroformo, se resuspendió en 10 µL buffer Laemmli (Tris 100 mM pH 6.8, SDS 1.7%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 1.7%, azul de bromofenol) y se hirvió durante 5 min para someter a electroforesis SDS-PAGE.

5.5. Electroforesis en Gel de Agarosa

Los geles de agarosa 1% se corrieron en buffer TAE con 0.2 mg/L bromuro de etidio a un potencial constante de 90 V durante 30 min y luego se escanearon en un equipo de detección de fluorescencia (Typhoon Trio, Amersham Biosciences) a fin de identificar las bandas

correspondientes a los rRNA 18S y 28S que permiten confirmar las fracciones en las que se encuentran los distintos complejos ribosomales.

5.6. Electroforesis SDS-PAGE

Los geles SDS-PAGE se corrieron en buffer Tris-Gly con 0.08% SDS a un potencial de 60 V hasta rebasar el gel de apilamiento, y luego a 120 V hasta que el frente de corrida alcanzó el borde inferior del gel, tras lo cual se sometieron a tinción con azul Coomassie (metanol 45%, ácido acético 5%, azul Coomassie R-250 0.2%) para el análisis visual correspondiente, o se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Merck Millipore) en presencia de buffer CAPS con 10% metanol aplicando un potencial constante de 50 V durante 1 h para luego proceder a realizar su análisis mediante Western blot.

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en las pruebas de Western blot.

Proteína a detectar / antígeno	Anticuerpo 1°	Clonalidad / hospedero	Dilución	Proveedor
VPs	α -TLPs	Policlonal / conejo	1:1000	Laboratorio*
S6	54D2	Monoclonal / ratón	1:1000	Cell Signaling Technology
NSP2	α -NSP2	Policlonal / conejo	1:1500	Laboratorio*
NSP3	α -NSP3	Policlonal / conejo	1:1000	Laboratorio*
NSP5	α -NSP5	Policlonal / conejo	1:2000	Laboratorio*
VP2	3A8	Monoclonal / ratón	1:1000	Laboratorio*
PP1	E-9	Monoclonal / ratón	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
GADD34	H-193	Policlonal / conejo	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
GST-tag	2H3-D10	Monoclonal / ratón	1:5000	Sigma-Aldrich
His-tag	Anti-His ₆	Monoclonal / ratón	1:5000	Roche

Se listan las proteínas detectadas mediante Western blot, la designación de los anticuerpos primarios empleados para su detección, su clonalidad y hospedero, así como también la proporción en la que fueron usados y proveedor.

*: Anticuerpos producidos en el Laboratorio de Virología Molecular del IBT, UNAM.

5.7. Pruebas de Western blot

Las membranas de nitrocelulosa con proteínas inmovilizadas se bloquearon con una suspensión de leche descremada 5% en buffer PBS-T (PBS con 0.1% Tween 20) durante toda la noche a 4 °C y se lavaron ligeramente con PBS-T. Las membranas bloqueadas se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 2) en suspensión de bloqueo durante 1 h a T_{amb} y se lavaron 3 veces por 10 min con PBS-T, tras lo cual se incubaron con el anticuerpo secundario (dilución 1:5000 acoplado a fluoróforo o dilución 1:2500 acoplado a peroxidasa) en suspensión de bloqueo durante 1 h a T_{amb} y se lavaron de nuevo 3 veces por 10 min con PBS-T. Finalmente, las membranas se escanearon en un equipo de detección de fluorescencia (Typhoon Trio, Amersham Biosciences) o se revelaron con luminol por quimioluminiscencia (Western Lightning Plus, PerkinElmer), según se haya empleado un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo (Alexa Fluor 647, Molecular Probes) o acoplado a la enzima peroxidasa (α -ratón o α -conejo peroxidasa, Invitrogen) respectivamente.

5.8. Lisados para Determinar Probables Interacciones con PP1 o NSP2

Monocapas de células confluentes MA104 cultivadas en platos de 100 mm ($\sim 7.0 \times 10^6$ cel) se infectaron, o no, con rotavirus RRV (MOI 5) durante 1 h a 37 °C, luego se incubaron durante 6 h a 37 °C y se cosecharon lisando con 250 μ L buffer de lisis (Tris 20 mM pH 8.0, KCl 140 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Complete EDTA-free 1X, DTT 0.5 mM, Tritón X-100 0.5%). Los lisados se colectaron e incubaron en hielo durante 20 min, agitando cada 5 min por 30 seg, tras lo cual se centrifugaron a 5000 rpm / 4 °C durante 10 min. Los sobrenadantes (lisados depurados o extractos celulares) se recuperaron y se almacenaron a -70 °C para después realizar los ensayos de pull-down que permitieran evaluar probables interacciones.

5.9. Ensayos de Pull-Down con las Proteínas Recombinantes

Inóculos crecidos durante la noche de bacterias transformadas *E. coli* BL21(DE3) que expresan la proteína recombinante (Tabla 3), se cultivaron en medio LB con antibiótico (30 μ g/mL kanamicina o 100 μ g/mL ampicilina) durante 3 h a 37 °C y se indujeron con 1 mM IPTG durante 3 h a 30 °C, tras lo cual se cosecharon y lisaron en buffer con 20 μ g/mL PMSF

en condiciones nativas (Tris 20 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M) o desnaturizantes (Tris 10 mM pH 8.0, NaH₂PO₄ 100 mM, urea 8 M), para purificar la proteína recombinante por su afinidad con resina glutatión-agarosa (GST-tag) o Ni-agarosa (His-tag) respectivamente, incubando durante 1 h a T_{amb.} Una vez fijada a la resina mediante su etiqueta, la proteína recombinante se incubó con los extractos preclareados de células (sin infectar o infectadas) durante 18 h a 4 °C. De otra manera, la proteína PP1-H₆ se eluyó (Tris 20 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, glicerol 20%, urea 6 M) y dializó (Tris 20 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, glicerol 20%) inmediatamente antes de incubarse con los extractos celulares preclareados durante 18 h a 4 °C, para luego recapturar la proteína recombinante junto a las proteínas que pudiese haber unido, mediante incubación con resina Ni-agarosa durante 1 h a T_{amb.} De manera similar, el extracto bacteriano que contenía la proteína NSP2-H₆ se incubó con el extracto celular preclareado durante 18 h a 4 °C, para luego obtener la proteína recombinante junto a las proteínas que pudiese haber unido, mediante incubación con resina Ni-agarosa durante 1 h a T_{amb.} Finalmente, la resina se centrifugó, se lavó al menos 4 veces y se eluyó con glutatión reducido 10 mM (GST-tag), o empleando imidazol 250 mM o EDTA 100 mM pH 8.0 (His-tag), para después someter las distintas fracciones de la purificación a electroforesis SDS-PAGE por duplicado a fin de efectuar el análisis correspondiente mediante tinción con azul Coomassie y pruebas de Western blot.

Tabla 3. Plásmidos usados en la transformación de bacterias *E. coli* BL21(DE3).

Vector	Proteína Recombinante	Etiqueta / Posición	Nivel de Expresión	Marcador de Resistencia	Referencia
pGEX-4T1	GST	-	Alto	Ampicilina	GE Healthcare
pRB4892	GST-PP1	GST / N-terminal	Alto	Ampicilina	Roizman, B. ³⁶
pET-28a	PP1-H ₆	His / N-terminal	Alto	Kanamicina	Laboratorio*
pET-28a	NSP2-H ₆	His / N-terminal	Alto	Kanamicina	Laboratorio*

Se registran las principales características de los plásmidos con los que se transformaron bacterias *E. coli* BL21(DE3) para obtener las correspondientes proteínas recombinantes.

*: Plásmidos construidos en el Laboratorio de Virología Molecular del IBT, UNAM.

6. DATOS Y RESULTADOS

6.1. Análisis Bioinformático

Las secuencias de aminoácidos de las 12 proteínas de rotavirus usadas en este trabajo se tradujeron *in silico* a partir de los 11 genes de la cepa RRV de rotavirus secuenciados en el Laboratorio de Virología Molecular del IBT, UNAM, empleando la herramienta de traducción disponible en el portal ExPASy (Anexo 1)⁴³.

6.1.1. Propiedades fundamentales de las proteínas de rotavirus

El proteoma de la cepa RRV de rotavirus está constituido por 12 proteínas: 6 estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y 6 no estructurales (NSP1-NSP6). Cabe recordar que el segmento 11 del genoma de RRV es bicistrónico, lo cual le permite codificar dos proteínas (NSP5 y NSP6). Se registran los resultados obtenidos para las 12 secuencias de aminoácidos analizadas mediante las herramientas de cálculo disponibles en el portal ExPASy (Tabla 4, Anexo 2)⁴³. El número de proteínas estructurales por virión se ha tomado de los valores reportados, los cuales han sido calculados a partir del estudio estructural de viriones purificados^{1,4}.

Tabla 4. Propiedades fundamentales de las proteínas de rotavirus RRV.

Proteína	Moléculas / virión	Aminoácidos (Nº)	PM (Da)	PM (kDa)	pI
VP1	12	1082	124436	124	8.42
VP2	120	887	103285	103	5.71
VP3	12	835	97904	98	6.86
VP4	180	776	86584	87	5.11
VP6	780	397	44896	45	6.01
VP7	780	326	37112	37	4.68
NSP1	-	501	58649	59	8.52
NSP2	-	317	36660	37	9.06
NSP3	-	313	36315	36	5.83
NSP4	-	175	20450	20	6.33
NSP5	-	198	21667	22	6.83
NSP6	-	92	11006	11	9.21

Se muestra el número de moléculas por virión de las proteínas estructurales, el número de aminoácidos, el peso molecular (PM) en unidades Da y kDa, y el punto isoeléctrico (pI) que arroja el análisis mediante las herramientas de cálculo del portal ExPASy para las 12 secuencias de aminoácidos traducidas *in silico* a partir de los 11 genes de la cepa RRV de rotavirus secuenciados en el Laboratorio de Virología Molecular del IBT, UNAM.

6.1.2. Características generales de los aminoácidos

Aunque existen diversas clasificaciones de aminoácidos, por simplicidad se eligió una clasificación basada en tres propiedades fisicoquímicas fundamentales: polaridad, carga y aromaticidad (Tabla 5, Anexo 3). Puede observarse que la probabilidad conjunta de los aminoácidos polares es muy similar a la de los no polares, así como también lo es la probabilidad de los aminoácidos con carga. En contraste, la probabilidad conjunta de los aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp) tiene un valor muy inferior, pues se trata de tres de los aminoácidos con más baja frecuencia en las proteínas, el Trp con el valor más bajo, un rango solo alcanzado por la Cys, clasificado aquí como polar. Se muestra una clasificación general, los códigos tanto de tres letras como de una letra, y la probabilidad con que ocurren en las proteínas los 20 aminoácidos. Cabe señalar que los valores tabulados se obtuvieron de la base de datos ELM, los cuales derivan del análisis estadístico de la base de datos UniProt^{44,45}.

Tabla 5. Clasificación general, códigos y probabilidad de los aminoácidos.

Clasificación	Aminoácido	Código (3 letras)	Código (1 letra)	Probabilidad	
No polares	Alanina	Ala	A	0.074253	0.333169
	Valina	Val	V	0.045399	
	Leucina	Leu	L	0.073093	
	Isoleucina	Ile	I	0.026977	
	Metionina	Met	M	0.019150	
	Prolina	Pro	P	0.094297	
Aromáticos	Fenilalanina	Phe	F	0.018359	0.039350
	Tirosina	Tyr	Y	0.014141	
	Triptófano	Trp	W	0.006850	
Polares	Glicina	Gly	G	0.073955	0.337565
	Serina	Ser	S	0.104119	
	Treonina	Thr	T	0.059547	
	Cisteína	Cys	C	0.009697	
	Asparagina	Asn	N	0.033851	
	Glutamina	Gln	Q	0.056396	
	Cargados (-)	Aspartato	Asp	D	
Glutamato		Glu	E	0.089011	
Cargados (+)	Lisina	Lys	K	0.061170	0.150756
	Arginina	Arg	R	0.063802	
	Histidina	His	H	0.025784	

Se registra una clasificación general, los códigos tanto de tres letras como de una letra, y la probabilidad de ocurrencia en las proteínas de los 20 aminoácidos.

6.1.3. Motivos relacionados con el proceso de traducción

El análisis *in silico* de las secuencias de aminoácidos de las 12 proteínas de rotavirus RRV mediante el uso de la base de datos ELM (*Eukaryotic Linear Motif*)^{44,45}, un recurso bioinformático que predice sitios funcionales de proteínas, reveló la presencia de dos tipos de motivo relacionados con el proceso de traducción: unión a eIF4E e interacción con PP1. El motivo de unión a eIF4E tiene una probabilidad de 0.0002 y lo poseen cuatro proteínas virales: tres estructurales (VP1, VP2, VP3) y una no estructural (NSP2); el motivo de interacción con PP1 tiene una probabilidad de 0.0008 y lo poseen siete proteínas virales: cuatro estructurales (VP1, VP3, VP6, VP7) y tres no estructurales (NSP1, NSP2, NSP5). Aunque la base de datos arroja la probabilidad ajustada a cuatro cifras decimales, se ilustra el cálculo de dichos valores a partir de la frecuencia de los aminoácidos que componen los motivos (Tablas 6). La identificación de tales motivos resulta particularmente interesante por la baja probabilidad de que puedan ocurrir al azar, dado que se ingresó como parámetro fundamental un valor de 0.001 como probabilidad de corte, además que puede notarse que el cálculo de la probabilidad de cada motivo solamente tiene en cuenta la frecuencia de los aminoácidos que lo componen, y por lo tanto, no se considera la longitud de la secuencia de aminoácidos de la proteína.

Tabla 6. Probabilidad de los dos tipos de motivo relacionados con el proceso de traducción.

Motivo de unión a eIF4E: Y****L[VILMF]							
Y	*	*	*	*	L	[VILMF]	
0,014141	1	1	1	1	0,073093	0,182978	
Probabilidad: 0.0001891 ≈ 0.0002							
Motivo de interacción con PP1: **[RK]{0,1}[VIL][^P][FW]*							
*	*	[RK]	{0,1}	[VIL]	[^P]	[FW]	*
1	1	0,124972	2	0,145469	0,905701	0,025209	1
Probabilidad: 0.0008301 ≈ 0.0008							

Se muestra el cálculo de la probabilidad de ocurrencia al azar de los dos tipos de motivo relacionados con el proceso de traducción (unión a eIF4E e interacción con PP1) que se encuentran en las secuencias de aminoácidos de las proteínas virales, cálculos que se basan en los valores de probabilidad registrados en la Tabla 5.

El motivo de unión a eIF4E (Tabla 6) se compone de dos residuos aminoácidos altamente conservados (Tyr y Leu), separados por cuatro posiciones en las que puede haber cualquier residuo, y seguidos de un residuo aminoácido poco variable en la última posición (Val, Leu, Ile, Met o Phe). Se registran las secuencias y posiciones de los probables sitios de unión a eIF4E hallados en las secuencias de aminoácidos de las proteínas virales (Tabla 7).

Tabla 7. Proteínas virales que presentan motivo de unión a eIF4E.

Proteína	Motivo de unión a eIF4E									
	Secuencia	Posición	Probabilidad	Y****L[VILMF]						
VP1	YGCYQLF	1001-1007	0.0002	Y	po	po	ar	po	L	F
VP2	YIRPNLL	305-311		Y	no	+	no	po	L	L
	YNYETLM	559-565		Y	po	ar	-	po	L	M
VP3	YENAFLL	29-35		Y	-	po	no	ar	L	I
NSP2	YLEHRLM	171-177		Y	no	-	+	+	L	M

Se registran las secuencias y posiciones de los motivos de unión a eIF4E que arrojan cuatro proteínas de rotavirus RRV (VP1, VP2, VP3 y NSP2). Se resaltan en casillas de color rojo los residuos aminoácidos altamente conservados y en letras de color rojo los residuos poco variables. También se analiza el carácter de los otros residuos de acuerdo a la clasificación general dada en la Tabla 5 (po: polar, no: no polar, ar: aromático, +: cargado positivo, -: cargado negativo).

Tabla 8. Proteínas virales que presentan motivo de interacción con PP1.

Proteína	Motivo de interacción con PP1										
	Secuencia	Posición	Probabilidad	**[RK]{0,1}[VIL][^P][FW]*							
VP1	ENRCIEFH	35-42	0.0008	-	po	R	po	I	-	F	+
	ESRQLKFG	404-411		-	po	R	po	L	+	F	po
	RTRIIFI	458-464		+	po	R	I	no	F	no	
	GGKIFFR	684-690		po	po	K	I	ar	F	+	
	LQKPVTFK	861-868		no	po	K	no	V	po	F	+
VP3	HHKELFFE	318-325		+	+	K	-	L	ar	F	-
	EPKVGFK	497-503		-	no	K	V	po	F	+	
VP6	KFKRINFD	123-130		+	ar	K	+	I	po	F	-
	FKRINFD	124-130		ar	+	R	I	po	F	-	
VP7	MMRINWK	284-290		no	no	R	I	po	W	+	
NSP1	LVKDILWH	380-387		no	no	K	-	I	no	W	+
NSP2	DQRVIWQ	261-267		-	po	R	V	no	W	po	
	ICKLLFQ	284-291		no	po	K	+	L	no	F	po
	CKLLFQ	285-291		po	+	K	L	no	F	po	
NSP5	CDRVDFS	105-111		po	-	R	V	-	F	po	

Se registran las secuencias y posiciones de los motivos de unión a PP1 que arrojan siete proteínas de rotavirus RRV (VP1, VP3, VP6, VP7, NSP1, NSP2 y NSP5). Se resaltan en casillas de color rojo los residuos aminoácidos altamente conservados y en letras de color rojo los residuos poco variables. También se analiza el carácter de los otros residuos de acuerdo a la clasificación general dada en la Tabla 5 (po: polar, no: no polar, ar: aromático, +: cargado positivo, -: cargado negativo).

El motivo de interacción con PP1 (Tabla 6) se compone de un residuo aminoácido altamente conservado (Lys o Arg), después de dos posiciones en las que puede haber cualquier residuo, seguido de una posición en la que puede o no haber residuo (un gap), luego un residuo aminoácido poco variable (Val, Leu o Ile), una posición en la que puede haber cualquier residuo excepto Pro y un residuo aminoácido altamente conservado en la penúltima posición (Phe o Trp), seguido de una posición en la que puede haber cualquier residuo. Se registran las secuencias y posiciones de los probables sitios de interacción con PP1 hallados en las secuencias de aminoácidos de las proteínas virales (Tabla 8).

Considerando que es bien conocido que el factor eIF4G y las proteínas 4E-BPs (Anexos 4 y 5) interactúan con el factor eIF4E, se procedió entonces a realizar el mismo análisis informático a las secuencias de aminoácidos de eIF4G (2 isoformas) y de las proteínas 4E-BPs (3 isoformas), revelando no solo que todas poseen el motivo de unión a eIF4E, sino que además existe evidencia experimental de funcionalidad registrada en la base de datos ELM. Se registran las secuencias y posiciones de los sitios de unión a eIF4E hallados en las secuencias de aminoácidos de las proteínas celulares mencionadas (Tabla 9).

Tabla 9. Proteínas celulares que presentan motivo de unión a eIF4E.

Proteína	Motivo de unión a eIF4E									
	Secuencia	Posición	Probabilidad	Y****L[VILMF]						
eIF4GI (Humano)	YDREFLL	612-618	0.0002	Y	-	+	-	ar	L	L
eIF4GII (Humano)	YDREFLL	624-630		Y	-	+	-	ar	L	L
4E-BP1 (Humano)	YDRKFLM	54-60		Y	-	+	+	ar	L	M
4E-BP2 (Humano)	YDRKFLM	54-60		Y	-	+	+	ar	L	L
4E-BP3 (Humano)	YDRKFLM	40-46		Y	-	+	+	ar	L	L

Se registran las secuencias y posiciones de los motivos de unión a eIF4E que arrojan las isoformas de dos proteínas humanas (eIF4G y 4E-BPs). Las secuencias se resaltan en casillas de color amarillo porque existe evidencia experimental de su funcionalidad. Se resaltan en casillas de color rojo los residuos aminoácidos altamente conservados y en letras de color rojo los residuos poco variables. También se analiza el carácter de los otros residuos de acuerdo a la clasificación general dada en la Tabla 5 (po: polar, no: no polar, ar: aromático, +: cargado positivo, -: cargado negativo).

De la misma manera, se sabe que dos proteínas relacionadas directamente con el proceso de traducción (GADD34 y CReP) constituyen subunidades regulatorias que dirigen la fosfatasa celular PP1 a la defosforilación del factor eIF2 α , así como también lo hace el factor de neurovirulencia ICP34.5 del virus herpes simple tipo 1 (HSV-1) ^{18,36,37}. También se ha sugerido que la proteína DP71L del virus de la fiebre porcina africana (ASFV) podría actuar como subunidad regulatoria de PP1 (Anexo 5) ^{18,38,39}. Si bien el análisis informático de las secuencias de aminoácidos reveló que todas estas proteínas poseen motivos de interacción con PP1, en la base de datos ELM solamente hay registrada evidencia experimental de funcionalidad del motivo que media la interacción entre las proteínas ICP34.5 y PP1. Resulta interesante que ambas isoformas de eIF4G también arrojaron motivos de interacción con PP1. Se registran las secuencias y posiciones de los sitios de interacción con PP1 hallados en las secuencias de aminoácidos de las proteínas mencionadas (Tabla 10).

Tabla 10. Proteínas analizadas que presentan motivo de interacción con PP1.

Proteína	Motivo de interacción con PP1										
	Secuencia	Posición	Probabilidad	**[RK]{0,1}[VIL][^P][FW]*							
eIF4GI (Humano)	IGKDLDFE	942-949	0.0008	no	po	K	-	L	-	F	-
	SSRIRFM	972-978		po	po	R	I	+	F	no	
	GGRLSWG	1088-1094		po	po	R	L	po	W	po	
eIF4GII (Humano)	IGKDLDFE	936-943		no	po	K	-	L	-	F	-
	SSRIRFM	966-972		po	po	R	I	+	F	no	
	EQKLDIFI	1399-1405		-	po	K	L	-	F	no	
GADD34 (Humano)	KARKVRFS	552-559		+	no	R	+	V	+	F	po
	ARKVRFS	553-559		no	+	K	V	+	F	po	
CReP (Humano)	LQKVLIWS	78-85		no	po	K	no	L	no	W	po
	PTRWLDFA	93-100		no	po	R	ar	L	-	F	no
	RMKRLEFL	297-304		+	no	K	+	L	-	F	no
	MKRLEFL	298-304		no	+	R	L	-	F	no	
	KRKKVTFL	637-644		+	+	K	+	V	po	F	no
	RKKVTFL	638-644		+	+	K	V	po	F	no	
ICP34.5	PARVRFS	190-196		no	no	R	V	+	F	po	
DP71L	DTKHVRFA	12-19	-	po	K	+	V	+	F	no	

Se registran las secuencias y posiciones de los motivos de unión a PP1 que arrojan tres proteínas celulares (eIF4G, GADD34 y CReP) y dos proteínas virales (ICP34.5 de HSV-1 y DP71L de ASFV). Se resalta en una casilla de color amarillo la única secuencia de la cual existe evidencia experimental registrada de su funcionalidad. Se resaltan en casillas de color rojo los residuos aminoácidos altamente conservados y en letras de color rojo los residuos poco variables. También se analiza el carácter de los otros residuos de acuerdo a la clasificación general dada en la Tabla 5 (po: polar, no: no polar, ar: aromático, +: cargado positivo, -: cargado negativo).

6.2. Complejos Ribosomales

El aislamiento de los complejos de inicio 48S se llevo a cabo mediante un proceso que puede simplificarse en cuatro etapas (Figura 8). Básicamente, lisados de células sin infectar (mock) o infectadas con rotavirus RRV (MOI 5), cosechadas 6 hpi, se cargaron en gradientes discontinuos de sacarosa (10-50%) y se sometieron a una velocidad de centrifugación de 36000 rpm / 4 °C durante 2 h, después de lo cual se colectaron fracciones de ~500 µL y se procedió a cuantificar la concentración de RNA presente en cada fracción (el procedimiento detallado se describe en la sección de Materiales y Métodos).

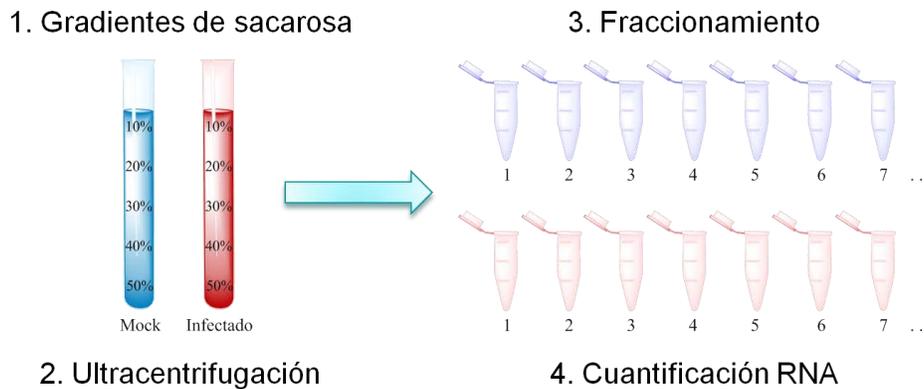


Figura 8. Aislamiento de los complejos de inicio 48S. Lisados de células sin infectar (mock) o infectadas con rotavirus RRV (MOI 5), cosechadas 6 hpi, se cargaron en gradientes discontinuos de sacarosa (10-50%) y se centrifugaron a 36000 rpm / 4 °C durante 2 h, después de lo cual se colectaron fracciones de ~500 µL y se cuantificó la concentración de RNA presente en cada fracción (hpi: horas posinfección).

6.2.1. Perfiles ribosomales

Los valores de concentración de RNA presente en las fracciones colectadas de los gradientes de sacarosa se graficaron en función de los números de fracción, números que en orden ascendente corresponden a valores crecientes de densidad, de tal manera que se obtuvieron en experimentos independientes las curvas características que indican las regiones respectivas a los distintos complejos ribosomales (Figura 9). Los perfiles ribosomales superpuestos de fracciones celulares mock e infectadas obtenidas de aproximadamente 10 gradientes mostraron de manera reiterada y consistente que los picos correspondientes a los complejos 40S y 80S

son más pronunciados en las fracciones provenientes de células mock que en las infectadas, mientras que los picos correspondientes a los polisomas son más prominentes en las fracciones de las células infectadas, lo cual sugiere que la iniciación y la eficiencia de la síntesis de proteínas en general se encuentra incrementada en las células infectadas.

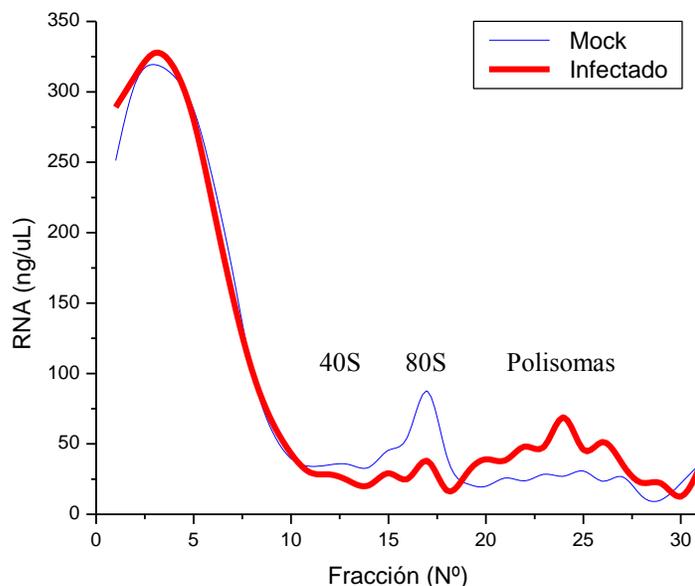


Figura 9. Perfiles ribosomales de lisados celulares mock e infectados. Los valores de concentración de RNA presente en las fracciones colectadas de los gradientes de sacarosa se graficaron en función de los números de fracción, obteniéndose las curvas características que permiten señalar las regiones correspondientes a los distintos complejos ribosomales. Se muestran superpuestos los perfiles ribosomales completos de fracciones mock (azul) e infectadas (rojo), lo cual permite notar que los picos que indican los complejos 40S y 80S son más pronunciados en las fracciones mock, mientras que los picos polisomales son más prominentes en las fracciones infectadas, sugiriendo que la eficiencia de la síntesis de proteínas se encuentra incrementada en células infectadas.

Para confirmar los números de fracción en los que se encuentran las subunidades ribosomales, se aisló el RNA de fracciones numeradas a intervalos regulares mediante extracción con fenol-cloroformo y se sometió a electroforesis en gel de agarosa 1% (Figura 10). Los perfiles ribosomales en conjunto con el patrón de bandas de RNA revelado por el gel de agarosa permitieron identificar las fracciones de los gradientes en las cuales se encuentran los distintos complejos ribosomales.

En este experimento en particular, el análisis de los perfiles ribosomales (Figura 9), apoyado por los perfiles de RNA en gel de agarosa (Figura 10), indica que los complejos 48S se encuentran entre las fracciones 11-14, los ribosomas 80S entre las fracciones 15-18 y una parte representativa de los polisomas entre las fracciones 21-27.

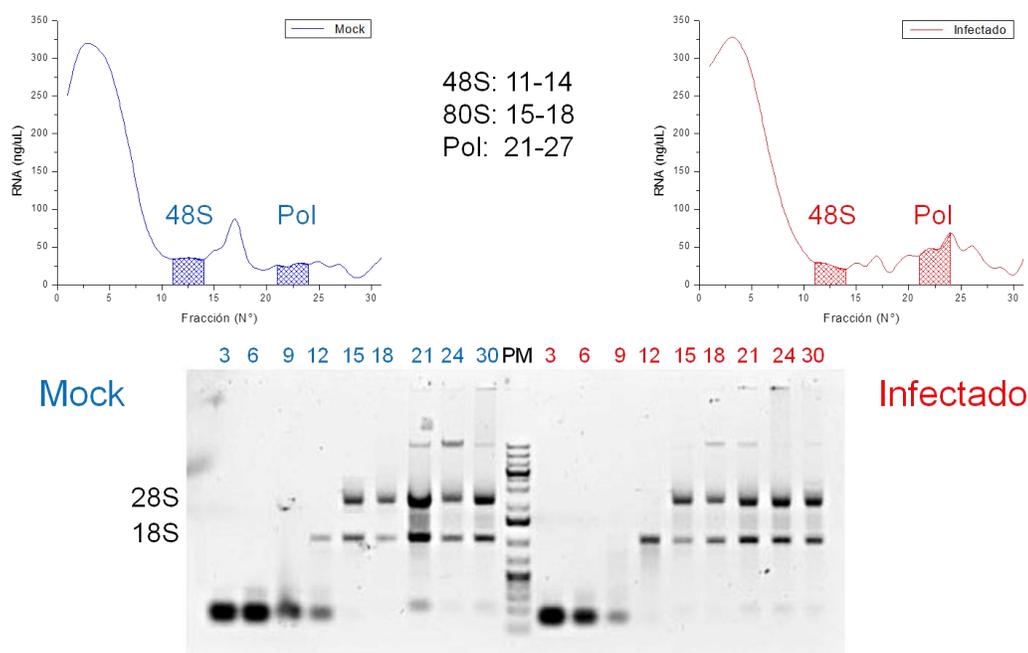


Figura 10. Perfiles ribosomales y de RNA de fracciones mock e infectadas. Se aisló el RNA de las fracciones indicadas mediante extracción con fenol-cloroformo y se sometió a electroforesis en gel de agarosa 1%, obteniéndose un patrón de bandas típico en el que pueden identificarse los rRNAs 18S y 28S (abajo), moléculas que confirman la presencia de las subunidades 40S y 60S respectivamente, en tanto que ambas moléculas señalan la presencia del ribosoma 80S. El análisis conjunto con los perfiles ribosomales (arriba), indica que en este gradiente los complejos 48S se encuentran entre las fracciones 11-14, los ribosomas 80S entre las fracciones 15-18 y los polisomas entre las fracciones 21-27.

6.2.2. Análisis de proteínas en los complejos 48S y polisomas

El contenido proteico de las fracciones mock e infectadas en las que se identificaron los complejos 48S y los polisomas, se aisló mediante precipitación con metanol-cloroformo y se sometió a electroforesis SDS-PAGE 10% para luego teñir los geles con azul Coomassie a fin de estimar la proporción relativa de proteína entre los complejos, de tal manera que se obtuvieron en experimentos independientes perfiles típicos de proteína (Figura 11).

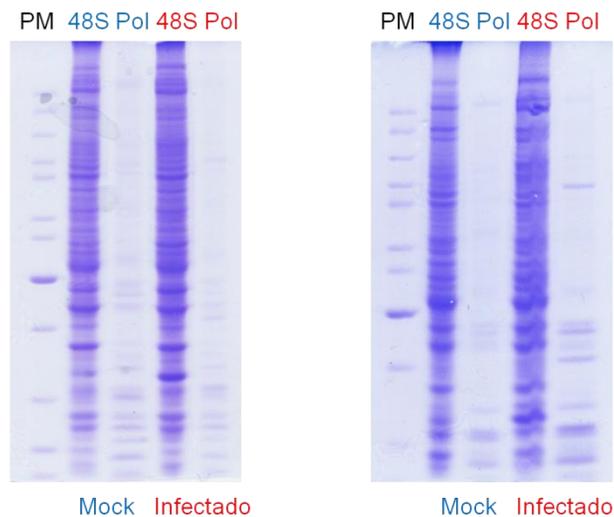


Figura 11. Perfiles de proteína en los complejos ribosomales mock e infectados. El contenido proteico de las fracciones correspondientes a los complejos indicados se concentró mediante precipitación con metanol-cloroformo y se sometió a electroforesis SDS-PAGE 10% para luego teñir los geles con azul Coomassie a fin de estimar la proporción relativa de proteína entre los complejos ribosomales.

Las muestras de proteína también se sometieron a electroforesis SDS-PAGE 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a fin de realizar pruebas de Western blot contra proteínas estructurales de rotavirus. Dado que todos los complejos ribosomales poseen la subunidad 40S, para cargar cantidades similares de complejos 48S y polisomas que pudiesen estimarse por simple inspección visual se empleó como control de carga la proteína ribosomal de la subunidad pequeña rpS6 (S6).

Teniendo en cuenta que los perfiles obtenidos mediante la tinción con azul Coomassie muestran mayor cantidad de proteína total en los complejos 48S que en los polisomas, se decidió entonces cargar en los carriles 48S la cuarta parte del volumen cargado en los polisomas, estimando que de esta manera se lograría “equilibrar” la cantidad de proteína de la subunidad ribosomal 40S (Figura 12). Sin embargo, el Western blot contra la proteína S6 detectó una señal muy débil en los carriles 48S, lo cual parece sugerir que la interpretación derivada de los geles teñidos con azul Coomassie con respecto a la cantidad de proteína de la subunidad ribosomal 40S no fue acertada.

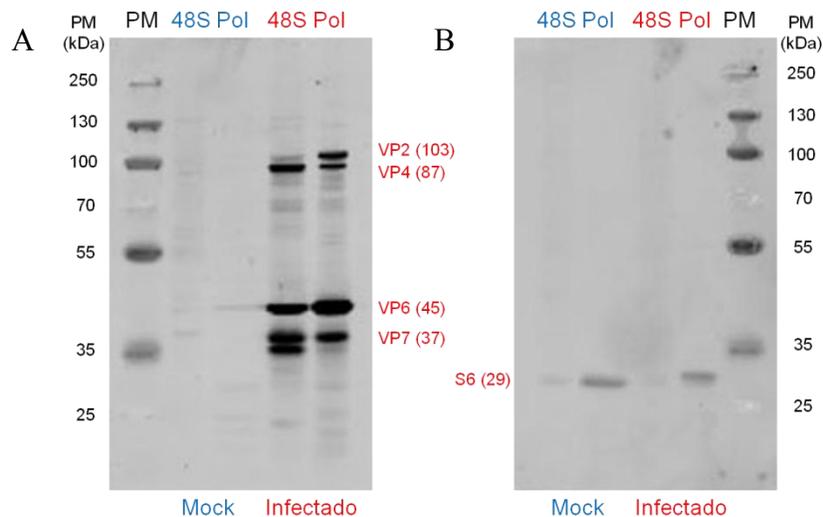


Figura 12. Western blot contra proteínas estructurales de rotavirus en las fracciones de los complejos ribosomales. Se corrió un gel SDS-PAGE 10% en el que se cargó en los carriles 48S la cuarta parte del volumen de proteína cargado en los polisomas, buscando de esta manera “equilibrar” la cantidad de proteína de la subunidad ribosomal 40S en todas las fracciones, y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a fin de realizar pruebas de Western blot contra proteínas estructurales de rotavirus (A), y de manera paralela, contra la proteína S6 como control de carga (B). Tanto en los complejos 48S como en los polisomas se pudieron detectar las bandas correspondientes a las proteínas VP2, VP4, VP6 y VP7 (A), destacando la banda doble de la glicoproteína VP7 en los complejos 48S, probablemente efecto de su modificación postraduccional.

Se hizo entonces otro gradiente de sacarosa en el que se aisló el contenido proteico de las fracciones correspondientes a los complejos 48S y polisomas para luego cargar el mismo volumen en todos los carriles, lo cual permitió estimar que las fracciones no parecen tener diferencias notables en el contenido de proteína de la subunidad ribosomal 40S, pues la banda correspondiente a la proteína S6 aparece relativamente uniforme (Figura 13). Ambos experimentos mostraron en esencia el mismo patrón de bandas, un patrón que corresponde a las proteínas estructurales VP2, VP4, VP6 y VP7 tanto en los complejos 48S como en los polisomas, resultando en particular interesante la banda doble de la glicoproteína VP7 en los complejos 48S, probablemente debido a que se trata de una proteína que sufre procesamiento postraduccional mediante N-glicosilación ² (Figuras 12 y 13).

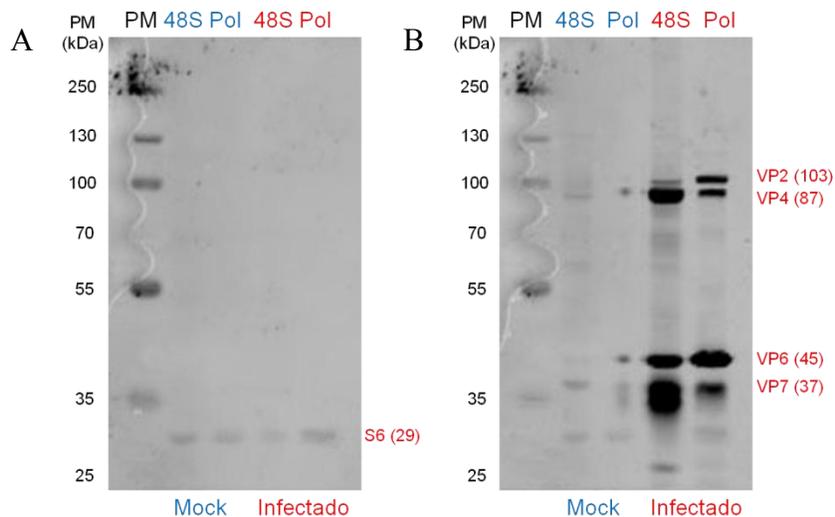


Figura 13. Western blot contra proteínas estructurales de rotavirus en las fracciones de los complejos ribosomales. Se corrió un gel SDS-PAGE 10% en el que se cargó el mismo volumen de proteína total en todos los carriles y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a fin de realizar pruebas de Western blot contra la proteína S6 como control de carga (A), y luego sobre la misma membrana, contra proteínas estructurales de rotavirus (B). Tanto en los complejos 48S como en los polisomas se pudieron detectar las bandas correspondientes a las proteínas VP2, VP4, VP6 y VP7 (B), destacando de nuevo la banda doble de la glicoproteína VP7 en los complejos 48S, probablemente efecto de su modificación postraducciona.

Para descartar que el patrón de proteínas estructurales detectado se debiera a partículas infecciosas que pudiesen migrar a la misma densidad de los complejos ribosomales aislados, se decidió determinar la presencia de estas partículas en las fracciones correspondientes tanto a los complejos 48S como a los polisomas mediante un ensayo de cuantificación de focos virales, lo cual reveló de manera inesperada la presencia de virus infeccioso en ambas fracciones del gradiente (Tabla 11).

Tabla 11. Presencia de partículas infecciosas en las fracciones de los complejos ribosomales.

Fracción	Título (ffu/mL)
48S	4.3×10^6
Pol	5.9×10^6

La cuantificación de focos virales en las fracciones de los lisados celulares infectados arrojó títulos en el orden de 10^6 (ffu: unidades formadoras de foco).

6.2.3. Análisis de proteínas en fracciones individuales

Considerando la presencia de partículas infecciosas tanto en las fracciones de los complejos 48S como en los polisomas, se optó entonces por correr un gradiente de sacarosa a fin de aislar y analizar el contenido proteico de fracciones individuales. Se muestran los perfiles ribosomales y los perfiles de RNA que permiten confirmar que en este gradiente, los complejos 48S se encuentran entre las fracciones 5-7, los ribosomas 80S entre las fracciones 8-9 y los polisomas entre las fracciones 13-19 (Figura 14).

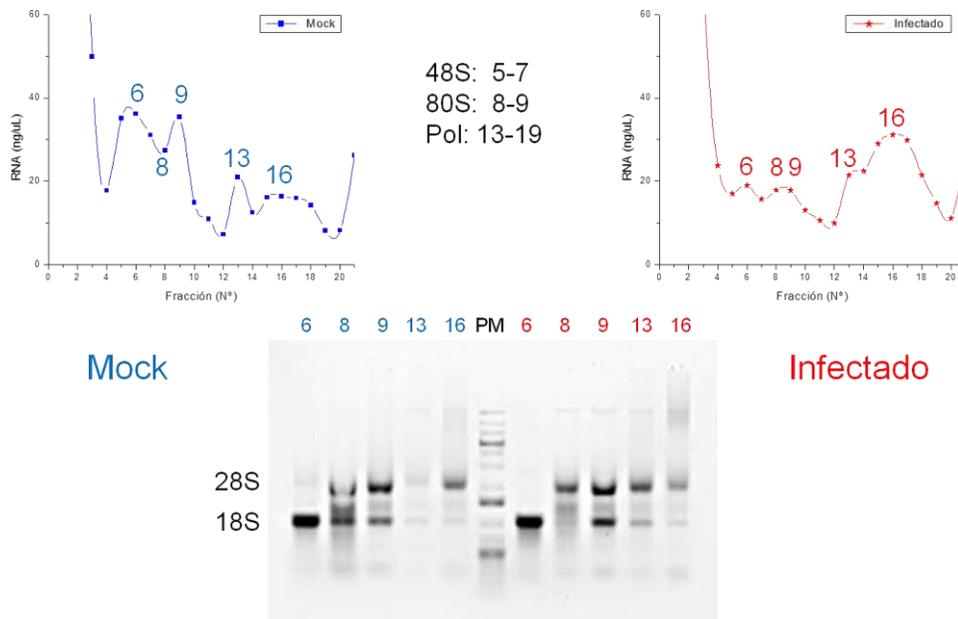


Figura 14. Perfiles ribosomales y de RNA de fracciones mock e infectadas. Se aisló el RNA de las fracciones indicadas mediante extracción con fenol-cloroformo y se sometió a electroforesis en gel de agarosa 1%, obteniéndose un patrón de bandas típico en el que pueden identificarse los rRNAs 18S y 28S (abajo), que corresponden a las subunidades 40S y 60S respectivamente. El análisis conjunto con los perfiles ribosomales (arriba), indica que en este gradiente los complejos 48S se encuentran entre las fracciones 5-7, los ribosomas 80S entre las fracciones 8-9 y los polisomas entre las fracciones 13-19.

El análisis mediante Western blot reveló nuevamente la presencia de proteínas estructurales en todas las fracciones analizadas, destacando otra vez la banda doble de la glicoproteína VP7 en las fracciones correspondientes a los complejos 48S (Figura 15). Sobre la misma membrana, también se realizó un Western blot contra la proteína no estructural NSP2 que permitió ver una banda intensa en los complejos 48S y tenue en los ribosomas 80S (Figura 16).

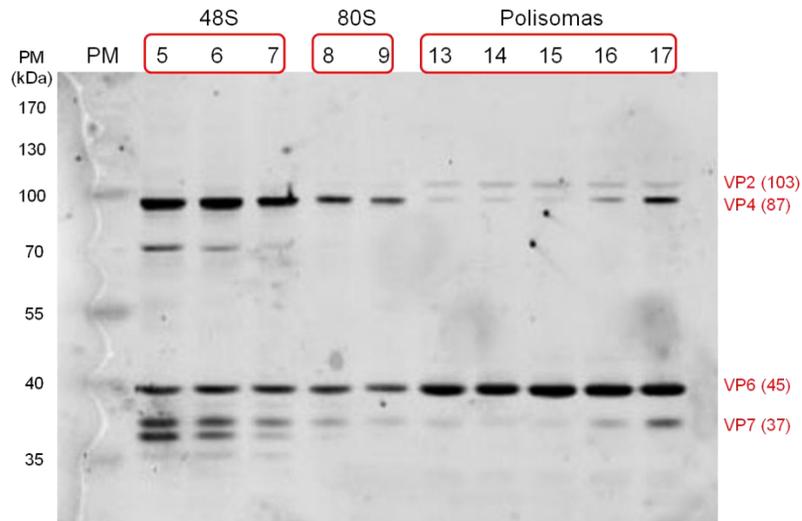


Figura 15. Western blot contra proteínas estructurales de rotavirus en las fracciones de los complejos ribosomales. Se corrió un gel SDS-PAGE 10% en el que se cargó el mismo volumen de proteína de cada una de las fracciones indicadas y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a fin de analizar mediante un Western blot contra proteínas estructurales de rotavirus. La prueba reveló un patrón de bandas diferenciado en todas las fracciones analizadas de los distintos complejos ribosomales que corresponde a las proteínas VP2, VP4, VP6 y VP7, destacando otra vez la banda doble de la glicoproteína VP7 en las fracciones correspondientes al complejo 48S.

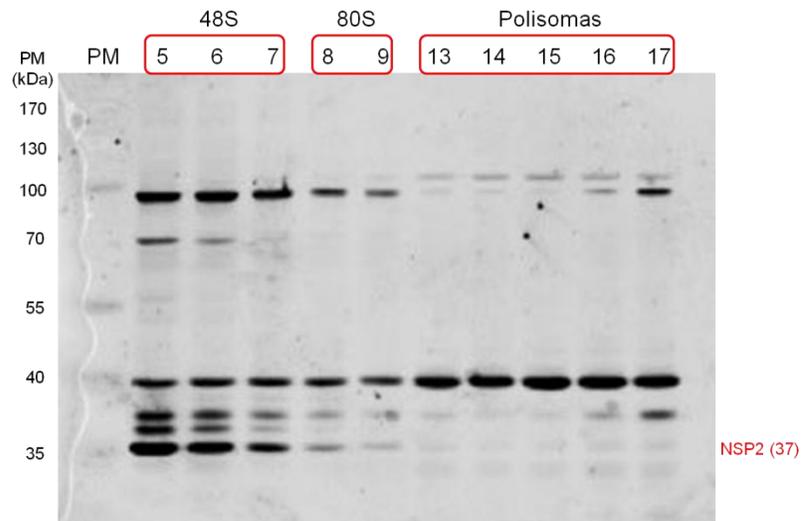


Figura 16. Western blot contra la proteína no estructural NSP2. Sobre la misma membrana en la que se detectaron las proteínas estructurales (Fig. 15), se realizó un Western blot contra la proteína no estructural NSP2 que permitió detectar una banda intensa en las fracciones correspondientes a los complejos 48S, aunque también pudo verse una banda tenue en las fracciones de los ribosomas 80S.

También se cuantificaron los focos virales y se pudo detectar partículas infecciosas en todas las fracciones analizadas (Tabla 12). Sin embargo, no se logró cuantificar los focos virales en el lisado infectado total (input del gradiente) debido a su elevado número.

Tabla 12. Presencia de partículas infecciosas en las fracciones de los complejos ribosomales.

Fracción		Título (ffu/mL)
48S	5	3.8×10^5
	6	5.7×10^5
	7	7.2×10^5
80S	9	7.4×10^5
Pol	15	1.2×10^5
	16	2.6×10^5
	17	4.5×10^5
Lisado total		?

La cuantificación de focos virales en las fracciones de lisados infectados arrojó títulos en el orden de 10^5 , mientras que en el lisado infectado total no se logró cuantificar debido a su elevado número (ffu: unidades formadoras de foco).

6.2.4. Análisis comparativo lisados mock con TLPs purificadas - lisados infectados

Dada la presencia reiterada de partículas infecciosas en las fracciones colectadas de los gradientes de sacarosa, se decidió correr un gradiente que permitiera identificar las fracciones a las cuales migran las partículas virales. Para este propósito se mezclaron 200 μ L TLPs purificadas con un lisado de células mock inmediatamente antes de cargar los gradientes, a fin de realizar un análisis comparativo con un lisado de células infectadas. Se muestran los perfiles ribosomales y los perfiles de RNA que permiten confirmar que en este gradiente, los complejos 48S se encuentran entre las fracciones 5-6, los ribosomas 80S entre las fracciones 8-10 y los polisomas entre las fracciones 13-19 (Figura 17).

La cuantificación de los focos virales tanto en las fracciones de los lisados mock+TLPs seleccionadas como en las fracciones de lisados infectados correspondientes, permitió observar que en las dos fracciones mock+TLPs de menor densidad (5 y 6) no se logró detectar focos virales, mientras que en todas las contrapartes infectadas se detectaron focos y se obtuvieron mayores valores de título (Tabla 13). También se pudo cuantificar los focos virales

en el lisado total mock+TLPs, mientras que a la dilución efectuada no se logró cuantificar los focos virales en el lisado total infectado debido a su alta concentración.

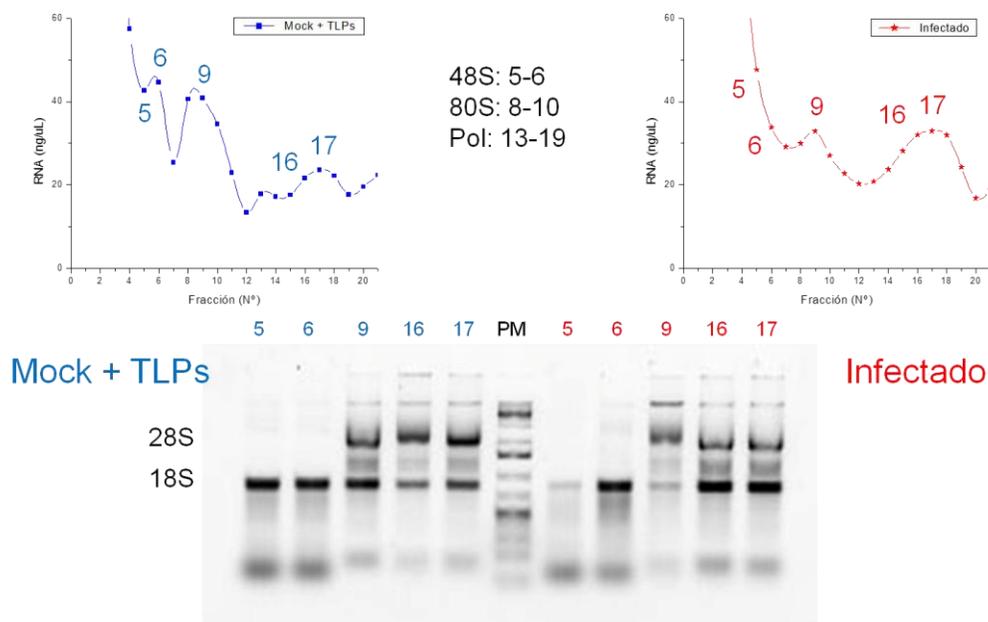


Figura 17. Perfiles ribosomales y de RNA de fracciones mock+TLPs e infectadas. Se aisló el RNA de las fracciones indicadas mediante extracción con fenol-clorofórmico y se sometió a electroforesis en gel de agarosa 1%, obteniéndose un patrón de bandas típico en el que pueden identificarse los rRNAs 18S y 28S (abajo), que corresponden a las subunidades 40S y 60S respectivamente. El análisis conjunto con los perfiles ribosomales (arriba), indica que en este gradiente los complejos 48S se encuentran entre las fracciones 5-6, los ribosomas 80S entre las fracciones 8-10 y los polisomas entre las fracciones 13-19.

Tabla 13. Presencia de partículas infecciosas en las fracciones de los complejos ribosomales.

Mock+TLPs			Infectado		
Fracción		Título (ffu/mL)	Fracción		Título (ffu/mL)
48S	5	0	48S	5	6.8×10^5
	6	0		6	6.8×10^5
80S	9	3.5×10^4	80S	9	2.1×10^6
Pol	16	1.3×10^5	Pol	16	1.2×10^6
	17	1.4×10^5		17	9.9×10^5
Lisado total		8.7×10^5	Lisado total		?

La cuantificación de focos virales en las fracciones de lisados mock+TLPs no detectó partículas infecciosas en las dos fracciones de menor densidad (5 y 6), mientras que en todas las contrapartes infectadas arrojó mayores valores de título, además de que en el lisado total infectado no se logró cuantificar debido a su alta concentración (ffu: unidades formadoras de foco).

6.2.5. Análisis de proteínas no estructurales

Resulta evidente que la presencia de partículas infecciosas en las fracciones colectadas de los gradientes dificulta el análisis de proteínas estructurales, pues a tales partículas bien pueden atribuirse las proteínas estructurales detectadas, aunque realizando simples cálculos estequiométricos con base en los números de moléculas por virión reportados en la literatura (Tabla 4)^{1,4}, podría discutirse que los patrones de bandas obtenidos mediante Western blot no corresponden solamente a partículas infecciosas. De cualquier manera, en las mismas fracciones en las que se detectaron focos virales se optó por analizar la presencia de proteínas no estructurales mediante pruebas de Western blot dirigido contra las proteínas NSP2, NSP3 y NSP5, aunque también se consideraron la proteína estructural VP2 y la fosfatasa celular PP1.

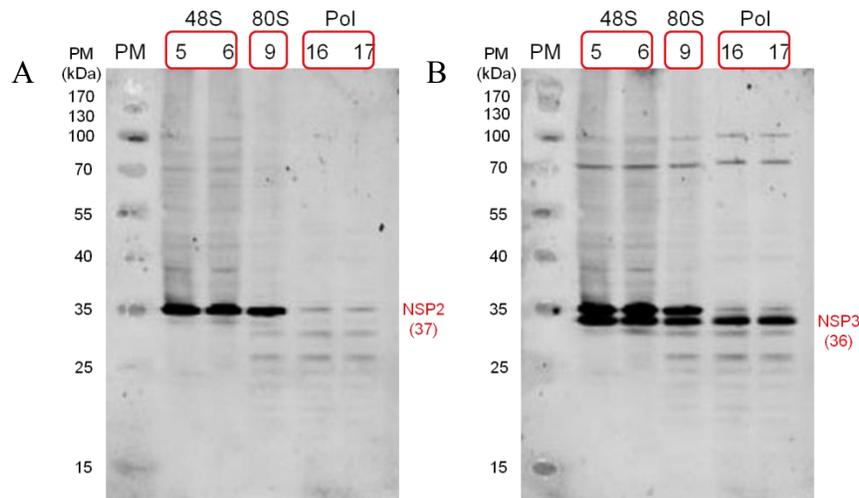


Figura 18. Western blot contra las proteínas no estructurales NSP2 y NSP3. El contenido proteico de las fracciones indicadas se concentró mediante precipitación con metanol-cloroformo, se separó mediante electroforesis SDS-PAGE 12.5% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a fin de analizar mediante pruebas de Western blot, el primero dirigido contra NSP2 (A), y después sobre la misma membrana contra NSP3 (B).

El análisis mediante Western blot sobre la misma membrana, permitió detectar bandas bien definidas de las proteínas NSP2 y NSP5 en las fracciones correspondientes a los complejos 48S y 80S, pudiéndose ver la doble banda con barrido característica de la fosfoproteína NSP5, mientras que la banda de la proteína NSP3 apareció relativamente uniforme en todas las fracciones de los distintos complejos ribosomales (Figuras 18 y 19). Considerando el bajo

peso molecular de las proteínas no estructurales analizadas (22-37 kDa), parece muy probable que deban estar asociadas de alguna manera a estructuras macromoleculares que les permita migrar a mayores densidades. Puede notarse incluso que la proteína NSP3, la cual se ha demostrado que se une específicamente al factor eIF4G⁴⁶, está presente aun en altos valores de densidad (Figura 18).

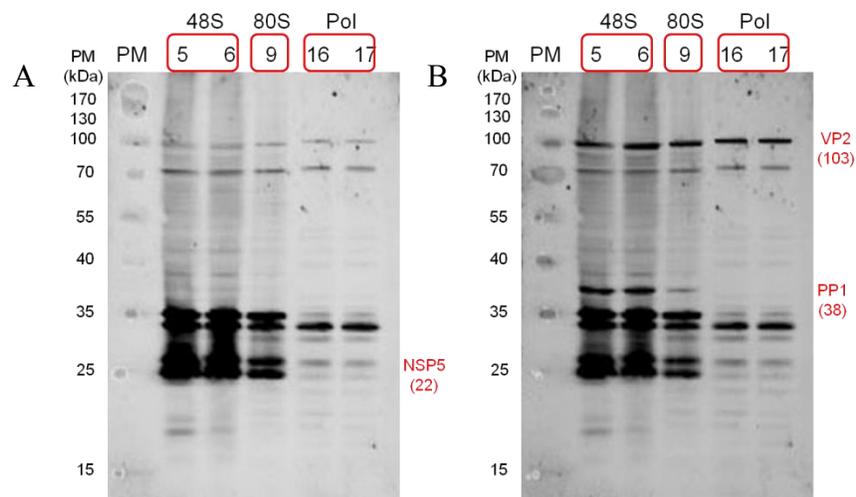


Figura 19. Western blot contra las proteínas virales NSP5 y VP2, y la fosfatasa celular PP1. Sobre la misma membrana revelada en la Fig. 18, se realizaron pruebas de Western blot contra NSP5 (A), y luego de manera simultánea contra la proteína estructural VP2 y la fosfatasa celular PP1 (B).

La proteína NSP2 se encuentra involucrada en la replicación y empaquetamiento del genoma, y junto con NSP5 tiene una función esencial en la formación de viroplasmos, inclusiones citoplásmicas donde se lleva a cabo la replicación del RNA viral²⁻⁴. Se sabe que NSP2 puede formar octámeros, los cuales tienen un peso molecular aproximado de 300 kDa y alcanzan un coeficiente de sedimentación 12S⁴⁷, pero aun así, los octámeros de NSP2 por si solos no podrían migrar a la densidad de los complejos ribosomales. Resulta además muy interesante que ambas proteínas involucradas en la formación de viroplasmos (NSP2 y NSP5) puedan detectarse en los complejos 48S y 80S (Figuras 18 y 19).

Considerando que las proteínas NSP2 y NSP5 presentan motivos de interacción con PP1 (Tabla 8), se decidió efectuar sobre la misma membrana, un Western blot dirigido contra la fosfatasa para determinar si se encontraba en las mismas fracciones. Pese a la detección de partículas infecciosas en todas las fracciones contempladas, también se realizó una prueba de

Western blot contra VP2 empleando un anticuerpo monoclonal (Tabla 2), dado que se trata de una proteína estructural que posee un motivo de unión a eIF4E (Tabla 7), y es una buena candidata a tener un papel relevante en el inicio de la traducción viral.

Se encontró que la proteína VP2 se distribuye de manera relativamente uniforme en todas las fracciones analizadas (Figura 19), en claro contraste con lo observado en el Western blot empleando un anticuerpo α -TLPs (Figura 15) y la cuantificación de focos virales (Tabla 13), lo cual parece confirmar que el patrón de proteínas estructurales no corresponde solamente a partículas infecciosas. El análisis cuantitativo de las bandas detectadas con el anticuerpo α -TLPs (Figura 15), en conjunto con los títulos virales (Tablas 12 y 13) y los números de moléculas por virión reportados en la literatura (Tabla 4) ^{1,4}, quizás permitirían estimar la proporción de proteínas estructurales que no están ensambladas en las partículas infecciosas.

La fosfatasa celular PP1 solamente se detectó en las fracciones correspondientes a los complejos 48S y 80S, si bien en la fracción 80S la banda se observó muy tenue (Figura 19), un resultado muy sugerente considerando que se encuentra en las mismas fracciones que NSP2 y NSP5, dos proteínas que poseen motivos de interacción con PP1 (Tabla 8).

La presencia de la fosfatasa PP1 en los complejos 48S y 80S motivó la idea de aislar más proteína de las mismas fracciones infectadas, así como también de las fracciones mock+TLPs correspondientes, dado que a estas fracciones solo se les agregó TLPs purificadas de manera previa a la corrida del gradiente, y por lo tanto se trata de un lisado de células que no sufrieron el proceso de infección.

El análisis mediante Western blot permitió detectar bandas uniformes y bien definidas de la fosfatasa PP1 en los complejos 48S tanto de las fracciones mock+TLPs como de las infectadas correspondientes, aunque de nuevo también pudo verse una banda muy débil en los ribosomas 80S de las fracciones infectadas (Figura 20). Estas observaciones sugieren que la presencia de la fosfatasa PP1 en estas fracciones es independiente del proceso de infección.

Teniendo en cuenta que GADD34 es una conocida subunidad regulatoria de PP1, se decidió realizar sobre la misma membrana una prueba de Western blot para determinar las fracciones

en las cuales se encontraba esta proteína. Si bien el anticuerpo policlonal dirigido contra GADD34 reconoce otros blancos, GADD34 se detectó en los complejos 48S tanto de las fracciones mock+TLPs como de las infectadas, y también se pudo ver en los ribosomas 80S de las fracciones infectadas, un patrón de migración en las fracciones muy similar al mostrado por la subunidad catalítica PP1 como cabe esperar de una subunidad regulatoria (Figura 21).

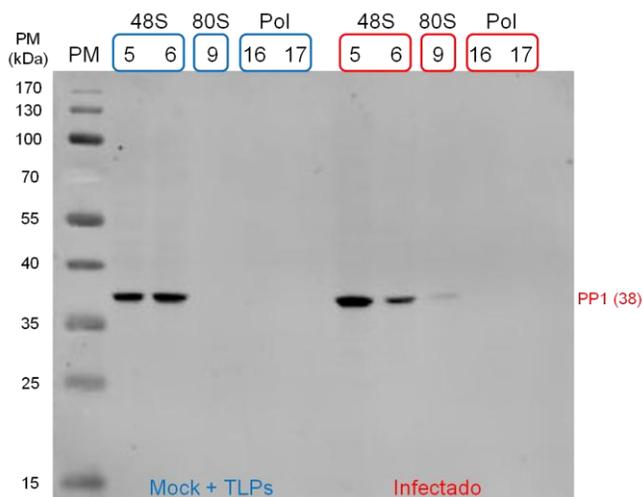


Figura 20. Western blot contra la fosfatasa celular PP1. El contenido proteico de las fracciones indicadas se concentró mediante precipitación con metanol-cloroformo, se separó mediante electroforesis SDS-PAGE 12.5% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a fin de analizar mediante un Western blot dirigido contra la fosfatasa celular PP1.

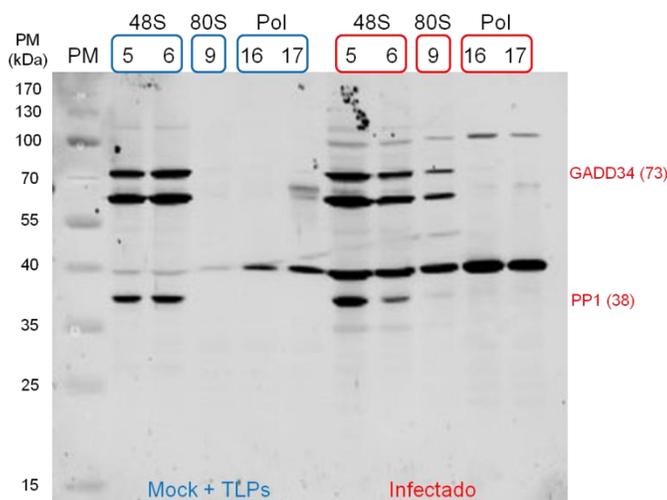


Figura 21. Western blot contra la subunidad regulatoria GADD34. Sobre la misma membrana revelada en la Fig. 20, se realizó un Western blot dirigido contra la proteína GADD34, una conocida subunidad regulatoria de la fosfatasa celular PP1.

6.3. Interacciones entre Proteínas Virales y la Fosfatasa Celular PP1

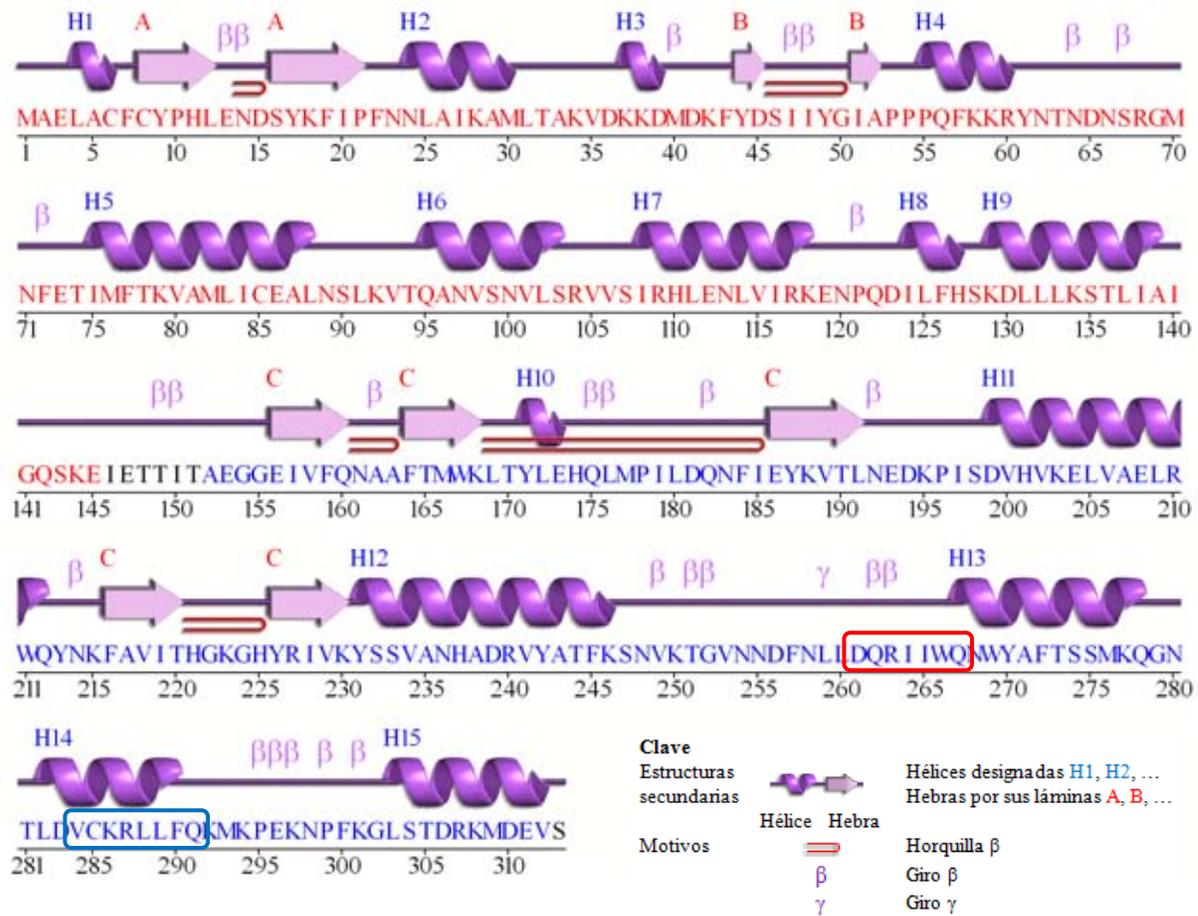
Considerando que según el análisis bioinformático cuatro proteínas estructurales (VP1, VP3, VP6 y VP7) y tres proteínas no estructurales (NSP1, NSP2 y NSP5) de rotavirus RRV poseen motivos de interacción con la fosfatasa celular PP1, se decidió entonces generar una proteína PP1 recombinante que permitiera realizar ensayos de pull-down a fin de evaluar *in vitro* sus probables interacciones con proteínas virales.

Si bien el análisis *in silico* reveló la presencia del motivo de interacción con PP1 en tres proteínas no estructurales, la atención se dirigió especialmente a NSP2, una proteína cuya secuencia de aminoácidos presenta dos motivos de interacción con PP1, uno entre los residuos 261-267 (DQRVIWQ), y otro entre los residuos 284-291 (ICKKLLFQ) que arrojó dos lecturas debido a la presencia de dos lisinas consecutivas que pueden situarse en la posición altamente conservada, y a que el motivo admite un gap de un residuo entre esta posición y el residuo poco variable que sigue en la secuencia que define al motivo (Tabla 8, Figura 22).

Además, se ha mostrado que la proteína NSP2 tiene algún papel en inducir o mantener el estado de fosforilación de eIF2 α ¹⁵, y a diferencia de NSP5, el alineamiento de secuencias de distintas cepas de rotavirus reveló que sus motivos están altamente conservados (Anexo 6), resultando particularmente interesante el motivo que yace entre los residuos aminoácidos 261-267 debido a que se encuentra expuesto en un giro β de la estructura molecular de NSP2 determinada por cristalografía de rayos X (Figuras 22 y 23)⁴⁸.

A partir de bacterias transformadas *E. coli* BL21(DE3) se obtuvieron las tres proteínas recombinantes con las que se llevaron a cabo los ensayos de pull-down iniciales: la fosfatasa PP1 fusionada a la enzima glutatión S-transferasa (GST-PP1) en el extremo N-terminal y la proteína GST como su control de unión, y la fosfatasa PP1 fusionada a un tag de histidinas (PP1-H₆) en el extremo N-terminal (Tabla 3).

Finalmente, para confirmar los resultados obtenidos con la proteína recombinante PP1-H₆ se produjo una proteína NSP2 recombinante fusionada a un tag de histidinas (NSP2-H₆) en el extremo N-terminal (Tabla 3), también con bacterias transformadas *E. coli* BL21(DE3).



MAELACFCYPHLEND^ASYR^AFIPFNSLAIKCMLTA^AKVDK^AKKDQDKFYNSIIYGIAPP^BPQFKKRYNTNDNSRGMNYETPMFNKVAVLICEALNSIKV^BTQSDVANVLSKVVS^BVRHLENL^BVLRRENHQDVL^BFHSKELVLKSVLIAIGHSKEIETTATAEGGEIVFQNA^CAFTM^CWKLTYLEHRLMPILDQNFIEYKITYNEDKPISESHVKELIAELRWQYNKFAVITHGKGHYRVVKYSSVANHADR^CVYATFKSNNKNGNVLEFNLL^CDQR^CVIWQ^CNWYAFTSSMKQGN^CTLE^CICK^CKLLFQ^CKMKRESNPFKGLSTDRKMDEVSQIGI

Figura 22. Motivos de interacción con PP1 en la proteína viral NSP2. Se resaltan los dos probables motivos de unión a PP1 que arrojó el análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la proteína no estructural NSP2 (abajo), uno entre los residuos 261-267 (rojo) y otro entre los residuos 284-291 (azul). También se muestra un diagrama (arriba) en el que se representan las estructuras secundarias de NSP2 (PDBsum 1L9V) organizadas en sus dos dominios, N-terminal y C-terminal, los cuales están separados por un loop de 10 aminoácidos entre los residuos 141-151, señalando en el dominio C-terminal los motivos de unión a PP1 con recuadros del color respectivo. El motivo que yace entre los residuos 261-267 (rojo) resulta particularmente interesante debido a que se encuentra expuesto en un giro β de la estructura molecular de NSP2 determinada por cristalografía de rayos X.



Figura 23. Estructura molecular de la proteína viral NSP2 (PDB 1L9V)⁴⁸. Se muestra el diagrama de cintas de la estructura molecular de NSP2 determinada por cristalografía de rayos X, destacando con una circunferencia roja el giro β en el que se encuentra el probable motivo de interacción con PP1.

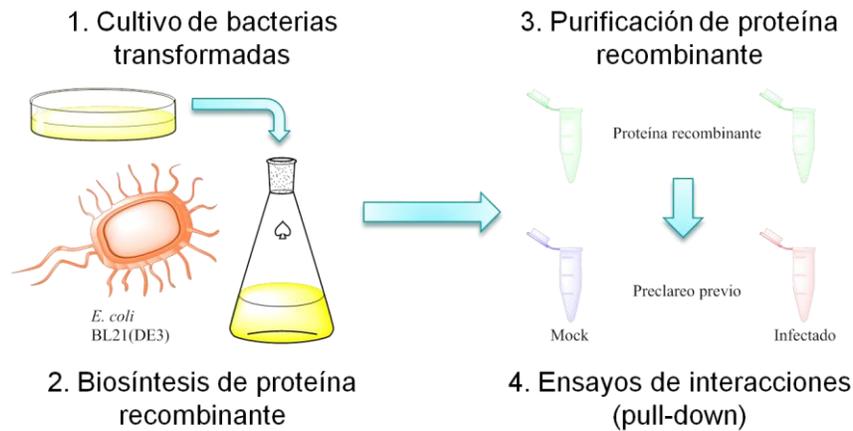


Figura 24. Análisis de probables interacciones entre NSP2 y PP1. Bacterias transformadas *E. coli* que expresan la proteína recombinante se cultivaron, cosecharon y lisaron para purificar la proteína por su afinidad con resina glutatión-agarosa (GST-tag) o Ni-agarosa (His-tag). La proteína recombinante se incubó durante 18 h a 4 °C con lisados preclareados de células sin infectar (mock) o infectadas con rotavirus RRV (MOI 5), cosechadas 6 hpi. Finalmente, la resina se centrifugó, se lavó varias veces y se eluyó para luego someter las distintas fracciones a electroforesis SDS-PAGE por duplicado a fin de efectuar el análisis correspondiente mediante tinción con azul Coomassie y pruebas de Western blot.

6.3.1. Interacciones con GST-PP1

El primer enfoque para determinar probables interacciones de PP1 con proteínas virales se realizó empleando una proteína recombinante fusionada a la enzima glutatión S-transferasa (GST-PP1) purificada y fijada a resina glutatión-agarosa, siguiendo un proceso que puede resumirse en cuatro etapas (Figura 24), preclareando de manera previa los lisados de células y eluyendo con glutatión reducido 10 mM al final de los ensayos de pull-down (el procedimiento detallado se describe en la sección de Materiales y Métodos).

Aunque el perfil de purificación de GST-PP1 mostró reiteradamente que la mayor parte se queda como cuerpos de inclusión en el pellet, se logró obtener proteína del sobrenadante y se dejó fijada a la resina glutatión-agarosa para realizar los ensayos de pull-down con lisados celulares tanto mock como infectados (Figura 25).

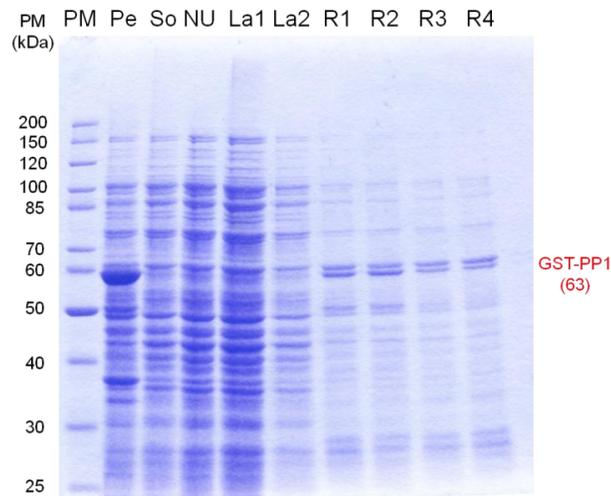


Figura 25. Perfil de purificación de GST-PP1. Bacterias transformadas *E. coli* que expresan GST-PP1 se cultivaron, cosecharon y lisaron para purificar la proteína recombinante por su afinidad con resina glutatión-agarosa. Las fracciones indicadas se sometieron a electroforesis SDS-PAGE 10%, seguida de la tinción del gel con azul Coomassie. Aunque la mayor parte se queda como cuerpos de inclusión en el pellet, se logró obtener proteína GST-PP1 del sobrenadante y se dejó fijada a la resina en 4 tubos (R1-R4) para efectuar los ensayos de pull-down con lisados celulares tanto mock como infectados (PM: peso molecular, Pe: pellet, So: sobrenadante, NU: no unido, La1: lavado 1, La2: lavado 2, R1: resina 1, R2: resina 2, R3: resina 3, R4: resina 4).

La identidad de la proteína fijada a la resina se confirmó mediante dos pruebas de Western blot realizadas en paralelo, una dirigida contra GST y otra dirigida contra PP1 (Figura 26).

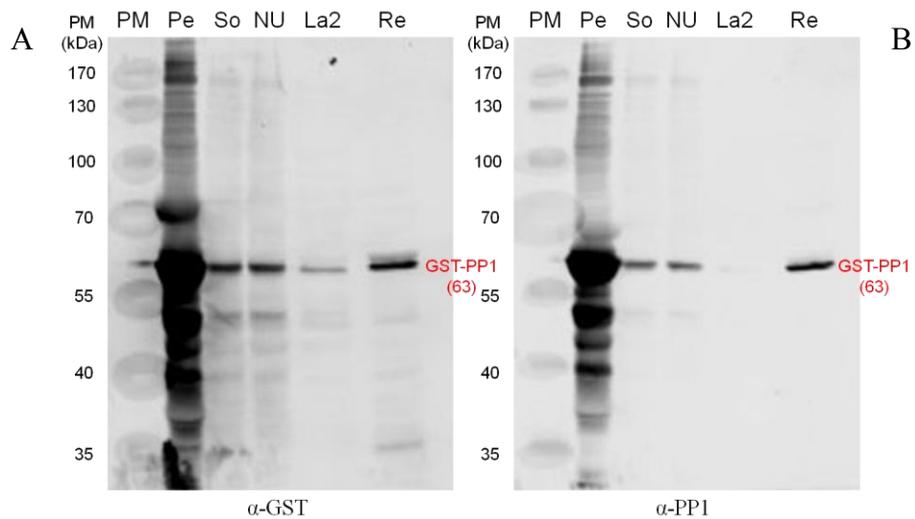


Figura 26. La proteína purificada es GST-PP1. Las fracciones indicadas se sometieron a electroforesis SDS-PAGE 10%, seguida de la transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa a fin de realizar dos pruebas de Western blot en paralelo, una dirigida contra GST (A), y otra dirigida contra PP1 (B). A manera de control se cargaron muestras de pellet, sobrenadante, no unido y lavado (PM: peso molecular, Pe: pellet, So: sobrenadante, NU: no unido, La2: lavado 2, Re: resina).

La proteína GST-PP1 fijada a la resina se incubó con lisados celulares tanto mock como infectados, preclareados previamente con resina glutatión-agarosa. Las fracciones de interés se sometieron a electroforesis SDS-PAGE 10% por duplicado empleando un control positivo de presencia de la proteína (GST-PP1 fijada a la resina), de tal manera que un gel se tiñó con azul Coomassie y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para efectuar el análisis mediante pruebas de Western blot.

El perfil de probables interacciones obtenido mediante tinción con azul Coomassie no mostró diferencias significativas entre las muestras mock y las infectadas que pudiesen sugerir interacciones con alguna proteína viral, especialmente si se observa que los carriles correspondientes a los eluidos carecen de bandas evidentes (Figura 27). No obstante, a manera de control se realizó un Western blot dirigido contra GADD34, la conocida subunidad regulatoria de PP1, cuya señal se pudo detectar en el preclareado, no unido y resina final (después de eluir), tanto de las muestras mock como infectadas, aunque el anticuerpo policlonal empleado reconoce otros blancos (Figura 28). La señal no se detectó en los eluidos correspondientes como se esperaba de una subunidad regulatoria.

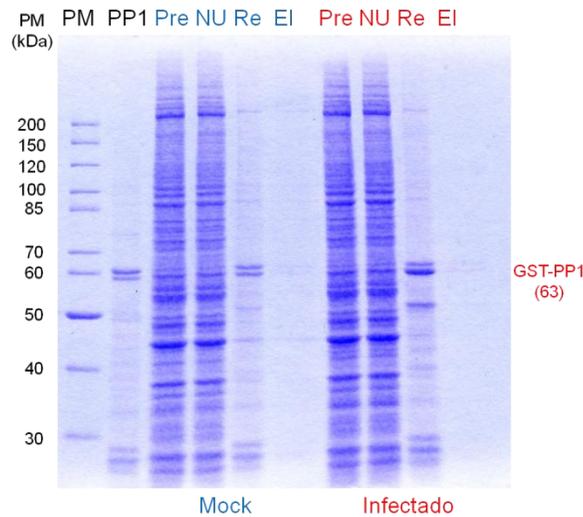


Figura 27. Perfil de probables interacciones entre proteínas virales y GST-PP1. La proteína GST-PP1 fijada a la resina se incubó durante 18 h a 4 °C con lisados de células mock o infectadas con rotavirus RRV (MOI 5), cosechadas 6 hpi, preclareando de manera previa con resina glutatión-agarosa. La resina se centrifugó, se lavó varias veces y se eluyó con glutatión reducido 10 mM para después someter las fracciones indicadas a electroforesis SDS-PAGE 10%, seguida de la tinción del gel con azul Coomassie. A manera de control se cargó proteína GST-PP1 fijada a la resina (PM: peso molecular, PP1: proteína fijada, Pre: preclareado, NU: no unido, Re: resina, El: eluido).

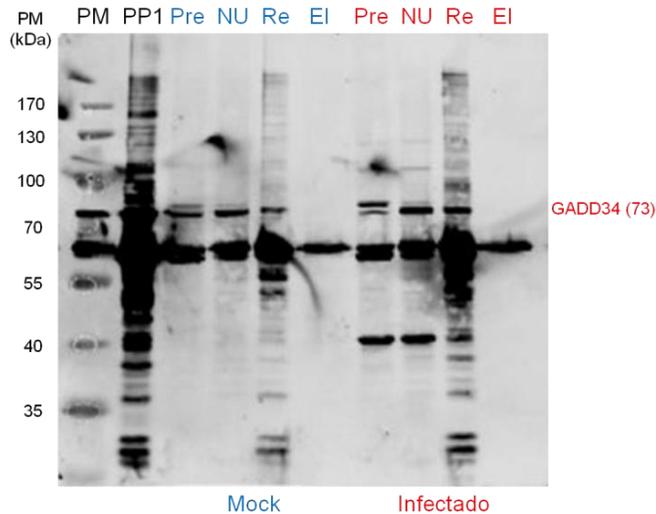


Figura 28. Western blot contra la subunidad regulatoria GADD34. La proteína GST-PP1 fijada a la resina se incubó durante 18 h a 4 °C con lisados de células mock o infectadas con rotavirus RRV (MOI 5), cosechadas 6 hpi, preclareando de manera previa con resina glutatión-agarosa. La resina se centrifugó, se lavó varias veces y se eluyó con glutatión reducido 10 mM para después someter las fracciones indicadas a electroforesis SDS-PAGE 10%, seguida de la transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa a fin de analizar mediante un Western blot dirigido contra GADD34. A manera de control se cargó proteína GST-PP1 fijada a la resina (PM: peso molecular, PP1: proteína fijada, Pre: preclareado, NU: no unido, Re: resina, El: eluido).

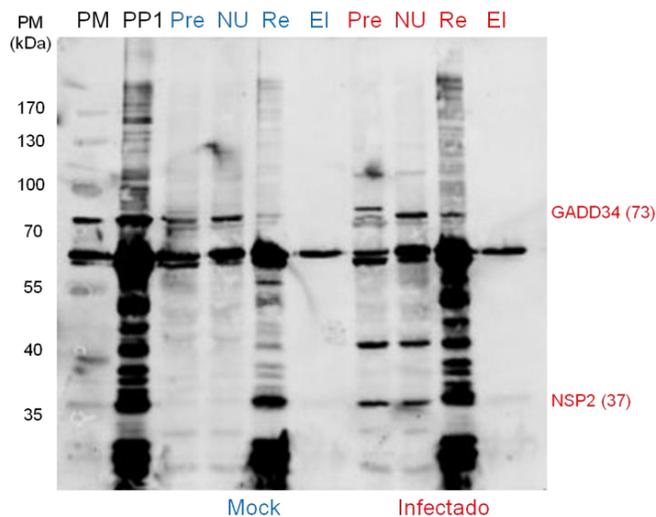


Figura 29. Western blot contra la proteína no estructural NSP2. Sobre la misma membrana revelada en la Fig. 28, se realizó un Western blot dirigido contra NSP2 (PM: peso molecular, PP1: proteína fijada, Pre: preclareado, NU: no unido, Re: resina, El: eluido).

El Western blot contra NSP2 sobre la misma membrana reveló la presencia de la proteína en el preclareado y no unido de las muestras infectadas, pero su presencia en la resina no se pudo confirmar debido a una banda situada en la misma posición en su contraparte mock. Tampoco se detectó señal de NSP2 en el eluido, resultados que sugieren una elusión fallida de la resina o muy probablemente la precipitación de la proteína GST-PP1, lo que habría conllevado la pérdida de su funcionalidad.

6.3.2. Interacciones con GST y GST-PP1

Para descartar cualquier posible interacción de proteínas de origen celular o viral con GST, el segundo enfoque para determinar probables interacciones entre PP1 y proteínas virales se realizó con la proteína recombinante fusionada a GST (GST-PP1) purificada y fijada a resina glutatión-agarosa, siguiendo el proceso de cuatro etapas (Figura 24), pero empleando la proteína GST recombinante (no fusionada) purificada y fijada a resina glutatión-agarosa como control de unión en el preclareo previo de los lisados de células.

El perfil de purificación de las proteínas permitió ver que GST es una proteína muy soluble que pudo obtenerse del sobrenadante en mayor cantidad que la proteína GST-PP1, la mayor

parte de la cual se queda como cuerpos de inclusión en el pellet (Figura 30). Se tuvo entonces que purificar más proteína GST-PP1 para realizar los ensayos de pull-down.

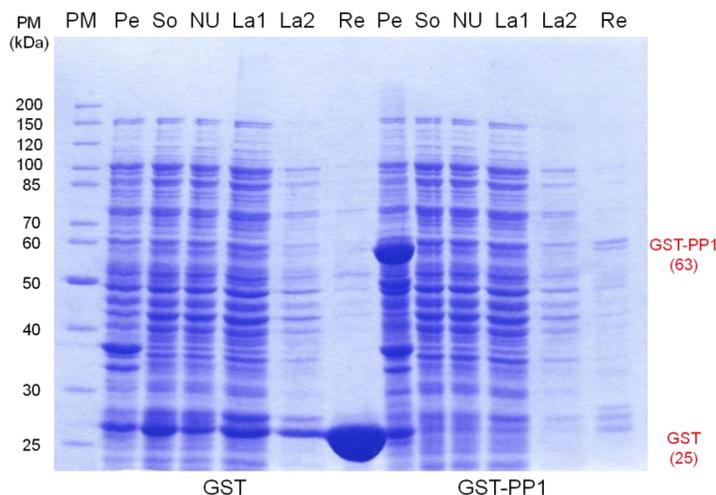


Figura 30. Perfil de purificación de GST y GST-PP1. Bacterias transformadas *E. coli* que expresan GST o GST-PP1 se cultivaron, cosecharon y lisaron para purificar ambas proteínas recombinantes por su afinidad con resina glutatión-agarosa. Las fracciones indicadas se sometieron a electroforesis SDS-PAGE 10%, seguida de la tinción del gel con azul Coomassie. Ambas proteínas se dejaron fijadas a la resina para efectuar los ensayos de pull-down con lisados celulares tanto mock como infectados (PM: peso molecular, Pe: pellet, So: sobrenadante, NU: no unido, La1: lavado 1, La2: lavado 2, Re: resina).

La proteína GST-PP1 fijada a la resina se incubó con lisados celulares tanto mock como infectados, preclareados previamente con GST. Las fracciones de interés se sometieron a electroforesis SDS-PAGE 10% por duplicado empleando un control positivo de presencia de la proteína (GST-PP1 fijada a la resina), de tal manera que un gel se tiñó con azul Coomassie y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para efectuar el análisis mediante pruebas de Western blot.

Aunque nuevamente el perfil de probables interacciones obtenido mediante tinción con azul Coomassie no mostró diferencias significativas entre las muestras mock y las infectadas, se realizó un Western blot dirigido contra NSP2. Desafortunadamente, la prueba mostró un patrón extraño que carece de relevancia (datos no mostrados), dado que ni siquiera pudo detectarse la señal correspondiente a NSP2 en el preclareado y por lo tanto no aportó dato alguno que pudiese sugerir interacciones entre esta proteína y la fosfatasa PP1.

6.3.3. Interacciones con PP1-H₆ fijada

Dado el problema de solubilidad de GST-PP1, el tercer enfoque para determinar probables interacciones de PP1 con proteínas virales se realizó empleando una proteína recombinante fusionada a un tag de histidinas (PP1-H₆) purificada y fijada a resina Ni-agarosa, siguiendo el proceso de cuatro etapas (Figura 24), preclareando de manera previa los lisados de células y eluyendo con EDTA 100 mM pH 8.0 al final de los ensayos de pull-down.

Si bien la identidad de la proteína fijada a la resina se confirmó mediante dos pruebas de Western blot realizadas en paralelo, una dirigida contra el tag de histidinas y otra dirigida contra PP1 (Figura 31), la mayor parte de la proteína PP1-H₆ seguía quedando como cuerpos de inclusión en el pellet. Considerando que el tag de histidinas permite la purificación de proteínas en condiciones desnaturizantes, se decidió entonces lisar las bacterias en un buffer desnaturizante con urea 8 M a fin de obtener una mayor cantidad de proteína para efectuar los ensayos de interacciones.

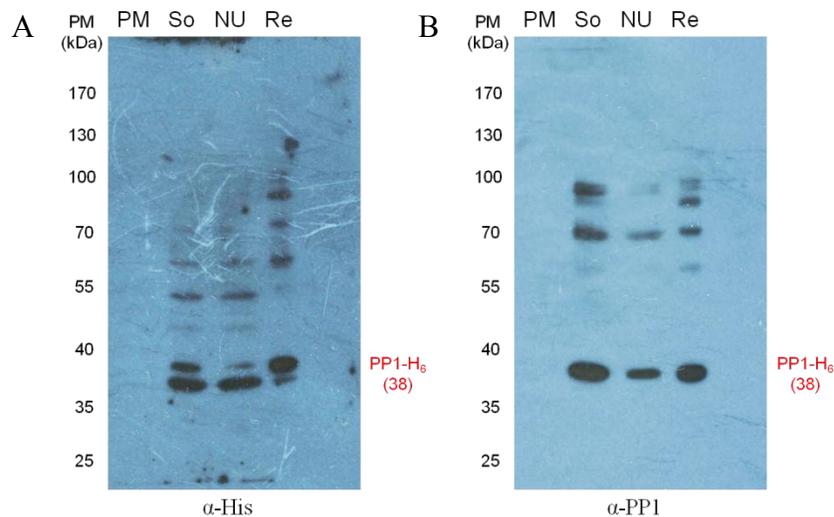


Figura 31. La proteína purificada es PP1-H₆. Las fracciones indicadas se sometieron a electroforesis SDS-PAGE 10%, seguida de la transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa a fin de realizar dos pruebas de Western blot en paralelo, una dirigida contra el tag His (A), y otra dirigida contra PP1 (B). A manera de control se cargaron muestras de sobrenadante y no unido (PM: peso molecular, So: sobrenadante, NU: no unido, Re: resina).

El perfil de purificación de PP1-H₆ en condiciones desnaturalizantes mostró que efectivamente se podía obtener mucha mayor cantidad de proteína (Figura 32). Sin embargo, es bien conocido que la función de las proteínas y sus interacciones moleculares dependen de la estructura terciaria, lo cual requiere que las proteínas se encuentren en su condición nativa. Por lo tanto, era necesario proceder al replegamiento de la proteína PP1-H₆ disminuyendo de manera gradual la concentración de urea.

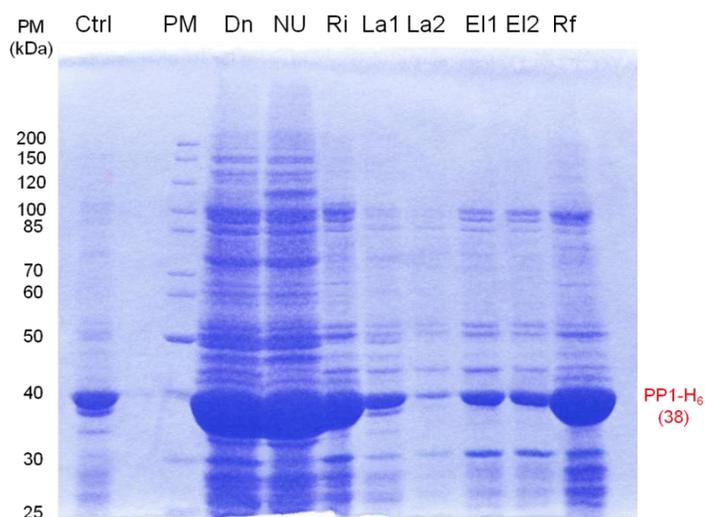


Figura 32. Perfil de purificación de PP1-H₆ en condiciones desnaturalizantes. Se pudo obtener una gran cantidad de proteína PP1-H₆ en condiciones desnaturalizantes, lisando las bacterias en buffer con urea 8 M (Dn) e incubando con resina Ni-agarosa durante 1 h a T_{amb} para luego lavar (La1, La2) y eluir (E11, E12) con descensos de pH. Se cargó una pequeña cantidad de proteína fijada a la resina antes (Ri) y después (Rf) de los lavados y eluciones. A manera de control (Ctrl) se puso una cantidad mínima de bacterias lisadas en buffer de carga (Ctrl: control, PM: peso molecular, Dn: desnaturalizado, NU: no unido, Ri: resina inicial, La1: lavado 1, La2: lavado 2, E11: eluido 1, E12: eluido 2, Rf: resina final).

La disminución gradual de la concentración de urea mostró que PP1-H₆ podía eluirse con imidazol 250 mM en presencia de urea 1 M, aunque la mayor parte de la proteína se quedaba en la resina (Figura 33). No obstante, se hizo una purificación y renaturalización completa de la proteína fijada a la resina llevándola con un gradiente escalonado hasta urea 0 M para luego realizar los ensayos de pull-down (Figura 34).

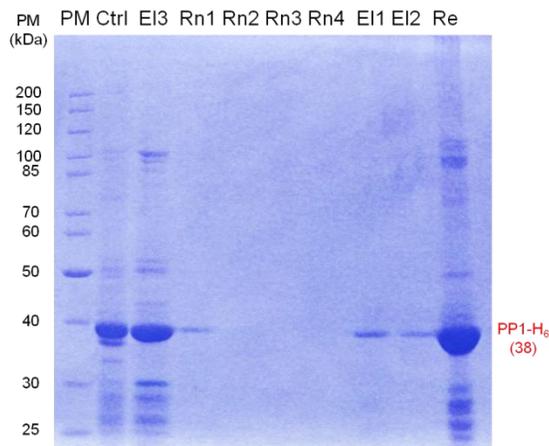


Figura 33. Perfil de purificación y renaturalización parcial de PP1-H₆. La proteína PP1-H₆ purificada en condiciones desnaturalizantes (Fig. 32) se eluyó por tercera vez en urea 8 M (EI3) y la que quedaba fijada a la resina se sometió a un gradiente escalonado de urea: 6 M (Rn1), 4 M (Rn2), 2 M (Rn3), 1 M (Rn4), para finalmente eluirla con imidazol 250 mM en urea 1 M (EI1, EI2). Si bien la proteína eluye en urea 1 M (EI1, EI2), puede notarse que la mayor parte queda en la resina (Re) y que evidentemente eluye mayor cantidad en urea 8 M (EI3). A manera de control (Ctrl) se puso una cantidad mínima de bacterias lisadas en buffer de carga (PM: peso molecular, Ctrl: control, EI3: eluido 3, Rn1: renaturalizado 1, Rn2: renaturalizado 2, Rn3: renaturalizado 3, Rn4: renaturalizado 4, EI1: eluido 1, EI2: eluido 2, Re: resina).

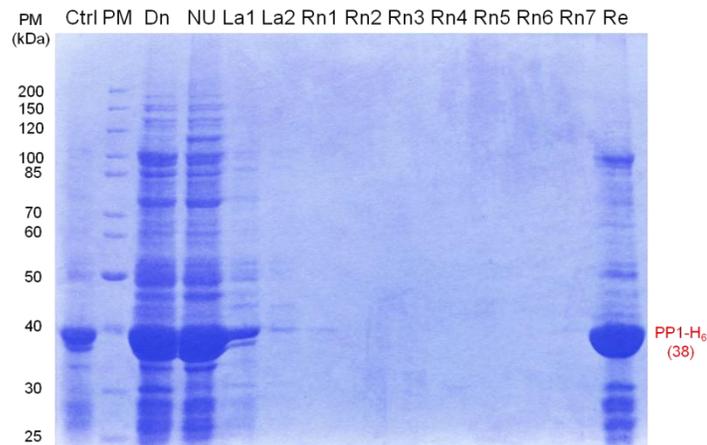


Figura 34. Perfil de purificación y renaturalización completa de PP1-H₆. Se pudo obtener proteína PP1-H₆ en condiciones desnaturalizantes, lisando las bacterias en buffer con urea 8 M (Dn) e incubando con resina Ni-agarosa durante 1 h a T_{amb}, para luego lavar con descenso de pH (La1, La2) y proceder a renaturalizar sobre la resina con un gradiente escalonado de urea: 6 M (Rn1), 4 M (Rn2), 2 M (Rn3), 1 M (Rn4), 0.5 M (Rn5), 0.25 M (Rn6), 0 M (Rn7). La proteína purificada y renaturalizada se dejó fijada a la resina para efectuar los ensayos de pull-down con lisados celulares tanto mock como infectados. A manera de control (Ctrl) se cargó proteína PP1-H₆ eluida en pruebas anteriores (Ctrl: control, PM: peso molecular, Dn: desnaturalizado, NU: no unido, La1: lavado 1, La2: lavado 2, Rn1: renaturalizado 1, Rn2: renaturalizado 2, Rn3: renaturalizado 3, Rn4: renaturalizado 4, Rn5: renaturalizado 5, Rn6: renaturalizado 6, Rn7: renaturalizado 7, Re: resina).

La proteína PP1-H₆ fijada a la resina se incubó con lisados celulares tanto mock como infectados, preclareados previamente con resina Ni-agarosa. Las fracciones de interés se sometieron a electroforesis SDS-PAGE 10% por duplicado empleando un control positivo de presencia de la proteína (PP1-H₆ fijada a la resina), de tal manera que un gel se tiñó con azul Coomassie y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para realizar el análisis mediante pruebas de Western blot.

El perfil de probables interacciones obtenido mediante tinción con azul Coomassie no mostró mayores diferencias entre las muestras mock y las infectadas, excepto una banda evidente alrededor de 35 kDa en los eluidos infectados (recuadro rojo), debajo de la banda correspondiente a PP1-H₆ (Figura 35).

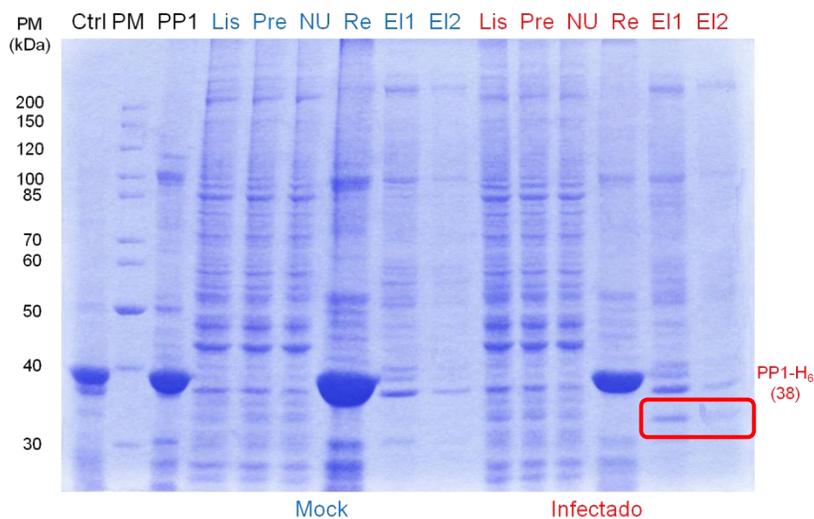


Figura 35. Perfil de probables interacciones entre proteínas virales y PP1-H₆. La proteína PP1-H₆ fijada a la resina se incubó durante 18 h a 4 °C con lisados de células mock o infectadas con rotavirus RRV (MOI 5), cosechadas 6 hpi, preclareando de manera previa con resina Ni-agarosa. La resina se centrifugó, se lavó varias veces y se eluyó con EDTA 100 mM pH 8.0 para después someter las fracciones indicadas a electroforesis SDS-PAGE 10%, seguida de la tinción del gel con azul Coomassie. A manera de control (Ctrl) se cargó proteína PP1-H₆ eluida en pruebas anteriores, además de la proteína PP1-H₆ fijada a la resina para los ensayos (Ctrl: control, PM: peso molecular, PP1: proteína fijada, Lis: lisado, Pre: preclareado, NU: no unido, Re: resina, El1: eluido1, El2: eluido2).

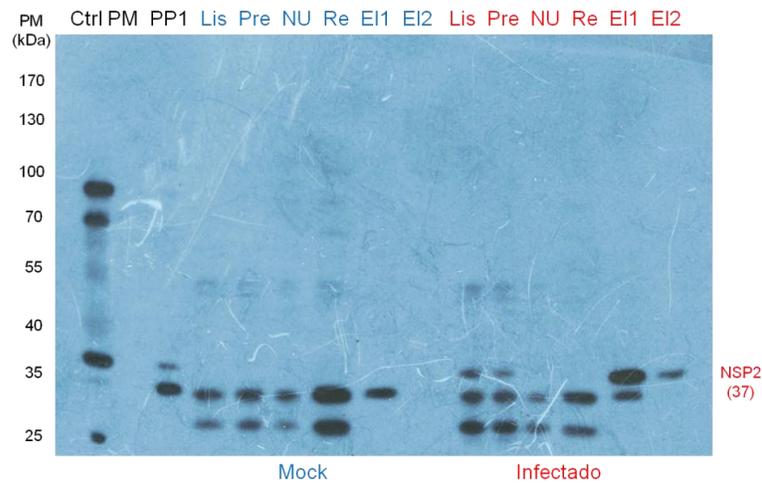


Figura 36. Western blot contra la proteína no estructural NSP2. La proteína PP1-H₆ fijada a la resina se incubó durante 18 h a 4 °C con lisados de células mock o infectadas con rotavirus RRV (MOI 5), cosechadas 6 hpi, preclareando de manera previa con resina Ni-agarosa. La resina se centrifugó, se lavó varias veces y se eluyó con EDTA 100 mM pH 8.0 para después someter las fracciones indicadas a electroforesis SDS-PAGE 10%, seguida de la transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa a fin de analizar mediante un Western blot dirigido contra NSP2. A manera de control (Ctrl) se cargó proteína PP1-H₆ eluida en pruebas anteriores, además de la proteína PP1-H₆ fijada a la resina para los ensayos (Ctrl: control, PM: peso molecular, PP1: proteína fijada, Lis: lisado, Pre: preclareado, NU: no unido, Re: resina, EI1: eluido1, EI2: eluido2).

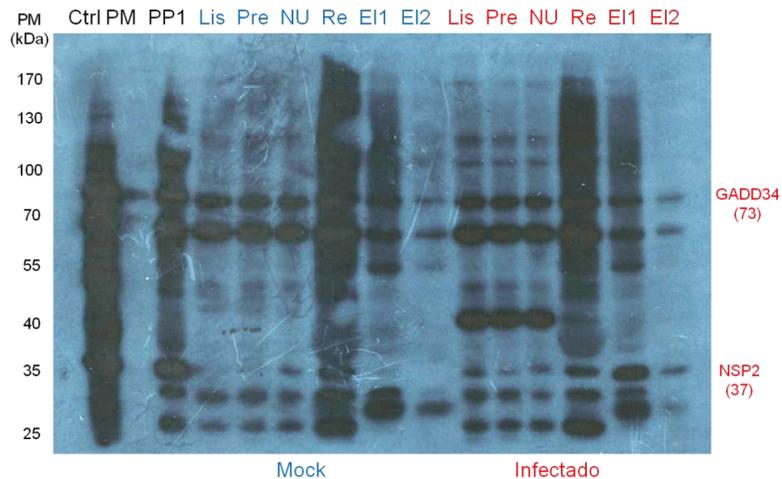


Figura 37. Western blot contra la subunidad reguladora GADD34. Sobre la misma membrana revelada en la Fig. 36, se realizó un Western blot dirigido contra GADD34 que resultó poco limpio probablemente debido a la sobreexposición de la película sumada a la calidad del anticuerpo, un policlonal que desde pruebas anteriores se sabe que reconoce otros blancos (Ctrl: control, PM: peso molecular, PP1: proteína fijada, Lis: lisado, Pre: preclareado, NU: no unido, Re: resina, EI1: eluido1, EI2: eluido2).

El análisis mediante Western blot contra NSP2 detectó la señal correspondiente no solo en el lisado y preclareado de las muestras infectadas como se esperaba, sino también en los dos eluidos, lo que sugiere que hubo unión entre las proteínas NSP2 y PP1-H₆ (Figura 36). Sobre la misma membrana, a manera de control se realizó un Western blot contra la subunidad regulatoria GADD34 y se pudo detectar su señal en todas las muestras analizadas, aunque la prueba resultó poco limpia probablemente debido a la sobreexposición de la película sumada a la calidad del anticuerpo, un policlonal que desde pruebas anteriores se sabe que reconoce otros blancos (Figura 37).

Si bien el análisis de los ensayos de interacciones resultó bastante sugerente respecto a la probable unión de NSP2 y PP1-H₆, una observación un poco más detallada de la tinción con azul Coomassie permite ver que la mayor parte de PP1-H₆ se queda unida a la resina final (después de efectuar las eluciones), lo que constituye un indicador de que la proteína probablemente estaba precipitada (Figura 35). No obstante, la tinción con azul Coomassie mostró la elusión de cierta cantidad de PP1-H₆ y el Western blot contra GADD34 reveló una señal relativamente clara en los eluidos de las muestras tanto mock como infectadas, lo que se espera de una subunidad regulatoria (Figuras 35 y 37).

Una nueva purificación y renaturalización de PP1-H₆ fijada a la resina, disminuyendo de manera escalonada la concentración de urea hasta 0 M, permitió ver que la proteína no eluye en estas condiciones, lo cual indica que PP1-H₆ se precipita en la resina (Figura 38).

Se decidió llevar gradualmente la concentración de urea de la proteína fijada a la resina hasta 1 M, para luego tratar de eluirla con imidazol 250 mM en urea 0.5 M, pero la proteína apenas pudo verse en el primer eluido (datos no mostrados). Se intentó reducir de nuevo la concentración de urea hasta 1 M, pero esta vez eluyendo con imidazol 250 mM en urea 1 M, y si bien pudo verse la banda de la proteína bastante limpia en dos de los tres eluidos, el contenido de proteína era muy bajo como para someter las muestras a diálisis (Figura 39).

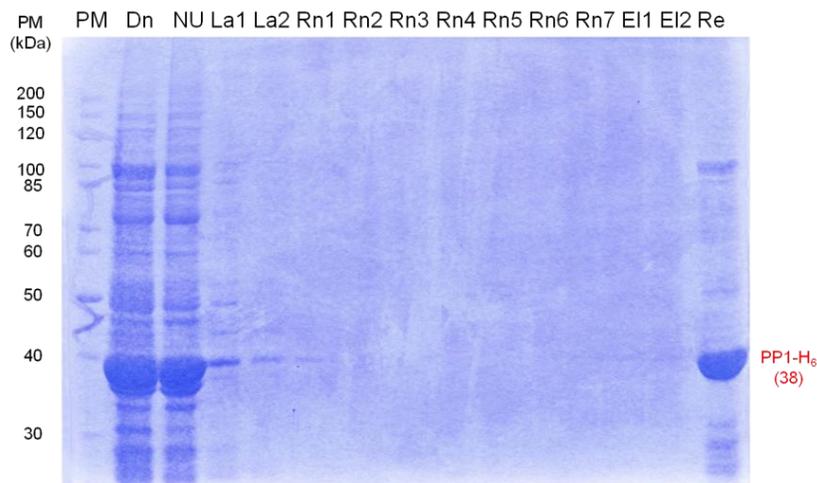


Figura 38. La proteína PP1-H₆ no eluye en ausencia de urea. Se lisaron bacterias en buffer con urea 8 M (Dn) y se incubó con resina Ni-agarosa durante 1 h a T_{amb}, para luego lavar con descenso de pH (La1, La2). Se procedió a renaturalizar sobre la resina con un gradiente escalonado de urea: 6 M (Rn1), 4 M (Rn2), 2 M (Rn3), 1 M (Rn4), 0.5 M (Rn5), 0.25 M (Rn6), 0 M (Rn7), para finalmente eluir (El1, El2) con EDTA 100 mM pH 8.0 en urea 0 M (PM: peso molecular, Dn: desnaturalizado, NU: no unido, La1: lavado 1, La2: lavado 2, Rn1: renaturalizado 1, Rn2: renaturalizado 2, Rn3: renaturalizado 3, Rn4: renaturalizado 4, Rn5: renaturalizado 5, Rn6: renaturalizado 6, Rn7: renaturalizado 7, El1: eluido 1, El2: eluido 2, Re: resina).

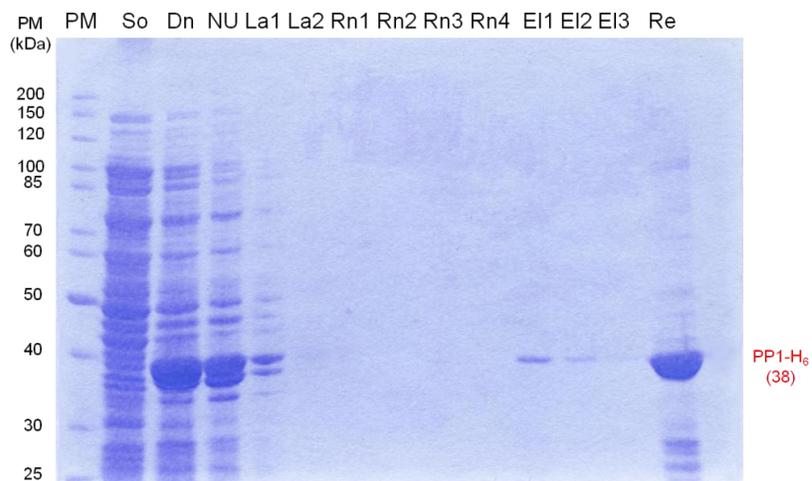


Figura 39. La proteína PP1-H₆ eluye escasamente en urea 1 M. Se lisaron bacterias en buffer con urea 8 M (Dn) y se incubó con resina Ni-agarosa durante 1 h a T_{amb}, para luego lavar con descenso de pH (La1, La2). Se procedió a renaturalizar sobre la resina con un gradiente escalonado de urea: 6 M (Rn1), 4 M (Rn2), 2 M (Rn3), 1 M (Rn4), para finalmente eluir (El1, El2) con imidazol 250 mM en urea 1 M (PM: peso molecular, Dn: desnaturalizado, NU: no unido, La1: lavado 1, La2: lavado 2, Rn1: renaturalizado 1, Rn2: renaturalizado 2, Rn3: renaturalizado 3, Rn4: renaturalizado 4, El1: eluido 1, El2: eluido 2, Re: resina).

La siguiente estrategia de purificación y completa renaturalización de PP1-H₆ consistió en eluir la proteína con imidazol 250 mM en presencia de urea 6 M para luego efectuar su diálisis en buffer sin urea (Figura 40). Aunque la estrategia dio muy buen resultado dado que se obtuvo una proteína notablemente purificada, al tercer día la proteína se había precipitado.

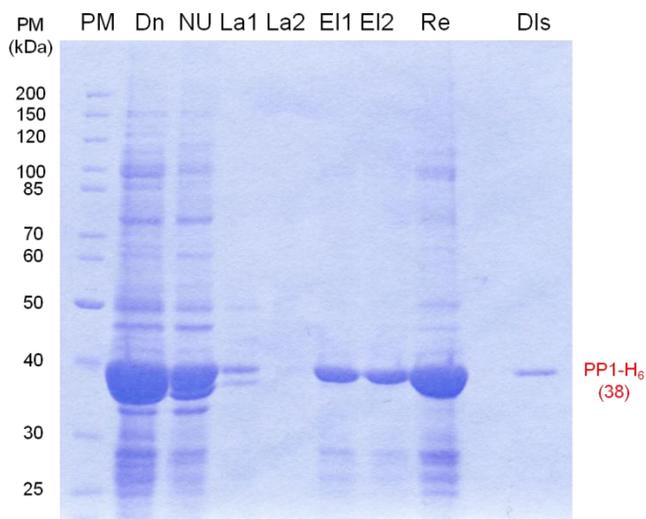


Figura 40. La proteína PP1-H₆ se puede eluir en urea 6 M para proceder a su diálisis. Se lisaron bacterias en buffer con urea 8 M (Dn) y se incubó con resina Ni-agarosa durante 1 h a T_{amb}, para luego lavar con descenso de pH (La1, La2) y eluir con imidazol 250 mM en urea 6 M (E11, E12). Aunque sigue quedando en la resina (Re) una gran cantidad de proteína, la diálisis (Dls) de una alícuota de los eluidos permitió obtener una proteína notablemente purificada (PM: peso molecular, Dn: desnaturalizado, NU: no unido, La1: lavado 1, La2: lavado 2, E11: eluido 1, E12: eluido 2, Re: resina, Dls: dializado).

A fin de confirmar tal observación, se procedió al análisis del sobrenadante de la muestra mediante electroforesis SDS-PAGE 10% seguida de tinción con azul Coomassie, pero inmediatamente antes de proceder, los eluidos disponibles de PP1-H₆ en urea 6 M se sometieron a diálisis para cargar muestras recientes en el gel (Figura 41). La tinción con azul Coomassie permitió ver claramente que en urea 6 M la proteína se mantenía soluble, mientras que la muestra dializada pocos días antes tenía una cantidad de proteína prácticamente imperceptible mediante la tinción. En contraste, la muestra dializada inmediatamente antes de correr el gel permitió ver que se trataba de una proteína soluble notablemente purificada.

Aunque hasta la fecha se han determinado las estructuras de 15 complejos con PP1, todos generados a partir de sistemas de expresión heteróloga en *E. coli* y con distintas metodologías

de purificación, los datos reportados señalan que PP1 es una proteína altamente insoluble y difícil de purificar que aun en concentraciones muy bajas permanece soluble por cortos periodos de tiempo antes de comenzar a formar agregados³⁰. Se registran los datos relevantes de las estrategias llevadas a cabo para la purificación y renaturalización de PP1-H₆ (Tabla 14).

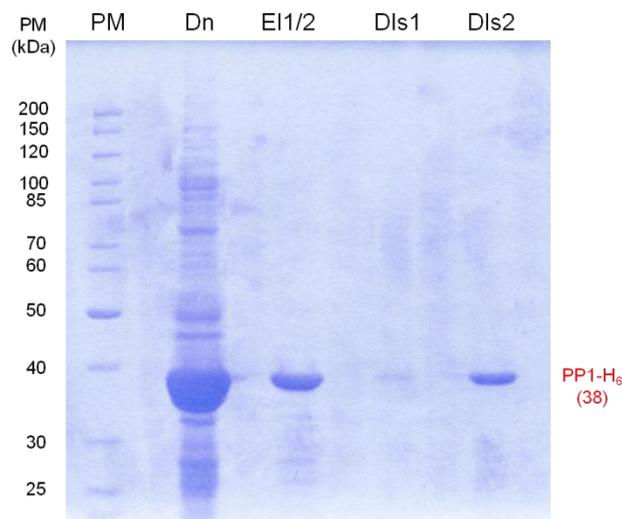


Figura 41. La proteína PP1-H₆ se mantiene soluble poco tiempo. Se confirmó que la muestra de proteína dializada pocos días antes se había precipitado dejando una cantidad de proteína en el sobrenadante imperceptible mediante la tinción (Dls1), mientras que la muestra recientemente dializada contenía proteína soluble notablemente purificada (Dls2). A manera de control se cargó una muestra de proteína eluida en urea 6 M (E11/2), además de una cantidad mínima de bacterias lisadas en buffer con urea 8 M (PM: peso molecular, Dn: desnaturalizado, E11/2: eluidos, Dls1: dializado 1, Dls2: dializado 2).

Tabla 14. Estrategias de purificación y renaturalización de la proteína recombinante PP1-H₆.

Estrategia de Purificación y Renaturalización	Eluyente	Resultado
Gradiente escalonado de urea hasta 0 M y elusión	EDTA 100 mM pH 8.0 en urea 0	No eluye
Gradiente escalonado de urea hasta 1 M y elusión	Imidazol 250 mM en urea 0.5 M	Elusión ínfima
Gradiente escalonado de urea hasta 1 M y elusión	Imidazol 250 mM en urea 1 M	Elusión escasa
Elusión en urea 6 M y diálisis en ausencia de urea	Imidazol 250 mM en urea 6 M	Proteína purificada, soluble pocos días

Se registran los datos más relevantes de las estrategias llevadas a cabo para la purificación y renaturalización parcial o completa de la proteína PP1-H₆ para los ensayos de pull-down.

6.3.4. Interacciones con PP1-H₆ solubilizada

Dada la tendencia de PP1-H₆ a precipitar en la resina, el cuarto enfoque para determinar probables interacciones entre PP1 y proteínas virales se realizó con la proteína recombinante fusionada a un tag de histidinas (PP1-H₆) eluida y dializada, siguiendo el proceso de cuatro etapas (Figura 24), preclareando de manera previa los lisados de células y eluyendo con EDTA 100 mM pH 8.0 después de recapturar PP1-H₆, junto a las proteínas que pudiese haber unido, por su afinidad con resina Ni-agarosa.

Considerando que la proteína PP1-H₆ se mantiene soluble poco tiempo, después de su elusión y diálisis se procedió inmediatamente a incubarla con lisados celulares tanto mock como infectados, preclareados previamente con resina Ni-agarosa. Las fracciones de interés se sometieron a electroforesis SDS-PAGE 10% por duplicado, de tal manera que un gel se tiñó con azul Coomassie y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para realizar el análisis mediante pruebas de Western blot.

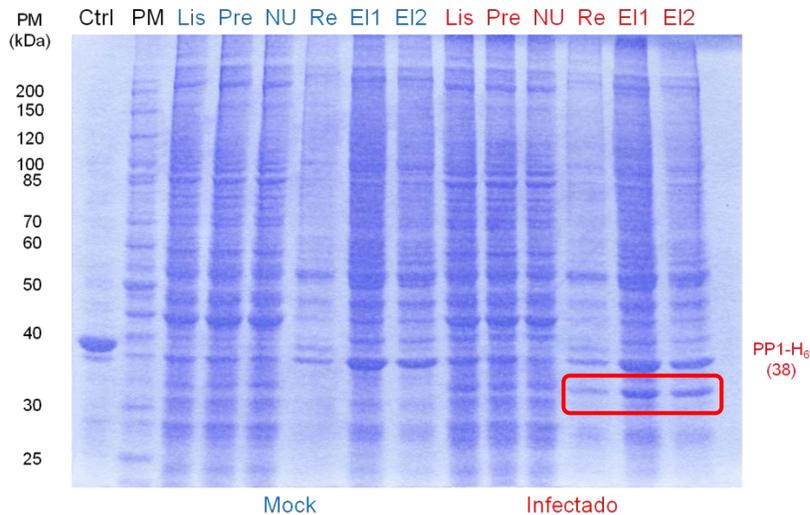


Figura 42. Perfil de probables interacciones entre proteínas virales y PP1-H₆. La proteína PP1-H₆ se eluyó y dializó inmediatamente antes de incubarla durante 18 h a 4 °C con lisados preclareados de células mock o infectadas con rotavirus RRV (MOI 5), cosechadas 6 hpi, para luego recapturar la proteína PP1-H₆ por su afinidad con resina Ni-agarosa. La resina se centrifugó, se lavó varias veces y se eluyó con EDTA 100 mM pH 8.0 para después someter las fracciones indicadas a electroforesis SDS-PAGE 10%, seguida de la tinción del gel con azul Coomassie. A manera de control (Ctrl) se cargó proteína PP1-H₆ eluida en pruebas anteriores (Ctrl: control, PM: peso molecular, Lis: lisado, Pre: preclareado, NU: no unido, Re: resina, EI1: eluido1, EI2: eluido2).

Nuevamente el perfil de probables interacciones obtenido mediante tinción con azul Coomassie no mostró diferencias significativas entre las muestras mock y las infectadas, excepto una banda evidente alrededor de 35 kDa en los eluidos infectados (recuadro rojo), debajo de la banda correspondiente a PP1-H₆ (Figura 42), la cual ya había sido identificada previamente en los ensayos con la proteína recombinante fijada a la resina (Figura 35), y en este experimento en particular, también pudo detectarse una señal muy tenue en la resina final (después de efectuar las eluciones).

El análisis mediante Western blot contra NSP2 detectó la señal correspondiente no solo en el lisado y preclareado de las muestras infectadas como se esperaba, sino que también detectó una señal intensa en los dos eluidos y más débil en la resina final, lo que sugiere que hubo unión entre las proteínas NSP2 y PP1-H₆ (Figura 43). Sobre la misma membrana, a manera de control se realizó un Western blot contra GADD34 y se pudo detectar su señal en todas las muestras analizadas, aunque la prueba también detectó muchas otras señales probablemente debido a la ya cuestionada calidad del anticuerpo policlonal empleado (Figura 44). No obstante, la señal de GADD34 aparece relativamente clara en los eluidos como se espera de una subunidad regulatoria.

Resulta evidente que el perfil de probables interacciones obtenido mediante tinción con azul Coomassie muestra una gran cantidad de proteínas en todo el rango de pesos moleculares en los carriles correspondientes a los eluidos tanto mock como infectados, lo cual presumiblemente se deba a que la proteína recombinante PP1-H₆ empleada en los ensayos de pull-down haya podido interactuar de manera directa o indirecta con muchas proteínas celulares, pues se sabe que PP1 es una fosfatasa involucrada en la regulación de diversas funciones a través de la formación de complejos enzimáticos con más de 200 subunidades regulatorias, las cuales pueden dirigir o impedir la defosforilación de cientos de sustratos, de hecho, según los datos reportados cataliza más de la mitad de todas las defosforilaciones en residuos Ser/Thr que se llevan a cabo en la célula eucariota²⁶⁻³¹.

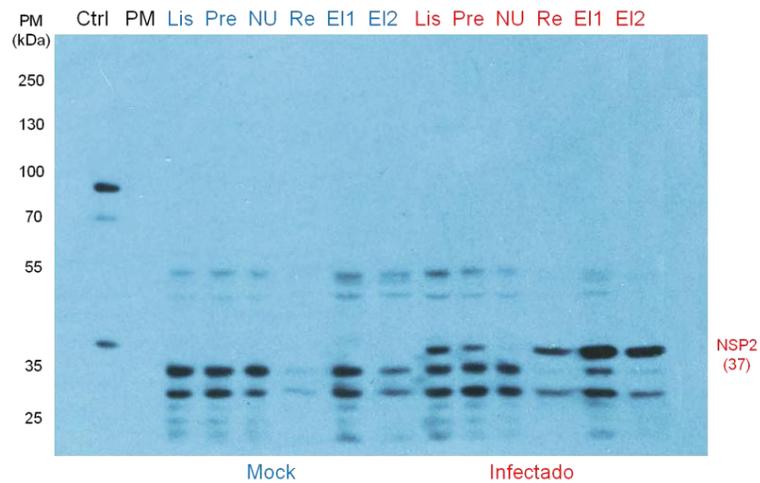


Figura 43. Western blot contra la proteína no estructural NSP2. La proteína PP1-H₆ se eluyó y dializó inmediatamente antes de incubar durante 18 h a 4 °C con lisados preclareados de células mock o infectadas con rotavirus RRV (MOI 5), cosechadas 6 hpi, para luego recapturar la proteína PP1-H₆ por su afinidad con resina Ni-agarosa. La resina se centrifugó, se lavó varias veces y se eluyó con EDTA 100 mM pH 8.0 para después someter las fracciones indicadas a electroforesis SDS-PAGE 10%, seguida de la transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa a fin de analizar mediante un Western blot dirigido contra NSP2. A manera de control (Ctrl) se cargó proteína PP1-H₆ eluida en pruebas anteriores (Ctrl: control, PM: peso molecular, Lis: lisado, Pre: preclareado, NU: no unido, Re: resina, E1: eluido1, E2: eluido2).

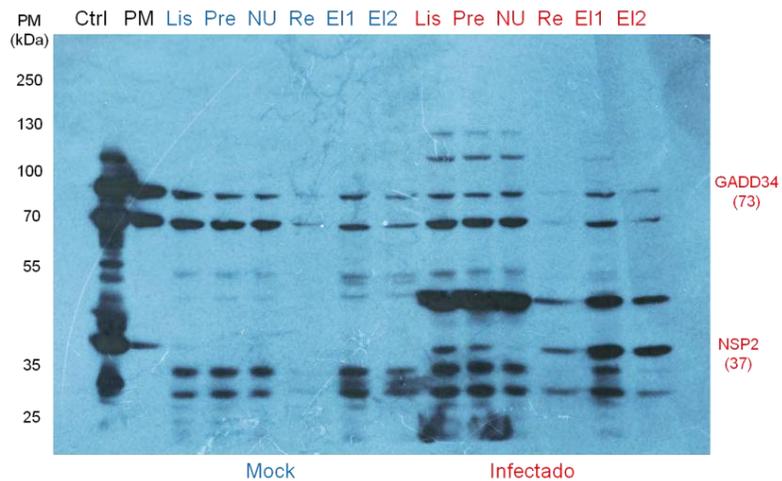


Figura 44. Western blot contra la subunidad reguladora GADD34. Sobre la misma membrana revelada en la Fig. 43, se realizó un Western blot dirigido contra GADD34 que resultó poco limpio probablemente debido a la cuestionada calidad del anticuerpo, un policlonal que desde pruebas anteriores se sabe que reconoce otros blancos. A manera de control (Ctrl) se cargó proteína PP1-H₆ eluida en pruebas anteriores (Ctrl: control, PM: peso molecular, Lis: lisado, Pre: preclareado, NU: no unido, Re: resina, E1: eluido1, E2: eluido2).

6.3.5. Interacciones con NSP2-H₆

Para confirmar las interacciones de NSP2 con PP1 se realizaron ensayos de pull-down empleando una proteína NSP2 recombinante fusionada a un tag de histidinas (NSP2-H₆) purificada y fijada a resina Ni-agarosa, siguiendo el proceso de cuatro etapas ya descrito (Figura 24), preclareando de manera previa el lisado celular y eluyendo con imidazol 250 mM al final de los ensayos de pull-down.

El perfil de purificación de NSP2-H₆ obtenido mediante tinción con azul Coomassie apoyado de manera paralela por el análisis mediante Western blot contra NSP2, permitió ver que se trata de una proteína soluble que se puede obtener del sobrenadante en gran cantidad y dejar fijada a la resina Ni-agarosa para los ensayos de pull-down con lisados celulares (Figura 45).

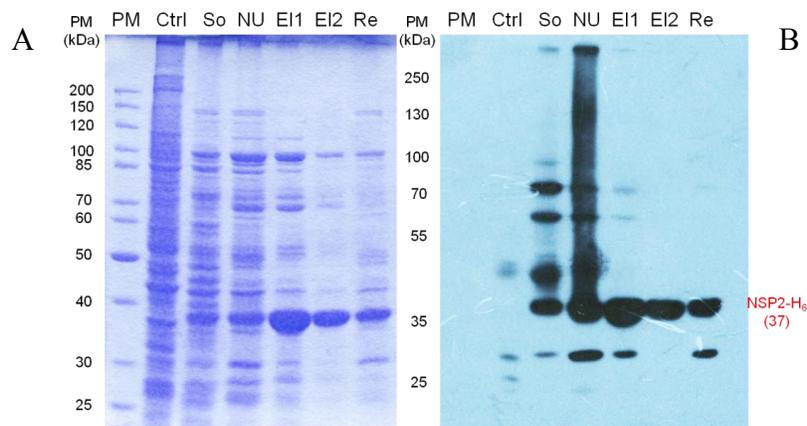


Figura 45. Perfil de purificación de NSP2-H₆. Bacterias transformadas *E. coli* que expresan NSP2-H₆ se cultivaron, cosecharon y lisaron para purificar la proteína recombinante por su afinidad con resina Ni-agarosa. Las fracciones indicadas se sometieron a electroforesis SDS-PAGE 10% por duplicado, de tal manera que la mitad del gel se tiñó con azul Coomassie (A) y la otra mitad se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a fin de realizar un Western blot contra NSP2 (B). A manera de control (Ctrl) se cargó una muestra de lisado celular infectado con rotavirus RRV en la que no se alcanzó a detectar la proteína NSP2 por su escasa proporción (PM: peso molecular, Ctrl: control, So: sobrenadante, NU: no unido, E1: eluido 1, E2: eluido 2, Re: resina).

La proteína NSP2-H₆ fijada a la resina se incubó con el lisado celular preclareado previamente con resina Ni-agarosa. Las fracciones de interés se sometieron a electroforesis SDS-PAGE 15% por duplicado empleando un control positivo de presencia de la proteína (NSP2-H₆ fijada a la resina), de tal manera que un gel se tiñó con azul Coomassie y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para el análisis mediante pruebas de Western blot.

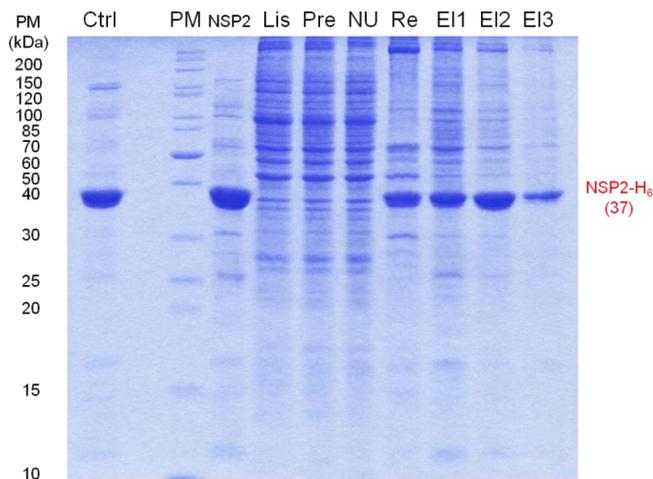


Figura 46. Perfil de probables interacciones entre NSP2-H₆ y PP1. La proteína NSP2-H₆ fijada a la resina se incubó durante 18 h a 4 °C con el lisado celular preclareado de manera previa con resina Ni-agarosa. La resina se centrifugó, se lavó varias veces y se eluyó con imidazol 250 mM para después someter las fracciones indicadas a electroforesis SDS-PAGE 15%, seguida de la tinción del gel con azul Coomassie. A manera de control (Ctrl) se cargó proteína NSP2-H₆ eluida en pruebas anteriores, además de la proteína NSP2-H₆ fijada a la resina para los ensayos (Ctrl: control, PM: peso molecular, NSP2: proteína fijada, Lis: lisado, Pre: preclareado, NU: no unido, Re: resina, E1: eluido1, E2: eluido2, E3: eluido3).



Figura 47. Western blot contra la fosfatasa celular PP1. La proteína NSP2-H₆ fijada a la resina se incubó durante 18 h a 4 °C con el lisado celular preclareado de manera previa con resina Ni-agarosa. La resina se centrifugó, se lavó varias veces y se eluyó con imidazol 250 mM para después someter las fracciones indicadas a electroforesis SDS-PAGE 15%, seguida de la transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa a fin de analizar mediante un Western blot dirigido contra PP1. A manera de control (Ctrl) se cargó proteína NSP2-H₆ eluida en pruebas anteriores, además de la proteína NSP2-H₆ fijada a la resina para los ensayos (Ctrl: control, PM: peso molecular, NSP2: proteína fijada, Lis: lisado, Pre: preclareado, NU: no unido, Re: resina, E1: eluido1, E2: eluido2, E3: eluido3).

El perfil de probables interacciones obtenido mediante tinción con azul Coomassie mostró la banda correspondiente a NSP2-H₆ en la resina final (después de efectuar las eluciones) y en los tres eluidos, pero no se esperaba identificar a PP1 con facilidad dado que ambas proteínas (NSP2-H₆ y PP1) tienen un peso molecular aproximado de 37.5 kDa (Figura 46). No obstante, el análisis mediante Western blot contra PP1 detectó la señal correspondiente no solo en el lisado y preclareado de las muestras celulares como se esperaba, sino también en los tres eluidos y en la resina final, pero particularmente intensa en el primer eluido, lo que sugiere que hubo unión entre las proteínas NSP2-H₆ y PP1 (Figura 47). También pudo notarse una señal muy intensa en la fracción no unida, lo cual indica que hay una gran proporción de PP1 que no se une a NSP2-H₆.

Considerando que PP1 es una fosfatasa celular involucrada en la regulación de diversas funciones mediante la formación de complejos enzimáticos con más de 200 subunidades regulatorias²⁶⁻³¹, puede suponerse razonablemente que la mayor parte de PP1 en algún momento dado se encuentra asociada a muchas de sus subunidades regulatorias, y que por lo tanto haya sido una proporción minoritaria la que estaba disponible para interactuar con la proteína recombinante NSP2-H₆.

El último enfoque implementado para confirmar las interacciones entre PP1 y proteínas virales se realizó con la proteína NSP2 recombinante fusionada a un tag de histidinas (NSP2-H₆) presente en un lisado de bacterias, siguiendo el proceso de cuatro etapas (Figura 24), incubando el extracto bacterial con el extracto celular preclareado de manera previa y eluyendo con imidazol 250 mM después de purificar NSP2-H₆, junto a las proteínas que pudiese haber unido, por su afinidad con resina Ni-agarosa.

Las fracciones de interés se sometieron a electroforesis SDS-PAGE 12.5% por duplicado empleando un control positivo de presencia de la proteína (NSP2-H₆ eluida en pruebas anteriores), de tal manera que un gel se tiñó con azul Coomassie y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para el análisis mediante pruebas de Western blot.

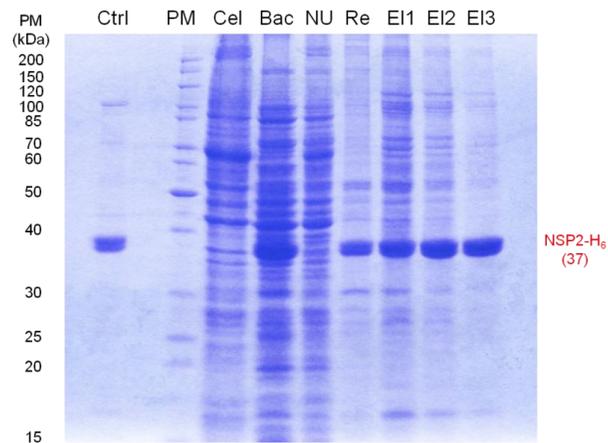


Figura 48. Perfil de probables interacciones entre NSP2-H₆ y PP1. Bacterias transformadas *E. coli* que expresan NSP2-H₆ se cultivaron, cosecharon y lisaron para luego incubar durante 18 h a 4 °C los extractos bacteriales con extractos celulares preclareados a fin de purificar NSP2-H₆ y las proteínas que pudiese haber unido por su afinidad con resina Ni-agarosa. La resina se centrifugó, se lavó varias veces y se eluyó con imidazol 250 mM para después someter las fracciones indicadas a electroforesis SDS-PAGE 12.5%, seguida de la tinción del gel con azul Coomassie. A manera de control (Ctrl) se cargó proteína NSP2-H₆ eluida en pruebas anteriores (Ctrl: control, PM: peso molecular, Cel: preclareado celular, Bac: extracto bacterial, NU: no unido, Re: resina, E11: eluido1, E12: eluido2, E13: eluido3).

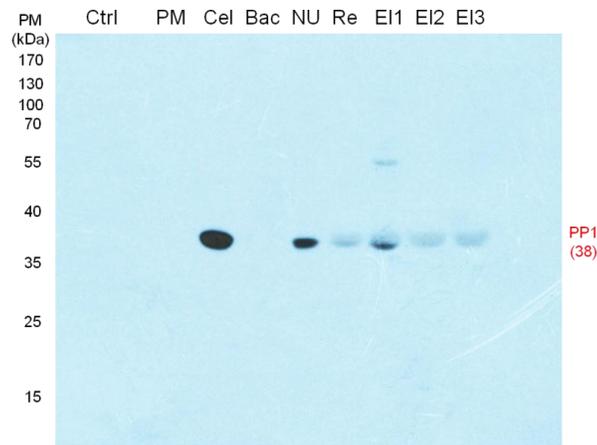


Figura 49. Western blot contra la fosfatasa celular PP1. Bacterias transformadas *E. coli* que expresan NSP2-H₆ se cultivaron, cosecharon y lisaron para luego incubar durante 18 h a 4 °C los extractos bacteriales con extractos celulares preclareados a fin de purificar NSP2-H₆ y las proteínas que pudiese haber unido por su afinidad con resina Ni-agarosa. La resina se centrifugó, se lavó varias veces y se eluyó con imidazol 250 mM para después someter las fracciones indicadas a electroforesis SDS-PAGE 12.5%, seguida de la transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa a fin de analizar mediante un Western blot dirigido contra PP1. A manera de control (Ctrl) se cargó proteína NSP2-H₆ eluida en pruebas anteriores (Ctrl: control, PM: peso molecular, Cel: preclareado celular, Bac: extracto bacterial, NU: no unido, Re: resina, E11: eluido1, E12: eluido2, E13: eluido3).

El perfil de probables interacciones obtenido mediante tinción con azul Coomassie mostró la banda correspondiente a NSP2-H₆ en el extracto bacterial, resina final (después de efectuar las eluciones) y en los tres eluidos (Figura 48), mientras que el análisis mediante Western blot contra PP1 detectó la señal correspondiente no solo en el preclareado celular como se esperaba, sino que también se pudo detectar una señal evidente en el primer eluido, lo que sugiere que hubo unión entre las proteínas NSP2-H₆ y PP1 (figura 49). Y de nuevo pudo verse una señal intensa en la fracción no unida, lo cual indica que hay una gran proporción de PP1 que no se une a NSP2-H₆.

Los ensayos de pull-down con proteínas recombinantes (PP1-H₆ y NSP2-H₆) han permitido entonces confirmar que la proteína viral NSP2 y la fosfatasa celular PP1 interactúan *in vitro* (Tabla 15), lo cual sugiere que es muy probable que también puedan interactuar *in vivo*, y por lo tanto, los resultados experimentales junto a los datos obtenidos mediante análisis *in silico* dejan abierta la posibilidad de que NSP2 pueda ser una subunidad regulatoria de PP1 con función aún por determinar.

Tabla 15. Resultados de los ensayos de pull-down con proteínas recombinantes.

Proteína Recombinante	Estado de la Proteína	Control de Unión (Preclareado)	Eluyente	Interacción NSP2-PP1
GST-PP1	Fijada a la resina	Resina glutatión-agarosa	Glutatión reducido 10 mM	Negativa, precipitación de PP1 en la resina
GST-PP1	Fijada a la resina	GST fijada a la resina	Glutatión reducido 10 mM	Negativa, datos no mostrados
PP1-H ₆	Fijada a la resina	Resina Ni-agarosa	EDTA 100 mM pH 8.0	Positiva, precipitación de PP1 en la resina
PP1-H ₆	Eluida y dializada	Resina Ni-agarosa	EDTA 100 mM pH 8.0	Positiva, presencia de NSP2 en los eluidos
NSP2-H ₆	Fijada a la resina	Resina Ni-agarosa	Imidazol 250 mM	Positiva, presencia de PP1 en los eluidos
NSP2-H ₆	Extracto bacterial	Resina Ni-agarosa	Imidazol 250 mM	Positiva, presencia de PP1 en los eluidos

Se listan los datos más relevantes de los ensayos de pull-down con proteínas recombinantes y el resultado obtenido para la presunta interacción NSP2-PP1.

7. DISCUSIÓN

La traducción es uno de los procesos más interesantes en la permanente disputa virus - célula, dado que constituye una inevitable encrucijada en la que ambos actores se encuentran obligados a utilizar la misma maquinaria de síntesis de proteínas, una maquinaria cuya pieza fundamental es de naturaleza exclusivamente celular: los ribosomas. La síntesis de proteínas virales está entonces sujeta a las mismas reglas que rigen la síntesis de proteínas celulares, y por lo tanto, a diferencia de otros procesos del ciclo viral, se puede afirmar que en el proceso de traducción los virus son completamente dependientes de la maquinaria celular.

Y aunque los ribosomas constituyen la pieza clave del proceso, la síntesis de proteínas requiere además de la participación de un gran número de factores accesorios que median las interacciones entre el mRNA y los ribosomas, constituyendo en conjunto un sistema que “selecciona” los mRNAs que se han de traducir. Pese a que se trata de un proceso sumamente complejo, de esta manera el sistema admite la posibilidad de que los virus puedan evolucionar proteínas que les permitan reclutar a los ribosomas para favorecer la traducción de sus mRNAs virales, generalmente en detrimento de los mRNAs celulares.

Según este planteamiento, parece entonces evidente que rotavirus debe contar con proteínas para iniciar y mantener activo el proceso de traducción durante el ciclo replicativo, aunque dada la complejidad del proceso, resulta difícil identificar las proteínas virales involucradas, y más aun esclarecer su aporte individual. No obstante, la búsqueda de motivos relacionados con el proceso de traducción mediante recursos bioinformáticos, acompañada del aislamiento de complejos ribosomales y su análisis correspondiente a través de técnicas clásicas de identificación de proteínas constituye una formidable estrategia para obtener algunos indicios sobre el mecanismo traduccional de rotavirus.

El análisis bioinformático de las secuencias de aminoácidos de las 12 proteínas de rotavirus RRV (Anexo 1) arrojó dos tipos de motivo relacionados con el proceso de traducción: unión a eIF4E (Tabla 7) e interacción con PP1 (Tabla 8). Si bien ambos tipos de motivo podrían presentarse en cualquier proteína, la probabilidad de encontrarlos al azar es relativamente baja (probabilidad de corte 0.001), dado que los valores calculados solo a partir de la frecuencia de

los aminoácidos que los componen, dejando de lado la longitud de las secuencias, están en el orden de las diezmilésimas (Tabla 6).

La presencia de tales motivos en las proteínas estructurales, especialmente el motivo de unión a eIF4E en las proteínas VP1, VP2 y VP3, parece factible teniendo en cuenta que se trata de proteínas de las que el virus dispone tan pronto ingresa en la célula, y es un motivo clave dado que media la interacción con el factor eIF4E, la proteína que reconoce y une la estructura cap de los mRNAs en el inicio de la traducción. Sin embargo, las proteínas VP1 y VP3 poseen funciones bien definidas, pues VP1 es la RNA polimerasa RNA-dependiente involucrada en la replicación y transcripción del genoma, mientras que VP3 es la enzima que cataliza la formación de la estructura cap en el extremo 5' de los mRNAs virales. Esto deja entonces a VP2, la proteína que constituye el core del virión como posible candidata, quizá la más probable a tener un papel relevante en el inicio de la traducción viral.

Desafortunadamente, la cuantificación de focos en las fracciones colectadas de los gradientes de sacarosa reveló la presencia de virus infeccioso a lo largo del gradiente (Tablas 11-13), de tal manera que a tales partículas bien pueden atribuirse las proteínas estructurales detectadas en los complejos ribosomales, aunque realizando simples cálculos estequiométricos con base en los números de moléculas por virión reportados en la literatura (Tabla 4) ^{1,4}, podría discutirse que los patrones obtenidos mediante Western blot no corresponden solamente a partículas infecciosas. Considerando el peso molecular estimado de un virión (~100 MDa), lo que equivale al peso de más de 20 ribosomas, parece muy probable que en las condiciones bajo las cuales se aislaron los complejos ribosomales, el virus pueda asociarse con diversas estructuras y complejos celulares que le permiten migrar a un amplio rango de densidades.

Dado este escenario, el análisis de proteínas no estructurales representa un enfoque que puede reivindicar el aislamiento de complejos ribosomales por gradientes de sacarosa. La presencia del motivo de interacción con PP1 en las proteínas NSP1, NSP2 y NSP5 cobra entonces importancia en la búsqueda de respuestas sobre el proceso de traducción viral, dado que se trata de un motivo que media la unión a la fosfatasa celular PP1, la proteína responsable, entre muchas otras funciones, de la defosforilación del factor eIF2 α .

Si bien el análisis *in silico* reveló la presencia del motivo de interacción con PP1 en tres proteínas no estructurales, la atención se dirigió especialmente a NSP2, una proteína cuya secuencia de aminoácidos presenta dos motivos de interacción con PP1 (Tabla 8), uno entre los residuos 261-267 (DQRVIWQ), y otro entre los residuos 284-291 (ICKKLLFQ) que arrojó dos lecturas debido a la presencia de dos lisinas consecutivas que pueden situarse en la posición altamente conservada, y a que el motivo admite un gap de un residuo entre esta posición y el residuo poco variable que sigue en la secuencia que define al motivo (Figura 22). Y a diferencia de NSP5, el alineamiento de secuencias de NSP2 de diferentes cepas de rotavirus reveló que sus motivos están altamente conservados (Anexo 6), resultando particularmente interesante el motivo que yace entre los residuos aminoácidos 261-267 debido a que se encuentra expuesto en un giro β de la estructura molecular de NSP2 determinada por cristalografía de rayos X (Figuras 22 y 23) ⁴⁸.

Se sabe que la proteína NSP2 se encuentra involucrada en la replicación y empaquetamiento del genoma, y junto con NSP5 tiene una función esencial en la formación de viroplasmos, inclusiones citoplásmicas donde se lleva a cabo la replicación del RNA viral, además de que muestra unión a ssRNA, así como también actividades NTPasa, RTPasa y helicasa ATP-independiente ^{2,3,48}. También se ha mostrado que la presencia de NSP2 durante la infección podría inducir o mantener el estado de fosforilación de eIF2 α ¹⁵.

El análisis mediante Western blot de las fracciones colectadas de los gradientes de sacarosa reveló la presencia de NSP2 en los complejos 48S y 80S de células infectadas (Figura 18), fracciones en las que también se pudo detectar a la fosfatasa celular PP1 (Figura 19). Los ensayos de pull-down con una proteína PP1 recombinante (PP1-H₆) expuesta a lisados celulares tanto mock como infectados, sugirieron interacción entre esta fosfatasa y NSP2 (Figura 43), un resultado que se confirmó desde el enfoque inverso utilizando una proteína NSP2 recombinante (NSP2-H₆) expuesta a lisados celulares (Figura 47).

Los resultados obtenidos permiten entonces afirmar que las proteínas NSP2 y PP1 interactúan *in vitro*, sugiriendo que es muy probable que también puedan interactuar *in vivo*, lo cual es muy interesante, ya que NSP2 podría ser una subunidad regulatoria de PP1 con función aun

desconocida. Tendrán que realizarse más experimentos a fin de determinar si el motivo predicho mediante análisis bioinformático es el responsable de esa interacción y finalmente dilucidar el papel de la presunta interacción NSP2-PP1 en el ciclo replicativo de rotavirus.

Los estudios fosfoproteómicos han sugerido que aproximadamente el 70% de todas las proteínas celulares eucarióticas son reguladas por fosforilación, lo cual es controlado por la acción concertada de cinasas y fosfatasa sobre residuos de Ser (86.4%), Thr (11.8%) o Tyr (1.8%), los cuales en suma representan el 98.2% (Ser/Thr) y 1.8% (Tyr) de todos los eventos de fosforilación. El genoma mamífero codifica alrededor de 500 cinasas, de las cuales ~100 son cinasas Tyr y ~400 son cinasas Ser/Thr^{29-31,49}. Sorprendentemente, mientras el número de cinasas y fosfatasa Tyr se encuentra balanceado (~100), el genoma mamífero codifica solo ~40 fosfatasa Ser/Thr para revertir la fosforilación generada por ~400 cinasas Ser/Thr. Esta discrepancia en la proporción de enzimas (un orden de magnitud) efecto de una estrategia de diversificación diferente durante la evolución, ha sido compensada por un número limitado de fosfatasa mediante la formación de complejos enzimáticos estables con diversidad de proteínas que determinan la localización subcelular y la especificidad de sustrato, lo cual permite catalizar la defosforilación de manera selectiva y altamente regulada^{29-31,49}.

La subunidad catalítica PP1 es la principal fosfatasa Ser/Thr de la célula eucariota, una proteína involucrada en la regulación de diversas funciones, pero carente de especificidad intrínseca, que se asocia con más de 200 subunidades regulatorias para formar complejos enzimáticos en los que la subunidad regulatoria puede dirigir o impedir la defosforilación de determinados sustratos²⁶⁻³¹. Se sabe que se asocia con una de dos subunidades regulatorias para llevar a cabo la defosforilación del factor eIF2 α , reanudando la traducción después de superado el estrés asociada con GADD34, o manteniendo de manera constitutiva bajos niveles de la forma fosforilada asociada con CREP^{18,32,33}.

Se ha reportado que el virus herpes simple tipo I (HSV-1) codifica una proteína denominada factor de neurovirulencia ICP34.5, la cual actúa como subunidad regulatoria que recluta a PP1 para defosforilar a eIF2 α contrarrestando el apagado de la síntesis de proteína causado durante la infección^{18,36,37}. De la misma manera que ICP34.5, se ha propuesto que la proteína DP71L

del virus de la fiebre porcina africana (ASFV), la cual posee un característico motivo de unión a PP1, y tiene la capacidad de interactuar con la fosfatasa celular tanto *in vitro* como *in vivo*, también podría actuar como subunidad reguladora de PP1 ^{18,38,39}.

Los datos reportados han mostrado que la infección por rotavirus induce y mantiene la fosforilación de eIF2 α durante el ciclo replicativo, siendo la fosforilación llevada a cabo por la cinasa PKR ^{15,16}. Dada la función fundamental de este factor en el inicio de la traducción, cabe esperar que rotavirus despliegue algún mecanismo para evadir esta restricción. Considerando que el estado de fosforilación de eIF2 α en un tiempo dado es el resultado del equilibrio entre las actividades de la cinasa/fosfatasa involucradas, se ha planteado que una posible explicación para este resultado es que durante la infección se presentan eventos rápidos y/o localizados de defosforilación de eIF2 α que permiten la síntesis de proteína viral ¹⁶.

Se ha demostrado que el salubrinal, una droga que inhibe de manera específica la actividad fosfatasa de cualquiera de los dos complejos enzimáticos que llevan a cabo la defosforilación de eIF2 α , también inhibe la actividad fosfatasa de PP1 asociada con ICP34.5, lo cual impide la replicación de HSV-1 ³³. Pero los experimentos realizados con salubrinal en células MEF infectadas con rotavirus RRV revelaron que la inhibición de la actividad de los complejos que defosforilan a eIF2 α no afecta la síntesis de proteína viral, lo cual llevó a sugerir que los mRNAs virales son traducidos a través de un mecanismo menos sensible a sus efectos y que por lo tanto rotavirus puede superar el bloqueo impuesto por la fosforilación de eIF2 α ¹⁶.

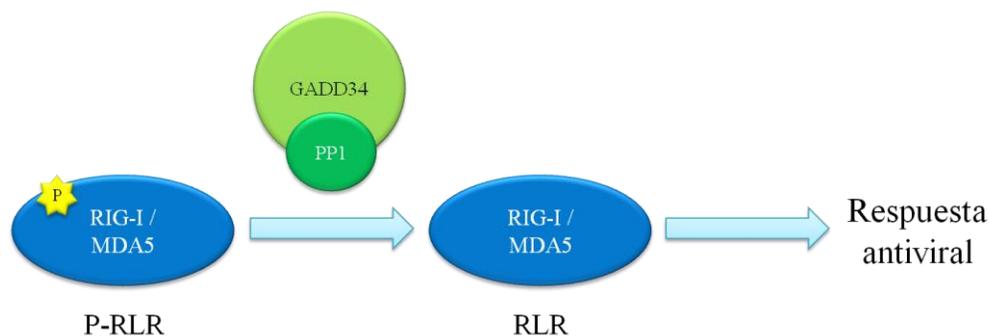


Figura 50. Activación de los sensores de RNA viral RIG-I y MDA5. Los RLRs (*RIG-I-Like Receptors*) RIG-I y MDA5 se activan vía defosforilación por PP1 desencadenando una serie de eventos que conducen a la respuesta antiviral.

También se sabe que en células infectadas, los sensores de RNA viral RIG-I (*Retinoic acid-Inducible Gene I protein*) y MDA5 (*Melanoma Differentiation-Associated protein 5*) se activan vía defosforilación por la fosfatasa PP1 desencadenando una serie de eventos que conducen a la producción de interferón tipo I, lo cual induce genes antivirales para abatir la replicación viral ⁵⁰ (Figura 50). Se ha reportado que el virus del sarampión (MV, *Measles Virus*) inhibe esta respuesta antiviral dirigiendo a PP1, lo que impide la defosforilación y consecuente activación de RIG-I y MDA5 ^{51,52}. De hecho, recientemente se ha presentado evidencia de que la proteína V de MV (MV-V) forma un complejo enzimático con PP1 sirviendo además como sustrato para la defosforilación, lo cual inhibe de manera competitiva la defosforilación de MDA5 ⁵³.

Los resultados publicados sugieren que NSP2 no está involucrada en la defosforilación de eIF2 α ¹⁶, lo que no descarta que pudiese estar implicada en mantener su estado de fosforilación, o incluso en dirigir o impedir la defosforilación de sustratos tales como los RLRs. Más aun, experimentos de interferencia con siRNA dirigidos contra cada uno de los 11 genes virales han sugerido que VP2, NSP2 y NSP5 están involucradas en inducir o mantener el estado de fosforilación de eIF2 α , además de que su silenciamiento causa una reducción general en la síntesis de proteína viral, lo que correlaciona en todos los casos con un incremento en la síntesis de proteína celular ¹⁵. En este contexto, se podría especular que la presunta interacción NSP2-PP1 tiene algún papel en impedir la defosforilación de eIF2 α , de tal manera que el efecto del salubrinal solo se habría enmascarado en el ya causado durante la infección, lo que explicaría el hecho de que la droga no afecte la síntesis de proteína viral.

La fosforilación y defosforilación son eventos continuos en la célula, y si bien se asume que el factor eIF2 α se fosforila desde tiempos tempranos y permanece en ese estado a lo largo de la infección por rotavirus ¹⁵, un análisis detallado de la relación eIF2 α total / P-eIF2 α de acuerdo a los datos reportados permite ver que la proporción de P-eIF2 α durante el tiempo observado (las primeras 10 h de infección) no llega siquiera a la mitad del total, lo que significa que al menos la otra mitad no está fosforilada, y por lo tanto se supone razonablemente que se encuentra disponible para el inicio de la traducción.

Teniendo en cuenta que durante la infección la eficiencia de la traducción se encuentra incrementada como ha sido visto reiteradamente en los perfiles ribosomales (Figura 9), y que la proteína NSP3 tiene un papel relevante en el apagado de la síntesis de proteína celular, induciendo la acumulación de PABP y mRNAs poliadenilados en el núcleo de células infectadas, y que en efecto, el silenciamiento de NSP3 permite una notable recuperación de la síntesis de proteína celular ^{8,14,54}, parece probable que la síntesis de proteína viral se pueda llevar a cabo aun con una reducida proporción de eIF2 α , y que presumiblemente la interacción NSP2-PP1 pueda favorecer la traducción viral manteniendo un bajo nivel del factor en su forma no fosforilada, mientras se arresta la síntesis de proteína celular desde otro frente.

Otra posibilidad interesante es que la presunta interacción NSP2-PP1 inhiba la actividad de la fosfatasa de tal manera que podría favorecer el mantenimiento de los sensores de RNA viral RIG-I y MDA5 en su forma inactiva, lo cual disminuiría la respuesta antiviral de la célula. Dada la importancia de NSP2 en el ciclo replicativo, tendrán que diseñarse experimentos precisos que permitan dilucidar la función de esta proteína en el mecanismo traduccional de rotavirus y en la respuesta inmune innata de la célula.

8. CONCLUSIÓN

El análisis bioinformático de las secuencias de aminoácidos de las 12 proteínas de la cepa RRV de rotavirus arrojó dos tipos de motivo relacionados con el proceso de traducción: unión a eIF4E e interacción con PP1. El motivo de unión a eIF4E lo poseen cuatro proteínas virales: tres estructurales (VP1, VP2, VP3) y una no estructural (NSP2); y el motivo de interacción con PP1 lo poseen siete proteínas virales: cuatro estructurales (VP1, VP3, VP6, VP7) y tres no estructurales (NSP1, NSP2, NSP5).

La presencia reiterada de partículas infecciosas a lo largo de las fracciones colectadas de los gradientes de sacarosa no permitió realizar mayores interpretaciones respecto a la identificación de proteínas estructurales en los complejos ribosomales. Sin embargo, la detección mediante Western blot de la proteína viral NSP2 y de la fosfatasa celular PP1 en los complejos 48S y 80S de células infectadas, sumada a la identificación *in silico* de dos motivos de interacción con PP1 altamente conservados en NSP2, uno de los cuales se encuentra expuesto en un giro β de su estructura molecular, motivaron la idea de realizar ensayos de pull-down a fin de determinar probables interacciones entre NSP2 y PP1.

Los ensayos de pull-down con una proteína PP1 recombinante (PP1-H₆) revelaron su unión a la proteína viral NSP2, lo cual fue confirmado desde el enfoque inverso por la unión de una proteína NSP2 recombinante (NSP2-H₆) a la fosfatasa celular PP1. Los resultados obtenidos permiten entonces afirmar que NSP2 y PP1 interactúan *in vitro*, lo cual sugiere que es muy probable que también puedan interactuar *in vivo*, de tal manera que queda abierta la tentadora posibilidad de que la proteína viral NSP2 pueda ser una subunidad regulatoria de la fosfatasa celular PP1 con función aún por determinar.

9. PERSPECTIVAS

Las perspectivas más relevantes que surgen de este trabajo se listan a manera de objetivos para futuros estudios a continuación:

- Identificar el motivo implicado en la interacción entre NSP2 y PP1 *in vitro*, y verificar si existe interacción *in vivo* entre estas proteínas.
- Determinar el estado de fosforilación de los sensores de RNA viral RIG-I y MDA5 durante la infección por rotavirus RRV.
- Identificar las proteínas que podrían ser blanco de la interacción NSP2-PP1, así como también determinar si se promueve o impide su defosforilación.
- Definir el papel que podría tener la presunta interacción NSP2-PP1 en el ciclo replicativo de rotavirus RRV.
- Realizar ensayos de pull-down con proteínas His-tag a fin de establecer la funcionalidad de los motivos de unión a eIF4E que arrojó el análisis *in silico* de VP2, quizá la más probable candidata a tener un papel relevante en el inicio de la traducción de rotavirus.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Estes, M. K.; Greenberg, H. B., Rotaviruses. In *Fields Virology*, 6 ed.; Knipe, D. M.; Howley, P. M., Eds. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2013; Vol. II, pp 1347-1401.
2. Pesavento, J. B.; Crawford, S. E.; Estes, M. K.; Prasad, B. V., Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr Top Microbiol Immunol* **2006**, *309*, 189-219.
3. Hu, L.; Crawford, S. E.; Hyser, J. M.; Estes, M. K.; Prasad, B. V., Rotavirus non-structural proteins: structure and function. *Curr Opin Virol* **2012**, *2* (4), 380-8.
4. Desselberger, U., Rotaviruses. *Virus Res* **2014**, *190*, 75-96.
5. Dever, T. E., Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* **2002**, *108* (4), 545-56.
6. Bushell, M.; Sarnow, P., Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. *J Cell Biol* **2002**, *158* (3), 395-9.
7. Schneider, R. J.; Mohr, I., Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem Sci* **2003**, *28* (3), 130-6.
8. Lopez, S.; Arias, C. F., Rotavirus-host cell interactions: an arms race. *Curr Opin Virol* **2012**, *2* (4), 389-98.
9. Verschoor, A.; Srivastava, S.; Grassucci, R.; Frank, J., Native 3D structure of eukaryotic 80s ribosome: morphological homology with E. coli 70S ribosome. *J Cell Biol* **1996**, *133* (3), 495-505.
10. Wilson, D. N.; Doudna, Cate, J. H., The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2012**, *4* (5).
11. Yusupova, G.; Yusupov, M., High-resolution structure of the eukaryotic 80S ribosome. *Annu Rev Biochem* **2014**, *83*, 467-86.
12. Ben-Shem, A.; Jenner, L.; Yusupova, G.; Yusupov, M., Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science* **2010**, *330* (6008), 1203-9.
13. Ben-Shem, A.; Garreau de Loubresse, N.; Melnikov, S.; Jenner, L.; Yusupova, G.; Yusupov, M., The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* **2011**, *334* (6062), 1524-9.
14. Montero, H.; Arias, C. F.; Lopez, S., Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J Virol* **2006**, *80* (18), 9031-8.
15. Montero, H.; Rojas, M.; Arias, C. F.; Lopez, S., Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2 α but prevents the formation of stress granules. *J Virol* **2008**, *82* (3), 1496-504.
16. Rojas, M.; Arias, C. F.; Lopez, S., Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2 α in rotavirus infection. *J Virol* **2010**, *84* (20), 10457-66.
17. Jackson, R. J.; Hellen, C. U.; Pestova, T. V., The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, *11* (2), 113-27.
18. Walsh, D.; Mohr, I., Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat Rev Microbiol* **2011**, *9* (12), 860-75.
19. Firth, A. E.; Brierley, I., Non-canonical translation in RNA viruses. *J Gen Virol* **2012**, *93* (Pt 7), 1385-409.
20. Hinnebusch, A. G., The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu Rev Biochem* **2014**, *83*, 779-812.
21. Marcotrigiano, J.; Gingras, A. C.; Sonenberg, N.; Burley, S. K., Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol Cell* **1999**, *3* (6), 707-16.
22. Ptushkina, M.; von der Haar, T.; Karim, M. M.; Hughes, J. M.; McCarthy, J. E., Repressor binding to a dorsal regulatory site traps human eIF4E in a high cap-affinity state. *EMBO J* **1999**, *18* (14), 4068-75.

23. Mohr, I., Phosphorylation and dephosphorylation events that regulate viral mRNA translation. *Virus Res* **2006**, *119* (1), 89-99.
24. Kimball, S. R., Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int J Biochem Cell Biol* **1999**, *31* (1), 25-9.
25. Proud, C. G., eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol* **2005**, *16* (1), 3-12.
26. Aggen, J. B.; Nairn, A. C.; Chamberlin, R., Regulation of protein phosphatase-1. *Chem Biol* **2000**, *7* (1), R13-23.
27. Bollen, M., Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends Biochem Sci* **2001**, *26* (7), 426-31.
28. Cohen, P. T., Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* **2002**, *115* (Pt 2), 241-56.
29. Bollen, M.; Peti, W.; Ragusa, M. J.; Beullens, M., The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends Biochem Sci* **2010**, *35* (8), 450-8.
30. Peti, W.; Nairn, A. C.; Page, R., Structural basis for protein phosphatase 1 regulation and specificity. *FEBS J* **2013**, *280* (2), 596-611.
31. Boens, S.; Szeker, K.; Van Eynde, A.; Bollen, M., Interactor-guided dephosphorylation by protein phosphatase-1. *Methods Mol Biol* **2013**, *1053*, 271-81.
32. Brush, M. H.; Weiser, D. C.; Shenolikar, S., Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* **2003**, *23* (4), 1292-303.
33. Boyce, M.; Bryant, K. F.; Jousse, C.; Long, K.; Harding, H. P.; Scheuner, D.; Kaufman, R. J.; Ma, D.; Coen, D. M.; Ron, D.; Yuan, J., A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* **2005**, *307* (5711), 935-9.
34. Roberts, L. O.; Jopling, C. L.; Jackson, R. J.; Willis, A. E., Viral strategies to subvert the mammalian translation machinery. *Prog Mol Biol Transl Sci* **2009**, *90*, 313-67.
35. Walsh, D.; Mathews, M. B.; Mohr, I., Tinkering with translation: protein synthesis in virus-infected cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**, *5* (1), a012351.
36. He, B.; Gross, M.; Roizman, B., The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94* (3), 843-8.
37. He, B.; Gross, M.; Roizman, B., The gamma134.5 protein of herpes simplex virus 1 has the structural and functional attributes of a protein phosphatase 1 regulatory subunit and is present in a high molecular weight complex with the enzyme in infected cells. *J Biol Chem* **1998**, *273* (33), 20737-43.
38. Zhang, F.; Moon, A.; Childs, K.; Goodbourn, S.; Dixon, L. K., The African swine fever virus DP71L protein recruits the protein phosphatase 1 catalytic subunit to dephosphorylate eIF2alpha and inhibits CHOP induction but is dispensable for these activities during virus infection. *J Virol* **2010**, *84* (20), 10681-9.
39. Sanchez, E. G.; Quintas, A.; Nogal, M.; Castello, A.; Revilla, Y., African swine fever virus controls the host transcription and cellular machinery of protein synthesis. *Virus Res* **2013**, *173* (1), 58-75.
40. Wilson, J. E.; Powell, M. J.; Hoover, S. E.; Sarnow, P., Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Mol Cell Biol* **2000**, *20* (14), 4990-9.

41. Wilson, J. E.; Pestova, T. V.; Hellen, C. U.; Sarnow, P., Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome. *Cell* **2000**, *102* (4), 511-20.
42. Jan, E.; Sarnow, P., Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *J Mol Biol* **2002**, *324* (5), 889-902.
43. Artimo, P.; Jonnalagedda, M.; Arnold, K.; Baratin, D.; Csardi, G.; de Castro, E.; Duvaud, S.; Flegel, V.; Fortier, A.; Gasteiger, E.; Grosdidier, A.; Hernandez, C.; Ioannidis, V.; Kuznetsov, D.; Liechti, R.; Moretti, S.; Mostaguir, K.; Redaschi, N.; Rossier, G.; Xenarios, I.; Stockinger, H., ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40* (Web Server issue), W597-603.
44. Dinkel, H.; Michael, S.; Weatheritt, R. J.; Davey, N. E.; Van Roey, K.; Altenberg, B.; Toedt, G.; Uyar, B.; Seiler, M.; Budd, A.; Jodicke, L.; Dammert, M. A.; Schroeter, C.; Hammer, M.; Schmidt, T.; Jehl, P.; McGuigan, C.; Dymecka, M.; Chica, C.; Luck, K.; Via, A.; Chatr-Aryamontri, A.; Haslam, N.; Grebnev, G.; Edwards, R. J.; Steinmetz, M. O.; Meiselbach, H.; Diella, F.; Gibson, T. J., ELM--the database of eukaryotic linear motifs. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40* (Database issue), D242-51.
45. Dinkel, H.; Van Roey, K.; Michael, S.; Davey, N. E.; Weatheritt, R. J.; Born, D.; Speck, T.; Kruger, D.; Grebnev, G.; Kuban, M.; Strumillo, M.; Uyar, B.; Budd, A.; Altenberg, B.; Seiler, M.; Chemes, L. B.; Glavina, J.; Sanchez, I. E.; Diella, F.; Gibson, T. J., The eukaryotic linear motif resource ELM: 10 years and counting. *Nucleic Acids Res* **2014**, *42* (Database issue), D259-66.
46. Piron, M.; Vende, P.; Cohen, J.; Poncet, D., Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J* **1998**, *17* (19), 5811-21.
47. Schuck, P.; Taraporewala, Z.; McPhie, P.; Patton, J. T., Rotavirus nonstructural protein NSP2 self-assembles into octamers that undergo ligand-induced conformational changes. *J Biol Chem* **2001**, *276* (13), 9679-87.
48. Jayaram, H.; Taraporewala, Z.; Patton, J. T.; Prasad, B. V., Rotavirus protein involved in genome replication and packaging exhibits a HIT-like fold. *Nature* **2002**, *417* (6886), 311-5.
49. Moorhead, G. B.; Trinkle-Mulcahy, L.; Ulke-Lemee, A., Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8* (3), 234-44.
50. Wies, E.; Wang, M. K.; Maharaj, N. P.; Chen, K.; Zhou, S.; Finberg, R. W.; Gack, M. U., Dephosphorylation of the RNA sensors RIG-I and MDA5 by the phosphatase PP1 is essential for innate immune signaling. *Immunity* **2013**, *38* (3), 437-49.
51. Seya, T., Measles virus takes a two-pronged attack on PP1. *Cell Host Microbe* **2014**, *16* (1), 1-2.
52. Mesman, A. W.; Zijlstra-Willems, E. M.; Kaptein, T. M.; de Swart, R. L.; Davis, M. E.; Ludlow, M.; Duprex, W. P.; Gack, M. U.; Gringhuis, S. I.; Geijtenbeek, T. B., Measles virus suppresses RIG-I-like receptor activation in dendritic cells via DC-SIGN-mediated inhibition of PP1 phosphatases. *Cell Host Microbe* **2014**, *16* (1), 31-42.
53. Davis, M. E.; Wang, M. K.; Rennick, L. J.; Full, F.; Gableske, S.; Mesman, A. W.; Gringhuis, S. I.; Geijtenbeek, T. B.; Duprex, W. P.; Gack, M. U., Antagonism of the phosphatase PP1 by the measles virus V protein is required for innate immune escape of MDA5. *Cell Host Microbe* **2014**, *16* (1), 19-30.
54. Rubio, R. M.; Mora, S. I.; Romero, P.; Arias, C. F.; Lopez, S., Rotavirus prevents the expression of host responses by blocking the nucleocytoplasmic transport of polyadenylated mRNAs. *J Virol* **2013**, *87* (11), 6336-45.

ANEXOS

Anexo 1. Secuencias de aminoácidos de las proteínas de la cepa RRV de rotavirus

Las secuencias de aminoácidos de las 12 proteínas virales se tradujeron *in silico* a partir de los 11 genes de la cepa RRV de rotavirus secuenciados en el Laboratorio de Virología Molecular del IBT, UNAM, empleando la herramienta de traducción disponible en el portal ExPASy.

Proteínas estructurales: VP1-VP4, VP6 y VP7

>RRV - VP1

MGKYNLILSEYLSFIYNSQSAVQIPIYYSSNSELENRCIEFHSCLENSKNGLSLKKLFVEYSDVI
ENATLLSILSYSDKYNAVERKLVKYAKGKPLEADLTVNELDYENNKITSELPFTAEEYTDLL
MDPAILTSLSSNLNAVFMFWLEKHENDVAEKLKIYKRRLDLFTIVASTVNKYGVPRHNAKYRY
EYEVMDKDPYYLVTWANSSIEMLSVFSHEDYLIARELIVLSYSNRSTLAKLVSSPMSILVAL
VDINGTFITNEELELEFSNKYVRAIVPDQTFDELKQMLDNMRKAGLTDIPKMIQDWLVDCSIE
KFPLMAKIYSWSFHVGFGRKQKMLDAALDQLKTEYTEDVDDEMYREYTMLIRDEVVKMLEEP
VKHDDHLLQDSELAGLLSMSSASNGESRQLKFRKTIFSTKKNMHVMDDMANGRYTPGIIPP
VNVDKPIPLGRRDVPGRRTRIIFILPYEYFIAQHAVVEKMLIYAKHTREYAEFYSSQSNQLLSYG
DVTRFLSNNSMVLVYTDVSQWDSSQHNTQPFRKGIIIMGLDMLANMTNDARVIQTLNLYKQTQI
NLMDSYVQIPDGNVIKKIQYGAVASGEKQTKAANSIANLALIKTVLSRISNKYSFATKIIRVDG
DDNYAVLQFNTEVTKQMVQDVSNDVRETYARMNTKVKALVSTVGIIEIAKRYIAGGKIFFRAG
INLLNNEKKGQSTQWDQAAVLYSNYIVNRLRGFETDREFILTKIMQMTSVAITGSLRFLPSEV
LTTNSTFKVFDSEDFIIEYGTDDDEVYIQRAFMSLSSQKSGIADEIAASSKFKNYVSRLSEQLLFS
KNNIVSRGIALTEKAKLNSYAPISLEKRRRAQISALLTMLQKPVTFKSSKITINDILRDIKPFPTVN
EAHLPIQYQKFMPTLPDQVYIIQICIGSRTYQIEDDGSKSAISRLISKYSVYKPSIEELYKVISLHE
NEIQLYLISLGIPKIDADTYVGSKIYSQDKYRILESYYVYNLLSINYGCYQLDFDFNSPDLEKLIRIPF
KGKIPAVTFILHLYAKLEVINHAIKNGSWISLFCNYPKSEMIKLWKKMWNITSLRSPYTN

>RRV - VP2

MAYRKRGARRETNLKQDDRMQEKEENKNVNTNSENKNATKPQLSEKVLVSQKEEVITDNQEE
IKIADEVKKSNEESKQLLEVLTKEEHQKEVQYEILQKTIPTFEPKESILKKLEDIKPEQVKKQ
TKLFRIFEPRLPVYRANGEKELRNRWYWKLRDTPDGDYDVREYFLNLYDQVLTEMPDY
LLLKDMAVENKNSRDAGKVVDSETAAICDAIFQDEETEGVRRFIAEMRQRVQADRNVVNY
PSILHPIDHAFNEYFLQHQLVEPLNNDIIFNYIPERIRNDVNYILNMDRNL PSTARYIRPNLLQDR
LNLHDFESLWDTITTSNYILARSVVPDLKELVSTEAQIQKMSQDLQLEALTIQSETQFLTGIN
QAANDCFKTLIAAMLSQRTMSLDFVTTNYMSLISGMWLLTVVPNDMFIRESLVACQLAIINTII
YPAFGMQRMHYRNGDPQTPFQIAEQIQNFQVANWLHFVNNNQFRQVVIDGVNLNQLVNDNI
RNGHVVNQLMEALMQLSRQQFPTMPVDYKRSIQRGILLLSNRLGQLVDLTRLLAYNYETLMA
CITMNMQHVQTLTTEKLQLTSVTSLCMLIGNATVIPSPQTLFHYYNVNVNFHSNYNERINDAV
AIITAANRLNLYQKKMKSIVEDFLKRLQIFDISRVPDDQMYRLRDRLLPVEIRRLDIFNLILM
NMEQIERASDKIAQGVIIAYRDMQLERDEMYGYVNIARNLDGFQQINLEELMRTGDYAQITN
MLLNNQPVALVGALPFITDSSVISLVAKLDATVFAQIVKLLKVDTLKPILYKINSDSNDFYLV
NYDWVPTSTTKVYKQIPQQQDFRASHMMLTSLNLTFTVYSDLLAFVSADTVEPINAVAFDNMRI
MNEL

>RRV - VP3

MKVLALRHGVAQVYADTQIYTHDDTKDSYENAF LISNL TTHN ILYLNYSIKTLEILNKSGIAAV
EIQSLEELFTLIRCNFYDYENNIIYLHDYSYTNNEIRTDQHWVTKTDIEEYLLPGWKLT YVG
YNGSDTRGHYNFSFTCQNAATDDDLIEYIYSEALDFQNFMLKKIKERM TTS LPIARLSNRVFR
DKLFPLLSEKHQRIVNIGPRNESMFTFLNFPSIKQFSNGPYLVKDTIKLKQERWLGKRVSQFDIG
QYKNMMNVITTVYYYYNLYQKKPIIYMVGSAPSYWIYDVKQYSDFMFETWDPLDTPYSSVH
HKELFFEKDIRLKD DSILYIDIRTD RGNTDWKEWRKIVEAQTISNLKLA YRYLSGGKSKVCCV
KMTAMDLELPISAKLLHHPTTEIRSEFYLLLDIWDISNVKRFIPKGVLYSFINNVTTENVFIQPPF
KIKPFKN DYIVALYALSNDFNDR TDVINLNNQKQSLITVRINNTFKDEPKVGFKNIYDWTFLPT
DFTTTDAIITSYDGLGIFGLSISLASKPTGNNHLFILNGTDKYYKLDQFANHTGISRRSHQIRFS
ESATSYSGYIFRDL SNNFN LIGTNVENS VSGHVYNALIYYRYNYSFDLKRWIYLHSIEKADIE
GGKYEHAPIELIYACRSAKEFALLQDDLTVLRYANEIESYINKVYSITYADDPNYFIGIKFRHI
PYEYDVKIPHLTFGVLFISDNMIPDVVEIMKIMKKELFEMDITTSYTYMLSDGIYVANVSGVLA
TYFKMYNLFYK SQITFGQSRMFIPHITLSFSNNKTVRIESTRLKISSIYLRKIKGDTVFD MSE

>RRV - VP4

MASLIYRQLL TNSYTV DLSDEIQEIGSTK TQNV TINLGPFAQTGYAPVNWGPGETNDSTTVEPV
LDGPYQPTTFNPPVDYWMLLAPTAAGVVVEGTNNTDRWLATILVEPNVTSETRSYTLFGTQE
QITIANASQTQWK FIDVVKTTQNGSYSQYGPLQSTPKLYAVMKHNGKIYTYNGETPNVTTKY
YSTTNYDSVNMTAFCDFYIIPREEESTCTEYINNGLPPIQNTRNIVPLALSARNIISHRAQANEDI
VVKTS LWKEMQYNRDITIRFKFASSIVKSGGLGYKWSEISFKPANYQYTYTRDGEEVTAHTT
CSVNGMNDFNFN GGS LPTDFVISRYEVIKENS YVYVDYWD DSQA FRNMVYVRSLAANLNSVI
CTGGDY SFALPVGQWPVMTGGAVSLHSAGVTLSTQFTDFVSLNSLRFRFRLTVEEPSFSITRTR
VSRLYGLPAANPNNGKEYYE VAGRFS LISLVPSNDDYQTPITNSVTVRQDLERQLGELREEFN
ALSQEIAMSQLIDLALLPLDMFSMFSGIKSTIDAAKSMATSVMKKFKKSGLAN SVSTLTDSLSD
AASSIRGASIRSVGSSASAWTDVSTQITDVSSSVSSISTQTSTISRRLRLKEMATQTEGMNFDDI
SAAVLKTKIDRSTQISPNTLPDIVTEASEKFIPNRAYRVINNDEVFEAGTDGRFFAYRVETFDEIP
FDVQKFADLVTDSPVISAHDFKTLKNLNDNYGISRQQAFNLLRSDPRVLRFINQDNPIRNRIE
QLIMQCRL

>RRV - VP6

MDVLYSLSKTLKDARDKIVEGTLYSNVSDLIQQFNQMIITMNGNEFQTGGIGNLPIRNWNFDF
G LLGTLLNLDANYVETARNTIDYFVDFVDNVCMDVMRESQRNGIAPQSDSLRKLSGIKFKR
INF DNSSEYIENWNLQNRRTGFTFHKNIFPYSASFTLNRSQPAHDNLMGTMWLNAGSEIQ
VAGFDYSCAINAPANIQQFEHIVQLRRVLT TATITLLPDAERFSFPRVINSADGATTWYFNPVIL
RPNNVEVEFLNGQIINTYQARFGTHIARNFDTIRLSFQLMRPPNMPAVAALFPNAQPFEHHAT
VGLTLRIESAVCESVLADASKTMLANVTSVRQEYAI PVGPVFPPGMNWTDLITNYS SREDNL
QRVFTVASIRSMLVK

>RRV - VP7

MYGIEYTTVLTF LISLILLNYILKSLTRMMDFIYRFLFIVVILSPLLKAQNYGINLPITGSM DTA Y
ANSTQEETFLTSTLCLYYPTEAATEINDNSWKDTLSQLFLTGWPTGSVYFKEYTDIASFSVDP
QLYCDYNVVL MKYDATLQLDMSELADLILNEWLCNPM DITLYYYQQTDEANKWISMGSSCT
IKVCPLNTQTLGIGCLTTDTATFEEVATAEKL VITDVVDGVNHKLDVTTATCTIRNCKKLGPRE
NVAVIQVGGSDVLDITADPTTAPQTERMMRINWKKWWQVFYTVVDYVNQIIQAMSKRSRSL
NSAAFYRI

Proteínas no estructurales: NSP1-NSP6

>RRV - NSP1

MKSLVLAMATFKDACFHYRRVTKLNRELLRIGANSVWTPVSSNKIKIKGWCIECCQLTGLTFC
HGCSLAHVCQWCIQNKRCFLDNEPHLLKLRTFESPITKEKLQCIINLYELLPINHGVINFKKKT
IKQRKCRNEFDKSWYNQLLLPITLNAAVFKFHSRDVYVFGFYEGSSPCIDLPYRLVNCIDLKDYK
LLLDQVNFERMSSLPDNLQSIYANKYFKLSRLPSMKLKRIYYSDFSKQNLINKYKTKSRIVLRN
LTFEFTWDSQTDLHHDLDKDKILAAALSTSSLKQFETHDLNLGRIKADIFELGHHCKPNYISSN
HWQPASKISKCKWCNVKYAFRDMDWKMESMYNELLFSFIQSCYKSNVNVGHCSSIEKAYPLV
KDILWHSITEYIDQTVEKLFNTMNPVQVNEQQGNKVLLANRYRLYMHIKMLETEALPFTFTL
NQFNIIKGINVQWCDVAELDHLPLCTEQTDALVKLEEEGKLSEGYELLISDSEDDD

>RRV - NSP2

MAELACFCYPHLENDYSYRFIPFNLSLAIKCMLTAKVDKDDQDKFYNSIYGIAPPPQFKKRYNTN
DNSRGMNYETPMFNKVAVLICEALNSIKVTQSDVANVLSKVVSVRHLENLVLRENHGDVLF
HSELVLSVLIAGHSKEIETTATAEGGEIVFQNAAFMWKLTYLEHRLMPILDQNFIEYKITV
NEDKPISESHVKELIAELRWQYNKFAVITHGKGHYRVVKYSSVANHADR VYATFKSNNKNGN
VLEFNLLDQRVIWQNWYAFTSSMKQGNTLEICKKLLFQKMKRESNPFKGLSTDRKMDEVSI
GI

>RRV - NSP3

MLKMESTQQMASSIINSSFEAAVVAATSTLELMGIQYDYNEVYTRVKSDFLVMDDSGVKNN
LIGKAITIDQALNGKFSSAIRNRNWMTDSRTVAKLDEDVNKLRLMLSSKGIDQKMRVLNACFS
VKRIPGKSSSIVKCTRLMKDKLERGEVEVDDSFVEEKMEVDITDWKSRYEQLEKRFESLKHRV
NEKYNHWVLKARKVNENMNSLQNVISQQQAHINELQMYNNKLERDLQSKIGSVSSIEWYL
RSMELSDDVKSIEQLNSIDQLNPVNAIDDFESILRNLISDYDRLFIMFKGLLQQCNYTYTYE

>RRV - NSP4

MEKLTDLNYTSLSVVTLMNDLHTIMEDPGMAYFPYIASVLTVLFTLHKASVPTMKIALKTSKC
SYKVIKYCIVSIFNTLLKLAGYKEQITTKDEIERQMDRVVKEMRRQLEMIDKLTTREIEQVELL
KRIHDMLIIPVDKIDMSQEFNQKYFKTLNDWAEGENPYEPKEVTASL

>RRV - NSP5

MSLSIDVTSLPSISSSIYKHESSTTSTLSGKSIGRSEQYVSPDAEAFNKYMLSKSPEDIGPSDSAS
NDPLTSFSIRSNAVKTNADAGVSMDSSTQSRPSSNVGCDRVDFSLSKGKVNANLDSSISVSTV
SKKEKSKSDHKNRKHYPRIEADSDEYVLDDSDSDDGKCKNCKYKKKYFALRMRMKQVA
MQLIEDL

>RRV - NSP6

MNHLQRRQLFLENLLVGVNSTFHQMOKHSISTCCRSQRILDHLILLQTTHSPVFRLLDRMQLR
QMQLACLWIHRHNHDLQVTLDAIEWISP

Anexo 2. Propiedades fundamentales de las proteínas de la cepa RRV de rotavirus

Proteína	Moléculas / virión	Aminoácidos (Nº)	PM (Da)	PM (KDa)	pI
VP1	12	1082	124436	124	8.42
VP2	120	887	103285	103	5.71
VP3	12	835	97904	98	6.86
VP4	120	776	86584	87	5.11
VP5*	-	529	59062	59	5.37
VP8*	-	231	25784	26	4.46
VP6	780	397	44896	45	6.01
VP7	780	326	37112	37	4.68
NSP1	-	501	58649	59	8.52
NSP2	-	317	36660	37	9.06
NSP3	-	313	36315	36	5.83
NSP4	-	175	20450	20	6.33
NSP5	-	198	21667	22	6.83
NSP6	-	92	11006	11	9.21

Los valores tabulados corresponden a los resultados obtenidos mediante las herramientas de cálculo y análisis bioinformático disponibles en el portal ExPASy (www.expasy.org), cálculos que se realizaron para las 12 secuencias de aminoácidos traducidas a partir de los 11 genes de la cepa RRV de rotavirus secuenciados en el Laboratorio de Virología Molecular del IBT, UNAM. Vale la pena recordar que el segmento 11 del genoma de RRV es bicistrónico, lo cual le permite codificar dos proteínas (NSP5 y NSP6), y que durante la entrada del virus en la célula, la proteína VP4 sufre procesamiento proteolítico entre los residuos aminoácidos 231-232 y 247-248 generando dos cadenas (VP5* y VP8*).

El número de proteínas estructurales por virión se ha tomado de los valores reportados, los cuales han sido calculados a partir del estudio estructural de viriones purificados (Estes, M. K.; Greenberg, H. B. *Rotaviruses*. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M. (Eds). *Fields Virology*. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2013. pp 1355).

Anexo 3. Clasificación general, códigos y probabilidad de los aminoácidos

Clasificación	Aminoácido	Código (3 letras)	Código (1 letra)	Probabilidad	
No polares	Alanina	Ala	A	0.074253	0.333169
	Valina	Val	V	0.045399	
	Leucina	Leu	L	0.073093	
	Isoleucina	Ile	I	0.026977	
	Metionina	Met	M	0.019150	
	Prolina	Pro	P	0.094297	
Aromáticos	Fenilalanina	Phe	F	0.018359	0.039350
	Tirosina	Tyr	Y	0.014141	
	Triptófano	Trp	W	0.006850	
Polares	Glicina	Gly	G	0.073955	0.337565
	Serina	Ser	S	0.104119	
	Treonina	Thr	T	0.059547	
	Cisteína	Cys	C	0.009697	
	Asparagina	Asn	N	0.033851	
	Glutamina	Gln	Q	0.056396	
Cargados (-)	Aspartato	Asp	D	0.050147	0.139158
	Glutamato	Glu	E	0.089011	
Cargados (+)	Lisina	Lys	K	0.061170	0.150756
	Arginina	Arg	R	0.063802	
	Histidina	His	H	0.025784	

Esta clasificación general de los aminoácidos se basa en tres propiedades fisicoquímicas fundamentales: polaridad, carga y aromaticidad. Los valores de probabilidad de los aminoácidos se obtuvieron de la base de datos ELM (www.elm.eu.org), los cuales derivan del análisis estadístico de la base de datos UniProt (www.uniprot.org).

Anexo 4. Propiedades fundamentales de los factores de inicio de la traducción

UniProt (ID)	Proteína	Aminoácidos (N°)	PM (Da)	PM (kDa)	pI
	eIF2			125	
P05198	eIF2 α	315	36112	36	5.01
P20042	eIF2 β	333	38388	38	5.60
P41091	eIF2 γ	472	51110	51	8.66
P60842	eIF4A I	406	46154	46	5.32
Q14240	eIF4A II	407	46402	46	5.33
P06730	eIF4E 1	217	25097	25	5.79
O60573	eIF4E 2	245	28362	28	8.97
Q8N5X7	eIF4E 3	224	24441	24	5.98
Q04637	eIF4G I	1599	175491	175	5.25
O43432	eIF4G II	1585	176652	177	5.27
P41567	eIF1	113	12732	13	6.90
P47813	eIF1A X	144	16460	16	5.07
O14602	eIF1A Y	144	16442	16	5.07
Q9BY44	eIF2A	585	64990	65	9.01
	eIF2B			261	
Q14232	eIF2B α	305	33712	34	6.91
P49770	eIF2B β	351	38990	39	5.77
Q9NR50	eIF2B γ	452	50240	50	6.08
Q9UI10	eIF2B δ	523	57557	58	9.45
Q13144	eIF2B ϵ	721	80380	80	4.97
P41214	eIF2D	584	64706	65	7.56
	eIF3			795	
Q14152	eIF3a	1382	166569	167	6.38
P55884	eIF3b	814	92482	92	4.89
Q99613	eIF3c	913	105344	105	5.48
O15371	eIF3d	548	63973	64	5.79
P60228	eIF3e	445	52221	52	5.71
O00303	eIF3f	357	37564	38	5.24
O75821	eIF3g	320	35611	36	5.87
O15372	eIF3h	352	39930	40	6.09
Q13347	eIF3i	325	36502	37	5.38
O75822	eIF3j	258	29062	29	4.72
Q9UBQ5	eIF3k	218	25060	25	4.81
Q9Y262	eIF3l	564	66727	67	5.93
Q7L2H7	eIF3m	374	42503	43	5.41
P23588	eIF4B	611	69151	69	5.54
Q15056	eIF4H	248	27385	27	6.66
P55010	eIF5	431	49223	49	5.41
O60841	eIF5B	1220	138827	139	5.39
P56537	eIF6	245	26599	27	4.56

Anexo 5. Propiedades fundamentales de proteínas relacionadas con el proceso de traducción y de otras proteínas mencionadas en este trabajo

UniProt (ID)	Proteína	Aminoácidos (N°)	PM (Da)	PM (kDa)	pI
P62136	PP1 α	330	37512	38	5.94
P62140	PP1 β	327	37187	37	5.84
P36873	PP1 γ	323	36984	37	6.12
P11940	PABP 1	636	70671	71	9.52
Q86U42	PABP 2	306	32749	33	5.04
Q9H361	PABP 3	631	70031	70	9.68
Q13310	PABP 4	644	70783	71	9.31
Q96DU9	PABP 5	382	43331	43	9.55
Q13541	4E-BP 1	118	12580	13	5.32
Q13542	4E-BP 2	120	12939	13	6.16
O60516	4E-BP 3	100	10873	11	4.37
P42345	mTOR	2549	288892	289	6.73
Q9BUB5	Mnk-1	465	51342	51	6.26
Q9HBH9	Mnk-2	465	51875	52	5.80
P19525	PKR	551	62094	62	8.58
Q9NZJ5	PERK	1116	125216	125	5.27
Q9BQI3	HRI	630	71106	71	5.68
Q9P2K8	GCN2	1649	186911	187	5.88
O75807	GADD34	674	73478	73	4.55
Q5SWA1	CReP	713	79152	79	4.59
P08353	ICP34.5	263	27533	28	11.84
Q65212	DP71L	71	8478	8	10.53
P62753	rpS6	249	28681	29	10.85
P08263	GST	222	25631	26	8.91
O95786	RIG-I	925	106600	107	6.03
Q9BYX4	MDA5	1025	116689	117	5.38
Q9EMA9	MV-V	299	32146	32	4.77

Anexo 6. Alineamiento múltiple de secuencias de NSP2 de distintas cepas de rotavirus

B3SRX8 | NSP2_ROTWI 241 VEATYKNIITKNGNAIDENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIDVCKKLLFQKIKCEKNPF 300 isolate Human/United States/WI61/1983
 B3SRR4 | NSP2_ROT7 241 VYATFKSNKNGNMLEENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIDVCKRLLLFQKMKRESNPF 300 isolate Human/United Kingdom/A64/1987
 Q02K62 | NSP2_ROT41 241 VYATFKSNSKNGGMIEENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIEI~~T~~CKKLLLFQKMKRESNPF 300 isolate Human/Belgium/B4106/2000
 Q03245 | NSP2_ROT14 241 VEATYKNSAKSNVIDENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIDVCKKLLLFQKMKCEKNPF 300 strain Human/United States/Wa/1974
 B3SR52 | NSP2_ROTAD 241 VEATYKNTKSNVIDENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIDVCKKLLLFQKIKCEKNPF 300 strain Human/United States/D/1974
 B3SRV4 | NSP2_ROT16 241 VEATYKNNAKSNVIDENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIDVCKKLLLFQKMKCEKNPF 300 strain Human/United States/P/1974
 Q03240 | NSP2_ROT15 241 VYATFKSNKNGNMLEENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIDVCKKLLLFQKIKRESNPF 300 strain Human/United States/DS-1/1976
 B3SRX0 | NSP2_ROT1 241 VEATYKNSAKSNVIDENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIDVCKKLLLFQKMKCEKNPF 300 strain Human/United Kingdom/ST3/1975
 A42CW3 | NSP2_ROT3 241 VYATFKNNIKSGIASDFILLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIEVCKRLLLFQKMKCEKNPF 300 strain Human/Japan/AU-1/1982
 Q03NA8 | NSP2_ROT8 241 VEATYKNNAKSNVIDENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIDVCKKLLLFQKMKCEKNPF 300 strain Human/Japan/KU/1995
 B3SRQ6 | NSP2_ROT6 241 VYATFKSNKNGNMLEENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIDVCKRLLLFQKMKRESNPF 300 strain Human/Indonesia/69M/1980
 A3DSK8 | NSP2_ROT11 241 VEATYKNNAKSNVIDENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIDVCKKLLLFQKMKCEKNPF 300 strain Human/Philippines/L26/1987
 A2T3M2 | NSP2_ROTAP 241 VYATFKSNKNGNMLEENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIEI~~T~~CKKLLLFQKMKRESNPF 300 isolate Cow/South Africa/Offal agent/1965
 Q03241 | NSP2_ROTBN 241 VYATFKSNKNGNMLEENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIEI~~T~~CKKLLLFQKMKRESNPF 300 strain Cow/United States/NCDV-Lincoln/1969
 B2BR3 | NSP2_ROT3 241 VYATFKSNKNGNMLEENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIEVCKRLLLFQKMKRESNPF 300 strain Cow/United States/WC3/1981
 P03538 | NSP2_ROTBU 241 VYATFKSNKNGNMLEENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIDVCKKLLLFQKMKRESNPF 300 strain Cow/United Kingdom/UK/1975
 Q86505 | NSP2_ROTFR 241 VYATFKSNKNGNMLEENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIEI~~T~~CKKLLLFQKMKRESNPF 300 strain Cow/France/RF/1975
 P09366 | NSP2_ROT5 241 VEATYKNNAKSNVIDENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIDVCKKLLLFQKMKCEKNPF 300 strain Pig/United States/OSU/1977
 A2T3P0 | NSP2_ROTSH 241 VYATFKSNVKTGWINDENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIDVCKRLLLFQKMKPEKNPF 300 isolate Monkey/South Africa/SA11-H96/1958
 P03537 | NSP2_ROT5 241 VYATFKSNKNGNMLEENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIEI~~T~~CKKLLLFQKMKRESNPF 300 strain SA11-Both
 Q03242 | NSP2_ROTSP 241 VYATFKSNVKTGWINDENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIEI~~T~~CKKLLLFQKMKPEKNPF 300 strain SA11-Patton
 Q03243 | NSP2_ROTSR 241 VYATFKSNVKTGWINDENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIDVCKRLLLFQKMKPEKNPF 300 strain SA11-Ramig
 Q03244 | NSP2_ROTAL 240 VYATFKSIQKRNWPSYKENELLDTRVIW~~T~~NWAAAFVKSMMNGMKLDDSKRLLLFTRMKPNESFF 299 strain Turkey/Ireland/Ty-1/1978
 CASL/NSP2/BRV 241 VYATFKSNKNGNMLEENLLDQRIIWQNWYAFTSSMKQGNLIEI~~T~~CKKLLLFQKMKRESNPF 300 strain RRV/Mexico/UNAM/IBT/CASL

El alineamiento múltiple se llevó a cabo ejecutando en línea el programa Clustal Omega con todas las secuencias revisadas de la proteína no estructural NSP2 de rotavirus A disponibles en la base de datos Uniprot, a las cuales se agregó en la última posición la secuencia de NSP2 de rotavirus RRV analizada en este trabajo. Se muestra la región de interés del alineamiento resaltando los dos probables motivos de interacción con PP1 altamente conservados, e incluyendo los códigos y datos relevantes del origen de las secuencias.