



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la importancia de la región *coiled coil* de NSP3 de rotavirus sobre su oligomerización y función inhibitoria de la traducción celular

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. HUGO ISRAEL CONTRERAS TREVIÑO

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Luis Padilla Noriega
Facultad de Medicina – UNAM
Instituto de Investigaciones Biomédicas – UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova
Facultad de Química – UNAM

Dra. Ana María Cevallos Gaos
Instituto de Investigaciones Biomédicas – UNAM

Ciudad de México. Marzo, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Abreviaturas

[³⁵S]	Isotopo radioactivo de azufre (35)	DMSO	Dimetilsulfóxido
17DMAG	17-Dimetilaminoetilamino-17-demetoxigeldanamicina	DNA	Ácido Desoxirribonucleico
20S	20 unidades Svedberg	dNTPs	Desoxinucleotidos trifosfato
26S	26 unidades Svedberg	E1	Enzima de activación de ubiquitina
40S	40 unidades Svedberg	E2	Enzima de conjugación de ubiquitina
43S	43 unidades Svedberg	E3	Enzima de ligación al sustrato de ubiquitina
4EBP	Proteína de unión a 4E	E4	Enzima para poliubiquitinación
60S	60 unidades Svedberg	EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
80S	80 unidades Svedberg	eEF1A	Factor de elongación eucarionte 1A
AraC	Arabinósido de citosina	eEF2	Factor de elongación eucarionte 2
ARE	Elemento enriquecido en AU	eIF1	Factor de inicio eucarionte 1
ARNcd	Ácido ribonucleico de cadena doble	eIF1A	Factor de inicio eucarionte 1A
ARNcs	Ácido ribonucleico de cadena sencilla	eIF2-GTP	Factor de inicio eucarionte 2 unido a guanosín trifosfato
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	eIF3	Factor de inicio eucarionte 3
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal	eIF4A	Factor de inicio eucarionte 4A
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia	eIF4E	Factor de inicio eucarionte 4E
ATP	Adenosina Trifosfato	eIF4F	Complejo de inicio 4F
AUG	Adenina-Uracilo-Guanina	eIF4G	Factor de inicio eucarionte 4G
BSC-1	Células epiteliales de riñón de mono verde (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	eIF5	Factor de inicio eucarionte 5
Ca²⁺	Catión de calcio	eRF1	Factor de termino eucarionte 1
CaCo-2	Células epiteliales de colon humano (<i>Homo sapiens</i>)	eRF3	Factor de termino eucarionte 3
CBP80	Proteína nuclear de unión al cap (subunidad 1)	g	Gravedades
CK2	Casein cinasa 2	GBD	Dominio de unión a eIF4G
CO₂	Dióxido de carbono	GP96	Chaperona de retículo endoplásmico, paralogo de HSP90
CV-1	Fibroblastos de riñón de mono verde (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	GRP94	Chaperona de retículo endoplásmico tipo HSP90 regulada por glucosa.
CHX	Cicloheximida	HID	Dominio de interacción detectada por el doble híbrido
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol		
DLP	Partículas de doble capa		

hpi	Horas post-infección	NaCl	Cloruro de sodio
Hsc70/Hsp70	Proteína de choque térmico 70	NES	Señal de exporte nuclear
HSF1	Factor de transcripción de choque térmico 1	ng	Nanogramos
Hsp90	Proteína de choque térmico 90	nm	Nanomolar
HSP90-BD	Dominio de unión a HSP90	NS1	Proteína no estructural 1 del virus influenza
HT29	Células epiteliales de colon humano (<i>Homo sapiens</i>)	NSL	Señal de localización nuclear
I3	Fosfoproteína de unión a ADN de doble cadena del virus vaccinia	NSP1	Proteína no estructural 1
IgG	Inmunoglobulina G	NSP2	Proteína no estructural 2
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido	NSP3	Proteína no estructural 3
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma	NSP4	Proteína no estructural 4
K171E	Mutación de la lisina 171 por ácido glutámico	NSP5/NSP6	Proteína no estructural 5/6
KDa	Kilodaltones	PABP	Proteína de unión a poliadenilación
LD	Dominio de reconocimiento LDXLLXXL en paxilina	pb	Pares de bases
M	Molar	PBS	Amortiguador salino de fosfatos
mA	Miliampere	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
MA104	Células epiteliales de riñón de mono verde (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	PDB	Banco de datos de proteínas
MEM	Medio mínimo esencial	pET28	Vector de expresión bacteriano con promotor T7lac
Met-Cys	Mezcla de metionina y cisteína	PKC	Proteína cinasa C
Met-tRNAi	ARN de transferencia iniciador cargado con metionina	PVDF	Polifluoruro de vinilideno
MF4G	Fragmento medio de eIF4G	R173E	Mutación de la arginina 173 por ácido glutámico
MG132	Z-L-Leu-D-Leu-L-Leu-al	R187E:K191E	Mutaciones de la arginina 187 y lisina 191 por ácido glutámico
MG2+	Catión magnesio	RBD	Dominio de unión al ARN viral
mM	Milimolar	RNA	Ácido desoxirribonucleico
MNK1	Cinasa 1 que interactúa con MAPK	RoXaN	Proteína X asociada a la proteína NSP3 de rotavirus
MOI	Multiplicidad de infección	RRM	Motivo de reconocimiento de ARN
MPA	Ácido micofénolico	RRV	Rotavirus de Simian rhesus
mTORC1	Complejo 1 blanco de rapamicina de mamíferos	RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa retro transcripta
		RVA	Rotavirus especie A
		RVC	Rotavirus especie C

SA11	Rotavirus de simio 11	VP3	Proteína viral estructural 3
SAM	S-adenosil metionina	VP4	Proteína viral estructural 4
SDS	Dodecilsulfato sódico	VP5	Proteína viral estructural 5
SDS-PAGE	Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida adicionado con SDS	VP6	Proteína viral estructural 6
SFB	Suero fetal bovino	VP7	Proteína viral estructural 7
t_{1/2}	Tiempo de vida media	vT7	Virus vaccinia que expresa la polimerasa del fago T7
TBS	Amortiguador salino de tris	vT7lacOI	Virus vaccinia que expresa la polimerasa del fago T7 y regulado por el operon lac
TLP	Partícula de triple capa	W170A	Mutación del triptófano 170 por alanina
TPR	Repetición de tetratricopeptidos	WB-D	Western-blot disociativo
TRAP1	Proteína 1 asociada al receptor del factor de necrosis tumoral (TNF)	WB-ND	Western-blot no disociativo
TTBS	Amortiguador salino de tris más Tween 20	Y192A	Mutación en tirosina 192 por alanina
UFP/mL	Unidades formadoras de placa por mililitro	zVAD	carbobenzyoxy-valyl- alanyl-aspartyl-[O- methyl]- fluoromethylketone
VOTE.1	Plásmido VOTE (vaccinia virus/Operon lac/T7/IRES) 1	μL	Microlitros
VP1	Proteína viral estructural 1	μg	Microgramos
VP2	Proteína viral estructural 2		

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, y en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la dirección del Dr. Luis Padilla Noriega. El alumno contó con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de beca 20130 y CVU 265543.

El alumno agradece al Programa de Apoyo de Estudio de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico para la asistencia y presentación del proyecto en el American Society of Virology Meeting en el 2015 en London, Ontario, Canada.

Se agradece el apoyo institucional a la realización de proyectos por parte de: Proyecto 051/2014 aprobado por la Comisión de Investigación y Ética, División de Investigación de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Comité tutor:

Dr. Luis Padilla Noriega – Facultad de Medicina, UNAM.

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova – Facultad de Química, UNAM.

Dra. Ana María Cevallos Gaos – Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Jurado de examen de grado:

Dr. Alfredo Torres Larios – Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. Ezequiel Moises Fuentes Pananá – Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

Dr. Tomás David López Díaz – Instituto de Biotecnología, UNAM.

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco – Facultad de Medicina, UNAM.

Dr. Ramón Antonio González García Conde – Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS:

- Al Dr. Luis Padilla Noriega, por permitir que continuará mi formación académica en su laboratorio y bajo su dirección. Por confirmar un proyecto de investigación y siempre considerar mis aportaciones.
- A la Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz, por permitir que en su laboratorio se llevarán a cabo los experimentos finales de esta tesis. Así como a la Dra. Verónica Monroy Martínez, por las facilidades técnicas y asesoría durante el manejo de experimentos con radioactividad.
- Al Dr. Renato León Rodríguez, por la asesoría brindada en los experimentos iniciales, y por la generación de los plásmidos mutantes.
- Al M.C. Edgar Rosas Reyna, por el trabajo colaborativo durante los experimentos, y la retroalimentación durante el análisis de resultados.
- A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta y a la M.C. María Cecilia Aguilar Zacarías, por las facilidades técnicas en su laboratorio.
- A las Dras. Tzvetanka Dimitrova Dinkova y Ana María Cevallos Gaos, por ser parte del comité tutor y por las retroalimentaciones hechas durante la presentación de resultados.
- A los Dres. Alfredo Torres Larios, Ezequiel M. Fuentes Pananá, Tomás D. López Días, Daniel A. Fernández Velasco y Ramón A. González García Conde, por aceptar formar parte del jurado de esta tesis y sus valiosas observaciones al documento final.

FINANCIAMIENTO

- La realización de esta tesis fue financiada parcialmente por los proyectos:
- 168046 del Fondo Sectorial SEP-CONACyT CB2011 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México.
- IN264230 e IN201212 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- 264230 del Fondo Institucional del CONACyT (FOINS) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México.
- También se recibió apoyo financiero del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Tabla de contenido

Índice de tablas y figuras	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN.....	12
Rotavirus	12
Genoma, partícula y ciclo de replicación viral.	13
Proteína No Estructural 3 de rotavirus (NSP3 – Non Structural Protein 3).	16
NSP3 CONTROLA LA TRADUCCIÓN CELULAR Y VIRAL.....	18
Inhibición de la traducción celular por NSP3.....	18
Hsp90 favorece el plegamiento de diversas proteínas celulares y virales.	25
NSP3 posee una región larga del tipo <i>coiled coil</i>	27
La proteólisis es un mecanismo de control de calidad para las proteínas.	29
NSP3 es una proteína estable que se degrada por la vía del proteasoma.....	32
JUSTIFICACIÓN.....	34
HIPOTESIS	35
OBJETIVOS	36
General.....	36
Particulares.....	36
Reactivos y anticuerpos.....	37
Líneas celulares, virus y plásmidos	38
Diseño de mutantes en NSP3 y mutagénesis del plásmido VOTE.1-RRV7	38
Generación de virus vaccinia recombinantes para expresar NSP3 mutantes.	40
Expresión de NSP3wt y NSP3 mutantes en el sistema del virus vaccinia.....	42
Marcaje metabólico con [³⁵ S]metionina y [³⁵ S]cisteína de células infectadas con virus vaccinia recombinantes.	43
Acumulación de NSP3 silvestre y mutantes por Western blot disociativo.....	43
Capacidad de dimerización por NSP3 silvestre y mutantes por Western blot no disociativo.	44
Estimación del tiempo de vida media de NSP3 silvestres por Western blot no disociativo.	44
RESULTADOS	46
Mutaciones en la región <i>coiled coil</i> de NSP3 de rotavirus.....	46

Expresión de NSP3 silvestre y mutantes en el sistema del virus vaccinia.....	46
Efecto del inductor (IPTG) sobre el efecto inhibitorio de la traducción por NSP3.....	47
Las mutantes de NSP3 difieren en la inhibición de la traducción celular con respecto a la proteína silvestre.....	49
Relación dosis-efecto inhibitorio de la traducción celular para las mutantes de NSP3.....	50
Optimización de la concentración y tiempo de exposición al inhibidor del proteasoma (MG132).....	53
El proteasoma regula el nivel de acumulación de NSP3 y sus mutantes.....	54
Las mutantes de NSP3 evidencian la importancia de la región <i>coiled coil</i> en la oligomerización.....	56
Participación del proteasoma en la acumulación de los dímeros y monómeros/intermediarios de la dimerización de NSP3.....	57
Los dímeros de NSP3 se degradan por el proteasoma.....	60
Localización intracelular de PABP tras la expresión de NSP3 en el sistema del virus vaccinia.....	61
Localización intracelular de PABP y RoXaN en células MA104.....	64
Modelo propuesto para la función inhibitoria de la traducción celular.....	65
DISCUSIÓN.....	67
CONCLUSIONES.....	73
PERSPECTIVAS.....	74
REFERENCIAS.....	75
PUBLICACIONES.....	80

Índice de tablas y figuras

Tablas	Página
Tabla 1. Segmentos genómicos, función y proteínas codificadas por rotavirus	14
Tabla 2. Oligonucleótidos para mutagénesis puntual y múltiple en el dominio <i>coiled coil</i> de NSP3	38

Figuras	Página
Figura 1. Arquitectura de las partículas de los rotavirus.	11
Figura 2. Ciclo de replicación de rotavirus.	13
Figura 3. Organización funcional de NSP3.	15
Figura 4. Estructuras cristalográficas del extremo amino terminal (A) y carboxilo-terminal (B) de NSP3.	16
Figura 5. Función y regulación de HSP90.	25
Figura 6. Dominios <i>coiled coil</i> .	26
Figura 7. Proteólisis de proteínas.	28
Figura 8. Sistema ubiquitina-proteasoma.	29
Figura 9. Reconocimiento y degradación por el proteasoma de proteínas.	30
Figura 10. Esquema secuencial de la generación de virus vaccinia recombinantes.	39
Figura 11. Alineamiento de las secuencias modificadas por mutagénesis en pVOTE-RRV7.	45
Figura 12. Expresión de NSP3 silvestre y las mutantes en el dominio <i>coiled coil</i> .	46
Figura 13. Efecto del inductor (IPTG) sobre el efecto inhibitorio de la traducción celular por NSP3.	46
Figura 14. Cinética del efecto inhibitorio de la traducción celular por NSP3.	47
Figura 15. Efecto de las mutaciones sobre el efecto inhibitorio de la traducción celular por NSP3.	49
Figura 16. Relación de la cantidad del inductor (IPTG) y la función inhibitoria de la traducción celular por NSP3 y sus mutantes.	50
Figura 17. Relación de la cantidad del inductor (IPTG) y la capacidad de dimerización de NSP3.	51
Figura 18. Optimización de la concentración del inhibidor del proteasoma (MG132).	53
Figura 19. Participación del proteasoma en la acumulación de NSP3 silvestre y mutantes.	54
Figura 20. Capacidad de dimerización de las mutantes de NSP3.	56
Figura 21. Capacidad de dimerización de las mutantes de NSP3 en presencia de MG132.	58
Figura 22. Cinética de la degradación de las formas oligoméricas de NSP3.	60
Figura 23. Distribución intracelular de PABP y NSP3 en el sistema del virus vaccinia.	62
Figura 24. Efecto del arabinósido de citosina sobre la distribución intracelular de PABP y NSP3.	63
Figura 25. Localización intracelular de RoXaN y PABP.	64
Figura 26. Modelo propuesto para la inhibición traduccional de NSP3 previo a la formación del dímero.	65

RESUMEN

Los virus han desarrollado una gran variedad de estrategias para controlar la maquinaria de síntesis de proteínas a favor de su ciclo de replicación. Los transcritos virales deben competir con los transcritos celulares por los ribosomas para ser traducidos eficientemente. Los rotavirus se replican exclusivamente en el citoplasma celular, y la síntesis de proteínas virales se favorece a lo largo del ciclo replicativo, desde el comienzo de la infección hasta la conformación de las partículas virales. En esta tesis estudiamos a la proteína NSP3 de rotavirus, que funciona como regulador traduccional de la expresión génica del hospedero y del virus. Determinamos la importancia de la estabilidad y la dimerización de NSP3 sobre su función inhibitoria de la traducción celular. Se generaron mutaciones puntuales sencillas y dobles en el dominio *coiled coil* de NSP3, se midió la acumulación y la dimerización por *Western blot* (disociativo y no disociativo), y la función inhibitoria de la traducción celular por marcaje metabólico con [³⁵S]metionina y [³⁵S]cisteína. Encontramos mutaciones que afectan el proceso de dimerización de NSP3 y disminuyen su estabilidad (W170A, K171E, R173E y R187E:K191E) o aumentan la estabilidad y en consecuencia la acumulación de la forma dimérica (Y192A). No obstante, observamos también que algunas mutantes severamente afectadas en la formación de dímeros solo revierten parcialmente la función máxima de NSP3 silvestre (90% de inhibición de la traducción celular *versus* aproximadamente 50% de la mutante W170A). Nuestros resultados sugieren que los intermediarios de la dimerización de NSP3 son funcionales, y que el dímero se degrada con mayor rapidez que el monómero, posiblemente como consecuencia de su poliubiquitinación.

ABSTRACT

Viruses have developed a wide variety of strategies to control the protein synthesis machinery in favor of its replication cycle. In addition, viral transcripts must compete with cellular transcripts for ribosomes to be translated efficiently. Rotavirus replicates exclusively in the cellular cytoplasm, and the synthesis of viral proteins must be favored throughout the replication cycle from the beginning of the infection until the formation of the viral infectious particles. In this thesis, we studied the rotavirus NSP3 protein, which functions as a translational regulator of both viral and host gene expression. We determined the importance of the stability and dimerization of NSP3 on its inhibitory function of cell translation. Single- and double-point mutations were designed in the *coiled coil* domain of NSP3, and the accumulation and dimerization were determined by Western blot (dissociating and non-dissociating), as well as the inhibitory function on host cell translation by metabolic labeling with [³⁵S]methionine and [³⁵S]cysteine. We found mutations that affected the dimerization process of NSP3 and decreased its stability (W170A, K171E, R173E and R187E: K191E). In contrast, a single mutation (Y192A) enhanced the stability and the yield of the dimeric form of NSP3. However, some mutants severely affected in the dimerization process were only partially affected on the host cell inhibitory function of wild-type NSP3 (90% inhibition of cell translation versus approximately 50% of the mutant W170A). Therefore, these results suggest that NSP3 dimerization intermediaries are functional. Additionally, we found that the NSP3 dimer degrades faster than the monomer, possibly as a consequence of its polyubiquitination.

INTRODUCCIÓN

Rotavirus

En 1973, los rotavirus fueron reconocidos como el mayor causante de gastroenteritis en niños (Bishop, R. F., G. P. Davidson, I. H. Holmes, & B. J. Ruck, 1973; Flewett, T. H., A. S. Bryden, & H. Davies, 1973). Antes de la introducción de las vacunas, se estimó que a nivel mundial rotavirus causaba 453 000 muertes de niños cada año y 36% de las hospitalizaciones por diarrea. Entre 2006 y 2007 se introdujo la vacunación contra el rotavirus en México, y se obtuvo una reducción del 56 % (2008-2010) de la mortalidad relacionada a diarrea en niños menores a 5 años (Richardson, V., U. Parashar, & M. Patel, 2011).

Los rotavirus (RV) tiene tropismo por los enterocitos con capacidad de infectar otros tipos celulares, e inducen diarrea por mala absorción en el intestino delgado, al modificar el transporte de electrolitos y/o glucosa-aminoácidos. Además, inducen la producción de moléculas neuroactivas que causan isquemia y de la proteína viral no estructural 4 (NSP4) que se comporta como enterotoxina (Hagbom, M., & L. Svensson, 2016).

Los rotavirus pertenecen al género *Rotavirus* dentro de la familia *Reoviridae* (subfamilia *Sedoreovirinae*), en base a la proteína VP6 se han descrito ocho especies del género *Rotavirus* (Rotavirus A – Rotavirus H). Basado en el porcentaje de identidad genómica de los genes virales se propuso un método de clasificación de acuerdo a los segmentos genómicos: VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6, y los genotipos se representan por Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, donde G(Glycosilated), P(Protease sensitive), I(Inner capsid), R(RNA-dependent RNA Polymerase), C(Core protein), M(Methyltransferase), A(Interferon Antagonist), N(NTPase), T(Translation enhancer), E(Enterotoxin) y H(PHosphoprotein). Particularmente para NSP3, se han reportado al menos 13 genotipos distintos con un umbral de corte de 85% de identidad nucleotídica (Desselberger, U., 2014; Matthijnssens, J., M. Ciarlet, S. M. McDonald, H. Attoui, K. Bányai, J. R. Brister, et al., 2011).

Genoma, partícula y ciclo de replicación viral.

El genoma de los rotavirus de la especie A (RVA) consiste de 18,500 pb y se divide en 11 segmentos de RNA de cadena doble (dsRNA), que codifican para seis proteínas estructurales y seis proteínas no estructurales como se observa en la figura 1A y en la tabla 1 (Matsuo, E., & P. Roy, 2009).

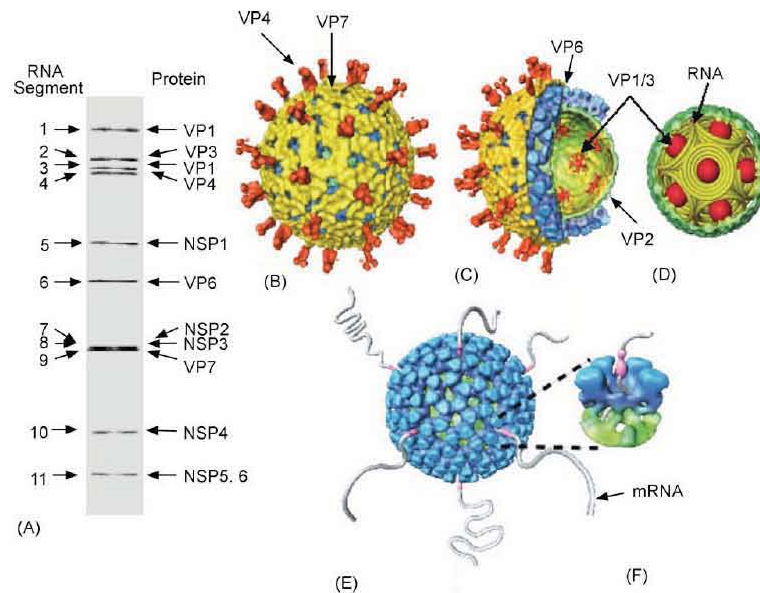


Fig. 1 Arquitectura de las partículas de los rotavirus. (B) Partícula de triple capa TLP, (C) Corte transversal de la TLP, (D) Capa interna de la partícula viral compuesta por VP2 y el genoma viral asociado a VP1 y VP3, (E) Partícula de doble capa DLP, transcripcionalmente activa, y (F) canal de salida de los RNA mensajeros virales que resultan de la asociación entre VP6 (azul) y VP2 (verde). Imagen tomada de H. Jayaram, *et al* 2004 (Jayaram, H., M. K. Estes, & B. V. V. Prasad, 2004).

La partícula completa de rotavirus mide 100 nm, no posee envoltura lipídica y está formada por tres capas concéntricas de proteínas estructurales, que se denomina partícula de triple capa (TLP, por sus siglas en inglés *triple-layered particle*) (Figura 1B). El núcleo del virión está formado por 120 moléculas de la proteína VP2 organizadas en 60 dímeros y alberga a los 11 segmentos de RNA genómico, y se asocian a VP1 (RNA polimerasa dependiente de RNA) y VP3 (guanilil-metil-transferasa), que forman el complejo de transcripción viral (Figuras 1C y 1D) (Desselberger, U., 2014; Estrozi, L. F., E. C. Settembre, G. Goret, B. McClain, X. Zhang, J. Z. Chen, et al., 2013; Greengard, P., 1992).

La capacidad infecciosa de rotavirus se adquiere por un corte proteolítico de VP4 por tripsina, que resulta en dos proteínas adicionales (VP5 y VP8) que funcionan como receptores virales; una vez dentro de la célula se pierde la última capa de proteínas, dando lugar a la partícula de doble capa (DLP por sus siglas en inglés *Double-Layered Particle*) (Greengardl, P., 1992).

El virus ingresa a la célula por endocitosis mediada por receptor, y la última capa de proteínas se desprende de la TLP por una baja concentración de Ca^{2+} en los endosomas (Figura 2B), y se libera la DLP. En el citoplasma, las DLP se vuelven transcripcionalmente activas para sintetizar los RNA mensajeros virales mediante VP1 y VP3, y los transcritos virales sirven para la síntesis de proteínas, y de molde para la replicación del genoma viral (Guglielmi, K. M., S. M. McDonald, & J. T. Patton, 2010).

La proteína NSP3 reconoce específicamente a los RNA mensajeros mediante la secuencia UGACC en el extremo 3', y se piensa que estimula su traducción circularizándolos de manera análoga a la que realiza PABP en RNAm celulares poliadenilados. Además, NSP3 impide la traducción de los mensajeros celulares poliadenilados unidos a PABP al desplazar competitivamente a esta proteína que se relocaliza en el núcleo (Figura 3D) (Desselberger, U., 2014; Navarro, A., L. Williamson, M. Angel, & J. T. Patton, 2016). El **RNAs(+)** y algunas proteínas virales se localizan en cuerpos de inclusión citoplasmáticos llamados "viroplasma", donde se lleva a cabo la replicación viral y la conformación de las DLP *de novo* (Figura 2F) (Desselberger, U., 2014). Los viroplasma se caracterizan por contener NSP2 y NSP5 que reclutan a otras proteínas virales (VP1, VP2, VP3 y VP6), y se ha propuesto que los viroplasma se comienzan a formar alrededor de las DLP durante la transcripción del genoma viral (Trask, S. D., S. M. McDonald, & J. T. Patton, 2012).

Las DLP recién formadas pueden tener actividad transcripcional secundaria y además migran al retículo endoplásmico (RE), donde adquieren una membrana transitoria a la cual se incorpora la última capa de proteínas (VP4 y VP7). Posteriormente, las TLP recién formadas se liberan por lisis celular o en vesículas derivadas del RE (Figura 2J) (Desselberger, U., 2014). En la tabla 1 se indican las funciones para cada una de las proteínas virales y el segmento genómico correspondiente.

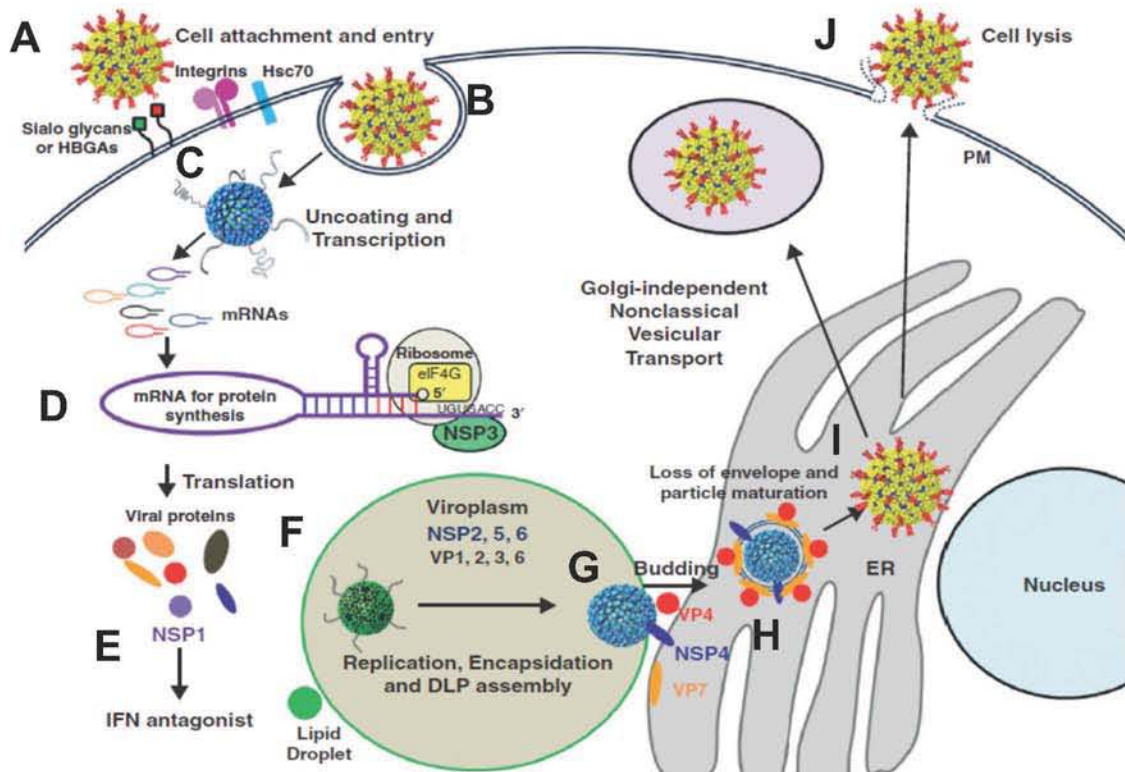


Figura 2. Ciclo de replicación de los rotavirus. (A) Interacción del receptor viral (VP4) por el receptor celular en la célula hospedera. (B) Internalización de la partícula viral por endocitosis y pérdida de las proteínas presentes en la capa externa de la TLP (VP7 y VP4). (C) La DLP se vuelve transcripcionalmente activa y produce los RNAs(+), que servirán como molde para la síntesis de proteínas virales y la replicación del genoma. (D) Producción de las proteínas virales regulada por NSP3 unido a los mensajeros virales en el extremo 3', y que interacciona con el factor eIF4G para circularizar el RNAm viral. (E) NSP1 posee un dominio del tipo RING, similar a ligasas de ubiquitina E3 y que promueve la degradación de factores celulares involucrados en la vía del interferón (IFN). (F) Formación de los viroplasmas compuestos por el RNA viral y las proteínas virales VP1, VP2, VP3, VP6, NSP2, NSP5 y NSP6. En los viroplasmas se lleva a cabo la replicación del genoma viral y el ensamblaje de las DLP. (G) Migración de la DLP hacia el retículo endoplásmico rugoso (RER), por la unión entre VP4 y NSP4 anclada en la membrana del RE. (H) Adquisición de una membrana lipídica transitoria en la DLP dentro del RER. (I) Pérdida de la membrana lipídica transitoria y adquisición de las proteínas VP7 y VP4 para formar la TLP. (J) Liberación de la partícula viral madura por vesículas o lisis celular. Imagen modificada de L Hu, *et al* (Hu, L., S. E. Crawford, J. M. Hyser, M. K. Estes, & B. V. Prasad, 2012).

Tabla 1. Segmentos genómicos, función y proteínas codificadas por los rotavirus A.

Gen	Tamaño (pb)	Proteína	Tamaño (kDa)	Funciones
1	3302	VP1	125	RdRP, unión al RNAs, complejo con VP3
2	2687	VP2	94	Capa interna del virión, unión al RNA viral, necesaria para la actividad de la RdRP
3	2592	VP3	88	Guanilmetiltransferasa, unión al RNAs, fosfodiesterasa y complejo con VP1
4	2362	VP4*	86	Antígeno de neutralización, receptor viral, aumento de infectividad por proteasa, virulencia, fusión con la membrana celular, componente de la TLP.
5	1581	NSP1	58	Antagonista del IFN, ligasa E3, unión al RNA viral
6	1356	VP6	44	Proteína más abundante, antígeno de neutralización, necesaria para la transcripción
7	1074	NSP3	34	Unión al extremo 3' del RNA mensajero viral, unión a proteínas celulares (eIF4G, RoXaN y HSP90), regulador traduccional del virus, desplaza a PABP de eIF4G.
8	1062	VP7	37	Glicoproteína, antígeno de neutralización, Ca ²⁺ dependiente, componente de la TLP.
9	1059	NSP2	36	Unión al RNA viral, NTPasa, NDP cinasa, helicasa, componente esencial para los viroplastos, interacción con NSP5
10	751	NSP4	20	Glicoproteína anclada al RER, viroporina, receptor para la DLP en el RER, interacción con los viroplastos, regulador de la autofagia, enterotoxina, (secretada), modulación del Ca ²⁺ intracelular, replicación del RNA, factor de virulencia
11	666	NSP5	21	Fosfoproteína, glicoproteína, unión a RNA viral, cinasa, componente esencial para los viroplastos, interacción con VP2
		NSP6**	12	Interacción con NSP5, localización en los viroplastos

Tabla modificada de Desselberger U., 2014. *VP4 por acción de la tripsina genera a las proteínas VP5 y VP8, **NSP6 producto del segundo marco abierto de lectura (ORF) en el segmento 11, RdRP (Polimerasa de RNA dependiente de RNA), RNAs (RNA de cadena sencilla), TLP (Partícula de Triple Capa), IFN (interferón), eIF4G (Factor de inicio de la traducción eucarionte 4 gamma), RoXaN (Rotavirus X protein associated to NSP3), HSP90 (Proteína de choque térmico 90), PABP (Proteína de unión a poli-A), NTPasa (Nucleótido trifosfatasa), NDP (Nucleótido difosfato), RER (Retículo Endoplásmico Rugoso), DLP (Partícula de doble capa).

Proteína No Estructural 3 de rotavirus (NSP3 – Non Structural Protein 3).

El producto del gen 7 de rotavirus A es la proteína NSP3 con 314 aminoácidos y se conforma como un homodímero con capacidad para interactuar específicamente con los RNAm virales, con las proteínas celulares eIF4G, RoXaN y Hsp90 (Dutta, D., S. Chattopadhyay, P. Bagchi, U. C. Halder, S. Nandi, A. Mukherjee, et al., 2011; Mattion, N. M., J. Cohen, C. Aponte, & M. K. Estes, 1992; Poncet, D., S. Laurent, & J. Cohen, 1994;

Vitour, D., P. Lindenbaum, P. Vende, M. Becker, D. Poncet, & M. M. Becker, 2004). La cepa SA-11 del rotavirus A posee un gen para NSP3 con 1,104 bases y en los extremos 3' y 5' tiene regiones no traducidas de 25 y 131 nucleótidos, respectivamente. Además, entre los distintos genotipos propuestos para NSP3 se observa una identidad nucleotídica de entre 46 y 85% (Ito, H., M. Sugiyama, K. Masubuchi, Y. Mori, & N. Minamoto, 2001; Matthijnssens, J., M. Ciarlet, M. Rahman, H. Attoui, K. Bányai, M. K. Estes, et al., 2008; Matthijnssens, J. et al., 2011).

Los monómeros de NSP3 tienen una masa molecular de 34 kDa y presentan una organización de la cadena polipeptídica compuesta por tres dominios distinguibles (Figura 3); el dominio de unión al RNA (RBD) se encuentra en el extremo amino terminal (aminoácidos 4-149), y mediante el extremo carboxilo terminal se une al factor eIF4G (GBD, aminoácidos 206-314), entre ambos segmentos de la proteína se encuentra la región mínima para dimerizar (HID, aminoácidos 150-205). Además, es posible predecir por herramientas de bioinformática una región extensa de tipo *coiled coil* que se encuentra traslapada con los dominios HID y GBD y comprendida entre los aminoácidos 159 y 245 (Piron, M., T. Delaunay, J. Grosclaude, & D. Poncet, 1999). Por otra parte, las proteínas Hsp90 y RoXaN también se unen a esta región entre los aminoácidos 225-258 y 167-237, respectivamente (Dutta, D. et al., 2011; Vitour, D. et al., 2004).

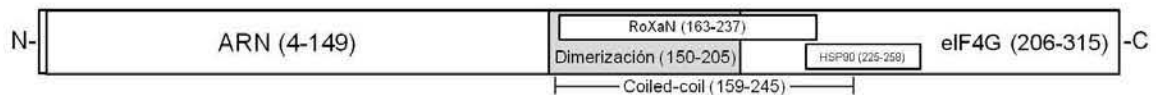


Figura 3. Organización estructural del monómero de NSP3. La proteína tiene 315 aminoácidos y 34 kDa de masa molecular. El extremo amino terminal une a la secuencia consenso en los rotavirus A (5'-GACC-3') en el extremo 3' del ARNm viral, y mediante el extremo carboxilo terminal NSP3 interacciona con eIF4G en el mismo sitio que PABP. En la parte central de la proteína se encuentra la región mínima para dimerizar y los dominios de unión a Hsp90 y RoXaN. Además, NSP3 tiene una secuencia larga del tipo *coiled coil*. Los números indican las posiciones de los aminoácidos que delimitan cada dominio en NSP3.

La estructura cristalográfica de NSP3 de la cepa SA11 fue resuelta parcialmente para el extremo amino terminal (residuos 4-164) y el carboxilo terminal (residuos 206-315). El extremo amino terminal fue cristalizado unido a un pentaribonucleotido (5'-UGACC-3') del RNAm viral y se conforma como un dímero asimétrico que tiene una interface alargada

de naturaleza polar (Deo, R. C., C. M. Groft, K. R. Rajashankar, & S. K. Burley, 2002) (Figura 4A). Mientras que el extremo carboxilo terminal se cristalizó con un péptido de eIF4G (residuos 132-160), y se muestra como un dímero simétrico con dos sitios hidrofóbicos para unir a eIF4G. La estructura cristalográfica correspondiente a la región de dimerización no ha sido reportada, no obstante una parte de la región *coiled coil* (residuos 206-251), es posible observarla en la estructura resuelta para el extremo carboxilo terminal (Figura 4B) (Groft, C. M., & S. K. Burley, 2002).

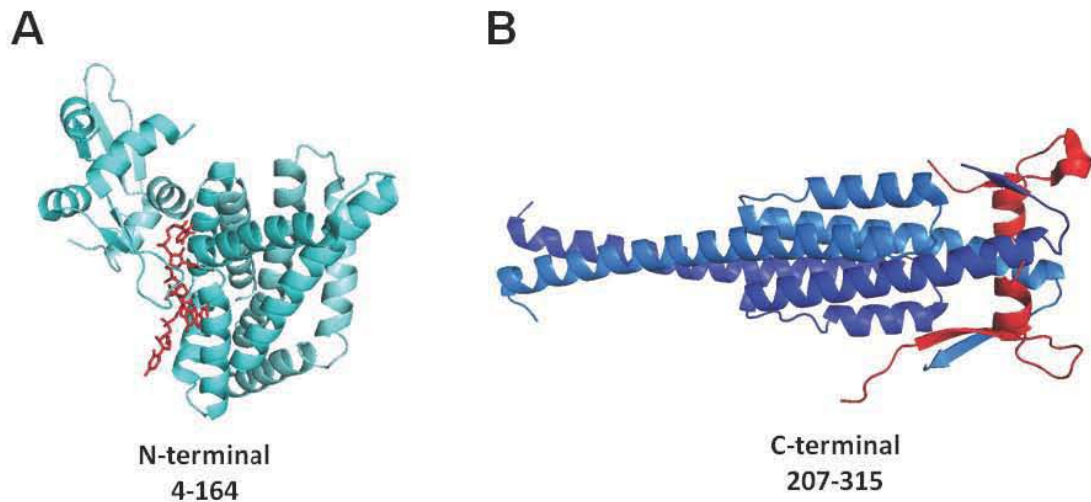


Figura 4. Estructuras cristalográficas del extremo amino terminal (A) y carboxilo terminal (B) de NSP3. (A) Homodimero asimétrico del extremo amino terminal (residuos 4-164) inducido por la secuencia consenso de RNA viral (5'-GUGACC-3') que se muestra como *sticks* de color rojo (PDB: 1KNZ). (B) Homodimero simétrico del extremo carboxilo terminal (residuos 206-315) en complejo con un péptido de eIF4G (*ribbons* de color rojo) (PDB: ILJ2). Las estructuras cristalográficas de NSP3 se representan como *ribbons* azules que muestran a cada monómero, respectivamente. Imagen modificada de Liya Hu, et al 2012 (Hu, L. et al., 2012).

NSP3 CONTROLA LA TRADUCCIÓN CELULAR Y VIRAL.

Inhibición de la traducción celular por NSP3.

La mayoría de los virus son considerados parásitos intracelulares obligados y la producción de las proteínas virales requieren en gran medida de la maquinaria de síntesis proteica celular. Por lo que, los virus han desarrollado estrategias que secuestra a los ribosomas en

los ARN mensajeros virales tanto espacio como temporalmente (Walsh, D., M. B. Mathews, I. Mohr, O. Larsson, B. Tian, N. Sonenberg, et al., 2012). Las estrategias de control están dirigidas a todas las fases de la traducción celular (iniciación, elongación y terminación) del hospedero. Sin embargo, los transcritos virales deben competir con los celulares, que mayoritariamente se traducen por la vía dependiente del *cap* en el extremo 5' del ARNm, y por la presencia de poliadenilación en el extremo 3'. Además, mediante el bloqueo de la traducción celular se contrarresta la respuesta inmune celular, sobretodo en las etapas intermedias del ciclo replicativo viral (Au, H. H., & E. Jan, 2014).

NSP3 inhibe la traducción celular al interactuar con el factor de inicio de la traducción eucariote 4G (eIF4G, por sus siglas en inglés *eukaryotic Initiation Factor 4 Gamma*), y los mensajeros celulares unidos a PABP son desplazados de los complejos traduccionales. eIF4G es una proteína que se expresa en todas las células y controla el inicio de la traducción dependiente del *cap* e IRES. Además, participa en la maduración del RNAm (*splicing*), en la estabilidad/degradación nuclear del RNAm y posiblemente en la traducción nuclear (Das, S., & B. Das, 2016). Los mensajeros celulares son reconocidos y protegidos en sus extremos 5' y 3' respectivamente por las proteínas eIF4E y PABP, lo que ocasiona que el ARNm sea reclutado en la subunidad ribosomal menor 40S en búsqueda del codón AUG para el inicio de la traducción celular. Adicionalmente, estas interacciones son dirigidas por eIF4G que funciona como andamiaje entre eIF4E y PABP, lo que favorece la circularización y la protección del ARNm para asegurar la traducción (Groft, C. M., & S. K. Burley, 2002; Piron, M., P. Vende, J. Cohen, & D. Poncet, 1998).

Durante el ciclo de replicación de rotavirus existe una disminución evidente de la traducción celular, mientras que la síntesis de proteínas virales aumenta desde los tiempos tempranos de la infección (1-2 hpi) (Montero, H., M. Rojas, C. F. Arias, & S. López, 2008; Piron, M. et al., 1998), este fenotipo ha sido vinculado directamente a NSP3. La inhibición de la traducción celular inducida por NSP3 ha sido ampliamente estudiado tanto en el contexto de la infección viral como en sistemas de expresión heterólogos. Los primeros reportes indicaron que NSP3 es capaz de interactuar con eIF4G tanto en experimentos *in vitro* e *in vivo*, lo cual resulta en el desplazamiento de PABP y por consiguiente del ARNm celular del complejo eIF4F que participa en el inicio de la traducción celular, en el cual participan otras proteínas (eIF4E, eIF4G, eIF4A y PABP). Además, no se encontró una disminución para la interacción entre eIF4G y eIF4E (proteína de unión al *cap* en 5') o

proteólisis de eIF4G, similar a lo encontrado para algunos otros virus de mamíferos (Piron, M. et al., 1998). Algunas proteasas de virus (HIV-1, picornavirus, poliovirus, etc.) separan los extremos amino y carboxilo terminal de eIF4G para inhibir la síntesis de proteínas celulares al impedir la circularización y posterior traducción del ARNm. Durante la infección con rotavirus no se han detectado cortes proteolíticos de eIF4G ni pérdida en la asociación con eIF4E o eIF4A (Castello, A., E. Álvarez, & L. Carrasco, 2011; Novoa, I., & L. Carrasco, 1999; Piron, M. et al., 1998; Walsh, D. et al., 2012). Adicionalmente, en la infección por rotavirus se activa la cinasa PKR, y el factor eIF2 α es fosforilado; un mecanismo ampliamente relacionado con la inhibición global de la síntesis de proteínas celulares (Montero, H. et al., 2008; Rojas, M., C. F. Arias, & S. López, 2010).

El dominio de unión para eIF4G en NSP3 fue localizado en el extremo carboxilo terminal entre los residuos 206 y 313 (Piron, M. et al., 1999); la estructura cristalográfica de esta región reveló un homodímero con dos sitios hidrofóbicos para la unión a eIF4G con leucinas y residuos aromáticos, donde las isoleucinas 140 y 142 de eIF4G hacen contactos con los residuos de fenilalanina (F296 y F299) y las tirosinas (Y308 y Y310) en NSP3. Además, interacciones del tipo *van der Waals* intervienen entre NSP3 y eIF4G particularmente los residuos Y308, M298 y L302. El núcleo hidrofóbico se establece entre los aminoácidos I140, I142, I152, I156 y M157 de eIF4G con F296, F299, Y308 y Y310 en NSP3 para brindarle estabilidad al homodímero. NSP3 comparte el sitio de unión a PABP en eIF4G, y se ha demostrado que eIF4G interacciona con mayor afinidad con NSP3 que con PABP por ensayos de calorimetría de titulación isotérmica (Groft, C. M., & S. K. Burley, 2002).

En el sistema de expresión heterólogo con el virus vaccinia se estudió la importancia de los dominios de unión a RNA, dimerización y de unión a eIF4G en el establecimiento del efecto inhibitorio traduccional. Mediante ensayos de marcaje metabólico de proteínas con ³⁵S, se encontró que tanto el extremo carboxilo terminal como la parte central son importantes para tener un máximo efecto sobre la inhibición de la síntesis de proteínas celulares y virales (vaccinia), por otra parte, la delección del dominio de unión al ARN viral no resultó en una reversión de la función de NSP3 (Padilla-Noriega, L., O. Paniagua, & S. Guzmán-León, 2002). Mediante este sistema se han evaluado diversas proteínas de unión a RNA de rotavirus fuera del contexto de la infección viral, ya que tiene las ventajas de que es inducible por IPTG, así como la incorporación en el sistema de una secuencia del tipo

IRES del virus de la encefalomiocarditis (EMC), lo que asegura la expresión de la proteína de interés a pesar de que la traducción dependiente del *cap* se encuentre comprometida (Elroy-Stein, O., T. R. Fuerst, & B. Moss, 1989; Padilla-Noriega, L. et al., 2002; Piña-Vázquez, C., M. De Nova-Ocampo, S. Guzmán-León, & L. Padilla-Noriega, 2007).

La localización intracelular de las proteínas celulares es determinante para su función, no obstante, durante la infección con rotavirus la proteína PABP se localiza predominantemente en el núcleo de la célula infectada, debido al desplazamiento de su sitio de unión en eIF4G por NSP3 (Harb, M., M. M. Becker, D. Vitour, C. H. Baron, P. Vende, S. C. Brown, et al., 2008; Montero, H. et al., 2008). El transporte nuclear-citoplásmico de PABP es acoplado a otras proteínas y factores de inicio de la traducción, debido a que carece de señales de localización y exporte nuclear. PABP interacciona con la proteína paxilina a través de los dominios LD o mediante intermediarios de RNA para poder localizarse en sitios específicos de la célula o para ser exportada del núcleo (Harb, M. et al., 2008; Woods, A. J., M. S. Roberts, J. Choudhary, S. T. Barry, Y. Mazaki, H. Sabe, et al., 2002; Woods, A. J., T. Kantidakis, H. Sabe, D. R. Critchley, & J. C. Norman, 2005). Los virus utilizan diversas estrategias para apoderarse de la maquinaria de síntesis de proteínas, alterar la función de PABP es un blanco funcional para llevar a cabo esta función. Diversos virus codifican proteasas (picornavirus, calicivirus, hepatitis A, HIV-1 y 2) que cortan a PABP, o bien algunos otros que modifican la distribución de la proteína con el objetivo de favorecer directa o indirectamente la replicación viral (rotavirus, dengue, citomegalovirus, vaccinia virus, influenza, VHH8) (Smith, R. W. P., & N. K. Gray, 2010). La relocalización de PABP en el núcleo celular se presenta cuando los dominios de unión a RNA (RRM, por sus siglas en inglés *RNA-recognition motif*) pierden la unión con el ARNm celular y por tanto interaccionan con la importina alfa (Kumar, G. R., L. Shum, & B. A. Glaunsinger, 2011).

Los transcritos celulares en células infectadas con rotavirus se acumulan en el núcleo celular, y cuando se bloquea la expresión de NSP3 con RNA de interferencia este fenómeno se revierte, por lo que esto puede ser atribuido a NSP3. Además, los transcritos celulares sufren de hiper-adelinación, sin cambio aparente en la cantidad de transcritos celulares, mientras que la cantidad de ARNm disminuye en el núcleo de la célula infectada (Rubio, R. M., S. I. Mora, P. Romero, C. F. Arias, & S. López, 2013).

NSP3 se une a otra proteína celular denominada RoXaN, que fue descrita en un estudio sobre el interactoma de NSP3. Mediante una biblioteca de DNA complementarios y el ensayo del doble híbrido, se identificó a RoXaN (*Rotavirus X protein associated to NSP3*) que consta de 977 aminoácidos y 110 kDa. RoXaN tiene un dominio tipo LD (LDxLLxxL), mediante el que interacciona con NSP3 por interacciones iónicas/hidrofóbicas (Vitour, D. et al., 2004). Además, NSP3 forma un complejo ternario con eIF4G1 y RoXaN, que se ha reportado es determinante para la relocalización de PABP en el núcleo. Mutaciones en NSP3 o RoXaN que afectan la interacción provocan que el complejo ternario se disocie y por consiguiente PABP no se acumula en el núcleo celular (Harb, M. et al., 2008). Adicionalmente, RoXaN fue detectada como una proteína que une a secuencias del tipo ARE (AU-rich element) en el RNA, y que regulan la estabilidad de diversos transcritos celulares (Leppek, K., & G. Stoecklin, 2014).

La circularización de los RNA mensajeros celulares a través de los extremos 5' (cap-eIF4E) y 3' (poliadenilación-PABP) favorece su traducción. Sin embargo, los mensajeros de rotavirus no están poliadenilados en 3'; en su lugar, poseen una secuencia conservada (UGACC) que específicamente reconoce NSP3 (Gratia, M., P. Vende, A. Charpilienne, H. C. Baron, C. Laroche, E. Sarot, et al., 2016; Vende, P., M. Piron, N. Castagné, & D. Poncet, 2000). NSP3 también es capaz de favorecer la traducción de RNAm con extremos similares a los mensajeros de rotavirus en células infectadas por rotavirus, y en células no infectadas que expresan a NSP3, por lo que se ha propuesto como un reemplazo de PABP para los RNAm virales (Gratia, M., E. Sarot, P. Vende, A. Charpilienne, C. H. Baron, M. Duarte, et al., 2015). Controversialmente, al reducir la expresión de NSP3 por RNA de interferencia no se afecta la síntesis de proteínas virales, y la producción de partículas virales infecciosas se incrementa (Montero, H., C. F. Arias, & S. Lopez, 2006).

NSP3 se conforma como un homodímero estable asistido por HSP90.

NSP3 es capaz de formar un homodímero y en la parte central de la proteína (aminoácidos 150-206), se delimitó la región mínima para la dimerización (Mattion, N. M. et al., 1992; Piron, M. et al., 1999). Además, se han detectado formas de oligomerización de la proteína por encima del tamaño esperado para el dímero (> 72 kDa) tanto en sistema de traducción *in vitro* como en mutantes que tienen duplicados algunos dominios de la proteína que se

obtuvieron por repetidos ciclos de infección de rotavirus (Arnold, M. M., C. S. Brownback, Z. F. Taraporewala, & J. T. Patton, 2012; Mattion, N. M. et al., 1992). Por lo tanto, la proteína tiende naturalmente a dimerizar, lo cual se ha atribuido directamente a la presencia de una secuencia del tipo *coiled coil* que se encuentra localizado entre la región mínima para dimerizar y el dominio de unión a eIF4G (aminoácidos 159-245), por lo que la importancia de esta región particular de la proteína ha sido complicado de abordar experimentalmente (Harb, M. et al., 2008; Piron, M. et al., 1999).

Inhibidores de HSP90 (17-AAG) tienen un efecto antiviral para rotavirus (Dutta, D., P. Bagchi, A. Chatterjee, M. K. Nayak, A. Mukherjee, S. Chattopadhyay, et al., 2009), por lo que esta chaperona debería tener un papel importante en el plegamiento de las proteínas virales. Posteriormente se encontró que HSP90 participa directamente en el plegamiento de NSP3, debido a que el bloqueo de la actividad de HSP90 a través del inhibidor 17-DMAG resulta en menor nivel de expresión de NSP3 detectada por Western blot, por otro lado, cuando se añade el inhibidor del proteasoma (MG132) y 17-DMAG la expresión de NSP3 se recupera (Dutta, D. et al., 2011). Esto indica que HSP90 también evita la degradación de NSP3 por la vía del proteasoma, resultados adicionales de nuestro laboratorio indican que el máximo inhibitorio traduccional de NSP3 está relacionado con la acumulación del dímero de NSP3 (Reyna-Rosas, manuscrito en preparación). La inhibición de la función de HSP90 impide que PABP se acumule en el núcleo celular, indicando que la formación del dímero de NSP3 es necesaria para el desplazamiento de PABP de los complejos traduccionales (Dutta, D. et al., 2011).

El dímero de NSP3 además regula la formación del complejo ternario con eIF4G y RoXaN, debido a que cuando se expresan mutantes incapaces para interactuar con cualquiera de estas proteínas celulares, la localización de PABP en el núcleo no se lleva a cabo. Por otro lado, en nuestro laboratorio se estimó que la estequiometría de interacción entre NSP3 y eIF4G es 2:1 (Reyna-Rosas, manuscrito en preparación; Harb *et al.*, 2008). Las formas oligoméricas de NSP3 son detectadas por separación de proteínas en condiciones no desnaturizantes (baja concentración de SDS y ausencia de agente reductor) y posterior detección por ensayos tipo *Western blot* (Arnold, M. M. et al., 2012; Contreras-Treviño, H. I., E. Reyna-Rosas, R. León-Rodríguez, B. H. Ruiz-Ordaz, T. D. Dinkova, A. M. Cevallos, et al., 2017; Dutta, D. et al., 2011; Mattion, N. M. et al., 1992). Además, duplicaciones en el gene de NSP3 resultan en homodímeros de mayor peso

molecular (124 kDa), y también se han observado formas superiores al dímero en células de insecto, probablemente trímeros y tetrámeros (Arnold, M. M. et al., 2012; Mattion, N. M. et al., 1992).

Previamente, en ensayos de traducción *in vitro* de retículos fueron encontradas formas tempranas del plegamiento de NSP3, que tienen la capacidad de co-immunoprecipitar con Hsp90 en los tiempos de expresión donde la forma dimerica y madura de NSP3 no es evidente. Por lo que, estos resultados sugieren que interacciones tempranas de NSP3 y Hsp90 se disgregan al someterlas a electroforesis no disociativas, y que los intermediarios de dimerización de NSP3 migran en el mismo peso molecular que los monómeros. Además, cuando se bloquea la actividad de la chaperona con 17DMAG los monómeros recién sintetizados de NSP3 no interactúan con Hsp90, y se degradan rápidamente por la vía del proteasoma (Dutta, D. et al., 2011).

En nuestro laboratorio se ha encontrado que la aparición de los dímeros de NSP3 en el sistema del virus vaccinia requiere aproximadamente 8 horas para mantenerse constante, este resultado no correlaciona totalmente con el establecimiento del máximo efecto inhibitorio de la traducción celular, además la adición de 17DMAG solo afecta la formación de dímeros estables sin afectar la función inhibitoria de la traducción celular (Reyna-Rosas, en proceso).

Cuando se expresan por separados los extremos amino y carboxilo terminal poseen la capacidad de formar dímeros en presencia de un oligonucleótido y un fragmento de eIF4G, respectivamente (Deo, R. C. et al., 2002; Groft, C. M., & S. K. Burley, 2002). Además, ensayos de marcaje metabólico de proteínas de células infectadas con el virus vaccinia recombinantes con el gen de NSP3, indican que tanto el dominio de dimerización como el dominio de unión a eIF4G son indispensables para la inhibición de la traducción celular, mientras que el extremo amino terminal no afecta la función inhibitoria de NSP3 (Padilla-Noriega, L. et al., 2002).

Por otro lado, una mutante de rotavirus (SA11-4Fg7re) que codifica para una proteína NSP3 de mayor tamaño (67 kDa) tiene algunos dominios duplicados de la proteína silvestre, conserva tanto la capacidad para oligomerizar y para unir al RNAm viral, RoXaN y a eIF4G. No obstante, esta variante de NSP3 es incapaz de inhibir la traducción celular y

de inducir la relocalización de PABP en el núcleo, sin afectar la replicación del virus determinado por la presencia de partículas virales infecciosas (Arnold, M. M. et al., 2012).

NSP3 forma un complejo ternario con las proteínas celulares eIF4G y RoXaN.

El desplazamiento de PABP tras la expresión de NSP3 resulta de la formación del complejo ternario con eIF4G y RoXaN. eIF4G es una proteína que se expresa en todas las células y controla el inicio de la traducción dependiente del *cap* e IRES. Además, se han demostrado funciones nucleares como la participación en la maduración del RNAm (*splicing*), la estabilidad/degradación nuclear del RNAm y posiblemente en la traducción nuclear (Das, S., & B. Das, 2016). También interactúa con otras proteínas celulares (eIF4A, eIF4E, PABP, eIF3, CBP80 y la cinasa Mkn1) y virales [proteasa 2A (picornavirus), NS1 (influenzavirus), NSP3 (rotavirus)]. La proteína posee tres dominios diferenciales; mediante el extremo amino terminal une a PABP y eIF4E, y en el carboxilo terminal une a eIF4A e indirectamente al ribosoma (a través de eIF3). La parte central de la proteína, llamada MF4G (Middle Domain of eIF4G), se une también a eIF4A. En mamíferos se han identificado dos segmentos de reconocimiento a RNA (RRM-RNA recognition motifs) ubicados en el extremo amino terminal (Bradley, C. a, J. C. Padovan, T. L. Thompson, C. a Benoit, B. T. Chait, & R. E. Rhoads, 2002; Prévôt, D., J.-L. L. Darlix, & T. Ohlmann, 2003).

RoXaN (Rotavirus X protein associated to NSP3) consta de 977 aminoácidos y 110 kDa, y se une a NSP3 mediante el dominio repetido del tipo LD (LDxLLxxL), semejante a los que se encuentran en la proteína paxilina (Vitour, D. et al., 2004). Mutaciones en NSP3 o RoXaN que afectan la interacción provocan que el complejo ternario se disocie y por consiguiente PABP no se acumula en el núcleo celular (Harb, M. et al., 2008). Adicionalmente, RoXaN fue detectada como una proteína que une a secuencias del tipo ARE (AU-rich element) en el RNA, y que regula la estabilidad de diversos transcritos celulares (Leppek, K., & G. Stoecklin, 2014).

Hsp90 favorece el plegamiento de diversas proteínas celulares y virales.

La familia de las chaperonas celulares, donde se incluye a Hsp90, participa en la estabilización, regulación y activación de ≈ 2000 proteínas "cliente" (quinasas, factores de

transcripción, receptores hormonales, RNA polimerasa, etcétera) (Eckl, J. M., & K. Richter, 2013; Makhnevych, T., & W. A. Houry, 2012). En células humanas se expresan dos isoformas de la chaperona: HSP90 α (inducible/mayor abundancia) y HSP90 β (constitutiva/menor abundancia). Las proteínas “cliente” de Hsp90 primero se pliegan parcialmente por otra chaperona (Hsp70), y posteriormente son transferidas por co-chaperonas a través de dominios del tipo tetratricopéptidos (TPR) (Sreedhar, A. S., E. Kalmár, P. Csermely, & Y.-F. Shen, 2004).

Hsp90 funciona como un dímero unido por los extremos carboxilo terminal, donde el extremo amino terminal de un monómero de Hsp90 une e hidroliza ATP, y el extremo carboxilo terminal reconoce a las proteínas cliente y estimula la actividad de Hsp90 concomitantemente con las co-chaperonas. El plegamiento asistido por Hsp90 comienza cuando la proteína “cliente” es reconocida como monómero, y posteriormente se une ATP para adoptar una conformación cerrada mediante la interacción de los extremos amino terminal. Inmediatamente se hidroliza el ATP, y la proteína “cliente” plegada y las co-chaperonas se liberan, finalmente el dímero de Hsp90 se abre para asistir en el plegamiento de otras proteínas (Figura 5) (Prodromou, C., 2016).

La formación de dímeros estables de NSP3 es asistida por Hsp90; al inhibir mediante fármacos específicos (17-DMAG) a la chaperona, NSP3 es inestable y se degrada por el proteasoma. El monómero de NSP3 interactúa con Hsp90 mediante los residuos 225-258 (HSP90-BD). Cuando se expresa una mutante de NSP3 con una deleción en el dominio de unión a Hsp90, PABP no es desplazada de su sitio de unión con eIF4G y posterior acumulación en el núcleo celular, por lo que la función de NSP3 es afectada (Dutta, D. et al., 2011; Harb, M. et al., 2008).

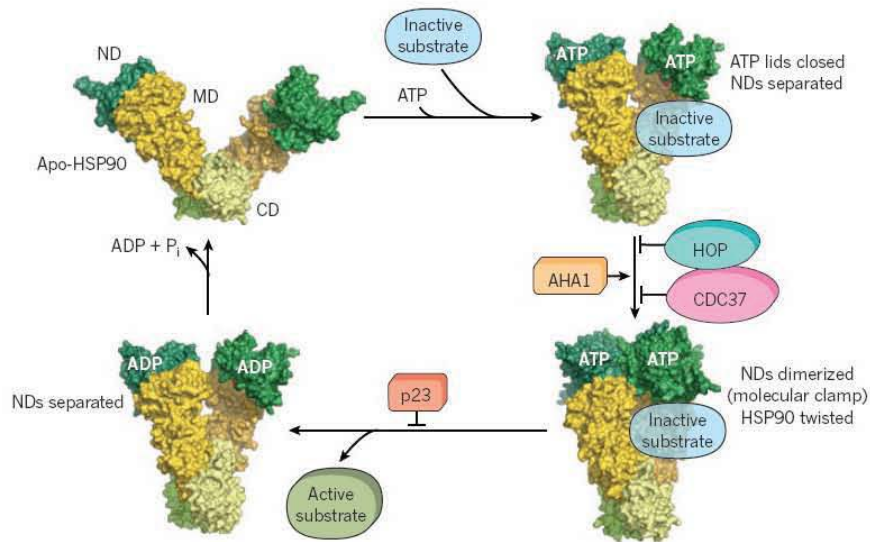


Figura 5. Función y regulación de HSP90. Previo al reconocimiento de la proteína cliente de HSP90 (Apo-HSP90), el dímero se une a través de la interacción entre el carboxilo terminal en una conformación abierta. Posterior a la unión de la proteína cliente y a la unión de ATP, el dímero adopta la conformación cerrada. Al hidrolizar al ATP se libera la proteína cliente plegada. Las co-chaperonas AHA1, HOP, CDC37 y/o p23 aceleran/bloquean la actividad de HSP90. Finalmente, el ADP unido en el amino terminal se libera para regresar a la conformación abierta y ser reciclada. Imagen tomada Hartl, Bracher and Hayer-Hartl, 2011).

NSP3 posee una región larga del tipo *coiled coil*.

Los dominios *coiled coil* están compuestos de hélices alfa y son una de las principales estructuras utilizadas para la oligomerización. La estructura primaria de los dominios *coiled coil* presenta residuos hidrófobos (H) y polares (P), y se compone por repeticiones de cada siete residuos (HPPHPPP)_n, donde **n** es el número de repeticiones a lo largo del *coiled coil*. Las posiciones en estos dominios se denotan como: **(a-b-c-d-e-f-g)_n** para una hélice y **(a'-b'-c'-d'-e'-f'-g')_n** para la otra. Regularmente, las posiciones **a** y **d** son ocupadas por residuos hidrofóbicos, mientras que las posiciones **e** y **g** por residuos con carga o hidrofílicos (Figura 6). Los residuos hidrofóbicos determinan la asociación entre hélices formando una super hélice. Mientras que las interacciones iónicas en las posiciones **e** y **g** contribuyen a la estabilidad del *coiled coil*, y dependiendo de la carga en las cadenas laterales, se involucran en la especificidad de la oligomerización (homo- o hetero-oligomerización) (Woolfson, D. N., G. J. Bartlett, M. Bruning, & A. R. Thomson, 2012).

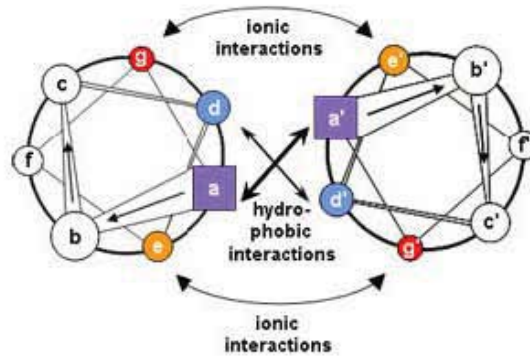


Figura 6. Dominios *coiled coil*. Patrón de hepta-repetición característico de los *coiled coil*. Interacciones hidrofóbicas se dan entre las posiciones a y d dentro del *coiled coil*, e interacciones iónicas se dan entre las posiciones e y g para favorecer la estabilidad. Imagen tomada de Jody M, et al 2004 (Jody, M. M., & A. K. M., 2004).

La estabilidad conferida por los *coiled coil* está determinada por 4 factores: el número de heptarepeticiones (n), la hidrofobicidad de los residuos en el núcleo de las hélices (**a** y **d**), interacciones electrostáticas entre los residuos polares (**e** y **g**), y la disposición de los residuos restantes (**b**, **c** y **f**). Un aumento en el número de alfa hélices presentes en la proteína, proporciona más oportunidades de interacciones iónicas e hidrofóbicas simultáneas, y generalmente se traduce en un aumento de la estabilidad de la proteína. La formación de homodímeros se favorece cuando existen cargas opuestas, mientras que la formación de heterodímeros es preferida cuando tiene la misma carga. Similar a la selectividad en la oligomerización, la orientación de las hélices se controla por las interacciones electrostáticas entre las posiciones **e** y **g**. La fuerza de atracción entre las posiciones **e:e'** y **g:g'** resulta en la formación de heterodímeros antiparalelos, mientras que la atracción entre **e:g'** y **g:e'** lleva a la orientación paralela (Pechar, M., & R. Pola, 2013).

NSP3 posee una región larga entre los aminoácidos 159 y 240 predicha como *coiled coil* mediante el algoritmo Lupas, la cual se subdivide en dos segmentos con mayor probabilidad de conformar *coiled coils* (Lupas, A., 1997; Piron, M. et al., 1999). En esta región están contenidos completamente los dominios de dimerización, de unión a RoXaN y HSP90, y un segmento del dominio de unión a eIF4G que es visible en la estructura cristalográfica del extremo carboxilo terminal (Groft, C. M., & S. K. Burley, 2002; Piron, M. et al., 1999). Mediante el ensayo del doble híbrido, se expresó una mutante de NSP3 donde

se eliminaron los primeros 162 aminoácidos (residuos 163-213) y se encontró que es capaz de multimerizar con otro segmento de NSP3 (88-313), mientras que una mutante que inicia en la segunda región predicha para formar un *coiled coil* (206-313) no interacciona con la proteína que conserva ambos segmentos. Además, se encontró que la posición 192 (Y) tiene el valor menos probable para formar un *coiled coil* (Piron, M. et al., 1999). Por lo que, la dimerización de NSP3 mediante la región *coiled coil* estaría directamente relacionada con el primer segmento predicho y estaría delimitada entre los residuos 159 y 191 que contiene cuatro hélices alfa suficientes para la dimerización de NSP3.

La proteólisis es un mecanismo de control de calidad para las proteínas.

La estructura tridimensional de las proteínas es adquirida posterior a la síntesis en el ribosoma, y es fundamental para la adquisición de la función, que debe ser conservada durante toda la existencia de la proteína. Aunque la secuencia de aminoácidos determina el plegamiento y la conformación final, dentro del ambiente intracelular el proceso de plegamiento de proteínas es energéticamente costoso, debido a que un conjunto de chaperonas requiere de la hidrólisis de ATP para asistir y acelerar el plegamiento. Las chaperonas reconocen regiones hidrofóbicas expuestas en las proteínas recién sintetizadas, y previenen sobretodo su agregación (Figura 7). No obstante, a pesar de la elevada efectividad de las chaperonas ocurren errores durante el plegamiento y además en ciertas proteínas se requiere cierta flexibilidad conformacional, que resulta en una menor estabilidad. Además, existen algunos factores que afectan el plegamiento de una proteína como las mutaciones, la temperatura, los radicales libres, los metales pesados y condiciones de estrés. Por lo tanto, los eucariontes han desarrollado la proteostasis, estrategias para el control de calidad de las proteínas con plegamiento incorrecto. En este sistema de regulación, además de la actividad de las chaperonas, participan dos vías de degradación de proteínas: el sistema ubiquitina-proteasoma y la proteólisis vacuolar inducida por autofagia (Amm, I., T. Sommer, & D. H. Wolf, 2014).

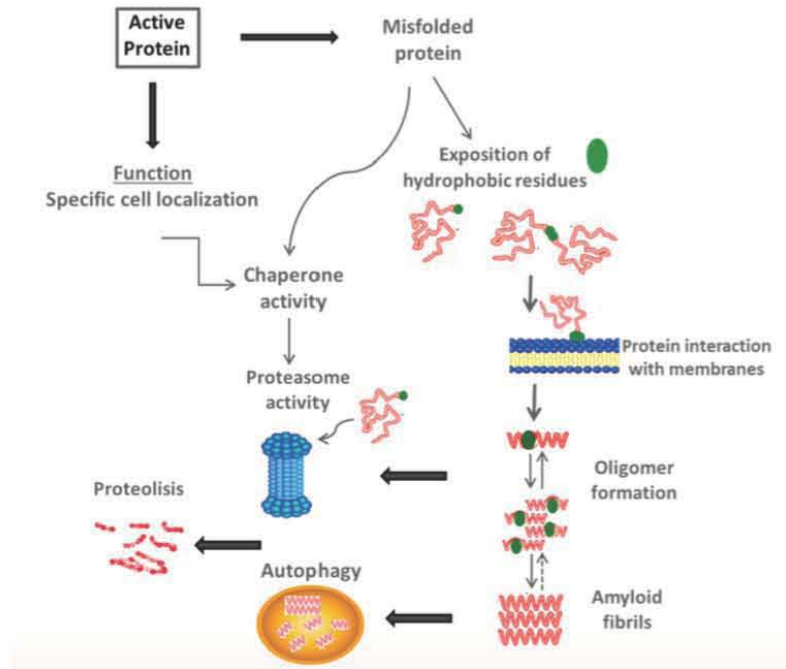


Figura 7. Proteólisis de proteínas. El control de calidad de las proteínas detecta el plegamiento incorrecto y activa mecanismos de degradación como el proteasoma y la autofagia. El sistema ubiquitina-proteasoma es la vía mayoritaria para degradar proteínas y reciclar los aminoácidos. (Tomado de: (Díaz-Villanueva, J., R. Díaz-Molina, & V. García-González, 2015)

Cuando las proteínas concluyen su función, su tiempo de vida celular o han sido mal plegadas, se modifican con ubiquitina (polipéptido de 76 aminoácidos) a través de la actividad coordinada de tres enzimas. El primer paso es la activación dependiente de ATP de la ubiquitina por la enzima E1, para formar un enlace tioéster entre la glicina del carboxilo terminal en la ubiquitina y la cisteína del sitio activo en la enzima E1. Posteriormente, la ubiquitina activada se transfiere a la enzima E2 a través de un enlace tioéster adicional. Finalmente, la enzima E3 (ligasa) transfiere a la ubiquitina hacia la proteína sustrato, formando un enlace covalente isopeptídico con los residuos de lisina. Varias rondas de ubiquitinación se realizan sobre otros residuos de lisina presentes en la proteína sustrato y en la misma molécula de ubiquitina por enzimas E4. Una vez que se han añadido al menos cuatro cadenas de ubiquitina, el sustrato es rápidamente reconocido y degradado por el proteasoma, mientras que las cadenas de ubiquitina son recicladas para etiquetar a otras

proteínas (Figura 8) (Geng, F., S. Wenzel, & W. P. Tansey, 2012; Inobe, T., & A. Matouschek, 2014).

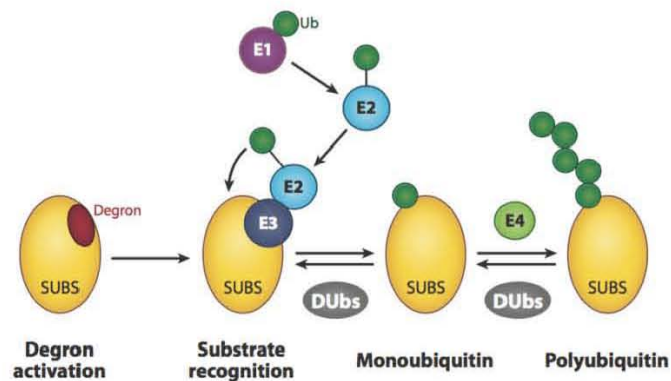


Figura 8. Sistema ubiquitina-proteasoma. La proteína que será degradada por el vía del proteasoma debe ser etiquetada con ubiquitina. La adición de la ubiquitina ocurre por una cascada enzimática realizada por las enzimas E1 a E4. El proceso puede ser regulado por enzimas que retiran la ubiquitina (DUbs). Tomado de Geng et al., 2012

El proteasoma (26S) es un complejo de proteasas con múltiples sitios catalíticos ubicado en el citoplasma y núcleo de la célula eucarionte. Consiste de un núcleo catalítico central (subunidad 20S) y dos complejos reguladores (subunidad 19S) en los extremos. La subunidad 20S es un cilindro en forma de barril compuesto de cuatro anillos agrupados: denominados alfa y beta con siete subunidades cada uno. Los dos anillos externos son catalíticamente inactivos y regulan la entrada de la proteína que será degradada, mientras que la actividad proteolítica radica en los siguientes dos anillos, donde los sitios catalíticos se forman por residuos de treonina (en el extremo amino terminal) y la degradación requiere de la hidrólisis de ATP. En total, tres tipos de actividades proteolíticas han sido reportadas: tipo tripsina, tipo quimiotripsina y tipo caspasa. Las dos subunidades 19S se encargan del reconocimiento de la ubiquitina, desubiquitinación, desnaturalización de la proteína y de la translocación del sustrato al núcleo catalítico (Figura 9). Además, el proteasoma participa en la regulación del ciclo celular, apoptosis, procesamiento antigénico, transducción de señales, regulación transcripcional, reparación del DNA, y regulación de receptores (Díaz-Villanueva, J. et al., 2015).

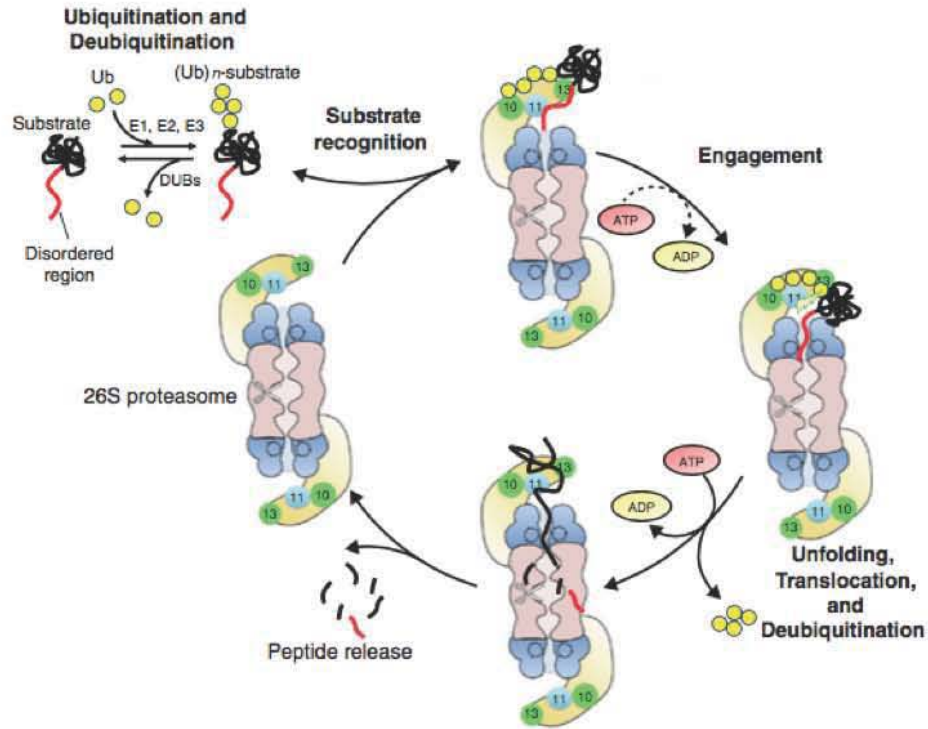


Figura 9. Reconocimiento y degradación de proteínas por el proteasoma. El sustrato modificado por el complejo de enzimas E son reconocidas por el proteasoma, y sufren un desdoblamiento inicial. Posteriormente son introducidas en el núcleo catalítico (20S) para generar cortes proteolíticos y la liberación de péptidos pequeños. Tomado de Inobe, T., & A. Matouschek, 2014.

NSP3 es una proteína estable que se degrada por la vía del proteasoma.

La degradación de una proteína por el proteasoma sirve como control de calidad cuando el plegamiento ha fallado, o bien cuando la función se ha cumplido. En las células infectadas con rotavirus y tratadas con el inhibidor de HSP90 (17DMAG), se acumula menor cantidad de NSP3, así mismo células que expresan a NSP3 en presencia de 17DMAG, PABP no se relocalizan en el núcleo y disminuye la señal de fluorescencia para NSP3. Además, cuando se utiliza el inhibidor del proteasoma (MG132) el nivel de expresión y la función de NSP3 se reestablecen (Dutta, D. et al., 2011). Por otro lado, NSP3 tiene un tiempo de vida media de 200 minutos determinado por ensayos de pulso y caza con [³⁵S]metionina mas [³⁵S]cisteína, y por comparación con NSP1 ($t_{1/2} = 90$ minutos), es considerada una proteína estable (Piña-Vázquez, C. et al., 2007). Estos resultados indican que la estabilidad de NSP3

se correlaciona con la formación y acumulación del dímero de NSP3, y por consiguiente con la función inhibitoria de la traducción celular.

JUSTIFICACIÓN

La función inhibitoria de la traducción celular por NSP3 se deriva fundamentalmente de las propiedades de sus segmentos central y carboxilo terminal, las cuales son responsables de la formación del complejo ternario con las proteínas celulares eIF4G y RoXaN, respectivamente, excluyendo la participación del dominio amino terminal de unión a RNA viral. Estos segmentos de la proteína afectan de alguna forma la función celular de eIF4G y se encuentran involucrados en la translocación nuclear de PABP-C. Particularmente, propiedades inherentes al segmento central como la dimerización y la estabilidad de la proteína no se han estudiado en el establecimiento de la función inhibitoria por NSP3. La región *coiled coil* presente en NSP3 llamó nuestra atención dado que es un segmento de la proteína que involucra interacciones con RoXaN, eIF4G y HSP90, y contiene la región mínima para dimerizar. En este estudio se abordó un enfoque de mutagénesis para estudiar el efecto de diversos cambios puntuales (cuatro sencillos y uno doble) en la región *coiled coil* de NSP3, expresada en el sistema del virus vaccinia recombinante. La capacidad para inhibir la traducción celular por NSP3 silvestre y sus mutantes se determinó en condiciones de máximo efecto (inductor y tiempo de expresión), mediante un ensayo de marcaje metabólico de proteínas. El nivel de acumulación y la capacidad de dimerización se determinaron por Western blot (disociativo y no disociativo, respectivamente), en presencia o ausencia de un inhibidor del proteasoma (MG132) para explorar la capacidad de dimerización y la estabilidad de la proteína. Además, se estableció un ensayo de bloqueo de síntesis de proteínas combinado con Western blot para estimar el tiempo de vida de la forma dimérica de NSP3. Estos enfoques permitieron explorar la importancia de la estabilidad y la dimerización de NSP3 en su función inhibitoria de la traducción celular. Sorprendentemente, se encontró un papel funcional de los intermediarios de dimerización de NSP3.

HIPOTESIS

La inhibición de la traducción celular por NSP3 no depende únicamente de la interacción con eIF4G, al desplazar de los complejos traduccionales a los RNA mensajeros celulares unidos a PABP-C, sino también de propiedades intrínsecas de NSP3 como su estabilidad y capacidad de dimerización. Por lo tanto, mutaciones simples o dobles en la región extensa del tipo *coiled coil*, serán capaces de afectar la dinámica de dimerización y la estabilidad de las formas oligoméricas de NSP3 (dímeros y monómeros).

OBJETIVOS

General

Estudiar la importancia de la región del tipo *coiled coil* de la proteína no estructural 3 (NSP3) de rotavirus en su función inhibitoria de la traducción celular y oligomerización.

Particulares

1. Determinar el efecto de mutaciones puntuales sencillas y dobles en la región *coiled coil* de NSP3 sobre la función inhibitoria de la traducción celular.
2. Determinar el efecto de mutaciones sencillas y dobles sobre la estabilidad y la dimerización en presencia o ausencia del inhibidor del proteasoma MG132.
3. Estimar el tiempo de vida media de la forma dímica de NSP3 por bloqueo de la síntesis de proteínas en presencia y ausencia del inhibidor del proteasoma MG132.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y anticuerpos

El inductor IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) con número de catálogo 70571 fue obtenido de Research Organics. El inhibidor del proteasoma (MG132 Cat. C2211) y la cicloheximida (CHX Cat. C76698) fueron comprados a Sigma-Aldrich.

El suero hiperinmune que reconoce a NSP3 sensible y específicamente, fue producido en nuestro laboratorio. Para lo cual, el gen 7 del rotavirus SA11 (GenBank M87502) fue amplificado por RT-PCR con los oligonucleótidos SA1175 y SA1173, y clonado entre los sitios NcoI y XhoI del plásmido pET28b, dando lugar al pET28-NSP3. La construcción añadió un extremo de hexahistidina en el extremo carboxilo terminal de NSP3. Las células competentes de *E. coli* BL21-DE3 (a una D. O. de 0.5) se transformaron con pTE28-NSP3 y se indujo la expresión de NSP3 con IPTG (1 mM) durante 5 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo, las células bacterianas fueron disgregadas por sonicación en PBS (libre de Ca^{2+} y Mg^{2+}) en presencia de inhibidores de proteasas (Complete EDTA-free, Roche, Basel, Suiza). El lisado bacteriano fue centrifugado a 10,000 g por 30 minutos a 4°C. La proteína NSP3 en la pastilla fue solubilizado por 14 h a 4°C en el amortiguador A (8 M urea, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M Tris-HCl pH 8.0) con 5 mM de imidazol e inhibidores de proteasas. La mezcla anterior se centrifugó a 10,000 g (30 minutos y 4°C), y el sobrenadante fue mezclado con agarosa Ni-NTA (Qiagen, Hilden, Germany, cat 30210) durante una 1 hora a temperatura ambiente en el amortiguador B (8 M urea, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M Tris-HCl pH 6.5) adicionado con 20 mM de imidazol e inhibidores de proteasas. Posteriormente, se centrifugó a 5,000 g (5 minutos a temperatura ambiente) y se lavó la resina dos veces en el amortiguador B más imidazol (5 mM). Se eluyó tres veces por 5 minutos a temperatura ambiente con el amortiguador C (8 M urea, 0.01 M NaH_2PO_4 , 400 mM imidazol pH 8.0). El eluato se centrifugó a 5,000 durante 5 minutos. Finalmente, el eluato fue dializado contra el amortiguador D (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0), y concentrado con Amicon Ultra 4 (Merck Milipore, Darmstadt, Germany). El perfil proteico fue determinado por SDS-PAGE, tinción de Coomassie y análisis densitométrico por comparación con estándares de BSA. Este procedimiento de purificación de NSP3 fue establecido en el laboratorio por Maritrini González Colón y realizado por Maximino Santiago Méndez.

El suero anti-NSP3, se generó al inmunizar ratas por vía intraperitoneal en cinco dosis (200 µg/dosis), con intervalos de 15 días. La primera dosis fue administrada con adyuvante de Freund (Sigma-aldrich, Saint Louis, Mo), el resto de las dosis no fueron suplementadas con adyuvante. Quince días posteriores a la última dosis, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico y se obtuvo la sangre por punción cardiaca. El suero fue obtenido por coagulación y los animales se sacrificaron con dióxido de carbono. El manejo de los animales se llevó de acuerdo a las guías para cuidado de animales de laboratorio aprobadas por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. La producción del suero hiperinmune anti-NSP3 fue realizada por Maximino Santiago Méndez.

El anticuerpo secundario anti rata (IgG) acoplado a peroxidasa fue comprado a Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Tx, Cat. SC2956).

Líneas celulares, virus y plásmidos

Las líneas celulares CV-1 y BSC-1 (*Cercopithecus aethiops*) fueron donadas por R. Rosales (UNAM, Ciudad de México) y la línea celular HeLa se obtuvo del laboratorio del Dr. Alfonso González-Noriega (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad de México). Las líneas se subcultivaron y sembraron en medio mínimo esencial Eagle (MEM) suplementado con suero fetal bovino al 7% (Biowest, México). El virus vaccinia parental vT7lacOI y el plásmido VOTE.1 fueron donados por el Dr. B. Moss (National Institutes of Health, Bethesda, MD). El virus vaccinia recombinante que expresa NSP3 silvestre de la cepa RRV7 se generó previamente en nuestro laboratorio a partir del virus vT7lacOI y el plásmido VOTE.1-RRV7 (Padilla-Noriega, L. et al., 2002).

Diseño de mutantes en NSP3 y mutagénesis del plásmido VOTE.1-RRV7

La región *coiled coil* (159-245) de NSP3 de la cepa RRV de rotavirus, y de todos los genotipos reportados para NSP3 (T1-T12) se alinearon con Clustal OMEGA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Matthijnssens, J. et al., 2011; Sievers, F., & D. G. Higgins, 2014). Se identificaron residuos conservados en esta región como candidatos

para mutagenizar (W170, K171, R173, R187, K191 y Y192), y que además estuvieran en las posiciones a, d, e y g de la hepta-repetición característica en los *coiled coil*. Los residuos con carga positiva (K-lisina o R-arginina) se cambiaron por residuos con carga negativa (E-ácido glutámico), y los residuos voluminosos e hidrofóbicos (W-triptófano y Y-tirosina) se modificaron por un residuo pequeño (A-alanina). Se diseñaron oligonucleótidos para generar las siguientes mutaciones: W170A, K171E, R173E, R187E:K191E y Y192A (Tabla 2). La mutagénesis sitio dirigida se realizó en el plásmido VOTE.1-RRV con el kit QuickChange® Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies, santa Clara, CA. Cat. 200518) acorde a las indicaciones del fabricante. Los plásmidos mutantes fueron confirmados por secuenciación en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (Instituto de Biotecnología, UNAM). Los plásmidos se amplificaron en células competentes de *E. coli* y el DNA plasmidico fue purificado con el kit QIAGEN Plasmid Purification (Duesseldorf, Germany, Cat No. 12145). El procedimiento de mutagénesis fue realizado con ayuda del Dr. Renato León Rodríguez.

Tabla 2. Oligonucleótidos para mutagénesis puntual y múltiple en el dominio *coiled coil* de NSP3

Mutación	Sentido	Antisentido
R187E:K191E	5'–GAGTCACTGAAACATGAGGTTAATGAGGAGTAT AATCATTGGG–3'	5'–CCCAATGATTATACTCCTCATTTAACCTCATGTT TCAGTGA CTC–3'
K171E	5'–GGAAGTAGATACAATTGATGCCAAATCAAGATA TGAACAG–3'	5'–CTAACTGTTTCATATCTTGACTCCCAATCAATTG TATCTACTTCC 3'
R173E	5'–GATACAATTGATTGGAAATCAGACTATGAACAG TTAGAAAAGAG–3'	5'–CTCTTTTCTAACTGTTTCATACTCTGATTTCCAA TCAATTGTATC 3'
W170A	5'GGAAGTAGATACAATTGATGCCAAATCAAGATAT GAACAG–3'	5'–CTGTTTCATATCTTGATTGGCATCAATTGTATC TACTTCC–3'
Y192A	5'–CATCGGGTTAATGAGAAGGCCAATCATTGGGTT CTTAAAGC–3'	5'–GCTTTAAGAACCCAATGATTGGCCTTCTCATT ACCCGATG–3'
K191E:Y192A	5'–GAAACATCGGGTTAATGAGGAGGCTAATCATTG GGTTCTTAAAGC–3'	5'–GCTTTAAGAACCCAATGATTAGCCTCCTCATT ACCCGATGTTTC–3'
W170A:K171E	5'–GGAAGTAGATACAATTGATGCCGAGTCAAGATA TGAACAGTTAG–3'	5'–CTAACTGTTTCATATCTTGACTCGGCATCAATTG TATCTACTTCC–3'
R173E:Y174A	5'–CAATTGATTGGAAATCAGAGGCCGAACAGTTAG AAAAGAG–3'	5'–CTCTTTTCTAACTGTTTCGGCCTCTGATTTCCAA TCAATTG–3'
K198E:R200E: K201E	5'–CATTGGGTTCTTGAGGCTGAGGAGGTAATGAA AATATG–3'	5'CATATTTTCATTTACCTCCTCAGCCTCAAGAACC CAATG–3'

Las posiciones de los residuos mutagenizados se indican en cada una de las mutantes. La aminoácidos con carga positiva lisina (K) o arginina (R) se modificaron por ácido glutámico (E). Los aminoácidos voluminosos y aromáticos triptófano (W) y tirosina (Y) fueron cambiados por alanina (A). Los tripletes de bases que fueron modificados con respecto a la secuencia del gen 7 de rotavirus (RRV) se indican en color rojo.

Generación de virus vaccinia recombinantes para expresar NSP3 mutantes.

Los virus vaccinia recombinantes se obtuvieron a través de recombinación homóloga entre el virus vaccinia que expresa la polimerasa del fago T7 (vT7lacOI) y el plásmido VOTE.1-

NSP3 con las mutaciones descritas anteriormente. Células CV-1 fueron infectadas con vT7lacOI a 0.05 de MOI y a las 2 hpi se transfectaron con 1000 ng totales de cada plásmido en presencia 250 μ L de lipofectamina (LFA-2000). Los virus se cosecharon a las 36 hpi por desprendimiento con gendarme de la monocapa celular. Posteriormente, los virus recombinantes se seleccionaron en células BSC-1 en presencia de ácido micofenólico (MPA), que impide la replicación del virus vaccinia parental vT7lacOI. En total se realizaron tres plaqueos consecutivos con MPA y en cada uno se colectaron 5 placas a las 72 hpi. El virus recuperado en el tercer plaqueo, se amplificó de manera secuencial en células HeLa en presencia de MPA, infectando 2.5×10^5 , 7.5×10^6 y 1.62×10^7 células con 5, 15 y 25 mL de diluciones 1:1 del virus, respectivamente. El virus se colectó a las 48-72 hpi en cada paso de amplificación y se almacenó a -70°C . Tras la última amplificación, a través del ensayo de formación de placas en células BSC-1 se tituló el virus recuperado (procedimiento descrito enseguida). Los stock virales se obtuvieron infectando monocapas de células HeLa a una multiplicidad de infección (MOI) igual a 3, y se incubó hasta observar el efecto citopático (48-72 hpi). Transcurrido este tiempo, las monocapas se desprendieron con gendarme y se congelaron/descongelaron tres veces para liberar al virus. El título viral final se determinó por el ensayo de formación de placas en células BSC-1 a las 60 hpi (Figura 10).

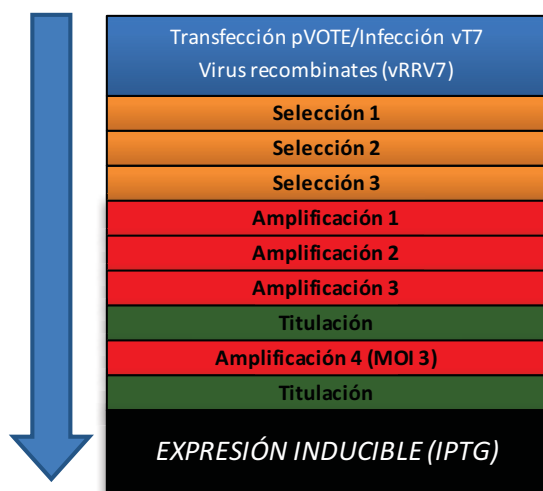


Figura 10. Esquema secuencial de la generación de virus vaccinia recombinantes. Las células CV-1 (5×10^5) se infectaron con el virus vaccinia vT7 a una MOI igual a 0.05. A las 2 hpi se lipofectaron los plásmidos correspondientes a cada mutación (10 μ g totales) y se incubaron por 48 horas. Posteriormente, los virus resultantes se seleccionaron por plaqueo selectivo en células BSC-1 en presencia de ácido micofenólico. Las

placas obtenidas se amplificaron gradualmente en células BSC-1 (25, 75 y 162 cm²). El stock viral se obtuvo en células HeLa (162 cm²) infectadas a una MOI de 3, y se tituló en células BSC-1.

Titulación del virus vaccinia.

Células BSC-1 (0.5×10^6 células) se sembraron en cajas de 6 pozos (10 cm²) con MEM adicionado con 7% de SFB, y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 24 horas. El virus vaccinia a titular se disgregó con vortex y jeringa, posteriormente se mezcló en una relación 1:1 con tripsina al 0.25 % (200 uL totales), y se incubó por 30 minutos a 37°C mezclando con vortex cada 10 minutos. El virus activado se diluyó 20 veces (1960 uL de MEM 2.5% + 40 uL de virus) y se mezcló al menos 15 veces. Se hicieron diluciones seriadas en base 10 (1800 uL de MEM 2.5% y 200 uL de virus diluido) hasta lograr las diluciones 1×10^{-7} , 1×10^{-8} y 1×10^{-9} . Las monocapas de células se infectaron con 500 uL de estas diluciones y se incubaron por 2 horas a 37°C y 5% de CO₂, mezclando cada 15 minutos durante la primera hora. A las 2 hpi se colocaron 3 mL de MEM 2.5% y se incubaron hasta las 60 hpi. Transcurrido este tiempo, se retiró el inóculo viral y las monocapas de células y se tiñeron con cristal violeta en 5% de metanol por 5 minutos. Se retiró la tinción por aspersion y las monocapas se dejaron secar al aire en campana de flujo laminar. Las placas en cada dilución se contaron y se calculó la concentración del stock viral (factor de dilución x 2).

Expresión de NSP3wt y NSP3 mutantes en el sistema del virus vaccinia.

Células BSC-1 (0.5×10^6 células) se sembraron en cajas de 6 pozos (10 cm²) con MEM adicionado con 7% de SFB, y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas. El virus vaccinia se activó por 30 minutos con tripsina (0.125%) a 37°C, y se mezcló en vortex cada 10 minutos. La dilución del virus fue la necesaria para lograr una concentración de 1×10^8 UFP/mL, de modo que al infectar una monocapa de 1×10^6 células se alcance una MOI de 5 con 500 uL de volumen final. Transcurridas las 24 horas de incubación para las células, el MEM al 7% se retiró y se colocaron 500 uL de virus vaccinia activado a una concentración de 1×10^7 UFP/mL. Las células con el virus se incubaron por 2 horas a 37°C y 5% de CO₂ mezclando cada 15 minutos durante la primera hora de infección. A las 2 hpi se retiró el inóculo viral y se añadieron 2.5 mL de MEM al 2% de SFB con el inductor IPTG (0.4 mM), incubando hasta 16 horas más (18hpi). En los experimentos donde se utilizó el inhibidor del

proteasoma (MG132, disuelto en DMSO), éste fue añadido a las 2 hpi a una concentración de 0.5 mM en conjunto con el inductor, y se mantuvo hasta el momento de la cosecha.

Marcaje metabólico con [³⁵S]metionina y [³⁵S]cisteína de células infectadas con virus vaccinia recombinantes.

La incorporación de Met-Cys marcadas con ³⁵S se utilizó para evaluar la función inhibitoria de la traducción celular de NSP3 silvestre y sus mutantes. A las 17.5 hpi el medio se retiró y se realizaron dos lavados con MEM libre de metionina y cisteína; y se incubaron por 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂ para depletar de metionina y cisteína. A las 18 hpi se añadieron 0.2 mCi por pozo de los aminoácidos marcados y se incubó por 1 hora más. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron dos veces con 1 mL PBS 1X frío y se cosecharon con gendarme en PBS (1 mL). Se obtuvieron dos alícuotas (0.5 mL) y se centrifugaron a 13,000 g por 10 minutos a 4°C. Una alícuota se resuspendió en 20 uL de amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.4 U/mL DNase I, 0.01 mg/mL RNase A y Complete[®] 233 [Roche, cat. 04693116001]), incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 20 uL de buffer Laemmli 2X (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 4% SDS y 2% β-mercaptoetanol), y se incubaron a 95°C por 5 minutos. Los lisados celulares se separaron por SDS-PAGE (12%) durante 16 horas (4 mA constantes y aproximadamente 100 volts iniciales), terminada la electroforesis los geles se secaron por 2 horas a 70°C y se expusieron por 48 horas en pantallas para autoradiografía. Las pantallas se leyeron en el Thyphoon FLA 9500 (GE Healthcare Life Sciences) y se llevó a cabo el análisis densitométrico con el programa Image J. La alícuota restante se sometió a SDS-PAGE al 12% en las mismas condiciones y los geles se procesaron para la tinción con nitrato de plata, de acuerdo a lo reportado previamente (Chevallet, M., S. Luche, & T. Rabilloud, 2006).

Acumulación de NSP3 silvestre y mutantes por Western blot disociativo.

El pellet celular (1.25 x10⁵ células) se lisó por 10 minutos a temperatura ambiente con 20 uL del buffer de lisis. Se añadieron 20 uL de buffer Laemmli 2X y se incubaron por 5 minutos a 95°C. Las proteínas celulares fueron separadas por SDS-PAGE al 12% por 16 horas (4 mA y 100 volts) y fueron transferidas a una membrana de PVDF durante 90 minutos (180

mA). La transferencia se llevó a cabo en un sistema semiseco (Hofer TE 70, Holliston, MA, USA) en buffer de transferencia (0.025 M Tris, 0.2 M glicina, 0.001% SDS y 20% de Metanol). Las membranas se bloquearon por 60 minutos a temperatura ambiente y movimiento constante con TBS (0.1 M Tris-HCl pH 7.4, 0.14 M de NaCl y 2.6 mM de KCl) adicionado con leche libre de grasa Svelty® al 5%. Las membranas se lavaron tres veces con TTBS (0.1 M Tris-HCl pH 7.4, 0.14 M de NaCl, 2.6 mM de KCl y 0.0005% de Tween 20). El suero hiperinmune se diluyó (1:20,000) en TTBS-1% de leche y se incubó con la membrana durante toda la noche a 4°C en agitación constante. La membrana se lavó tres veces con TTBS. El anticuerpo secundario (anti-IgG de rata) acoplado a peroxidasa se diluyó (1:20,000) en TTBS-1% de leche y se incubó por dos horas a temperatura ambiente y agitación constante. La membrana se lavó tres veces con TTBS. La unión de los anticuerpos fue revelada por quimioluminiscencia con sensibilidad de femtogramos con el kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, Cat. 34095), acorde a las instrucciones del fabricante. El análisis densitométrico de las radiografías se llevó a cabo con el software libre Image J.

Capacidad de dimerización por NSP3 silvestre y mutantes por Western blot no disociativo.

Posterior a la lisis, los paquetes celulares (1.25×10^5 células) se mezclaron con buffer de Laemmli no disociativo, que excluye el agente reductor y reduce ocho veces el SDS (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 0.5% SDS), y se incubaron por 30 minutos en hielo. Los lisados de células completas se sometieron a SDS y se procedió al Western blot para detectar a NSP3, como se describe anteriormente. En el análisis densitométrico se diferenciaron las bandas del dímero (68 kDa) y del monómero (34 kDa) para su cuantificación.

Estimación del tiempo de vida media de NSP3 silvestres por Western blot no disociativo.

La expresión de NSP3 silvestre y mutantes se llevó a cabo por 12 horas (14 hpi), el medio con el inductor se retiró y las células se lavaron dos veces con MEM 2.5% SFB. Se

colocaron 2 mL de medio nuevo (MEM 2.5% SFB) con cicloheximida (100 ug/mL), y se tomó como el tiempo cero o inicial de la cinética. Las células se cosecharon a las 0 (12hpi), 0.5 (12.5 hpi), 1.0 (13hpi), 2.0 (14hpi) y 4.0 horas (16 hpi) posterior a la adición de la cicloheximida. Los lisados celulares se procesaron por Werstern blot no disociativo (WB-ND). En los experimentos donde se utilizó MG132 (0.5 mM), se añadió a las 2 hpi y se mantuvo por 10 horas más.

RESULTADOS

Mutaciones en la región *coiled coil* de NSP3 de rotavirus.

En total se diseñaron oligonucleótidos para generar diez mutantes de NSP3 en los residuos conservados del *coiled coil*; mutaciones sencillas (W170A, K171E, R173E y Y192A) y múltiples (W170A:K171E, R173E:Y174A, R187E:K191E, K191E:K192A, y K198E:R200E:K201E). Las mutaciones se realizaron en el plásmido VOTE.1-RRV7 mediante el kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Células de *E. coli* se transformaron con los productos de PCR producidos, únicamente se obtuvieron transformantes para las mutaciones W170A, K171E, R173E, R187E:K191E y Y192A. Se decidió trabajar con estas cinco mutantes para generar los virus vaccinia correspondientes. Las mutaciones se confirmaron por secuenciación de los plásmidos generados en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Figura 11).

```
NSP3RRV      TGATTGGAATCAAGATATGAACAGTTAGAAAAGAGATTTGAGTCACTGAAACATCGGGTTAATGAGAAGTATAATCATTGGGTTCTTAAAGC
Y192A       TGATTGGAATCAAGATATGAACAGTTAGAAAAGAGATTTGAGTCACTGAAACATCGGGTTAATGAGAAGGCCAATCATTGGGTTCTTAAAGC
R173E       TGATTGGAATCAAGATATGAACAGTTAGAAAAGAGATTTGAGTCACTGAAACATCGGGTTAATGAGAAGTATAATCATTGGGTTCTTAAAGC
W170A       TGATGCCAAATCAAGATATGAACAGTTAGAAAAGAGATTTGAGTCACTGAAACATCGGGTTAATGAGAAGTATAATCATTGGGTTCTTAAAGC
K171E       TGATTGGAGTCAAGATATGAACAGTTAGAAAAGAGATTTGAGTCACTGAAACATCGGGTTAATGAGAAGTATAATCATTGGGTTCTTAAAGC
R187E:K191E TGATTGGAATCAAGATATGAACAGTTAGAAAAGAGATTTGAGTCACTGAAACATGAGGTTAATGAGGCTATAATCATTGGGTTCTTAAAGC
***** * ** * ***** **
```

Figura 11. Alineamiento de las secuencias modificadas por mutagénesis en pVOTE-RRV7. Los plásmidos pVOTE para cada mutante se amplificaron en bacterias competentes y el DNA plasmídico se purificó. Las secuencias en formato FASTA se alinearon con el gen 7 de RRV. En rojo se muestran los nucleótidos modificados para cada una de las mutaciones. Los nucleótidos marcados con * son idénticos a la secuencia silvestre.

Expresión de NSP3 silvestre y mutantes en el sistema del virus vaccinia.

Los virus vaccinia recombinantes para expresar las mutantes de NSP3 generados fueron: vRRV7_{W170A}, vRRV7_{K171E}, vRRV7_{R173E}, vRRV7_{R187E:K191E} y vRRV7_{Y192A}. La selección y amplificación de los virus vaccinia recombinantes es un proceso largo que implica varias etapas, por lo cual fue necesario verificar la expresión de NSP3 (silvestre y mutantes) en este sistema. Además, se exploró que el suero hiperinmune de nuestro laboratorio fuera capaz de reconocer a las mutantes generadas. Células BSC-1 se infectaron con los virus

vaccinia vT7lacOI, vRRV7_{wt}, vRRV7_{W170A}, vRRV7_{K171E}, vRRV7_{R173E}, vRRV7_{R187E:K191E} y vRRV7_{Y192A}, a una MOI = 5 en presencia de IPTG (2 mM) por 16 horas. A las 18 hpi las células se desprendieron con gendarme, y 2.5×10^6 células infectadas se sometieron a SDS-PAGE al 12% y se analizaron por Western blot para NSP3. En la figura 12 se muestra la confirmación de la expresión en el sistema del virus vaccinia de NSP3 silvestre y mutantes en la máxima dosis de IPTG (2 mM), además el suero hiperinmune es capaz de reconocer de forma específica y sensible a las mutantes de NSP3. No se detectó señal para NSP3 en células no infectadas o infectadas con el virus vaccinia vT7lacOI que no expresa a NSP3.

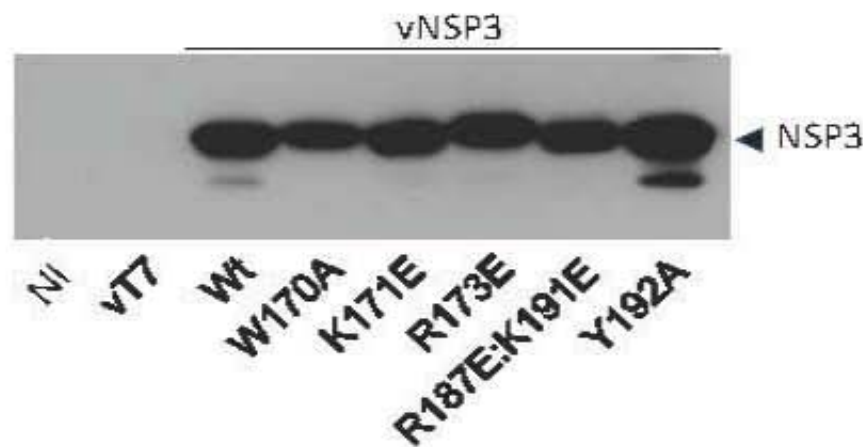


Figura 12. Expresión de NSP3 silvestre y las mutantes en el dominio *collected coil*. Células BSC-1 (1×10^6) se infectaron o no (NI) con los virus vaccinia recombinantes que expresan a la proteína silvestre y las mutantes o con la cepa parental vT7lacOI (vT7). Los lisados celulares se analizaron por WB disociativo con el suero hiperinmune contra NSP3. El triángulo negro indica la banda que corresponde a NSP3 con 34 kDa.

Efecto del inductor (IPTG) sobre el efecto inhibitorio de la traducción por NSP3.

Se determinó la cantidad mínima del inductor (IPTG) necesaria para establecer el efecto inhibitorio de la traducción por NSP3. Se expresó a NSP3 silvestre durante 16 horas con distintas concentraciones de IPTG (33, 100, 300 y 900 μ M). El efecto máximo inhibitorio se observa desde 100 μ M y se mantiene constante hasta 900 μ M (máxima concentración evaluada). Además, el nivel de síntesis de NSP3 durante una hora es constante para las

dosis 300 y 900 μM , por lo que, en los experimentos posteriores se eligió una dosis de 400 μM para asegurar tanto el efecto máximo inhibitorio como la síntesis constante de NSP3 (Figura 13). Por antecedentes del laboratorio se sabe que en tiempos largos de expresión (>12 horas), la síntesis de NSP3 disminuye con respecto a tiempos tempranos, esto se da por la aparición del efecto inhibitorio de la traducción celular por NSP3 (Figura 14).

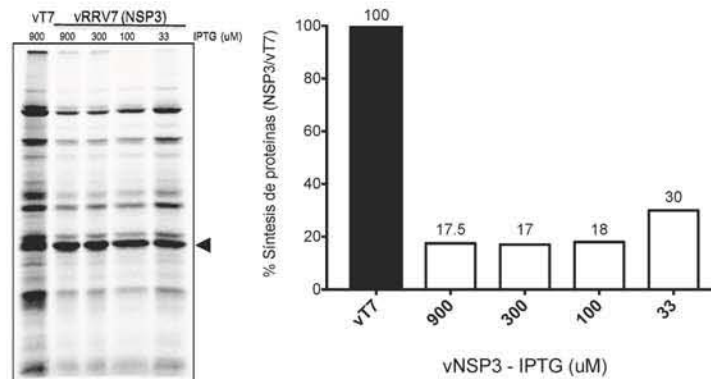


Figura 13. Efecto del inductor (IPTG) sobre el efecto inhibitorio de la traducción celular por NSP3. Células BSC-1 se infectaron con los virus vaccinia vT7 y vNSP3. A las 2 hpi se añadieron 33, 100, 300 y 900 μM de IPTG en MEM 2.5% de SFB. La incorporación de [^{35}S]metionina + [^{35}S]cisteína se midió durante una hora a las 18 hpi. Las proteínas separadas por SDS-PAGE se analizaron por autoradiografía y el triángulo negro indica la posición para NSP3 en la electroforesis.

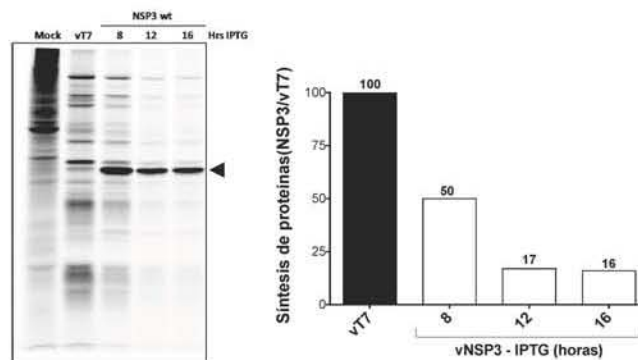


Figura 14. Cinética del efecto inhibitorio de la traducción celular por NSP3. Células BSC-1 infectadas con los virus vaccinia vT7 y vNSP3. La expresión de NSP3 se indujo en los tiempos indicados (8, 12 y 16 horas) con 2000 μM de IPTG en MEM 2.5% de SFB. La incorporación de [^{35}S] Met-Cys se midió durante una hora a las 18 hpi. Las proteínas separadas por SDS-PAGE se analizaron por autoradiografía y el triángulo negro indica la posición para NSP3 en la electroforesis.

Las mutantes de NSP3 difieren en la inhibición de la traducción celular con respecto a la proteína silvestre.

Tras la exploración de la concentración y tiempo de exposición al IPTG, donde el máximo efecto inhibitorio de la traducción fue constante, como se ha reportado resultados previos en nuestro laboratorio (2000 μM de IPTG por 16 horas), se estableció la concentración máxima de IPTG en 400 μM durante 16 horas para los siguientes experimentos. Por lo tanto, se expresaron las mutantes de NSP3 durante 16 horas y se midió el nivel de traducción celular mediante la incorporación de [^{35}S] Met-Cys (30 minutos). Las células fueron lavadas con PBS frío, se mezclaron con buffer de lisis y Laemmli 2X. Los lisados celulares se separaron en geles de acrilamida al 12% y se registró la señal por autoradiografía. Se tomó como referencia el estatus traduccional de las células infectadas con el virus vaccinia control (vT7lacOI).

Las células infectadas con el virus control muestran un patrón de expresión típico de la infección del virus vaccinia que corresponden a tiempos tardíos (>12 hpi), lo que difiere importantemente de las células no infectadas (Figura 15). Mientras que las células infectadas con los virus vaccinia para expresar a NSP3, presentan una señal evidente en 34 kDa que corresponde específicamente a NSP3, y que previamente fue determinado por ensayos de inmunoprecipitación con un suero hiperinmune para NSP3 (Padilla-Noriega, L. et al., 2002).

La síntesis de proteínas se reduce en las células infectadas con el virus vaccinia vT7lacOI en comparación con las células no infectadas, sin embargo, la disminución es mayor cuando la proteína NSP3 está presente con un 87% de inhibición traduccional, por lo que el efecto de NSP3 es dominante sobre los mecanismos inhibitorios del virus vaccinia. Mientras que al comparar las mutantes de NSP3 con la proteína silvestre se observaron diferentes efectos: K171E inhibe la traducción celular de forma similar a la proteína silvestre (87%), W170A y Y192A tiene un efecto inhibitorio parcial (49% y 64%, respectivamente), por otro lado, R173E y R187E:K191E tienen un efecto inhibitorio mínimo (33% y 24%, respectivamente). Por lo que, la mutación K171E no afecta la función inhibitoria de NSP3 y las mutantes R173E y R187E:K191E pierden parcialmente la capacidad inhibitoria de la síntesis de proteínas celulares (Figura 15).

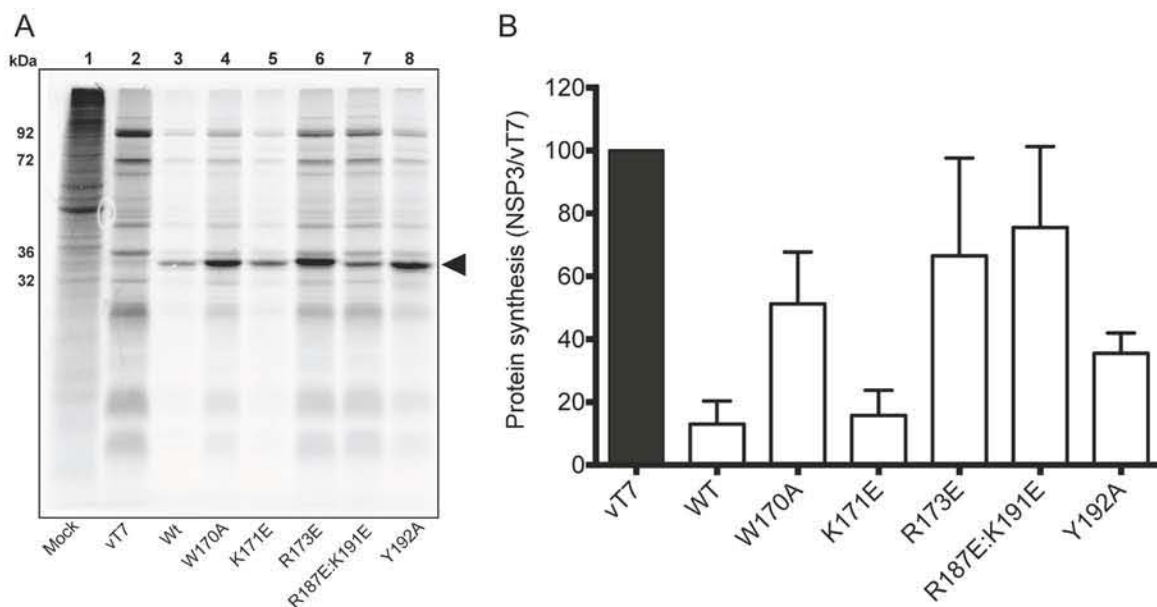


Figura 15. Efecto de las mutaciones sobre el efecto inhibitorio de la traducción celular por NSP3. Células BSC-1 infectadas con los virus vaccinia vT7, vNSP3, vW170A, vK171E, vR173E, vR187E:K191E y vY192A. La expresión de NSP3 silvestre y las mutantes se indujo durante 16 horas con 400 μ M de IPTG en MEM 2.5% de SFB. La incorporación de [S^{35}] Met-Cys se midió durante una hora a las 18 hpi. Las proteínas separadas por SDS-PAGE se analizaron por autoradiografía. El triángulo negro indica la posición para NSP3 en la electroforesis (34 kDa).

Relación dosis-efecto inhibitorio de la traducción celular para las mutantes de NSP3.

El sistema del virus vaccinia es regulable mediante la cantidad de inductor (IPTG) administrado, por lo que decidimos explorar si al modificar la concentración de IPTG, existe un comportamiento distinto en las mutantes de NSP3 con respecto a la proteína silvestre. En células BSC-1 se expresaron las proteínas NSP3 silvestre y sus mutantes por 18 horas en concentración crecientes de IPTG (25, 100, 400 y 2000 μ M), y se evaluó la función por marcaje metabólico tras la incorporación de [S^{35}] Met-Cys y la obtención de la autoradiografía. Se encontró que las mutantes presentan el mismo comportamiento que NSP3 silvestre, dado que el efecto máximo se observa con 100 μ M de IPTG y permanece casi constante a partir de esa concentración del inductor (Figura 16). Estos resultados

indican que la comparación del efecto de la proteína silvestre con las mutantes se puede realizar en un intervalo amplio de concentraciones del inductor a partir de 100 μM , utilizando un tiempo fijo para cosechar, tal como 18 hpi. Además, los resultados sugieren que las diferencias encontradas entre NSP3 silvestre y sus mutantes son consecuencia de la mutación realizada, y no de la cantidad de NSP3 expresada.

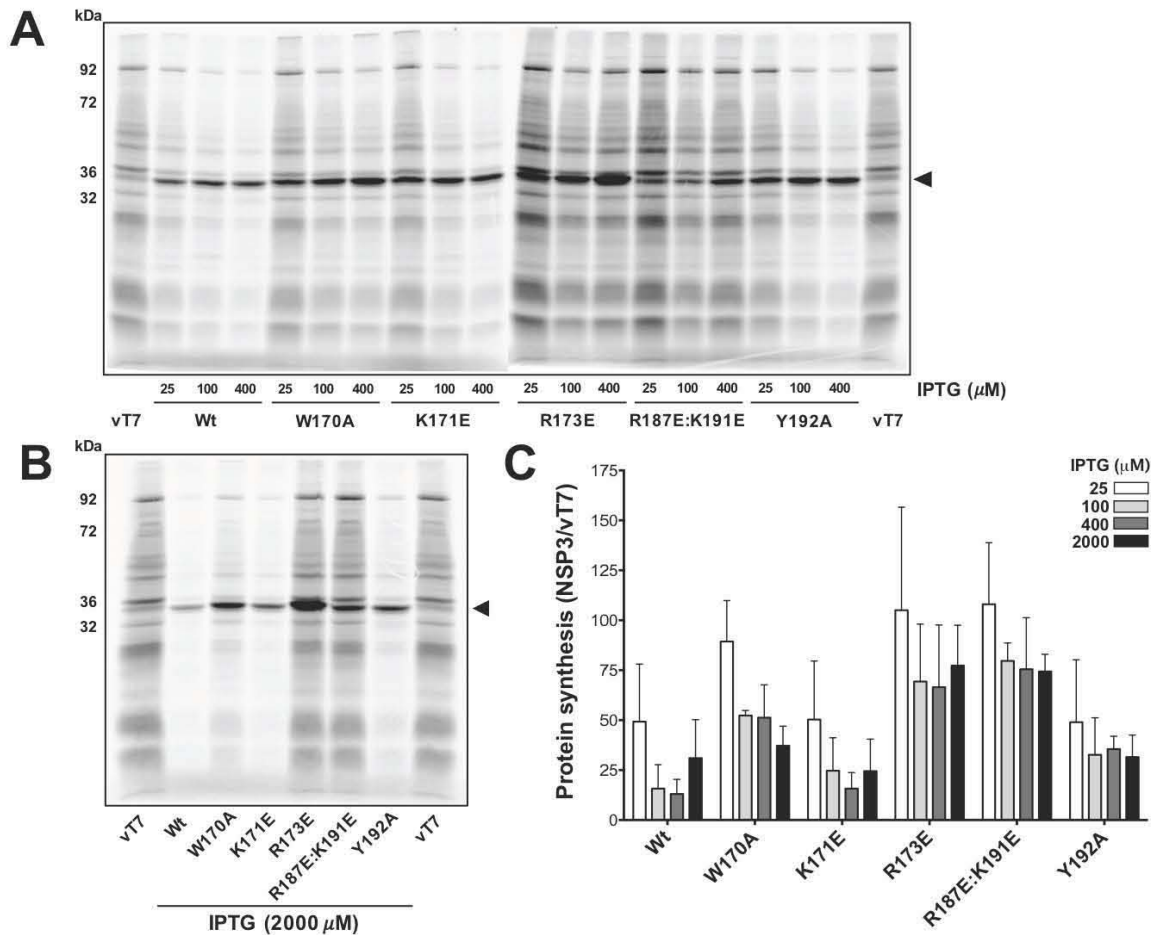


Figura 16. Relación de la cantidad del inductor (IPTG) y la función inhibitoria de la traducción celular por NSP3 y sus mutantes. Células BSC1 infectadas con los virus vaccinia recombinantes vNSP3 Wt, -W170A, -K171E, -R173E, -R187E:K191E y -Y192A se sometieron a dosis crecientes de IPTG (25-2000 μM). La incorporación de [S^{35}] Met-Cys se midió durante una hora a las 18 hpi. Las proteínas separadas por SDS-PAGE se analizaron por autoradiografía.

La mutación en el residuo W170A afecta la formación de dímeros de NSP3 estables y conserva parcialmente la función inhibitoria de la traducción.

La mutación W170A afecta totalmente la formación de dímeros estables de NSP3, y conserva cierta capacidad para inhibir la traducción celular ($\approx 50\%$). Se comparó la capacidad de dimerización de esta mutante con la proteína silvestre y la mutante que presenta el mayor nivel de acumulación (Y192A). Existe un aumento en los dímeros y monómeros de NSP3 (silvestre y Y192A) conforme se incrementa la dosis del inductor, y para la mutante W170A solo aumentan los monómeros, sin dímeros detectables en este ensayo (Figura 17). Sorprendentemente, esta mutante es capaz de inhibir la traducción celular, aunque en menor grado que la proteína silvestre. Estos resultados muestran la posibilidad que la señal detectada como monómero de NSP3 (34 kDa) sea una mezcla entre monómeros e intermediarios de la dimerización, que mediante esta técnica no es posible diferenciarlos. Dutta y colaboradores encontraron en experimentos de traducción *in vitro* que los monómeros de NSP3 son muy inestables y degradados por la vía del proteasoma, mientras que los dímeros son relativamente más estables (Dutta, D. et al., 2011). En base a estos resultados hipotetizamos que la banda de NSP3 aparentemente monomérica está constituida principalmente por intermediarios de dimerización.

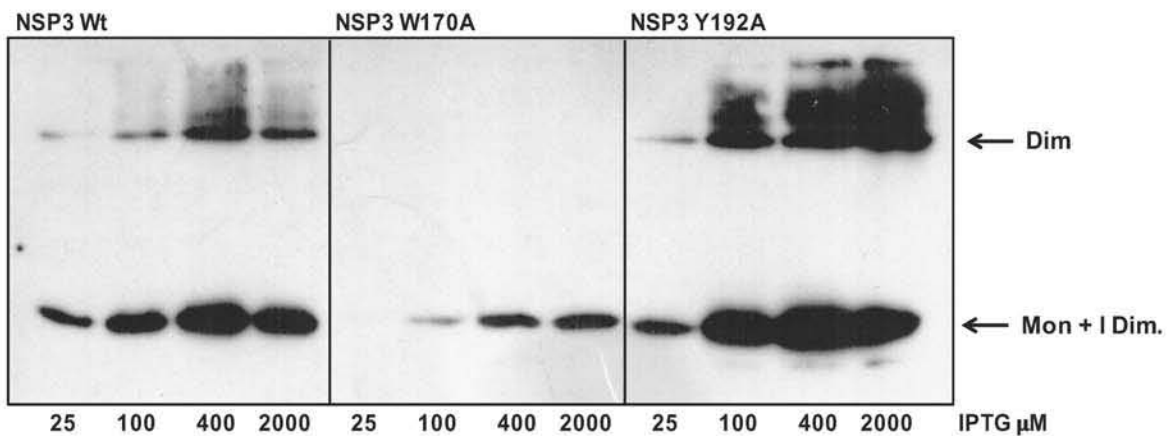


Figura 17. Relación de la cantidad del inductor (IPTG) y la capacidad de dimerización de NSP3. Células BSC1 infectadas con los virus vaccinia recombinantes vNSP3 Wt, -W170A y -Y192A se sometieron a dosis crecientes de IPTG (25-2000 μM). A las 18 hpi los lisados celulares se sometieron a WB-ND para determinar la cantidad de dímeros y monómeros/intermediarios de dimerización en cada condición.

Optimización de la concentración y tiempo de exposición al inhibidor del proteasoma (MG132).

NSP3 es una proteína que se degrada por la vía del proteasoma, y cuatro de las mutantes acumulan NSP3 en menor grado que la silvestre (mostrado en la figura 19), por lo que fue de interés evaluar la susceptibilidad de estas mutantes al inhibidor del proteasoma MG132. Generalmente, el inhibidor se utiliza a una concentración de 50 μM durante 2 horas previo a la obtención de lisado celular, sin embargo, en estas condiciones se encontró el efecto contrario al esperado (menor acumulación para la proteína silvestre y las mutantes). Es posible explicar esta disminución en la acumulación de NSP3 tras la adición de MG132 en altas concentraciones, en base a que el virus vaccinia depende del proteasoma para llevar a cabo su replicación eficientemente (Satheshkumar, P. S., L. C. Anton, P. Sanz, & B. Moss, 2009).

Se exploraron distintas concentraciones de MG132 (0.05, 0.5 y 5 μM) durante 2 y 16 horas previas a la cosecha, y se encontró que la concentración de 0.5 μM por 16 horas ocasiona un mayor nivel de acumulación en el monómero/intermediario de dimerización de NSP3, tanto en la proteína silvestre como en la mutante W170A (Figura 18). La forma dimérica de NSP3 se afecta en mucho menor nivel que la forma monomérica/intermediario de dimerización, sin embargo, fue interesante observar que por encima de la forma dimérica se detectan formas de mayor peso molecular tras la administración de MG132, esto sugiere poli-ubiquitinación del dímero de NPS3. En la mutante W170A, se confirma que tienen un defecto en la aparición del dímero estable y en la estabilidad del monómero o del intermediario de dimerización, debido a que en esta mutante en presencia de MG132 se aumenta considerablemente la forma monomérica/intermediario de dimerización de NSP3 (Figura 18).

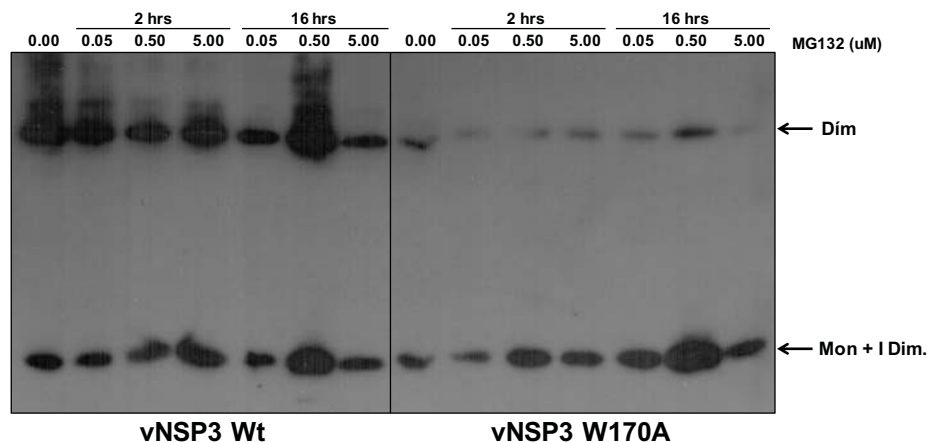


Figura 18. Optimización de la concentración del inhibidor del proteasoma (MG132). Células BSC-1 infectadas con los virus vaccinia vNSP3 Wt y vNSP3 W170A con 400 μM de IPTG (16 horas) se expusieron a distintas concentraciones de MG132 (0.00, 0.05, 0.50 y 5.00 μM) durante 2 y 16 horas previas a la cosecha. Los lisados celulares se analizaron por Western blot ND.

El proteasoma regula el nivel de acumulación de NSP3 y sus mutantes.

Las mutaciones fueron diseñadas para afectar la dimerización de NSP3 sin modificar ningún residuo dentro del dominio de unión a HSP90, sin embargo, como se reportó previamente NSP3 se degrada por la vía del proteasoma cuando se afecta la dimerización al bloquear la actividad de HSP90 mediante geldaminicina (Dutta, D. et al., 2011). Por lo tanto, resultó de interés evaluar la susceptibilidad de las mutantes al inhibidor del proteasoma MG132 mediante el nivel de acumulación de NSP3 y las mutantes a una concentración de 0.5 μM durante 16 horas como previamente fue estandarizado (Figura 19). Células BSC-1 fueron infectadas con los virus vaccinia correspondientes para expresar a NSP3 silvestre y las mutantes durante 16 horas (400 μM IPTG y 0.5 μM MG132), los lisados celulares fueron separados en geles desnaturizantes y transferidos a membranas de PVDF para el tratamiento posterior con el suero hiperinmune contra NSP3. Los niveles de acumulación fueron medidos por densitometría y corresponden a tres repeticiones bajo las mismas condiciones. En ausencia del inhibidor (MG132) se detecta que cuatro mutantes se acumulan en menor grado que la proteína silvestre (W170A, R173E, K171E y R187E:K191E), mientras que la mutación en Y192 se acumula en mayor nivel. El tratamiento con MG132 muestra un mayor efecto sobre la proteína silvestre de NSP3 y para

las mutantes W170A, K171E y Y192A; en el caso de R173E y R187E:K191E no se observan diferencias muy notables para la acumulación en ambas condiciones (MG132+ y MG132-). Estos resultados indican que la degradación por la vía del proteasoma depende de diversos factores como la velocidad y el máximo nivel de acumulación para cada mutante, debido a que se ha establecido en nuestro laboratorio que el nivel de acumulación máximo para NSP3 silvestre es de 12 horas, por lo que esto demuestra un mecanismo complejo de acumulación en el que diversos factores participan como interacciones con las proteínas de unión a NSP3, síntesis, plegamiento y degradación (proteostasis). Además, otra posibilidad adicional es que las mutaciones facilitan la degradación por la vía del proteasoma, por un grado mayor de ubiquitinación y/o aumento en la afinidad del proteasoma por NSP3.

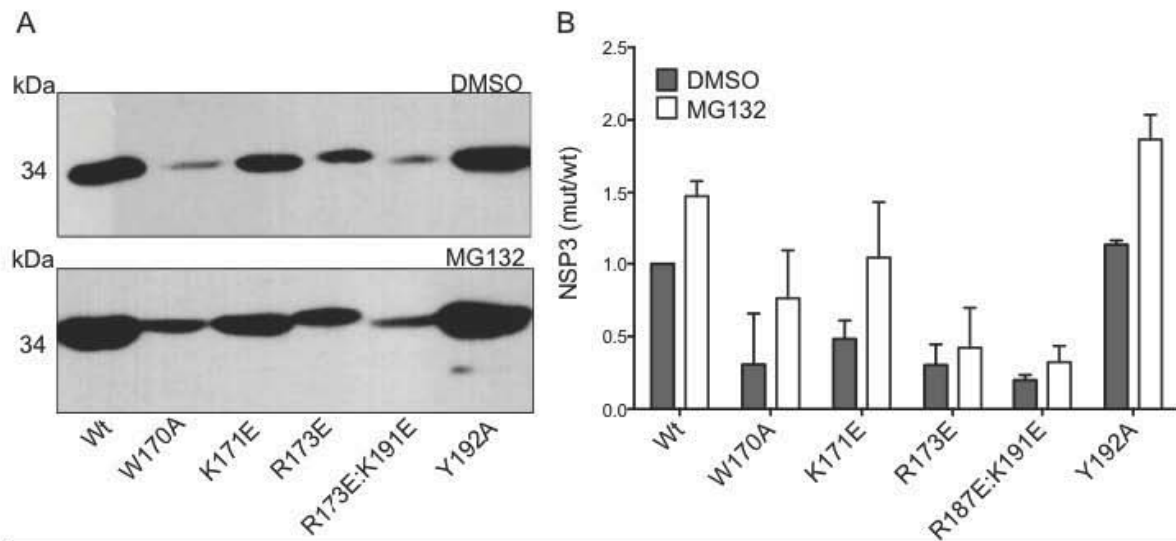


Figura 19. Participación del proteasoma en la acumulación de NSP3 silvestre y mutantes. Células BSC-1 con los virus vaccinia recombinantes para expresar a NSP3 Wt, W170A, K171E, R173E, R187E:K191E y Y192A durante 16 horas con 400 μ M de IPTG en ausencia de MG132 (panel A superior y barras grises) o presencia de 0.5 mM de MG132 (panel B inferior y barras blancas). Panel A, imagen representativa de los lisados celulares sometidos a Western blot disociativo con el suero hiperinmune para NSP3. Panel B, representación de la densitometría de tres experimentos independientes.

Las mutantes de NSP3 evidencian la importancia de la región *coiled coil* en la oligomerización.

Debido a que las mutaciones fueron diseñadas para afectar la continuidad de la heptarepetición y por consiguiente la dimerización de NSP3, fue de interés determinar el nivel de acumulación de los dímeros estables mediante Western blot no disociativo (WB-ND). El WB-ND es una estrategia experimental donde las condiciones de lisis celular y electroforesis son modificadas para la separación de los dímeros estables de NSP3. Posterior a la adición del buffer de lisis, las células se mezclan en vortex y se incuban por 30 minutos a 4°C, contrario a las condiciones desnaturalizantes por calor (95°C por cinco minutos). Además, se excluye el agente reductor (betamercaptoetanol) y el tensoactivo (SDS) se redujo cinco veces. Las condiciones no disociativas permiten separar notablemente a los dímeros de NSP3 (≈ 70 kDa) de los monómeros e intermediarios de la dimerización (34 kDa), esta técnica fue utilizada con NSP3 por Chawla-Sarkar ((Dutta, D. et al., 2011). Los intermediarios de la dimerización de NSP3 se definen como las formas monoméricas que se encuentran en proceso de dimerización y tienen interacciones tempranas con eIF4G o HSP90, mientras que los monómeros recién sintetizados (*bona fide*) son altamente inestables y se degradan rápidamente por el proteasoma cuando se bloquea la actividad de HSP90 (Reyna-Rosas, publicación en proceso; Dutta *et al.*, 2011).

El nivel de dímeros estables de NSP3 acumulado durante 16 horas post-inducción resultó severamente afectado para las mutantes W170A, R173E y R187E:K191E, poco afectado para la mutante K171E, mientras que existe una mayor acumulación en la mutante donde se modificó la tirosina 192 por alanina (Figura 20). Basado en resultados de tres repeticiones se encontró particularmente la mutante más afectada (W170A) una disminución del dímero nueve veces menor que la proteína silvestre, y 16 veces menor que Y192A. Cabe mencionar que el nivel de acumulación de los monómeros/intermediarios de la dimerización es similar a los dímeros estables, lo que indica que la acumulación de la forma estable de NSP3 depende del equilibrio entre la síntesis y la degradación de NSP3, así como la capacidad intrínseca del dominio *coiled coil* para la oligomerización. Además, ni el nivel de acumulación total de NSP3 ni el de los dímeros estables correlacionan totalmente con la capacidad para inhibir la síntesis de proteínas celulares, debido a que la mutante Y192A a pesar de tener más acumulación de la proteína y de la forma dimérica,

no tiene mayor capacidad para inhibir la traducción que la proteína silvestre, por contraparte, se comporta funcionalmente igual a la mutante W170A. (Figura 15).

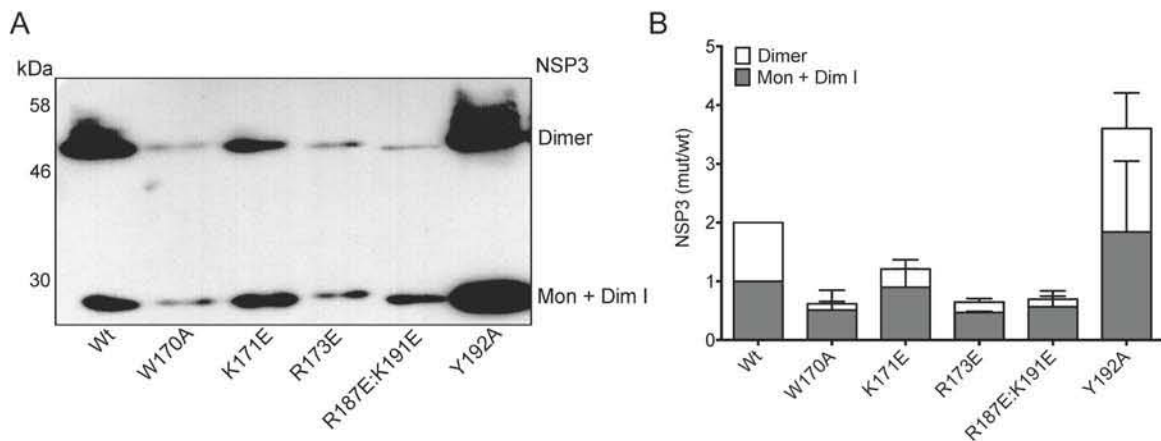


Figura 20. Capacidad de dimerización de las mutantes de NSP3. Células BSC-1 fueron infectadas con los virus vaccinia recombinantes (MOI 5) en presencia del inductor IPTG (400 μM) durante 16 horas. A las 18 hpi los lisados celulares fueron obtenidos y sometidos a electroforesis no desnaturizantes. (A) Imagen representativa de tres experimentos independientes de Western blot con el suero hiperinmune para NSP3 donde las bandas superiores corresponden a los dímeros de NSP3 (68 kDa) y las bandas inferiores a los monómeros/intermediarios de dimerización (34 kDa). (B) Representación gráfica de los tres experimentos independientes para la densitometría de los ensayos de WB-ND de los dímeros (barras blancas), y de los monómeros/intermedios de la dimerización (barras grises) para NSP3 silvestre y las mutantes.

Participación del proteasoma en la acumulación de los dímeros y monómeros/intermediarios de la dimerización de NSP3.

La acumulación total de NSP3 silvestre es notoriamente afectada cuando se bloquea la dimerización de la proteína con el uso del inhibidor de HSP90 (geldanamicina), lo que resulta en su rápida degradación dependiente del proteasoma (Dutta, D. et al., 2011), por lo que resultó de interés evaluar el efecto del inhibidor del proteasoma MG132 en la acumulación de los dímeros estables y de los monómeros/intermediarios de la dimerización de NSP3. El inhibidor MG132 (o el diluyente DMSO) se utilizó durante todo el tiempo de inducción con IPTG (16 horas) a una dosis más baja (0.5 μM) de lo convencional, y según la estandarización que se mostró anteriormente (Figura 18). Los lisados celulares infectados con los virus vaccinia correspondientes a NSP3 silvestre y las mutantes fueron

sometidos al WB-ND, y se cuantificaron los resultados por densitometría de tres experimentos independientes.

En comparación a lo encontrado con el diluyente DMSO, el tratamiento con MG132 aumenta considerablemente tanto las formas diméricas estables, así como los monómeros/intermediarios de la dimerización para la proteína silvestre y la mutante Y192A (Figura 21 paneles C y D). En contraste, el inhibidor MG132 no tiene efectos sobre las mutantes W170A, K171E, R173E y R187E:K191E para la acumulación de los dímeros y de los monómeros/intermediarios de la dimerización de NSP3 (Figura 21). Como previamente se encontró acumulación total, la proteína silvestre y las mutantes presentan mayor nivel al inhibir el proteasoma con MG132 (Figura 19), éstas diferencias pudieran ser explicadas por un efecto *in vitro*, dado que con el fin de preservar las formas oligoméricas de NSP3, el WB-ND utiliza bajas concentración de SDS, e involucra un tiempo de incubación por 30 minutos en hielo para detectar y separar las formas diméricas de los monómeros/intermediarios de la dimerización. Sin embargo, bajo estas condiciones es imposible inhibir por completo la actividad enzimática celular, por lo que aquellos sistemas involucrados en la degradación de proteínas como ubiquitin-ligasas, proteasas, chaperonas, el proteasoma, etc., se encuentran activos aún en los lisados celulares, particularmente para la mutante R173E se puede ejemplificar que los niveles detectados en este ensayo son menores para todas la formas de NSP3 analizadas.

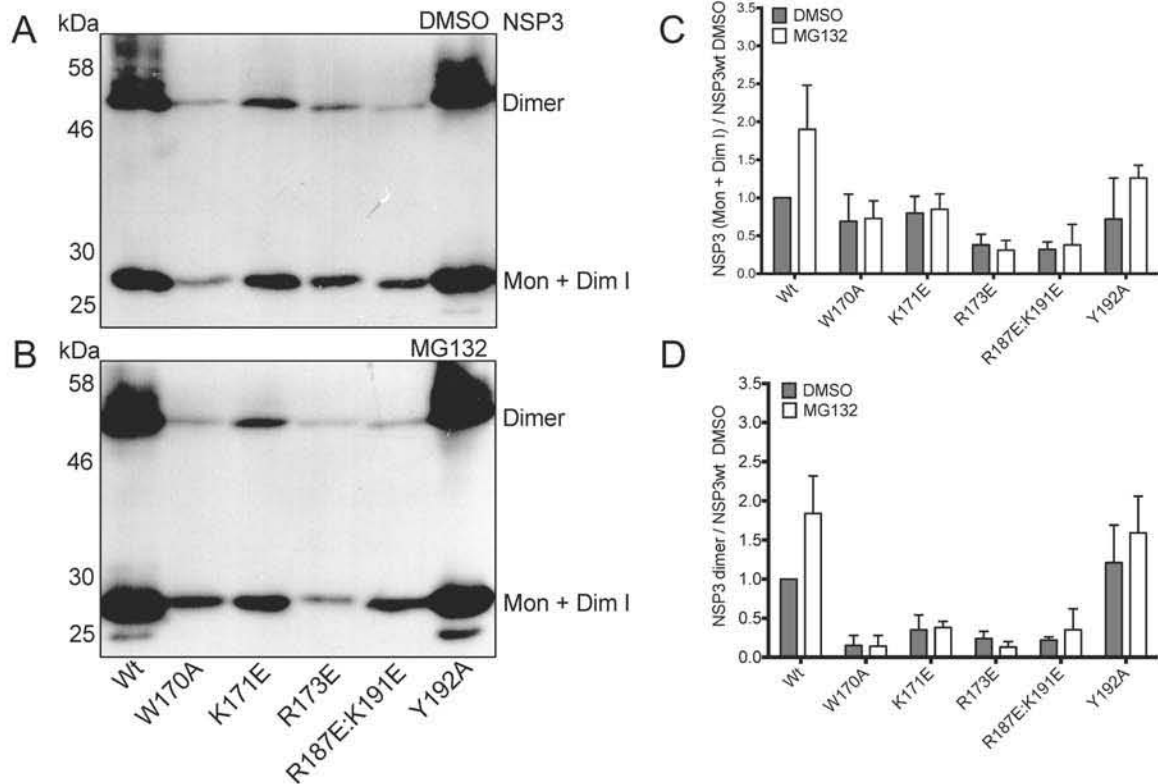


Figura 21. Capacidad de dimerización de las mutantes de NSP3 en presencia de MG132. Células BSC-1 fueron infectadas con los virus vaccinia recombinantes (MOI 5) en presencia del inductor IPTG (400 μ M) y en presencia de MG132 (B y D) durante 16 horas. A las 18 hpi los lisados celulares fueron obtenidos y sometidos a electroforesis no desnaturalizantes. (A y C) Imágenes representativas de tres experimentos independientes de Western blot con el suero hiperinmune para NSP3 donde las bandas superiores corresponden a los dímeros de NSP3 (68 kDa) y las bandas inferiores a los monómeros/intermediarios de dimerización (34 kDa). (B y D) Representación gráfica de los tres experimentos independientes para la densitometría de los ensayos de WB-ND de los dímeros (barras blancas), y de los monómeros/intermedios de la dimerización (barras grises) para NSP3 silvestre y las mutantes.

Por otro lado, en todos nuestros experimentos con distintos enfoques fue consistente la aparición de una banda de menor tamaño (\approx 30 kDa) a los monómeros/intermediarios de la dimerización de NSP3, particularmente en la proteína silvestre y en la mutante Y192A, esta banda se exacerbó con la adición del inhibidor del proteasoma MG132. Lo cual indica que esta forma de menor peso molecular a los monómeros de NSP3 resulta de vías alternas de degradación que no involucran directamente al proteasoma, posiblemente la vía de las caspasas que corta fragmentos de

las proteínas en sus extremos para inactivar o degradarlas, tal es el caso del factor eIF4G que es cortado en tres fragmentos (Bushell, M., D. Poncet, W. E. Marissen, H. Flotow, R. E. Lloyd, M. J. Clemens, et al., 2000; Hsu, Y. Y., Y. N. Liu, W. W. Lu, & S. H. Kung, 2009).

Los dímeros de NSP3 se degradan por el proteasoma.

Previamente se mostró que, para cuatro de las cinco mutantes evaluadas, el tratamiento con el inhibidor del proteasoma MG132 no correlaciona totalmente con los resultados para la acumulación de NSP3 total (Figuras 19 y 21), así como con la acumulación de los dímeros y monómeros/intermediarios de la dimerización (Figura 20). Dado que el proteasoma es el mayor determinante de la proteólisis de NSP3, decidimos evaluar con mayor detalle la cinética de degradación de los dímeros y monómeros /intermediarios de la dimerización de NSP3 silvestre, con el objetivo de identificar diferencias entre la estabilidad y la capacidad para que las formas oligoméricas de NSP3 sean degradadas, así como la participación del proteasoma en esta dinámica.

Se expresó a NSP3 silvestre en células BSC-1 infectadas con el virus vaccinia correspondiente (MOI = 5) en presencia y ausencia de MG132 durante 12 horas (14 hpi). Dos horas previas a la cosecha (12 hpi) se añadió cicloheximida (concentración final 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con el objetivo de bloquear la síntesis de proteínas celulares, y seguir la degradación temporal de NSP3 silvestre (0 a 240 minutos). Los lisados celulares fueron colectados a los 0, 30, 60, 120 y 240 minutos y analizados mediante WB-ND para estimar los tiempos de vida media de cada forma oligomérica de NSP3 silvestre. Los resultados muestran que la cantidad de la forma dimerica acumulada disminuye más rápidamente que los monómeros/intermediarios de dimerización, con tiempos de vida media de 60 y 134 minutos, respectivamente. Por otro lado, al comparar estos resultados en presencia de MG132 encontramos que ambas formas de NSP3 permanecen estables hasta los 120 minutos, particularmente, el tiempo de vida media para los monómeros/intermediarios de la dimerización se incrementa 1.8 veces que en ausencia del inhibidor del proteasoma (Figura 21). Estos resultados dan indicios que los dímeros de NSP3 también se degradan por la vía del proteasoma, lo que posiblemente explica las formas de tamaño superior al dímero (> 68 kDa) encontradas previamente para NSP3 silvestre y la mutante Y192A, los cuales podrían

corresponder a dímeros poliubiquitinados que se acumulan por el bloqueo proteasomal por MG132.

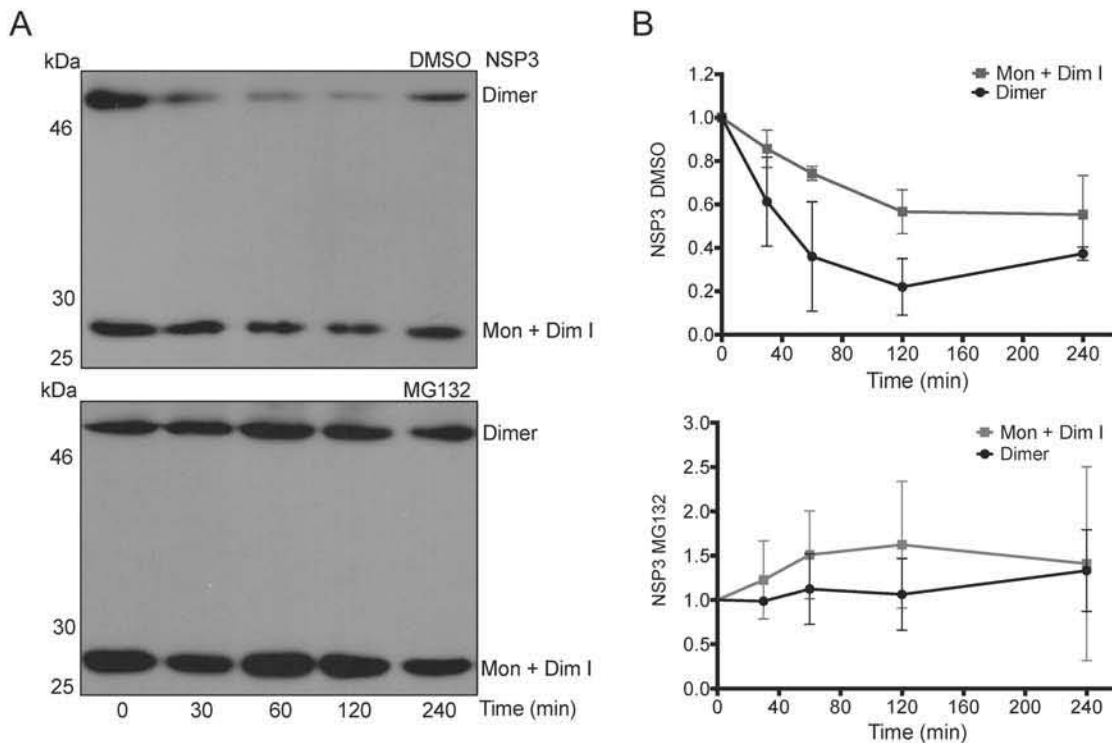


Figura 22. Cinética de la degradación de las formas oligoméricas de NSP3. Células BSC-1 fueron infectadas con los virus vaccinia recombinantes (MOI 5) en presencia del inductor IPTG (400 μ M) y en presencia/ausencia de MG132 durante 12 horas. Dos horas previas a la cosecha (14 hpi) se añadió cicloheximida, los lisados celulares fueron obtenidos y sometidos a electroforesis no desnaturalizantes. (Panel A) Imágenes representativas de tres experimentos independientes de Western blot con el suero hiperinmune para NSP3 donde las bandas superiores corresponden a los dímeros de NSP3 (68 kDa) y las bandas inferiores a los monómeros/intermediarios de dimerización (34 kDa). (Panel B) Representación gráfica de los tres experimentos independientes para la densitometría de los ensayos de WB-ND de los dímeros (línea oscura), y de los monómeros/intermediarios de la dimerización (línea gris) para NSP3.

Localización intracelular de PABP tras la expresión de NSP3 en el sistema del virus vaccinia.

Se ha demostrado que la relocalización nuclear de PABP es producto de la expresión de NSP3, y no se observa cuando se afecta la formación del complejo ternario eIF4G-NSP3-

RoXaN, o al bloquear la dimerización de NSP3 con el uso del inhibidor de HSP90 (17DMAG) (Dutta, D. et al., 2011; Harb, M. et al., 2008). Adicionalmente, los RNA mensajeros celulares se acumulan en el núcleo de la célula infectada por rotavirus (Rubio, R. M. et al., 2013). Se evaluó la localización intracelular de PABP al expresar a NSP3 en nuestro sistema, ya que es una consecuencia relevante para la función inhibitoria de la traducción celular. Células MA104 se infectaron con los virus vT7lacOI y vRRV7_{wt} (MOI 0.1 y 0.8), y a las 24 hpi se fijaron para realizar inmunolocalización con los anticuerpos para NSP3 y PABP. Se sabe que en células no infectadas la localización de PABP en células no infectadas es predominantemente citoplásmica (Burgess, H. M., & N. K. Gray, 2012). Contrario a lo esperado, la expresión de NSP3 en el sistema del virus vaccinia no induce la relocalización nuclear de PABP (Figura 22). El complejo eIF4F (eIF4E, eIF4G y PABP) es secuestrado en las fábricas virales del virus vaccinia. eIF4E y eIF4G se localizan en el interior y PABP en la periferia de las fábricas virales (Walsh, D., C. Arias, C. Perez, D. Halladin, M. Escandon, T. Ueda, et al., 2008). La compartimentalización de eIF4G en estas estructuras se da por la interacción con la proteína de unión al DNA de cadena sencilla, I3 del virus vaccinia (Zaborowska, I., K. Kellner, M. Henry, P. Meleady, & D. Walsh, 2012). Adicionalmente, se expresó a NSP3 en presencia de arabinósido de citosina (AraC); un inhibidor de la replicación de la síntesis de DNA del virus vaccinia que se usa como atenuador de la infección viral (Chou, W., T. Ngo, & P. D. Gershon, 2012). Sin embargo, al adicionar AraC también se afectó la síntesis de NSP3 (Figura 23), cuya señal inmunofluorescente se observó muy atenuada. A pesar de la atenuación de la expresión de NSP3, se aprecia que en las células en las que es posible detectar la expresión de NSP3 en el citoplasma, también presentan señal de PABP en citoplasma, similar a lo que ocurre en ausencia de Ara C.

Es muy importante contextualizar este resultado, ya que los reportes en la literatura postulan que un factor importante para la función inhibitoria de la traducción celular por NSP3, es la relocalización de PABP en el núcleo celular. En este estudio demostramos que NSP3 inhibe la traducción celular a pesar de que PABP permanece en el citoplasma celular.

Células MA104

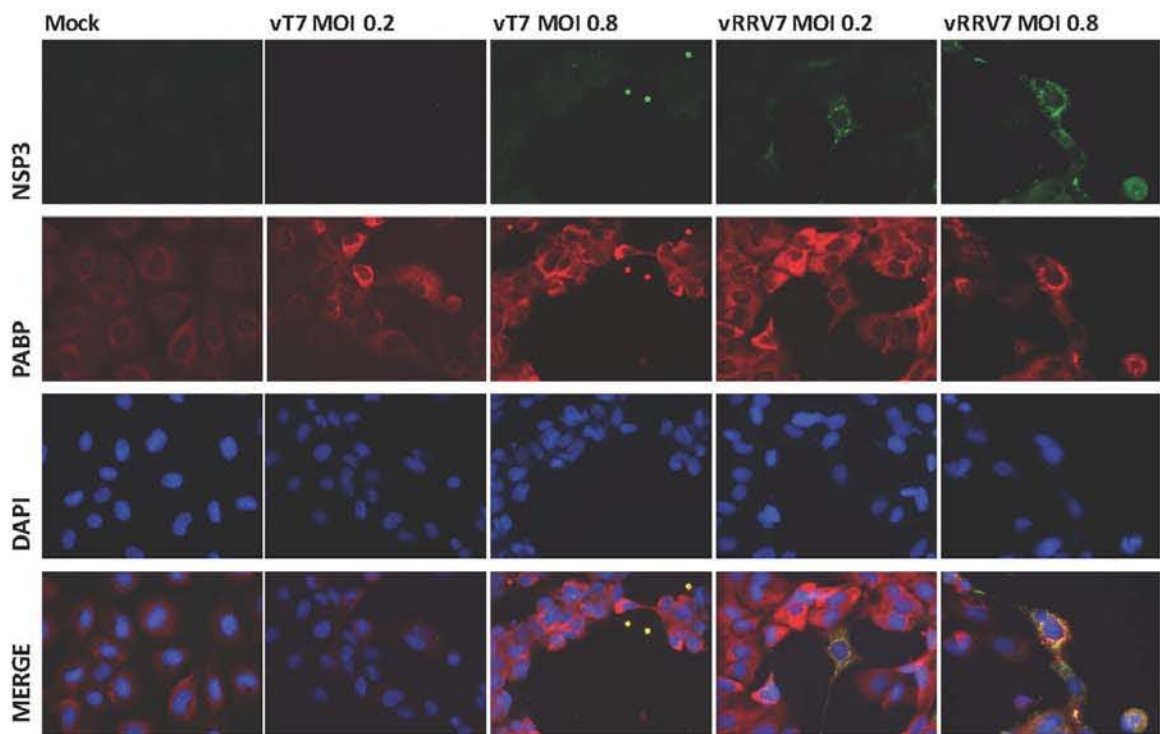


Figura 23. Distribución intracelular de PABP y NSP3 en el sistema del virus vaccinia. Células MA104 mock, infectadas con los virus vaccinia vT7 y vRRV7 a distintas MOI (0.2 y 0.8). A las 18 hpi las células se fijaron y se incubaron con los anticuerpos primarios anti-NSP3 de conejo y anti-PABP de ratón. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo Alexa Fluor 514 y anti-IgG de ratón Alexa Fluor 594. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. Amplificación 40X.

Células MA104 en presencia de Ara C (40 µg/mL)

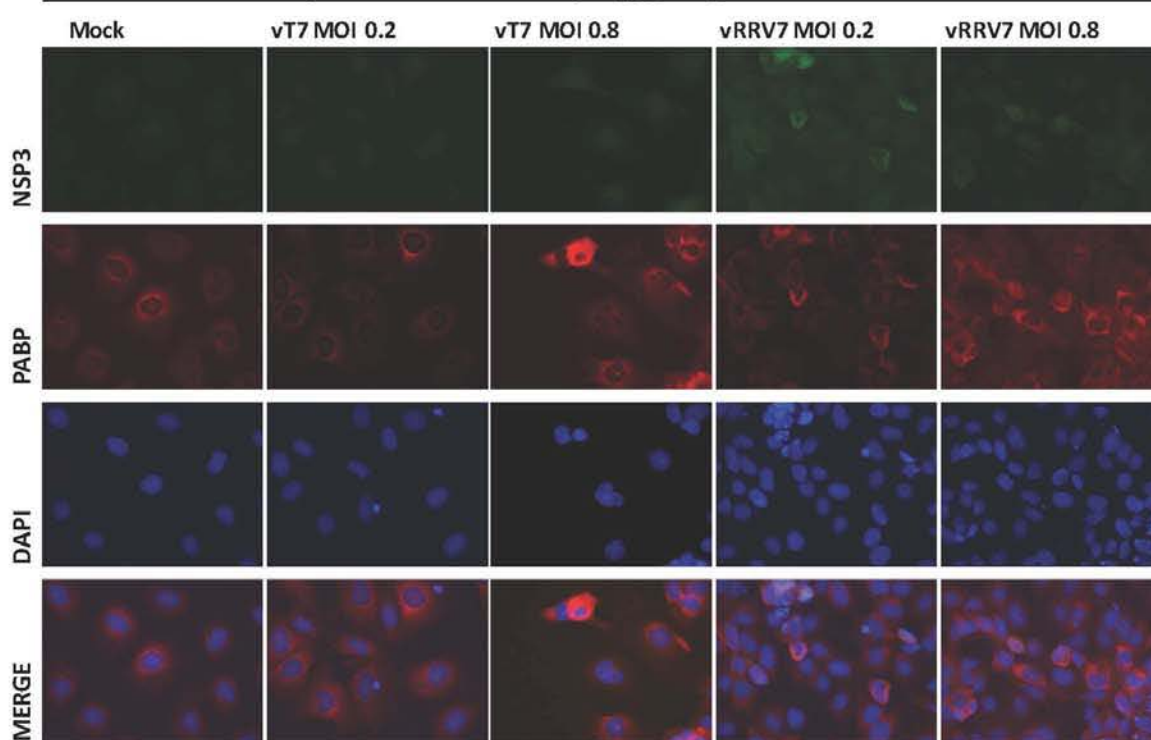


Figura 24. Efecto del arabinósido de citosina sobre la distribución intracelular de PABP y NSP3. Células MA104 mock, infectadas con los virus vaccinia vT7 y vRRV7 a distintas MOI (0.2 y 0.8) en presencia del atenuador de la infección de vaccinia Ara C (40 µg/mL). A las 18 hpi las células se fijaron y se incubaron con los anticuerpos primarios anti-NSP3 de conejo y anti-PABP de ratón durante 1 hora. Los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo Alexa Fluor 514 y anti-IgG de ratón Alexa Fluor 594. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. Ampliación 40X.

Localización intracelular de PABP y RoXaN en células MA104

Maya Harb, y colaboradores en el 2008 reportaron que existe un intercambio nuclear/citoplásmico entre PABP y RoXaN en células MA104 infectadas con rotavirus. Como se mencionó anteriormente, PABP es predominantemente citoplásmico, y RoXaN en células MA104 no infectadas se localiza principalmente en el núcleo celular, mientras que en células infectadas con rotavirus su localización es citoplásmico/nuclear. En base a estos antecedentes evaluamos la localización intracelular de PABP y RoXaN en células MA104 por ensayos de inmunolocalización con anticuerpos específicos para cada proteína. De

acuerdo a lo esperado, PABP se localiza en el citoplasma; no obstante, RoXaN es nuclear/citoplásmico con un enriquecimiento (mayor señal) en el retículo endoplásmico y/o periferia nuclear (Figura 24). Además, se evaluaron otras condiciones para intentar reproducir lo reportado previamente (línea celular BSC-1 y ausencia de SFB). Sin obtener diferencias importantes.

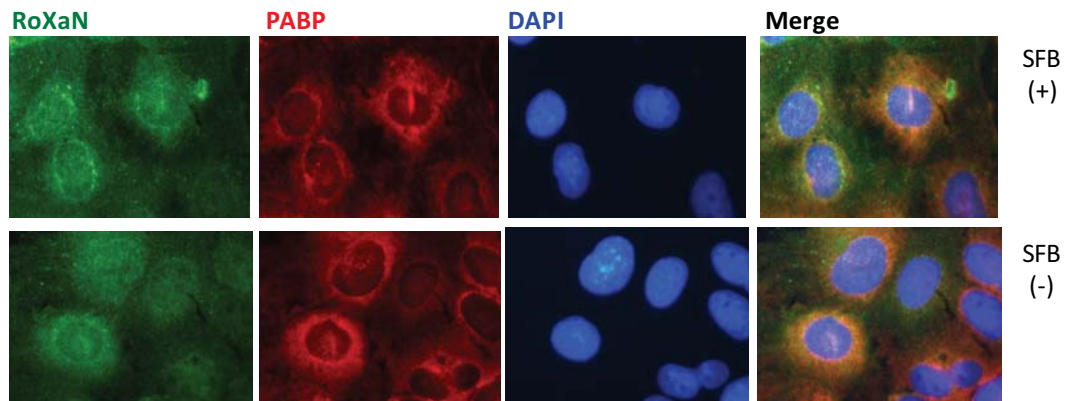


Figura 25. Localización intracelular de RoXaN y PABP. Células MA104 fueron sembradas en laminillas e incubadas a 37°C y 5% durante 24 horas en MEM 10% SFB. Se retiró el MEM 10% SFB y se incubaron por 12 horas con MEM sin SFB. Se fijaron con PFA 4% y bloquearon con BSA 1%. Los anticuerpos anti-RoXaN y anti-PABP se incubaron por 12 horas a 4°C. Durante 1 hora se colocaron los anticuerpos secundarios anti-rabbit Alexa Fluor 514 y anti-mouse Alexa Fluor 594. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. Amplificación 40X.

Modelo propuesto para la función inhibitoria de la traducción celular.

En nuestros resultados, las mutantes de NSP3 presentaron distintos niveles de acumulación de la forma dimérica de NSP3 con respecto a la proteína silvestre, particularmente cuatro mutantes presentaron niveles bajos de acumulación de la forma dimérica con el caso extremo de W170A, que presenta una reducción de nueve veces con respecto a la proteína silvestre y de casi 16 veces con respecto a la mutante Y192A. Sorprendentemente, ambas mutantes poseen el mismo nivel de inhibición de la traducción, sin correlacionar con la acumulación de los dímeros estables, cuestionando que la forma dimérica sea el único determinante y la encargada de establecer en primera instancia el efecto inhibitorio de la traducción celular. Adicionalmente, consideramos que la señal de 34 kDa en WB-ND corresponde en su mayoría a los intermediarios de la dimerización, debido

a que los resultados mostrados por Dutta y colaboradores en 2009 establecen que los monómeros de NSP3 recién sintetizados se degradan rápidamente, por lo que las interacciones tempranas de NSP3 con eIF4G y HSP90 podrían incrementar su estabilidad. En base a estos resultados proponemos que los intermediarios de la dimerización detectados con el WB-ND como monómeros son competentes para establecer el efecto inhibitorio traduccional. Por lo que el efecto inhibitorio traduccional de NSP3 parece depender tanto de los dímeros estables como de los intermediarios de la dimerización. En base a estas consideraciones la función de NSP3 comienza con las interacciones tempranas con Hsp90 que la convierten en intermediario de dimerización y subsecuentemente con eIF4G, previo a la liberación de la forma dimérica al concluir su interacción con Hsp90 (Figura 25). Cabe mencionar que no tenemos ningún indicio de que los dímeros pudieran perder la actividad inhibitoria de la traducción celular previamente adquirida por los intermediarios de dimerización.

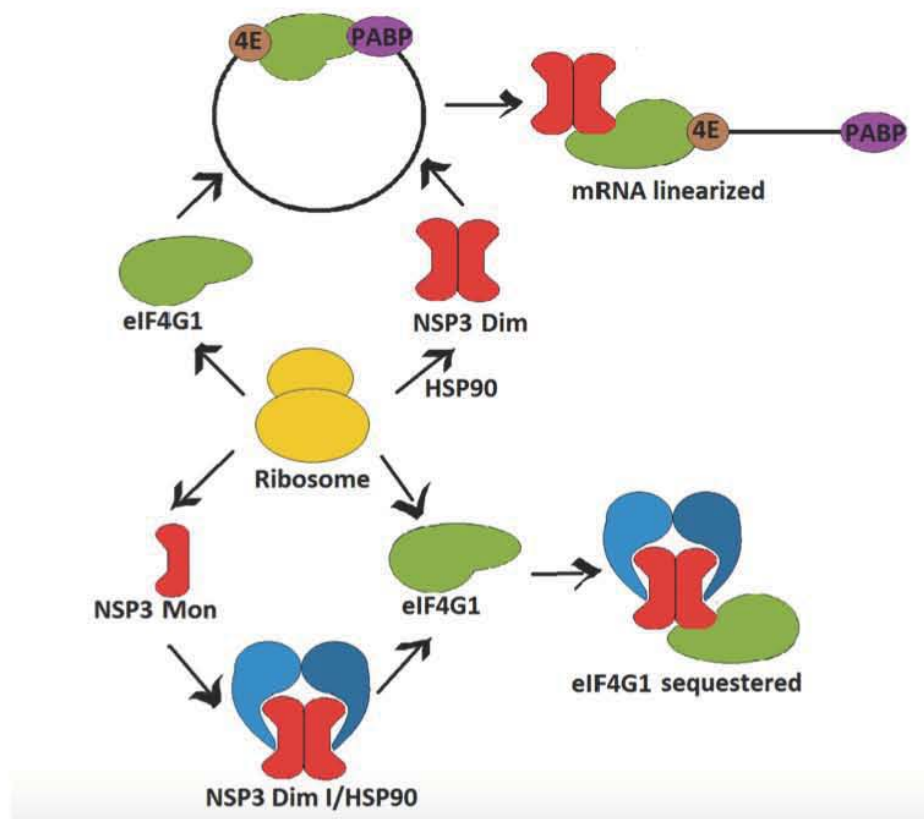


Figura 26. Modelo propuesto para la inhibición traduccional de NSP3 previo a la formación del dímero.

DISCUSIÓN

El papel de NSP3 como regulador a nivel traduccional de la expresión génica de rotavirus, se ha descrito con diversos enfoques. No obstante, en la mayoría de los casos, la inhibición de la traducción celular por NSP3 se ha inferido indirectamente; por la unión de NSP3 a eIF4G1 *in vitro* y en el sistema de dos híbridos en levadura (Piron et al., 1998). El sistema del virus vaccinia permite expresar de forma regulada a NSP3, y medir el impacto de esta proteína sobre la traducción de RNA mensajeros poliadenilados (virales y celulares) (Padilla-Noriega, L. et al., 2002). Es ampliamente aceptado que NSP3 inhibe la traducción por interrumpir las interacciones entre los extremos 3' y 5' en el RNA mensajero, dichas interacciones se regulan particularmente por eIF4E (5') y PABP (3'), que se anclan en la proteína andamio eIF4G. NSP3 se une a eIF4G en el mismo sitio que la proteína PABP, y con mayor fuerza (10 veces) (Piron, M. et al., 1998), por lo que se piensa que lineariza al RNA mensajero unido a PABP. En contraste, resultados recientes proponen que NSP3 es un sustituto de PABP, debido a que favorece la traducción de los RNA mensajeros virales y celulares, en distintas magnitudes (Gratia, M. et al., 2015).

El mayor determinante para establecer el efecto inhibitorio de la traducción celular, es la unión de NSP3 con eIF4G; como consecuencia de esta interacción la proteína PABP se relocaliza en el núcleo de células infectadas con rotavirus o que expresan a NSP3. Expresión de mutaciones en el dominio de unión a RoXaN, la inhibición de la actividad HSP90 o la expresión de una mutante de NSP3 con dominios del extremo carboxilo duplicados (SA11-4Fg7re), demostraron incapacidad para relocalizar a PABP (Arnold, M. M. et al., 2012; Dutta, D. et al., 2011; Harb, M. et al., 2008).

En nuestro laboratorio se estableció el sistema de expresión del virus vaccinia para NSP3 y otras proteínas de rotavirus. Este sistema inducible y por ensayos de marcaje metabólico con [³⁵S] Met-Cys, se demostró que la función inhibitoria de NSP3 depende de los dominios de unión a eIF4G y de dimerización, sin afectar la ausencia del dominio de unión al RNA viral. En estas condiciones NSP3 inhibe hasta 25 veces la traducción de proteínas celulares y del virus vaccinia, cuando la expresión de NSP3 se favorece por la presencia de una secuencia tipo IRES (Internal Ribosomal Entry Site), y en presencia de NaCl (Padilla-Noriega, L. et al., 2002), que se sabe que favorece la expresión de genes con

IRES (Elroy-Stein, O. et al., 1989). En este estudio se exploró reducir la cantidad de inductor sin afectar el efecto inhibitorio y el nivel de expresión. El máximo efecto inhibitorio se alcanza desde 300 μ M de IPTG (83 %) y permanece constante hasta la concentración más elevada del inductor (900 μ M). Posteriormente, se fijó 400 μ M como estándar para los experimentos subsecuentes. La diferencia con el estudio previo del laboratorio en cuanto a la magnitud del máximo efecto inhibitorio de la traducción celular (96 %) la atribuimos a la ausencia de condiciones hipertónicas (NaCl) en el presente estudio, lo que favorece la expresión de RNAm con IRES (Padilla-Noriega, L. et al., 2002).

Se ha propuesto que la dimerización de NSP3 resulta en una conformación ideal para la formación del complejo ternario eIF4G-NSP3-RoXaN, y ejercer la función inhibitoria de la traducción (Harb, M. et al., 2008), sin embargo en el sistema de traducción de reticulocitos se reportó que la forma dimérica de NSP3 por WB aparece a los 30 minutos de incubación con la chaperona HSP90, y se determinó que tras la inhibición de esta chaperona con un derivado de geldanamicina (17DMAG), se bloquea la función de NSP3 que relocaliza PABP al núcleo (Dutta, D. et al., 2011). Por lo tanto, el proceso de dimerización resulta ser un paso determinante, al menos en una de las funciones de NSP3. En base a estos antecedentes usamos un enfoque de mutagénesis dirigida para estudiar la importancia de la región *coiled coil* en el proceso de dimerización y adquisición de la función de NSP3. La función que estudiamos es la capacidad de NSP3 para inhibir la traducción celular, y no la relocalización de PABP al núcleo, como es estudios previos de la dimerización de esta proteína (Dutta *et al.*, 2011). La región *coiled coil* de NSP3 (residuos 159-245) contiene los dominios de dimerización y el de unión a RoXaN, además se encuentra una parte de los dominios de unión a HSP90 y a eIF4G. El patrón de heptarepetición característico en los *coiled coil*, se ha predicho en diversos estudios mediante el algoritmo reportado por Lupas (Lupas, a, 1996; Piron, M. et al., 1999; Vitour, D. et al., 2004).

Los residuos que se modificaron en el *coiled coil* de NSP3 se eligieron en base a su grado de conservación entre todos los genotipos reportados para la proteína y que además estuvieran en alguna posición importante para mantener el patrón heptarepetido (*a, d, g* y *e*). Los residuos con carga positiva se cambiaron por residuos con carga negativa (K171E, R173E, R187E y K191E), y residuos voluminosos aromáticos se modificaron por un residuo

pequeño hidrofóbico (W170A y Y192A). Las mutantes de NSP3 afectaron la función inhibitoria, dimerización y acumulación de la proteína. Las mutaciones afectaron la función inhibitoria de la traducción en diversos grados; W170A y Y192A parcialmente, R173E Y R187E:K191E severamente, mientras que K171E se comportó similar a la proteína silvestre. Por otro lado, la acumulación de la proteína disminuye con cuatro mutaciones W170A, K171E, R173E y R187E:K191E; en contraste, existe una mayor acumulación (\approx 20%) con la mutante Y192A. La dimerización se observa severamente afectada por la mutación W170A, disminuye parcialmente con K171E, R173E, R187E:K191E mientras que con la mutación Y192A existe un aumento en la cantidad de dímeros detectados por WB-ND. Además, como se menciona previamente, existe una relación entre la concentración del inductor (IPTG) y el tiempo de inducción con la función de NSP3, por lo que, en esta tesis evaluamos la capacidad de las mutantes para inhibir la traducción celular a diversas concentraciones del inductor (25, 100, 400 y 2000 μ M) y tiempos de expresión (8, 12 y 16 horas) para asegurar el máximo nivel inhibitorio por las mutantes. Se establecieron 16 horas y 400 μ M de IPTG para los experimentos posteriores y en estas condiciones se logra un 85% de inhibición como máximo efecto.

Las mutantes de NSP3 estandarizadas presentaron distintos grados para inhibir la traducción celular, encontramos que la mutante K171E inhibe de forma similar a la proteína silvestre (\approx 84%). Dos mutantes W170A y Y192A inhiben parcialmente la función de NSP3 con un nivel máximo inhibitorio entre 49 y 64%, respectivamente. El resto de las mutantes presentan el mayor efecto sobre la función inhibitoria de NSP3 con tan solo 33% (R173E) y 24% (R187E:K191E) de inhibición. En cuanto a la función de NSP3, no encontramos una relación total entre el residuo modificado, la posición dentro del *coiled coil* y el efecto sobre la función inhibitoria de la proteína. Por lo que, los resultados comprueban la hipótesis de que la región integra y completa del *coiled coil* es fundamental para la función inhibitoria de la traducción de NSP3.

En las estructuras *coiled coil* los residuos no polares se encuentran en las posiciones a y d, formando el núcleo y se involucran en la estabilidad de la proteína. Mientras que residuos con carga electrostática se encuentran en las posiciones g y e, determinando la especificidad y orientación para formar oligómeros. El resto de las posiciones (b, c y f) se encuentran expuestos y suelen ser polares (Jody, M. M., & A. K. M., 2004). En el caso de

NSP3 postulamos que las interacciones en el *coiled coil* son importantes para la dimerización de la proteína. Consistente con nuestra hipótesis, cuatro de los residuos mutados W170A, K171E, R173E y R187E:K191E afectaron la formación de dímeros estables y se encuentran en las posiciones d, e, g, g y d, respectivamente. Por contraparte, existe una mayor acumulación de dímeros estables con la mutación Y192A (posición e). La proteína monomérica de NSP3 es altamente inestable y se degrada por la vía del proteasoma (Dutta, D. et al., 2011). El uso del inhibidor del proteasoma MG132 (Figura 3) durante el tiempo de expresión de NSP3 silvestre y de algunas mutantes, mostró un aumento en la acumulación total de la proteína ($\approx 50\%$), sin embargo, en dos mutantes (R173E y R187E:K191E) el efecto fue relativamente menor ($\approx 10\%$). De acuerdo a lo mostrado en la figura 5, el efecto de MG132 es consistentemente más evidente sobre la forma monomérica detectada por el WB-ND. Mientras que el dímero estable solo aumenta en aquellas proteínas que no presentan un defecto en la acumulación/dimerización de la proteína (Wt y Y192A). Comparando los resultados de inhibición de la traducción con los de acumulación de las formas dimérica y monomérica/intermediario de dimerización, estos resultados demuestran que no hay una correlación directa entre la cantidad de NSP3 dimérica sumada a la cantidad de monómero/intermediario de dimerización que se acumulan y la magnitud del efecto inhibitorio de la traducción celular. La falta de correlación directa entre la acumulación solamente del dímero estable con la función inhibitoria de la traducción es evidente al comparar la cantidad de NSP3 dimérica de la mutante W170A con la de la proteína silvestre (nueve veces menos) o con la mutante Y192A (16 veces menos), mientras que las diferencias en cuanto a inhibición de la traducción son mucho menores (la mitad de inhibición con respecto a la proteína silvestre y aproximadamente igual que la mutante Y192A), estas diferencias hacen evidente que la inhibición traduccional por NSP3 es más compleja (tiempo de expresión y equilibrio en la síntesis/degradación), y que la integridad del dominio *coiled coil* es determinante para la estabilidad de la proteína así como para las interacciones tempranas de NSP3, particularmente aquellas donde se involucran los intermediarios de la dimerización como se muestra en la figura 26.

Mediante Western blot no disociativo (WB-ND) caracterizamos la cinética de degradación del dímero y monómero de NSP3 silvestre, y sorprendentemente encontramos que la forma dimérica de NSP3 decae rápidamente ($t_{1/2} \approx 60$ minutos), mientras que el

monómero lo hace con menor rapidez ($t_{1/2} \approx 134$ minutos). Estos resultados indican que la degradación del dímero es mucho más rápida que del intermediario de dimerización/monómero, y al evaluar el efecto de MG132 sobre esta cinética encontramos que la forma dimérica es más sensible al efecto de la droga. Proponemos que la banda del WB-ND que migra como monómero está constituida principalmente por intermediarios de dimerización, ya que otros grupos han demostrado que el monómero auténtico sintetizado *in vitro* es altamente inestable al proteasoma, por lo que es imposible que tenga una vida media de 134 minutos. Por otro lado, se confirma que el dímero de NSP3 se degrada por la vía del proteasoma (Figura 22). Además, es notable que cuando se expresa a NSP3 silvestre y la mutante Y192A (mayor acumulación) en presencia de MG132, claramente se observan complejos de mayor peso molecular al dímero de NSP3, que podría representar al dímero poli-ubiquitinado (Figuras 21 y 22).

La relocalización nuclear de la proteína celular PABP se ha utilizado para evaluar indirectamente la función inhibitoria de NSP3. Por lo que fue de interés explorar este fenotipo en el sistema del virus vaccinia recombinante. Encontramos que PABP se ubica (“es anclada”) en las fábricas virales de vaccinia en conjunto con otros factores de la traducción celular (eIF4E y eIF4G), y proteínas de unión al DNA viral (Walsh, D. et al., 2008; Zaborowska, I. et al., 2012). Además, el virus vaccinia posee dos enzimas (D9 y D10) que retiran la estructura tipo cap en los RNA mensajeros celulares, y que bloquean la respuesta antiviral celular por inhibir la traducción celular (Silverman, Robert H. 2015). No obstante, el efecto inhibitorio causado por NSP3 es mayor a lo observado con la infección del virus vaccinia parental (vT7), y este efecto predomina durante todo el tiempo que se induce con IPTG. La falta de relocalización nuclear de PABP, tras la expresión de NSP3 en el sistema del virus vaccinia demuestra que este fenotipo no es indispensable para establecer la función inhibitoria de la traducción celular. Además, encontramos que la localización intracelular de RoXaN en células MA104 y BSC-1 es nuclear-citoplásmica, con enriquecimiento aparente en el retículo endoplásmico, no obstante, se reportó previamente que RoXaN se localiza exclusivamente en el núcleo de células MA104. Las diferencias observadas se podrían deber a una menor especificidad del anticuerpo utilizado en nuestro estudio en comparación con los estudios previos (Vitour et al., 2004).

Previamente se ha propuesto que los determinantes principales para la función inhibitoria de NSP3 son: 1) la interacción con eIF4G; y 2) el dímero estable de la proteína. No obstante, es evidente en nuestros resultados que a pesar de encontrarse afectada la dimerización y la acumulación de la proteína en dos mutantes (W170A y K171E), estas conservan la capacidad de inhibir la traducción celular, en distinta magnitud. Esto sugiere que la forma detectada como monómeros de NSP3 en el WB-ND está constituida fundamentalmente por intermediarios de la dimerización, donde estos últimos podrían participar en el establecimiento de la función. El modelo que mejor ajusta a nuestros resultados es que durante la síntesis de NSP3, eIF4G es secuestrado y se bloquea la interacción selectiva por los mensajeros poliadenilados, dando preferencia a la traducción viral. Proponemos que durante la síntesis de NSP3, es estabilizada por interacciones tempranas con eIF4G y Hsp90, dando como resultado los intermediarios de dimerización, esto explica un mecanismo para poder estabilizar a NSP3 y garantizar que al menos la mayoría de las moléculas de eIF4G sean inhabilitados para la traducción celular.

CONCLUSIONES

- La integridad del segmento *coiled coil* de NSP3 de rotavirus es relevante para el establecimiento de la función inhibitoria de la traducción celular.
- La modificación de residuos en el dominio *coiled coil* de NSP3 puede reducir (W170A, K171E, R173E, R187E:K191E) o aumentar (Y192A) la cantidad de dímeros estables.
- La función inhibitoria de la traducción celular por NSP3 se adquiere previo a la formación de dímeros estables, y podría estar determinada por la aparición de los intermediarios de la dimerización.
- El dímero estable de NSP3 es probablemente poli-ubiquitinado y se degrada con mayor velocidad que el monómero-intermediarios de la dimerización por la vía del proteasoma.
- La relocalización nuclear de PABP no es necesaria para la función inhibitoria de la traducción celular de NSP3.

PERSPECTIVAS

- Explorar la cinética de formación de los intermediarios de dimerización de NSP3.
- Determinar el perfil de interacción de los intermediarios de dimerización con Hsp90, RoXaN y eIF4G.
- Explorar la importancia de la tirosina (Y) en la posición 192 sobre la estabilidad de NSP3 a través de una posible fosforilación.
- Identificar posible poliubiquitinación del dímero de NSP3 y su relación con la función inhibitoria de la traducción celular.
- Explorar el papel de las caspasas sobre la dimerización y estabilidad de las distintas formas de NSP3 (dímeros, intermediarios de dimerización y monómeros).
- Explorar la importancia de la localización de PABP en el núcleo celular para el establecimiento inhibitorio traduccional de NSP3.

REFERENCIAS

- Amm, I. ... Wolf, D. H. (2014). Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, **1843**(1), 182–196. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.031>
- Arnold, M. M., Brownback, C. S., ... Patton, J. T. (2012). Rotavirus variant replicates efficiently although encoding an aberrant NSP3 that fails to induce nuclear localization of poly(A)-binding protein. *The Journal of General Virology*, **93**(Pt 7), 1483–1494. <https://doi.org/10.1099/vir.0.041830-0>
- Jan, E. (2014). Novel viral translation strategies. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. <https://doi.org/10.1002/wrna.1246>
- Bishop, R. F., Davidson, G. P., ... Ruck, B. J. (1973). Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet (London, England)*, **2**(7841), 1281–1283. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4127639>
- Bradley, C. a, Padovan, J. C., Thompson, T. L., Benoit, C. a, ... Rhoads, R. E. (2002). Mass spectrometric analysis of the N terminus of translational initiation factor eIF4G-1 reveals novel isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**(15), 12559–12571. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111134200>
- Gray, N. K. (2012). An integrated model for the nucleo-cytoplasmic transport of cytoplasmic poly(A)-binding proteins. *Communicative & Integrative Biology*, (June), 243–247.
- Bushell, M., Poncet, D., Marissen, W. E., Flotow, H., Lloyd, R. E., ... Morley, S. J. (2000). Cleavage of polypeptide chain initiation factor eIF4G1 during apoptosis in lymphoma cells: characterisation of an internal fragment generated by caspase-3-mediated cleavage. *Cell Death and Differentiation*, **7**, 628–636. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400699>
- Castello, A. ... Carrasco, L. (2011, April 14). The multifaceted poliovirus 2A protease: Regulation of gene expression by picornavirus proteases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2011/369648>
- Chevallet, M. ... Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Chevallet, M., Luche, S., & Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc*, **1**(4), 1852–1858. doi:nprot.2006.288 [pii] 10.1038/nprot.2006.288. *Nat Protoc*, **1**(4), 1852–1858. <https://doi.org/nprot.2006.288> [pii] 10.1038/nprot.2006.288
- Chou, W. ... Gershon, P. D. (2012). An Overview of the Vaccinia Virus Infectome: a Survey of the Proteins of the Poxvirus-Infected Cell. *Journal of Virology*, **86**(3), 1487–1499. <https://doi.org/10.1128/JVI.06084-11>
- Contreras-Treviño, H. I., Reyna-Rosas, E., León-Rodríguez, R., Ruiz-Ordaz, B. H., Dinkova, T. D., ... Padilla-Noriega, L. (2017). Species A rotavirus NSP3 acquires its translation inhibitory function prior to stable dimer formation. *PLoS ONE*, **12**(7), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181871>
- Das, B. (2016). eIF4G-an integrator of mRNA metabolism? *FEMS Yeast Research*, **16**(7), 2–25. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow087>
- Deo, R. C., Groft, C. M., ... Burley, S. K. (2002). Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. *Cell*, **108**(1), 71–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792322>
- Desselberger, U. (2014). Rotaviruses. *Virus Research*, **190**, 75–96. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.06.016>
- Díaz-Villanueva, J. ... García-González, V. (2015). Protein Folding and Mechanisms of Proteostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**(8), 17193–17230. <https://doi.org/10.3390/ijms160817193>
- Dutta, D., Bagchi, P., Chatterjee, A., Nayak, M. K., Mukherjee, A., Chattopadhyay, S., Nagashima, S., Kobayashi, N., Komoto, S., ... Chawla-Sarkar, M. (2009). The molecular chaperone heat shock protein-90 positively regulates rotavirus infection. *Virology*, **391**(2), 325–333. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.06.044>
- Dutta, D., Chattopadhyay, S., Bagchi, P., Halder, U. C., Nandi, S., Mukherjee, A., Kobayashi, N., ... Chawla-Sarkar, M. (2011). Active participation of cellular chaperone Hsp90 in regulating the function of rotavirus

- nonstructural protein 3 (NSP3). *The Journal of Biological Chemistry*, **286**(22), 20065–20077. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.231878>
- Richter, K. (2013). Functions of the Hsp90 chaperone system: Lifting client proteins to new heights. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **4**(4), 157–165.
- Elroy-Stein, O. ... Moss, B. (1989). Cap-independent translation of mRNA conferred by encephalomyocarditis virus 5' sequence improves the performance of the vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid expression system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86**(16), 6126–6130. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6126>
- Estrozi, L. F., Settembre, E. C., Goret, G., McClain, B., Zhang, X., Chen, J. Z., ... Harrison, S. C. (2013). Location of the dsRNA-Dependent Polymerase, VP1, in Rotavirus Particles. *Journal of Molecular Biology*, **425**(1), 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.10.011>
- Flewett, T. H. ... Davies, H. (1973). Letter: Virus particles in gastroenteritis. *Lancet (London, England)*, **2**(7844), 1497. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4129337>
- Geng, F. ... Tansey, W. P. (2012). Ubiquitin and proteasomes in transcription. *Annual Review of Biochemistry*, **81**, 177–201. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052110-120012>
- Gratia, M., Sarot, E., Vende, P., Charpilienne, A., Baron, C. H., Duarte, M., ... Poncet, D. (2015). Rotavirus NSP3 Is a Translational Surrogate of the Poly(A) Binding Protein-Poly(A) Complex. *Journal of Virology*, **89**(17), 8773–8782. <https://doi.org/10.1128/JVI.01402-15>
- Gratia, M., Vende, P., Charpilienne, A., Baron, H. C., Laroche, C., Sarot, E., Pyronnet, S., ... Poncet, D. (2016). Challenging the Roles of NSP3 and Untranslated Regions in Rotavirus mRNA Translation. *PLoS One*, 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145998>
- Greengard, P. (1992). Structure and Function of the. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **267**(1/2), 7195–7198. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802241-2.00005-5>
- Burley, S. K. (2002). Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Molecular Cell*, **9**(6), 1273–1283. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086624>
- Guglielmi, K. M. ... Patton, J. T. (2010). Mechanism of intraparticle synthesis of the rotavirus double-stranded RNA genome. *The Journal of Biological Chemistry*, **285**(24), 18123–18128. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.117671>
- Svensson, L. (2016). Chapter 2.6 – Rotavirus Disease Mechanisms. In *Viral Gastroenteritis* (pp. 189–218). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802241-2.00010-9>
- Harb, M., Becker, M. M., Vitour, D., Baron, C. H., Vende, P., Brown, S. C., Bolte, S., ... Poncet, D. (2008). Nuclear localization of cytoplasmic poly(A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN. *Journal of Virology*, **82**(22), 11283–11293. <https://doi.org/10.1128/JVI.00872-08>
- Hartl, F. U. ... Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, **475**(7356), 324–332. <https://doi.org/10.1038/nature10317>
- Hsu, Y. Y., Liu, Y. N., ... Kung, S. H. (2009). Visualizing and quantifying the differential cleavages of the eukaryotic translation initiation factors eIF4GI and eIF4GII in the enterovirus-infected cell. *Biotechnology and Bioengineering*, **104**(6), 1142–1152. <https://doi.org/10.1002/bit.22495>
- Hu, L., Crawford, S. E., Hyser, J. M., ... Prasad, B. V. (2012). Rotavirus non-structural proteins: structure and function. *Current Opinion in Virology*, **2**(4), 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.06.003>
- Matouschek, A. (2014). Paradigms of protein degradation by the proteasome. *Current Opinion in Structural Biology*, **24**(1), 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.02.002>
- Ito, H., Sugiyama, M., Masubuchi, K., ... Minamoto, N. (2001). Complete nucleotide sequence of a group A avian rotavirus genome and a comparison with its counterparts of mammalian rotaviruses. *Virus Research*, **75**(2), 123–138. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(01\)00234-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00234-9)
- Jayaram, H. ... Prasad, B. V. V. (2004). Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Research*, **101**(1), 67–81.

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.007>

- M., A. K. (2004). Coiled Coil Domains: Stability, Specificity, and Biological Implications. *ChemBioChem*.
- Kumar, G. R. ... Glaunsinger, B. A. (2011). Importin alpha-mediated nuclear import of cytoplasmic poly(A) binding protein occurs as a direct consequence of cytoplasmic mRNA depletion. *Molecular and Cellular Biology*, **31**(15), 3113–3125. <https://doi.org/10.1128/MCB.05402-11>
- Stoecklin, G. (2014). An optimized streptavidin-binding RNA aptamer for purification of ribonucleoprotein complexes identifies novel ARE-binding proteins. *Nucleic Acids Research*, **42**(2), 1–15. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt956>
- Lupas, a. (1996). Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods in Enzymology*, **266**(1953), 513–525.
- Lupas, A. (1997). Predicting coiled-coil regions in proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, **7**, 388–393. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(97\)80056-5](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(97)80056-5)
- Houry, W. A. (2012). The role of Hsp90 in protein complex assembly. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.001>
- Roy, P. (2009). Bluetongue Virus VP6 Acts Early in the Replication Cycle and Can Form the Basis of Chimeric Virus Formation. *Journal of Virology*, **83**(17), 8842–8848. <https://doi.org/10.1128/JVI.00465-09>
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J. R., Buesa, J., Esona, M. D., Estes, M. K., Gentsch, J. R., Iturriza-Gómara, M., Johne, R., Kirkwood, C. D., Martella, V., Mertens, P. P. C., Nakagomi, O., Parreño, V., Rahman, M., Ruggeri, F. M., Saif, L. J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J. T., ... Van Ranst, M. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of Virology*, **156**(8), 1397–1413. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1006-z>
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Bányai, K., Estes, M. K., Gentsch, J. R., Iturriza-Gómara, M., Kirkwood, C. D., Martella, V., Mertens, P. P. C., Nakagomi, O., Patton, J. T., Ruggeri, F. M., Saif, L. J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., ... Van Ranst, M. (2008, August 5). Recommendations for the classification of group a rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Archives of Virology*. Springer Vienna. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>
- Mattion, N. M., Cohen, J., ... Estes, M. K. (1992). Characterization of an oligomerization domain and RNA-binding properties on rotavirus nonstructural protein NS34. *Virology*, **190**, 68–83. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)91193-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)91193-X)
- Montero, H. ... Lopez, S. (2006). Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *Journal of Virology*, **80**(18), 9031–9038. <https://doi.org/10.1128/JVI.00437-06>
- Montero, H., Rojas, M., ... López, S. (2008). Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *Journal of Virology*, **82**(3), 1496–1504. <https://doi.org/10.1128/JVI.01779-07>
- Navarro, A., Williamson, L., ... Patton, J. T. (2016). Rotavirus Replication and Reverse Genetics. In *Viral Gastroenteritis: Molecular Epidemiology and Pathogenesis* (pp. 121–143). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802241-2.00007-9>
- Carrasco, L. (1999). Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4G by exogenously added hybrid proteins containing poliovirus 2Apro in HeLa cells: effects on gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, **19**(4), 2445–2454. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10082510>
- Padilla-Noriega, L. ... Guzmán-León, S. (2002). Rotavirus Protein NSP3 Shuts Off Host Cell Protein Synthesis. *Virology*, **298**(1), 1–7. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1477>
- Pola, R. (2013). The coiled coil motif in polymer drug delivery systems. *Biotechnology Advances*, **31**(1), 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.003>
- Piña-Vázquez, C., De Nova-Ocampo, M., ... Padilla-Noriega, L. (2007). Post-translational regulation of rotavirus protein NSP1 expression in mammalian cells. *Archives of Virology*, **152**(2), 345–368. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0850-8>

- Piron, M., Delaunay, T., ... Poncet, D. (1999). Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *Journal of Virology*, **73**(7), 5411–5421. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=112597&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Piron, M., Vende, P., ... Poncet, D. (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *The EMBO Journal*, **17**(19), 5811–5821. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5811>
- Poncet, D. ... Cohen, J. (1994). Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *The EMBO Journal*, **13**(17), 4165–4173. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=395339&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Prévôt, D. ... Ohlmann, T. (2003). Conducting the initiation of protein synthesis: The role of eIF4G. *Biology of the Cell*, **95**(3–4), 141–156. [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(03)00031-5)
- Prodromou, C. (2016). Mechanisms of Hsp90 regulation. *The Biochemical Journal*, **473**(16), 2439–2452. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160005>
- Reyna-Rosas, E. (n.d.). *Article in process*.
- Richardson, V. ... Patel, M. (2011). Childhood Diarrhea Deaths after Rotavirus Vaccination in Mexico. *New England Journal of Medicine*, **365**(8), 772–773. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1100062>
- Rojas, M. ... López, S. (2010). Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2alpha in rotavirus infection. *Journal of Virology*, **84**(20), 10457–10466. <https://doi.org/10.1128/JVI.00625-10>
- Rubio, R. M., Mora, S. I., Romero, P., ... López, S. (2013). Rotavirus prevents the expression of host responses by blocking the nucleo-cytoplasmic transport of polyadenylated mRNAs. *Journal of Virology*, **87**(11), 6366–6345. <https://doi.org/10.1128/JVI.00361-13>
- Satheshkumar, P. S., Anton, L. C., ... Moss, B. (2009). Inhibition of the ubiquitin-proteasome system prevents vaccinia virus DNA replication and expression of intermediate and late genes. *Journal of Virology*, **83**(6), 2469–2479. <https://doi.org/10.1128/JVI.01986-08>
- Higgins, D. G. (2014). Clustal Omega. *Current Protocols in Bioinformatics*, **2014**, 3.13.1-3.13.16. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0313s48>
- Gray, N. K. (2010). Poly(A)-binding protein (PABP): a common viral target. *The Biochemical Journal*, **426**(1), 1–12. <https://doi.org/10.1042/BJ20091571>
- Sreedhar, A. S., Kalmár, E., ... Shen, Y.-F. (2004). Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Letters*, **562**(1–3), 11–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15069952>
- Trask, S. D. ... Patton, J. T. (2012). Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nature Reviews. Microbiology*, **10**(3), 165–177. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2673>
- Vende, P., Piron, M., ... Poncet, D. (2000). Efficient Translation of Rotavirus mRNA Requires Simultaneous Interaction of NSP3 with the Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4G and the mRNA 3' End. *Journal of Virology*, **74**(15), 7064–7071. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.15.7064-7071.2000>. Updated
- Vitour, D., Lindenbaum, P., Vende, P., Becker, M., ... Becker, M. M. (2004). RoXaN, a Novel Cellular Protein Containing TPR, LD, and Zinc Finger Motifs, Forms a Ternary Complex with Eukaryotic Initiation Factor 4G and Rotavirus NSP3. *Journal of Virology*, **78**(8), 3851–3862. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.8.3851>
- Walsh, D., Arias, C., Perez, C., Halladin, D., Escandon, M., Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., ... Mohr, I. (2008). Eukaryotic translation initiation factor 4F architectural alterations accompany translation initiation factor redistribution in poxvirus-infected cells. *Molecular and Cellular Biology*, **28**(8), 2648–2658. <https://doi.org/10.1128/MCB.01631-07>
- Walsh, D., Mathews, M. B., Mohr, I., Larsson, O., Tian, B., Sonenberg, N., Hershey, J. W. B., Roux, P. P., Topisirovic, I., Darnell, J. C., Richter, J. D., Pavitt, G. D., Ron, D., Cells, V., ... Parker, R. (2012). Tinkering with Translation: Protein Synthesis in Virus-Infected Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **5**(1), 1–28. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012351>

- Woods, A. J., Kantidakis, T., Sabe, H., ... Norman, J. C. (2005). Interaction of Paxillin with Poly (A) -Binding Protein 1 and Its Role in Focal Adhesion Turnover and Cell Migration. *Molecular and Cellular Biology*, **25(9)**, 3763–3773. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.9.3763>
- Woods, A. J., Roberts, M. S., Choudhary, J., Barry, S. T., Mazaki, Y., Sabe, H., Morley, S. J., ... Norman, J. C. (2002). Paxillin associates with poly(A)-binding protein 1 at the dense endoplasmic reticulum and the leading edge of migrating cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **277(8)**, 6428–6437. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109446200>
- Woolfson, D. N., Bartlett, G. J., ... Thomson, A. R. (2012). New currency for old rope: From coiled-coil assemblies to ??-helical barrels. *Current Opinion in Structural Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.03.002>
- Zaborowska, I., Kellner, K., Henry, M., ... Walsh, D. (2012). Recruitment of host translation initiation factor eIF4G by the Vaccinia Virus ssDNA-binding protein I3. *Virology*, **425(1)**, 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.12.022>

PUBLICACIONES

- Contreras-Treviño, H. I., Reyna-Rosas, E., León-Rodríguez, R., Ruiz-Ordaz, B. H., Dinkova, T. D., Cevallos, A. M., & Padilla-Noriega, L. (2017). Species A rotavirus NSP3 acquires its translation inhibitory function prior to stable dimer formation. *PLoS ONE*, 12(7), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181871>
- Contreras-Treviño, H. I., & Padilla-Noriega, L. (2018). Regulación de la traducción mediada por la proteína NSP3 de rotavirus. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21, 124–133. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.152>

RESEARCH ARTICLE

Species A rotavirus NSP3 acquires its translation inhibitory function prior to stable dimer formation

Hugo I. Contreras-Treviño^{1,2,3}, Edgar Reyna-Rosas^{1,2,3}, Renato León-Rodríguez³, Blanca H. Ruiz-Ordaz³, Tzvetanka D. Dinkova⁴, Ana M. Cevallos³, Luis Padilla-Noriega^{2,3*}

1 Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, **2** Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, **3** Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, **4** Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

* lpadilla@unam.mx



OPEN ACCESS

Citation: Contreras-Treviño HI, Reyna-Rosas E, León-Rodríguez R, Ruiz-Ordaz BH, Dinkova TD, Cevallos AM, et al. (2017) Species A rotavirus NSP3 acquires its translation inhibitory function prior to stable dimer formation. PLoS ONE 12(7): e0181871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181871>

Editor: Maria Gasset, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, SPAIN

Received: March 15, 2017

Accepted: July 7, 2017

Published: July 24, 2017

Copyright: © 2017 Contreras-Treviño et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by two grants to LPN from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CB2011/168046 and I0012/264230), and one grant to LPN from the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA),

Abstract

Species A rotavirus non-structural protein 3 (NSP3) is a translational regulator that inhibits or, under some conditions, enhances host cell translation. NSP3 binds to the translation initiation factor eIF4G1 and evicts poly-(A) binding protein (PABP) from eIF4G1, thus inhibiting translation of polyadenylated mRNAs, presumably by disrupting the effect of PABP bound to their 3'-ends. NSP3 has a long coiled-coil region involved in dimerization that includes a chaperone Hsp90-binding domain (HS90BD). We aimed to study the role in NSP3 dimerization of a segment of the coiled-coil region adjoining the HS90BD. We used a vaccinia virus system to express NSP3 with point mutations in conserved amino acids in the coiled-coil region and determined the effects of these mutations on translation by metabolic labeling of proteins as well as on accumulation of stable NSP3 dimers by non-dissociating Western blot, a method that separates stable NSP3 dimers from the monomer/dimerization intermediate forms of the protein. Four of five mutations reduced the total yield of NSP3 and the formation of stable dimers (W170A, K171E, R173E and R187E:K191E), whereas one mutation had the opposite effects (Y192A). Treatment with the proteasome inhibitor MG132 revealed that stable NSP3 dimers and monomers/dimerization intermediates are susceptible to proteasome degradation. Surprisingly, mutants severely impaired in the formation of stable dimers were still able to inhibit host cell translation, suggesting that NSP3 dimerization intermediates are functional. Our results demonstrate that rotavirus NSP3 acquires its function prior to stable dimer formation and remain as a proteasome target throughout dimerization.

Universidad Nacional Autónoma de México (IN201212). Financial support to LPN was also obtained from the Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. HICT and ERR were supported by Ph. D. thesis fellowships from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Species A rotavirus (RVA) is a double-stranded RNA virus of the *Reoviridae* family. RVA is a major cause of gastroenteritis in infants and in the young of several animal species. The genome of this virus has 11 segments that code for 12 proteins: six structural that form the triple-layered capsid (VP1-VP4, VP6 and VP7) and six non-structural (NSP1-NSP6) that participate in viral replication and host cell infection [1, 2].

RVA is useful as a model to study the relevance of the poly-(A) tail in translation of cellular mRNAs because rotaviral mRNAs lack this feature. Upon internalization into the host cell cytoplasm, the outer layer of the virion is lost, and the double-layered particle functions as a transcription machine that simultaneously produces the 11 viral mRNAs capped at the 5'-end and with the 3'-end sequence-UGACC. The viral mRNAs are either translated in the cytoplasm or used as templates to synthesize the dsRNA genome in cytoplasmic inclusion bodies known as viroplasm [3].

NSP3 of RVA is a 34-kDa protein with two major separate domains: an RNA-binding domain at the amino-terminus (RBD, amino acids 4–149) that binds to the 3'-terminal sequence-UGACC of viral mRNAs; and a translation initiation factor eIF4G1-binding domain (GBD, amino acids 206–313) localized at the carboxy-terminus. The NSP3 RBD and GBD are connected via a segment of the protein that is sufficient for interaction in a yeast two-hybrid system (HID [two-hybrid interaction domain], amino acids 150–206) [4]. The structures of the RBD and GBD have been separately determined by X-ray crystallography, and interestingly, the RBD is an asymmetric homodimer with a single RNA-binding tunnel, whereas the GBD is a symmetric homodimer with two hydrophobic eIF4G1 binding sites [5, 6]. Based on the ability of NSP3 to bind RVA mRNAs *in vitro* and to evict PABP from eIF4G *in vitro* and *in vivo*, Poncet and colleagues proposed two mechanisms by which NSP3 inhibits the translation of cellular mRNAs and also enhances the translation of rotaviral mRNAs. First, binding of NSP3 to eIF4G1 participating in translation initiation would inhibit polyadenylated mRNA translation by disruption of the 5' to 3' mRNA interaction that occurs via eIF4G1 bound to eIF4E and PABP [7]. Second, NSP3 simultaneously binding to the 3' end of RVA mRNA and eIF4G1 would enhance translation of rotavirus mRNAs, thus functioning as an analogue of PABP [8]. Recently, a third function of NSP3 as a surrogate of PABP was proposed based on the finding that NSP3 enhances translation of transfected polyadenylated and nonpolyadenylated mRNAs and favor eIF4E-eIF4G interaction [9].

The effect of RVA NSP3 on host cell translation has been studied with different methods that are difficult to compare. In an *in vitro* assay with rabbit reticulocytes programmed with endogenous mRNAs from HeLa cell extracts and complemented with purified recombinant NSP3₁₆₃₋₃₁₃, the truncated protein, containing the GBD, inhibited cellular translation [10]. Moreover, in an *in vivo* expression system of mammalian cells infected with a recombinant vaccinia virus for expression of NSP3, the full-length and a truncated protein, containing the GBD, inhibited host cell translation [11]. By contrast, using an *in vivo* approach based on transient cytoplasmic NSP3 expression programmed by electroporation with synthetic polyadenylated and nonpolyadenylated mRNAs, NSP3 enhanced translation of the transfected mRNAs regardless of their 3' end [9]. This *in vivo* approach based on electroporation of synthetic mRNAs was also used to demonstrate that NSP3 enhances translation of RVA-like mRNAs, *i. e.*, capped and with the 3'-end sequence-UGACC [12]. It is unclear why NSP3 inhibits host cell translation under some conditions but enhances host cell translation under other conditions.

Interestingly, expression of recombinant NSP3 redirects cytoplasmic PABP to the nucleus, a phenotype that has been proposed to contribute to host cell translation inhibition [13]. One

study showed that interaction of NSP3 with eIF4G1 and the cellular protein RoXaN are both required for nuclear localization of PABP [14]. RoXaN is an AU-rich element (ARE)-binding protein and is thus expected to bind AREs at the 3' untranslated region of many short lived mRNAs that serve as regulatory elements for mRNA degradation and translation [15]. Expression of a deletion NSP3 mutant, unable to bind eIF4G1 due to the lack of part of the carboxy-terminus GBD, restored cytoplasmic localization of PABP. In addition, expression of two NSP3 point mutations in the RoXaN-binding domain (RoBD, amino acids 163–237), that affected the ability to bind RoXaN as determined by co-immunoprecipitation, led to reduced nuclear localization of PABP compared to the wild type protein [14].

NSP3 has a long coiled-coil region (amino acids 159–245) predicted by the Lupas algorithm [4, 16] that is relevant for the dimerization of the protein. A segment of this region is sufficient to multimerize in a yeast two-hybrid system (HID, amino acids 150–205) [4]. Another segment is needed for binding to a chaperone, the Hsp90 binding domain (HS90BD, amino acids 225–258) [17]. Overlapping with the HS90BD, the coiled-coil participates in the dimer interface of the GBD, as determined by X-ray crystallography (amino acids 205–245) [6]. Coiled-coils are structural motifs common in dimers in which two alpha helices wrap around each other in a left-handed helix to form a supercoil. Coiled-coils have a periodicity of seven (heptad repeat), usually denoted (a-b-c-d-e-f-g)_n in one helix and (a'-b'-c'-d'-e'-f'-g')_n in the other, where "a" and "d" are typically nonpolar residues found at the core of the interface of the two helices and "e" and "g" are solvent-exposed polar residues that provide specificity between the two helices through electrostatic interactions. The remaining positions, "b", "c" and "f", lie away from the coiled-coil interface, and tend to be occupied by polar residues [16].

Chawla-Sarkar and colleagues demonstrated that NSP3-Hsp90 interaction is essential for NSP3 dimerization and for the acquisition of function. As determined by *in vitro* transcription-translation assays, the expression of NSP3 in the presence of the Hsp90 inhibitor 7-N,N-dimethylethylenediamine-geldanamycin (17DMAG) prevented dimer formation, as did expression of NSP3 lacking the HS90BD. In cells infected with RVA, treatment with 17DMAG impaired the nuclear localization of PABP [17]. Moreover, Chawla-Sarkar and colleagues identified intermediates in the process of dimerization of NSP3 assisted by Hsp90. *In vitro* translated NSP3 molecules interacting with Hsp90 were immunoprecipitated with anti-Hsp90. In spite of being dimerization intermediates, the NSP3 molecules interacting with Hsp90 were detected as monomers by non-dissociating electrophoresis [17]. Based on the demonstration that NSP3 dimerization intermediates migrate as monomers by non-dissociating Western blot (WB-ND), we refer to the apparently monomeric forms of the protein detected by this method as monomers/dimerization intermediates. Further incubation of immunoprecipitated NSP3-Hsp90 complexes with fresh translation mixture showed that NSP3 molecules were converted to stable dimers free of Hsp90, as determined by WB-ND. Interestingly, in the presence of 17DMAG, *in vitro* translated NSP3 monomers were readily degraded, suggesting that *bona fide* NSP3 monomers are short lived [17].

The recent finding of polyadenylated mRNA translation enhancement by RVA NSP3 challenges our notion about the role of this protein, that has long been considered an inhibitor of host cell translation [9, 12]. We hypothesized that the process of dimerization is a key in understanding the mechanism by which NSP3 affects host cell translation. In this study, we used a vaccinia virus system to express wtNSP3 and NSP3 carrying point mutations in a segment of the coiled-coil region and evaluated their dimerization status, effects on cellular translation, and stability to the proteasome. Our results demonstrate that NSP3 acquires its function prior to stable dimer formation.

Materials and methods

Reagents and antibodies

The inducer isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, cat. 70571) was obtained from Research Organics (Cleveland, OH). Proteasome inhibitor MG132 (cat. C2211) and cycloheximide (cat. C7698) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The horseradish peroxidase conjugated chicken anti-rat IgG (cat. SC2956) was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX). The hyperimmune anti-NSP3 rat serum was produced in our laboratory.

Cells, viruses, and plasmids

Cercopithecus aethiops CV-1 and BSC-1 cell lines were obtained from R. Rosales (Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico). The human HeLa cell line was obtained from A. González-Noriega (Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico). The vaccinia virus vT7lacOI and plasmid p.VOTE.1 were obtained from B. Moss (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Vaccinia virus vRRV7 containing RRV gene 7 for expressing wild type NSP3 was previously produced in our laboratory [11]. CV-1, BSC-1 and HeLa cells were cultured in Eagle's minimum essential medium (MEM) supplemented with 7% of fetal bovine serum (Biowest, Mexico).

Mutagenesis and recombinant vaccinia virus construction

Site-directed mutagenesis for expression in the VOTE (vaccinia virus/*lac* operon/T7 RNA polymerase/EMC IRES) mammalian cell expression system [18] was performed with the QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) according to the manufacturer's instructions. The plasmid p.VOTE-RRV7 [11] for the expression of the NSP3 gene of the simian RVA strain RRV (GenBank AY065842) was mutagenized using five oligonucleotide pairs to produce the plasmids p.VOTE-RRV7-W170A (ROXF7170, GGAAGTAGATACAATTGATGCCAAATCAAGATATGAACAG; ROXR7170, CTGTTTCATATCTTTGATTTGGCATCAATTGTATCTACTTCC), p.VOTE-RRV7-K171E (ROXF7171, GGAA GTAGATACAATTGATTGGGAGTCAAGATATGAACAGTTAG; ROXR7171, CTAACGTGTTTCATATCTTGACTCCCAATCAATTGTATCTACTTCC), p.VOTE-RRV7-R173E (ROXF7173, GATACAATTGATTGGAAATCAGAGTATGAACAGTTAGAAAAGAG; ROXR7173, CTCTTTTCTAACTGTTTCATACTCTGATTTCCAATCAATTGTATC), p.VOTE-RRV7-R187E:K191E (ROXF7187, GAGTCACTGAAACATGAGGTTAATGAGGAGTATAATCATTGGG; ROXR7187, CCCAATGAT TATACTCCTCATTAACTCATGTTTCAGTGACTC), and p.VOTE-RRV7-Y192A (ROXF7192, CATCGGGTTAATGAGAAGGCCAATCATTGGGTTCTTAAAGC; ROXR7192, GCTTTAAGAACC CAATGATTGGCCTTCTCATTAAACCCGATG). The NSP3 gene inserts in the corresponding plasmids were sequenced in both directions. The plasmids were then used to generate five recombinant vaccinia viruses by homologous recombination in CV-1 cells infected with the parental vaccinia virus vT7lacOI, as previously described [19]: vNSP3_{W170A}, vNSP3_{K171E}, vNSP3_{R173E}, vNSP3_{R187E:K191E}, and vNSP3_{Y192A}. In the VOTE system, the *lacI* gene is transcribed from a vaccinia early/late promoter, resulting in constitutive expression of the *E. coli lac* repressor, which binds to two *E. coli lacO* operators, one adjacent to a vaccinia virus late promoter to prevent transcription from the bacteriophage T7 RNA polymerase gene and the other next to a T7 promoter to prevent transcription of the NSP3 gene. Upon induction with IPTG, the repressor is inactivated, allowing expression of the T7 RNA polymerase, which then transcribes the NSP3 gene. Finally, the translation of the NSP3 mRNA is enhanced by an encephalomyocarditis virus

internal ribosome entry site (IRES). Vaccinia virus stocks were produced in HeLa cells and titrated for plaque forming units in BSC-1 cells, as previously described [19].

Metabolic labeling of proteins in vaccinia virus-infected cells

We performed metabolic labeling with [³⁵S]-methionine plus [³⁵S]-cysteine in cells infected with vaccinia viruses as previously described [19] with some modifications. BSC-1 cells in MEM containing 7% FBS were plated in 6-well plates (5 × 10⁵/well) and incubated 12–24 h at 37°C. The cells were infected with the recombinant vaccinia viruses with a multiplicity of infection (MOI) of five. At two hours post-infection (hpi), the inducer IPTG (0.4 mM, unless otherwise specified) and the proteasome inhibitor MG132 (0.5 μM) or its diluent dimethyl sulfoxide (DMSO) alone were added as indicated and maintained during expression. At 17.5 hpi, the cells were starved for 30 min at 37°C with methionine- and cysteine-free DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA). Labeling was performed by adding 20 μCi/well of [³⁵S]-methionine and [³⁵S]-cysteine mixture (EasyTag™ EXPRESS35S Protein Labeling Mix, Perkin Elmer, Norwalk, CT) in 500 μL of methionine- and cysteine-free DMEM. The cells were incubated for 1 h at 37°C and harvested by washing twice with cold PBS and scraping in 1 mL of cold PBS. The cells were divided in two 0.5-mL aliquots and centrifuged at 13,200 g for 5 min. The cell pellets were suspended in 20 μL of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.4 U/mL DNase I, 0.01 mg/mL RNase A and Complete[®] protease inhibitor [Roche]), and incubated for 10 min at room temperature. The cell lysates were mixed with 20 μL of 2x Laemmli sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS and 2% β-mercaptoethanol) and heated in boiling water bath for five minutes. Labeled proteins were separated in 12% SDS-PAGE and analyzed by autoradiography and densitometry. Molecular weight assessment was based on predominant late vaccinia virus proteins detected in cells infected with vT7lacOI [20]. Analysis to determine the effect of NSP3 on host cell translation was done by quantitating the densitometry profile (excluding the NSP3 band) of three independent experiments performed on different days. Identical aliquots were processed as loading controls by running SDS-PAGE and analyzing the protein content by silver staining, using a variant protocol optimized for protein quantification [21].

Western blot (WB) and non-dissociating Western blot (WB-ND)

BSC-1 cells were infected with vaccinia viruses and treated or not with MG132 as described above. At 18 hpi, the cells were harvested by washing twice with cold PBS and scraping in 1 mL of cold PBS. The cells were divided in four 0.25-mL aliquots and centrifuged at 13,200 g for 5 min. The cell pellets were suspended in 20 μL of lysis buffer and incubated for 10 min at room temperature. For dissociating conditions (WB), the cell lysates were mixed with 20 μL of 2x Laemmli sample buffer and heated in boiling water bath for five minutes. For non-dissociating conditions (WB-ND), the cell lysates were mixed with 20 μL of 2x non-dissociating sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.8% SDS, 20% glycerol) and incubated for 30 minutes on ice. The proteins were separated in 12% SDS-PAGE (run in a cold room for WB-ND) and transferred to polyvinylidene fluoride membranes (BioRad, Hercules, CA, cat. 162–0177). One lane of prestained protein markers (New England Biolabs, Ipswich, MA, cat. P7708S) was used to estimate the size of proteins. The membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (TBS) at room temperature for one hour. The membranes were incubated overnight at 4°C with anti-NSP3 (1:20,000) in 1% non-fat dry milk in T-TBS (0.05% Tween-20 in TBS), followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rat IgG (1:20,000) in 1% non-fat dry milk in T-TBS for two hours at room temperature. Finally, the blots were developed with SuperSignal West Femto chemiluminescence substrate (Pierce, Rockford,

IL) according to the manufacturer's instructions. A detailed protocol for determining the half-life of the dimeric form of NSP3 by cycloheximide blocking and WB-ND is available at [dx.doi.org/10.17504/protocols.io.iiwccfe](https://doi.org/10.17504/protocols.io.iiwccfe). Densitometry analysis of three independent experiments performed on different days was done by determining the pixels of the low molecular weight band consisting of NSP3 monomers/dimerization intermediates and the high molecular weight band consisting of NSP3 stable dimers, excluding the smear of putative poly-ubiquitinated dimers that migrates above the dimer band. Identical aliquots were processed as loading controls by running SDS-PAGE and analyzing the protein content by silver staining using a variant protocol optimized for protein quantification [21].

The half-lives of monomeric and stable dimeric NSP3 were determined by incubation in the presence of a protein synthesis inhibitor and quantification of protein decay by WB-ND. This method differs from half-life determination by pulse-chase assays in that the whole accumulated NSP3 contributes to the signal detected by WB rather than the recently synthesized protein labelled with radioactive amino acids during the pulse. BSC-1 cells were infected with vNSP3, adding IPTG and MG132 or its diluent as indicated above. At 14 hpi, the medium was removed, the cells were washed twice with MEM containing 2.5% SFB, and cycloheximide (100 µg/mL) was added in MEM containing 2.5% SFB. The cells were harvested immediately as described above (time 0) or incubated for 30, 60, 120 and 240 minutes and then harvested. The cells were processed by WB-ND with anti-NSP3 serum.

Nucleotide sequence analysis

Nucleotide sequences of the NSP3 gene from several RVA strains were aligned with Clustal Omega [22].

Results

Production of RVA NSP3 with point mutations in the coiled-coil region for expression in the vaccinia VOTE system

To begin to study the role of the coiled-coil region of RVA NSP3 in dimerization, we performed site-directed mutagenesis of conserved amino acids in a segment of the coiled-coil region adjoining the HS90BD. We used the vaccinia virus VOTE system to express the NSP3 gene of the simian RVA strain RRV [11, 18]. The VOTE system depends on infection of mammalian cells by recombinant vaccinia viruses carrying the gene of interest, allowing high levels of IPTG-inducible expression. Mutagenesis was first performed using the plasmid p.VOTE-RRV7 previously constructed for the expression of full-length NSP3 of RRV (amino acids 4–313) [11]. In this construct, the expressed protein lacks amino acids 1–3 due to initiation at the second initiation codon because the first in-frame initiation codon is in a poor context. After performing mutagenesis in the plasmids, five recombinant vaccinia viruses for expression of the mutant proteins (vNSP3_{W170A}, vNSP3_{K171E}, vNSP3_{R173E}, vNSP3_{R187E:K191E}, and vNSP3_{Y192A}) were produced in CV-1 cells infected with the parental vaccinia virus vT7lacOI, as described in materials and methods. Fig 1 shows the mutations produced in the context of the amino acid sequence of the coiled-coil segment of NSP3 from RRV, which is compared with the corresponding sequences of other RVA strains from different species. One mutation was produced in a “d” residue of the heptad repeat (W170A). Based on its position, it was expected to be at the core of the interface between the two helices of the dimer. Three mutations were produced at “e” (K171E and Y192A) or “g” (R173E) residues and were accordingly expected to affect the specificity between the two helices of the dimer. The double mutation (R187E:K191E) at “g” and “d” residues was expected to affect simultaneously the interface of

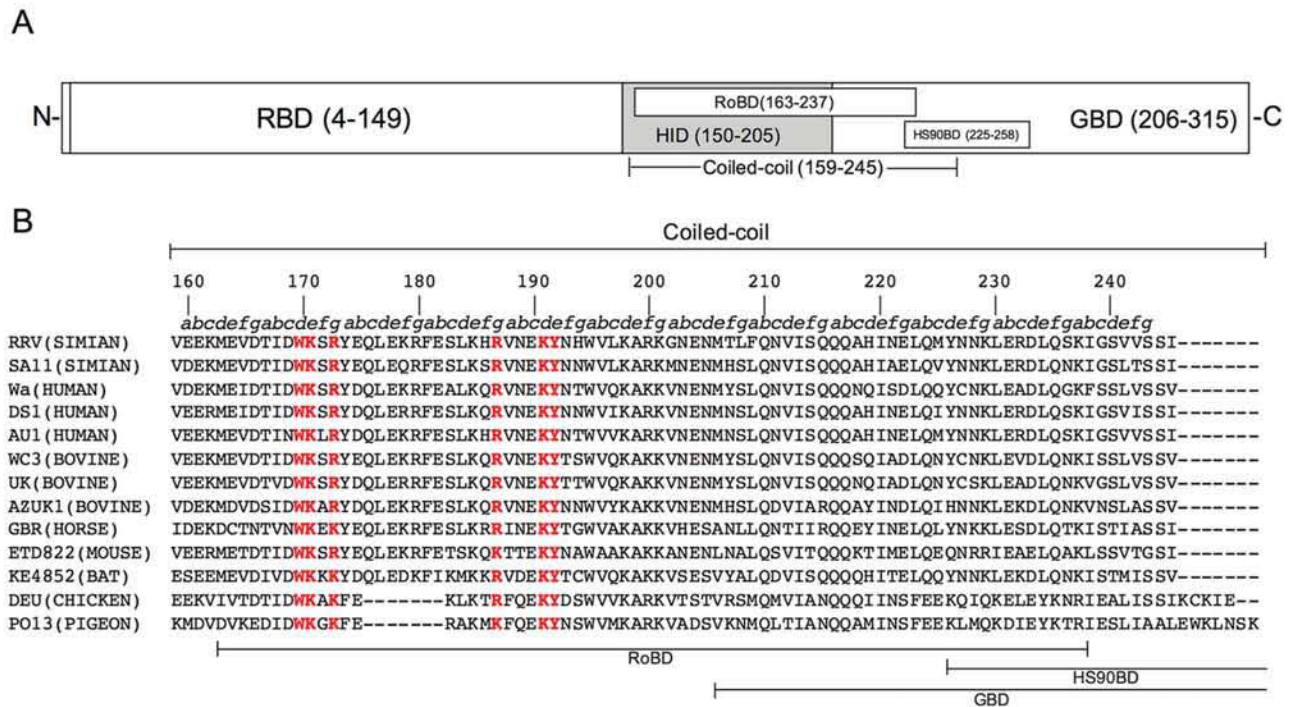


Fig 1. Mutations produced in the coiled-coil region of the RRV NSP3 gene and comparison with the sequence of other RVA strains. (A) Schematic representation of NSP3 domains: RBD, RNA-binding; RoBD, RoXaN-binding; HID, two-hybrid interaction; HS90BD, Hsp90-binding; GBD, eIF4G1-binding. The lower line indicates the coiled-coil region, and the numbers refer to the NSP3 amino acid sequence. (B) Alignment of the amino acid sequences of the coiled-coil region of the NSP3 gene of RRV and other RVA strains that infect diverse animal species. The heptad repeat pattern (a-g)_n is shown above, where “a” and “d” are hydrophobic and “e” and “g” are charged residues. The remaining positions, “b”, “c” and “f”, tend to be occupied by polar residues. Mutagenized residues are highlighted in red. The lower lines indicate the segments of the coiled-coil region that overlap with NSP3 domains.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181871.g001>

the dimer and the specificity of the interaction. The double mutant R187E:K191E combined two mutations that have been previously assessed individually in the NSP3 gene of the bovine RVA strain RF, where they were shown to affect the interaction with RoXaN by co-immunoprecipitation [14]. In this initial mutagenesis study, we targeted a few amino acids in the lengthy coiled-coil of NSP3 expected to have a range of effects on dimerization, including a double mutation known to affect the binding to a cellular protein. Our hypothesis was that mutations in “d” residues would interrupt the repeated hydrophobic interactions at the helical interface, thus having a stronger effect than mutations in “e” or “g” residues that affect interhelical ionic interactions and contribute marginally to the stability of the dimer. None of the mutations affected the HS90BD.

Effect of mutations in the coiled-coil region of RRV NSP3 on host cell translation

We determined the effect of the RRV NSP3 mutations on mammalian host cell translation using the vaccinia virus VOTE system [18]. Cells were infected with the recombinant vaccinia virus followed at 18 hpi by pulse labeling with [³⁵S]-labeled amino acids, SDS-PAGE of the harvested cells, autoradiography and densitometry analysis. This method was used to determine the combined effect of NSP3 on cellular and vaccinia virus mRNAs that are both capped and polyadenylated. We have previously used the VOTE system to demonstrate that NSP3 inhibits host cell translation [11]. However, in the present study, we avoided hypertonic

conditions during metabolic labeling, reduced the concentration of the inducer, and shortened the time of infection. Despite lowering the concentration of the inducer and shortening the time of infection, we still achieved maximum inhibition of host cell translation (S1 and S2 Figs). Hypertonic condition with higher NaCl concentration in the culture medium favors the expression of IRES-driven genes [23] and has a synergic effect with the inhibitory function of NSP3 on host cell translation, thus explaining the difference in maximum host cell translation inhibition obtained in this study (see below and S2 Fig) as compared to our previous studies [11].

Cercopithecus aethiops BSC-1 cells were infected with the parental control virus vT7lacOI lacking the NSP3 gene or with viruses for expression of wtNSP3 or its mutants, and their effects on host cell translation were determined in the presence of the inducer IPTG (0.4 mM). Cells infected with the parental virus vT7lacOI exhibited the characteristic pattern of cellular and late vaccinia virus proteins, which differs from the cellular proteins synthesized in mock-infected cells (Fig 2A, lanes 1 and 2). Cells infected with vNSP3 for the expression of wtNSP3 or with any of the five viruses for the expression of NSP3 mutants showed a prominent 34-kDa band that corresponds to the molecular weight of NSP3 (Fig 2A, lanes 3–8). In a previous study, we demonstrated that this 34-kDa band corresponds to NSP3 by immunoprecipitation with hyperimmune anti-NSP3 serum [11]. Compared with BSC-1 cells infected with the parental vT7lacOI virus, infection with the viruses for the expression of wtNSP3 or its mutants had different effects on host cell translation. As determined by densitometry analysis of three independent experiments (Fig 2B), expression of wtNSP3 inhibited 87% of host cell translation. The NSP3 harboring mutation K171E inhibited translation to a similar extent as wtNSP3 (84%). The other four mutations inhibited host cell translation moderately (64% Y192A and 49% W170A) or poorly (33% R173E and 24% R187E:K191E). Similar results were obtained using increasing doses of the inducer IPTG (S1 Fig). As observed in Fig 2A, the amount of wtNSP3 or its mutants synthesized *de novo* during the [³⁵S]-labeled amino acids-pulse (1 h) was widely variable. However, the observed differences were not the same as those of overall protein accumulated during the 18 h elapsed from the time of infection (see below).

Accumulation of wtNSP3 and its mutants and susceptibility to a proteasome inhibitor

We next sought to quantify the accumulation of wtNSP3 and its mutants at the post-infection time point used to determine their effects on host cell translation. In addition, we wanted to determine the effect of the proteasome on the accumulation of these proteins. We therefore infected BSC-1 cells with viruses to express wtNSP3 and its mutants, followed by the addition of the proteasome inhibitor MG132 or its diluent DMSO, and after 16 h of incubation with the drug, the cells were harvested and analyzed by Western blot (WB) with anti-NSP3 serum (Fig 3A). As determined by densitometry analysis of three independent experiments, the amount of accumulated NSP3 varied widely among the mutants (Fig 3B). In the absence of proteasome inhibitor, four mutants accumulated lower NSP3 levels as compared to wtNSP3 (W170A, K171E, R173E and R187E:K191E), and one mutant accumulated a higher level (Y192A). The treatment with proteasome inhibitor MG132 increased the accumulated wtNSP3, and the same happened to all of the mutant proteins, and under these conditions, only the mutant Y192A accumulated a higher level of the mutant protein than wtNSP3, similar to the results obtained in the absence of MG132. These findings indicate that wtNSP3 and all of its mutants are susceptible to the proteasome to some degree. Moreover, susceptibility to the proteasome is likely a contributing factor that determines the low levels of accumulation of four mutants

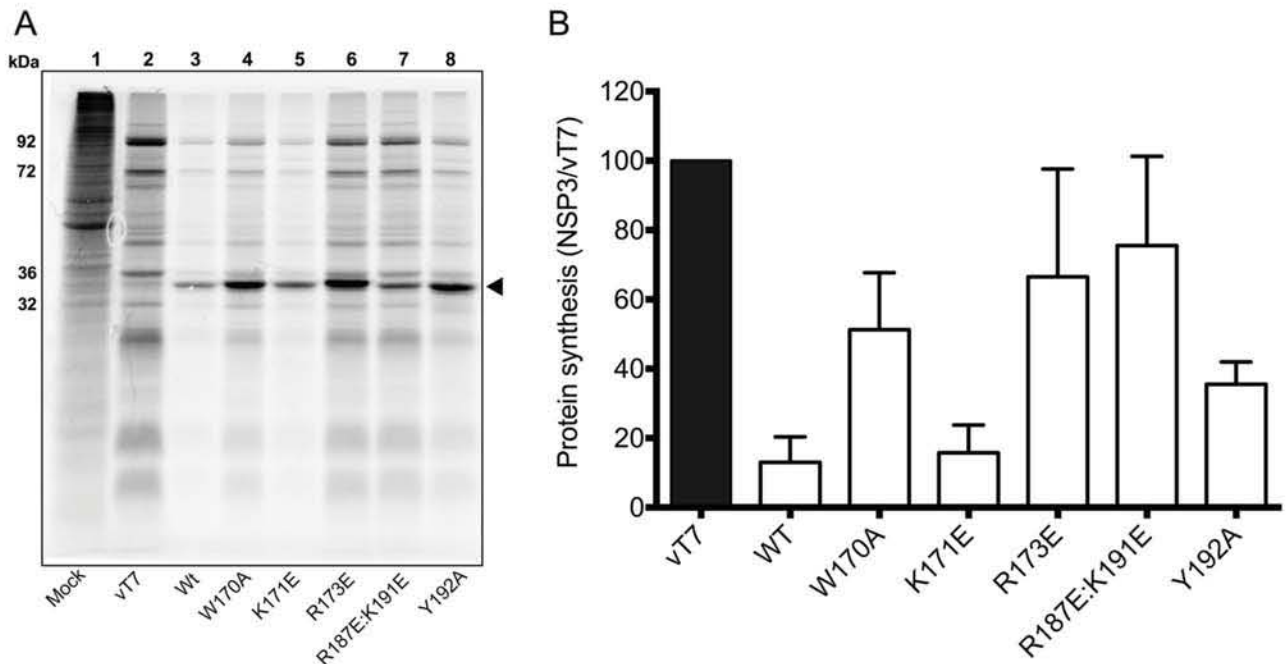


Fig 2. Effect of point mutations in the coiled-coil region of RRV NSP3 on the inhibitory function of NSP3 in host cell translation. BSC-1 cells were mock-infected, infected with the parental virus vT7lacOI, or with viruses for the expression of wild type NSP3 or its mutants with a MOI of five. At two hpi the inducer IPTG was added (0.4 mM). The infected cells were pulse labeled with [³⁵S]-methionine plus [³⁵S]-cysteine prior to harvesting at 18 hpi. The cells were then analyzed by SDS-PAGE and autoradiography (A). The molecular weights of four predominant vaccinia virus proteins detected in lane 2 are indicated to the left. The solid triangle indicates the position of the NSP3 bands (34 kDa). Based on densitometry analysis of three independent experiments, the graph bars (B) indicate the percentage of protein synthesis in cells expressing NSP3 or its mutants compared with control cells that do not express NSP3 (vT7). Bars indicate standard deviation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181871.g002>

(W170A, K171E, R173E and R187E:K191E) and high level of accumulation of one mutant (Y192A).

Accumulation of the stable dimer and monomer/dimerization intermediate forms of wtNSP3

Because the mutations were designed to affect dimerization, we determined the accumulation of stable dimers of wtNSP3 and its mutants. For this purpose we used non-dissociating Western blot (WB-ND), a method previously described by Chawla-Sarkar and colleagues that uses low concentrations of SDS to separate stable NSP3 dimers from monomers/dimerization intermediates, these last two migrating as *bona fide* monomers that cannot be resolved [17]. BSC-1 cells were infected with viruses to express wtNSP3 and its mutants, and at 18 hpi the cells were harvested and analyzed by WB-ND. The accumulation of stable dimers and monomers/dimerization intermediates varied between wtNSP3 and its mutants (Fig 4A). Of interest, smears directly above the dimeric wtNSP3 and NSP3_{Y192A} bands were consistently observed but were excluded from the densitometry analysis. Based on three independent experiments, four of the NSP3 mutants accumulated lower levels of stable dimers as compared to wtNSP3 (W170A, K171E, R173E and R187E:K191E), and one mutant (Y192A) accumulated more (Fig 4B). The mutation that most severely affected the accumulation of stable dimers was NSP3_{W170A} (nine-fold lower than wtNSP3, and sixteen-fold lower than NSP3_{Y192A}), and identical differences were obtained in further experiments that determined the accumulation of

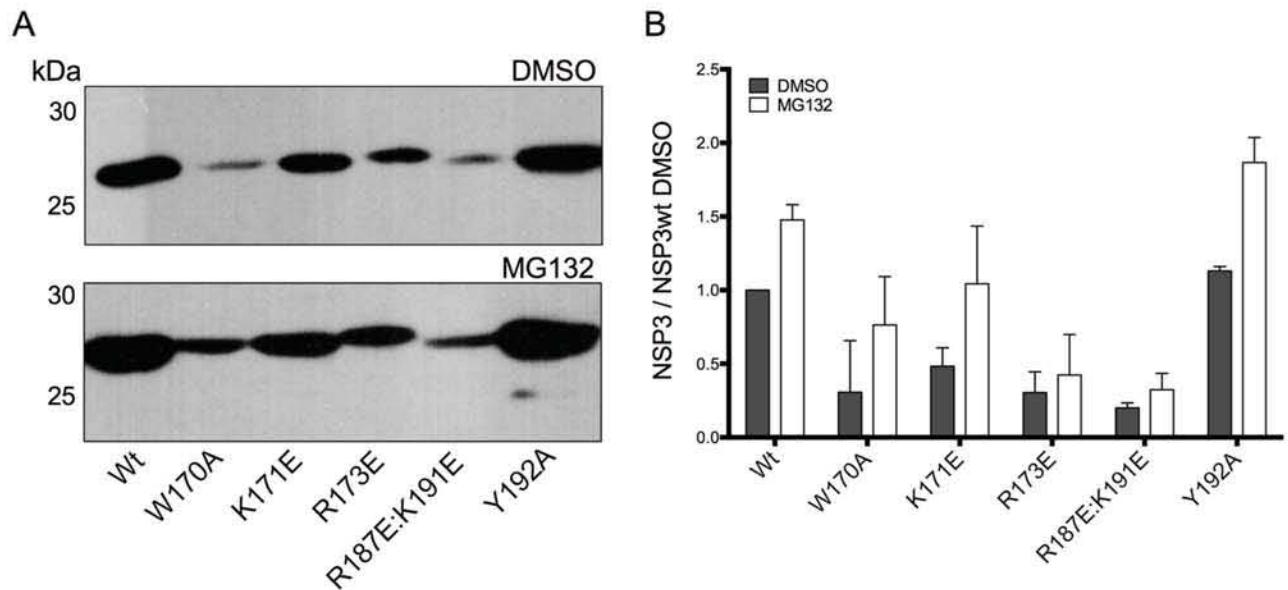


Fig 3. Effect of point mutations in the coiled-coil region of RRV NSP3 on its accumulation and susceptibility to the proteasome. Identical numbers of BSC-1 cells were infected with the parental virus vT7lacOI or with viruses for the expression of wild type NSP3 or its mutants. The cells were incubated with a proteasome inhibitor (MG132) or with its diluent (DMSO). The infected cells were harvested at 18 hpi and analyzed by WB with anti-NSP3 serum (A). Based on densitometry analysis of three independent experiments, the graph bars (B) indicate the accumulation of NSP3 in the presence of MG132 (white bars) or its diluent DMSO (gray bars) compared with the accumulation of the wild type protein in the absence of MG132 (Wt). Bars indicate standard deviation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181871.g003>

these proteins in the presence and absence of a proteasome inhibitor (see below). Consistent with the level of the stable dimeric form of the protein, the NSP3 mutants had variable levels of accumulated monomers/dimerization intermediates, with low levels for the mutations W170A, R173E and R187E:K191E, intermediate for the mutation K171E, and high for

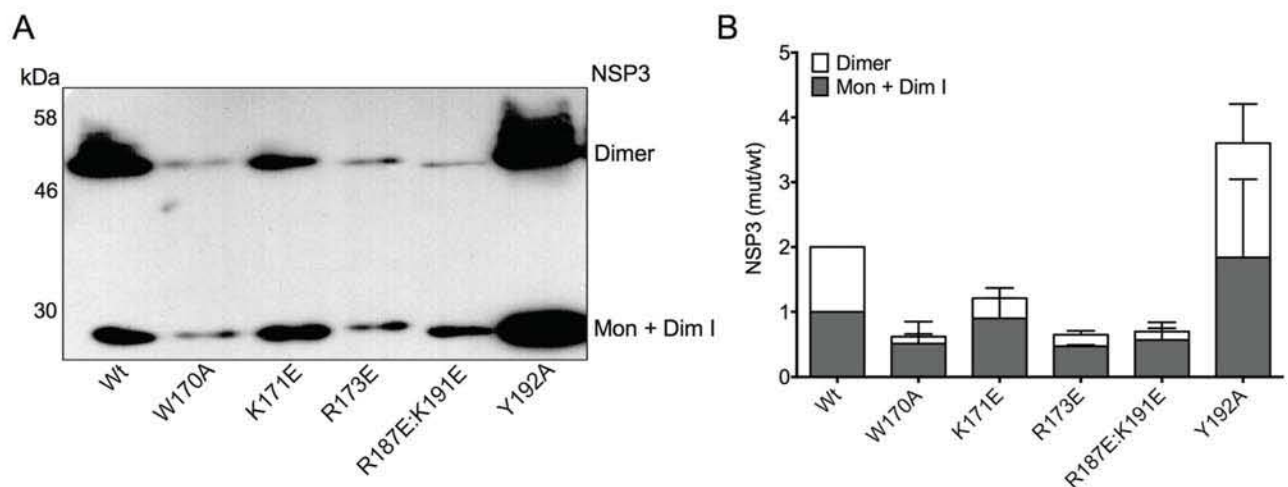


Fig 4. Effect of point mutations in the coiled-coil region of NSP3 on the accumulation of its stable dimeric and monomeric/dimerization intermediate forms. Identical numbers of BSC-1 cells were infected with vaccinia viruses for the expression of wild type NSP3 or its mutants. The infected cells were harvested at 18 hpi and analyzed by WB-ND with anti-NSP3 serum (A). The two bands correspond to monomeric/dimerization intermediate (34 kDa) and dimeric (68 kDa) forms of NSP3. Based on densitometry analysis of three independent experiments, the graph bars (B) indicate the accumulation of monomeric/dimerization intermediate and stable dimeric NSP3 compared with the accumulation of each one of these two forms of wtNSP3. Bar lines indicate standard deviation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181871.g004>

wtNSP3 and Y192A (Fig 4B). Notably, even though the mutant NSP3_{Y192A} accumulated a higher level of stable dimeric NSP3 than wtNSP3, inhibition of host cell translation was moderately affected as compared to the severe host cell translation inhibition caused by wtNSP3 (Fig 2). By contrast, the mutant NSP3_{W170A} had a severely reduced level of stable dimeric NSP3, but its function was moderately affected to a level that could not be distinguished from that of the mutant NSP3_{Y192A}. Hence there was no correlation between the level of accumulation of stable dimeric NSP3 and its inhibitory function on host cell translation among the mutants. The finding that mutants severely impaired to form stable NSP3 dimers were still able to inhibit host cell translation indicates that in addition to the stable dimeric NSP3, the remaining NSP3 consisting of *bona fide* monomers and/or dimerization intermediates is somehow functional.

Accumulation of the stable dimer and monomer/dimerization intermediate forms of wtNSP3 and its mutants in the presence of a proteasome inhibitor

We next compared the accumulation of monomeric/dimerization intermediate and stable dimeric wtNSP3 and its mutants in the absence of MG132 with the accumulation of both forms of the protein in the presence of MG132. BSC-1 cells were infected with viruses to express wtNSP3 and its mutants, followed by the addition of the proteasome inhibitor MG132 or its diluent DMSO, and after 16 h of incubation with the drug, the cells were harvested and analyzed by WB-ND (Fig 5A and 5B). Based on three independent experiments, treatment with MG132 increased the level of the stable dimeric forms of wtNSP3 and NSP3_{Y192A} (Fig 5D). Coincidentally, treatment with MG132 increased the level of the monomeric/dimerization intermediate forms of wtNSP3 and NSP3_{Y192A} (Fig 5C). By contrast, treatment with MG132 had no effect on the accumulation of the stable dimeric and monomeric/dimerization intermediate forms of four mutant proteins (W170A, K171E, R173E and R187E:K191E). Considering that all of the mutant NSP3 proteins were susceptible to the proteasome by WB (Fig 3), it is possible that WB-ND underestimates the effect of the proteasome on monomeric/dimerization intermediate and stable dimeric NSP3 because of an *in vitro* effect. WB-ND uses mild conditions to prepare cell extracts with a lower SDS concentration and maintains samples in the cold instead of boiling, and such conditions may not be able to fully prevent enzymatic activities that have an effect on the stability of NSP3, such as ubiquitination, Hsp90-assisted dimerization and proteasome degradation. Based on the observed differences in the apparent stability to *in vitro* conditions of four NSP3 mutants (W170A, K171E, R173E and R187E:K191E) that failed to accumulate higher levels of either dimeric and/or monomeric/dimerization intermediate forms of NSP3 in the presence of the proteasome inhibitor we hypothesize that the above mutations rendered proteins that are unstable *in vitro*.

Coincident with the high level of accumulation of the two forms of wtNSP3 and NSP3_{Y192A}, a minor 30-kDa band increased its yield in the presence of MG132 (Fig 5A and 5B). This minor band is likely a degradation product of NSP3 that is recognized by the hyperimmune anti-NSP3 serum. In addition, high levels of accumulation of stable dimeric wtNSP3 and the mutant NSP3_{Y192A} were accompanied by a smear with some discernible bands that migrate just above the NSP3 dimers (Fig 5A and 5B). These smears were more prominent in cells treated with MG132 of either wtNSP3 or NSP3_{Y192A}, thus suggesting that the smear consists of polyubiquitinated dimers. These putative polyubiquitinated NSP3 dimers were apparently absent in cells infected with four mutant viruses that exhibited reduced levels of accumulation of the monomeric/dimerization intermediate and stable dimeric forms. The above data are consistent with the notion that the low level of accumulation of the monomeric/dimerization

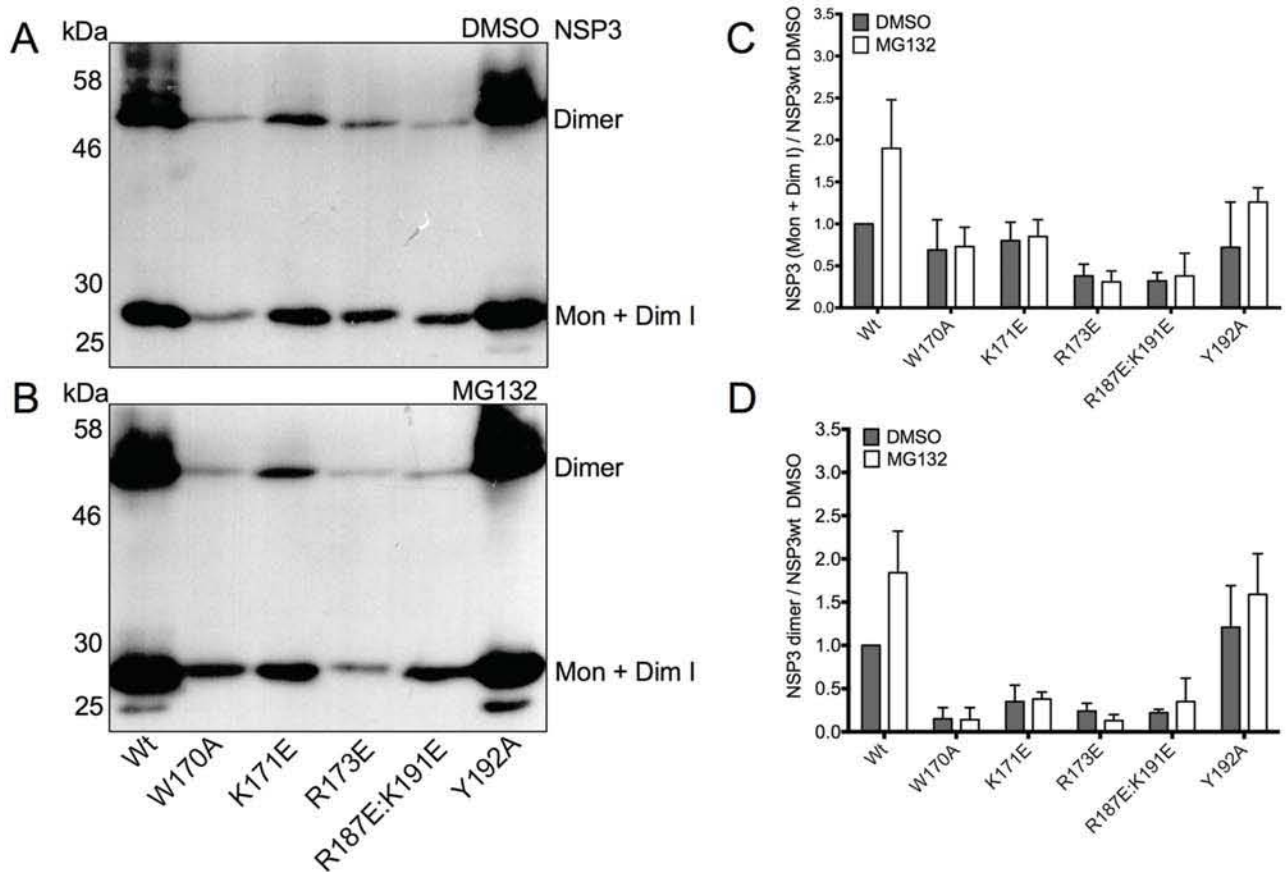


Fig 5. Effect of point mutations in the coiled-coil region of NSP3 on the accumulation of its stable dimeric and monomeric/dimerization intermediate forms in the presence and absence of MG132. Identical numbers of BSC-1 cells were infected with vaccinia viruses for the expression of wild type NSP3 or its mutants. The cells were incubated with a proteasome inhibitor (MG132) or its diluent (DMSO). The infected cells were harvested at 18 hpi and analyzed by WB-ND with anti-NSP3 serum (A and B). The two prominent bands correspond to monomeric/dimerization intermediate (34 kDa) and dimeric (68 kDa) forms of NSP3; the minor band may correspond to a putative degradation product (30 kDa). Based on densitometry analysis of three independent experiments, the graph bars compare the accumulation of monomers/dimerization intermediates (C) or stable NSP3 dimers (D) in the presence of MG132 (white bars) or its diluent (gray bars). Bars indicate standard deviation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181871.g005>

intermediate and stable dimeric forms of the four NSP3 mutants (W170A, K171E, R173E and R187E:K191E) is due to higher susceptibility to the proteasome as compared with wtNSP3. By contrast, the high level of accumulation of NSP3_{Y192A} is likely due to lower susceptibility to the proteasome as compared to wtNSP3.

Dimeric wtNSP3 is susceptible to proteasome degradation and has a shorter half-life than monomers and/or dimerization intermediates

The results in Fig 5 paradoxically failed to show directly an effect of the proteasome on the accumulation of the monomeric/dimerization intermediate and stable dimeric forms of four NSP3 mutants in spite of the fact that proteasome degradation is the major determinant of the level of accumulation of wtNSP3 [17]. We used a different approach to determine the proteasomal susceptibility of the stable dimeric versus monomeric/dimerization intermediate forms of wtNSP3 by determining the half-lives of these forms of the protein in cells treated with or

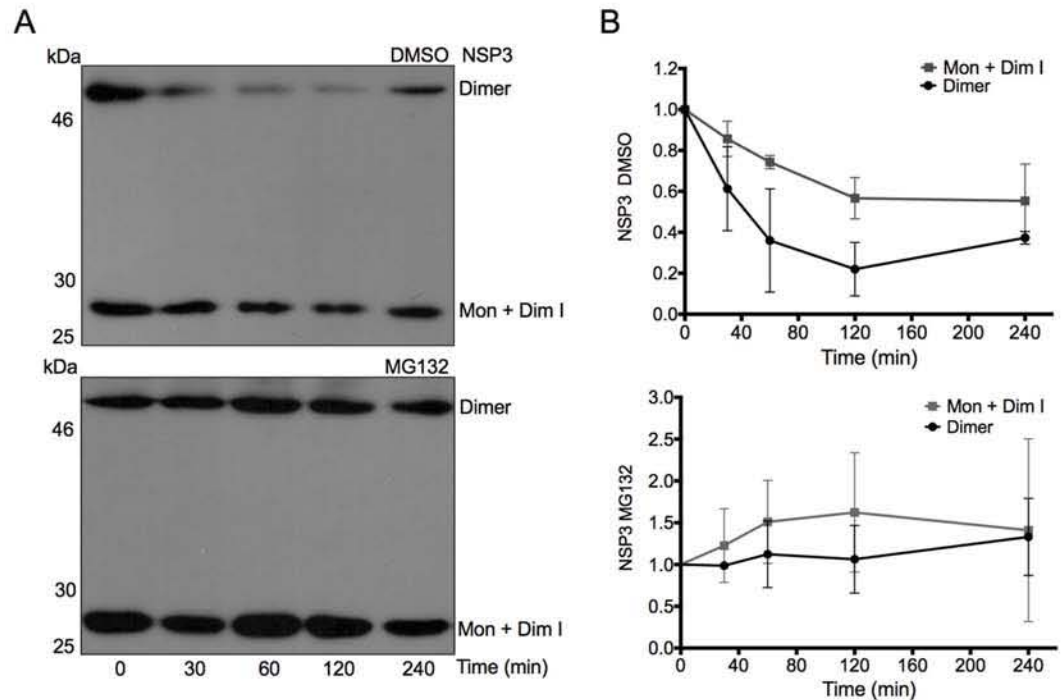


Fig 6. Determination of the half-lives of stable dimeric and monomeric/dimerization intermediate forms of wtNSP3 in the presence and absence of MG132. Identical numbers of BSC1 cells were infected with vNSP3 to express wtNSP3. At two hpi, the cells were treated with MG132 or its diluent DMSO, and at 14 hpi cycloheximide (CHX) was added to inhibit translation. The cells were harvested 0, 30, 60, 120 and 240 min after adding CHX. The harvested cells were analyzed by WB-ND with anti-NSP3 serum (A). The two bands correspond to the monomeric/dimerization intermediate (34 kDa) and dimeric (68 kDa) forms of NSP3. Based on densitometry analysis of three independent experiments, the graph lines (B) were used to determine the half-lives of the monomeric/dimerization intermediate (134 min) and stable dimeric (60 min) forms of the protein in the absence of MG132. Both forms of the protein were more stable in the presence of MG132. Bar lines indicate standard deviation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181871.g006>

without proteasome inhibitor. We infected BSC-1 cells with vNSP3 to express wtNSP3 and added MG132 or its diluent DMSO 12 h prior to the addition of cycloheximide (CHX) to inhibit host cell translation at 14 hpi (time 0). Thereafter, a number of replicas were harvested and analyzed by WB-ND to determine the decay of wtNSP3 in the absence of protein synthesis. As shown in Fig 6A, the presence of MG132 stabilized wtNSP3 monomers/dimerization intermediates and stable dimers. As estimated from the data of three independent experiments (Fig 6B), in the absence of MG132, stable NSP3 dimers decayed sharply, with a half-life of 60 min, and monomers/dimerization intermediates decayed at a slower rate, with a half-life of 134 min. Surprisingly, stable dimers were more susceptible to the proteasome than monomers/dimerization intermediates, as determined by comparison of their half-lives in the presence or absence of the proteasome inhibitor. These data indicate that both stable dimeric and monomeric/dimerization intermediate forms of wtNSP3 are degraded via the proteasome, and stable dimeric NSP3 has a shorter half-life than monomers/dimerization intermediates. It is of note that even after 240 minutes in the presence of MG132 and CHX the amount of monomers/dimerization intermediates increased slightly and stable dimers increased to a higher extent, with a high standard deviation. If indeed the amount of NSP3 raises in the presence of CHX, it may be due to the high efficiency of translation of its IRES-containing mRNA, before the effect of CHX is fully established, combined with the extremely long half-lives of both forms of the protein in the presence of a proteasome inhibitor.

Discussion

Regulated expression of RVA NSP3 in the vaccinia virus VOTE system is an effective approach to assay its inhibitory effect on host cell translation

It is widely believed that RVA NSP3 inhibits host cell translation by disrupting the 5' to 3' mRNA interaction of capped and polyadenylated cellular mRNAs. This mechanism is now under scrutiny based on recent findings suggesting the opposite role of NSP3 as a surrogate of PABP that enhances polyadenylated mRNA translation by stabilizing eIF4E-eIF4G interaction [9, 12]. We hypothesized that the process of dimerization is a key to understand the mechanism by which NSP3 affects host cell translation. To begin to study the process of NSP3 dimerization, we performed mutagenesis of conserved amino acids in a segment of the coiled-coil region of this protein. We used the vaccinia virus VOTE system, a method we previously used to demonstrate that RRV NSP3 inhibits host cell translation. We confirmed that expression of wtNSP3 inhibits host cell translation (Fig 2), achieving a maximum 10-fold reduction that is below the 25-fold reduction obtained previously using hypertonic conditions during metabolic labelling [11]. In spite of the quantitative difference on host cell translation inhibition compared with prior studies, the VOTE system consistently achieved host cell translation inhibition similar to that obtained in RVA infected cells. Moreover, the VOTE system allows temporal regulation of expression [18], a feature that makes it suitable to mimic some of the conditions that occur in RVA infected cells. Notably, the conditions used in this study were chosen to maximize the inhibitory effect of RRV NSP3 on host cell translation, but complete shutoff of host cell translation did not occur.

Point mutations in the coiled-coil of RRV NSP3 affect dimerization and stability to the proteasome

We observed in Fig 4 that four site-directed mutations reduced the level of NSP3 accumulation in comparison with wtNSP3 by affecting primarily the yield of stable dimers and to a lower extent the yield of monomers/dimerization intermediates (W170A, K171E, R173E and R187E: K191E). All mutations targeted a short 23 amino acids segment predicted to affect interactions between the two helices of a coiled-coil; hence, these mutations are likely affecting dimer formation. Based on these data, we conclude that four mutations affected primarily dimer formation and had a minor side effect on the yield of monomers/dimerization intermediates, possibly as a consequence of differential stability to the proteasome of the different forms of the protein.

This study confirms and expands prior studies indicating that degradation via the proteasome is the major determinant of NSP3 stability. We found that a proteasome inhibitor stabilized both stable NSP3 dimers and monomers/dimerization intermediates (Fig 6), thus demonstrating that stable NSP3 dimers and dimerization intermediates/monomers are targets of the proteasome. Moreover, the proteasome inhibitor enhanced the accumulation of high molecular weight forms of NSP3 migrating directly above the stable dimers (Fig 5), thus suggesting that the smears consists of polyubiquitinated dimers of this protein. A second band of approximately 30 kDa accumulated to a higher level in the presence of the proteasome inhibitor (Fig 5), however it is not clear how the proteasome inhibitor could enhance the yield of a putative degradation product of NSP3. Furthermore, our results indicate that stable NSP3 dimers have a shorter half-life than dimerization intermediates/monomers (Fig 6). The results of others indicates that *bona fide* NSP3 monomers are highly susceptible to proteasome degradation and are protected from such degradation as a consequence of binding to Hsp90, *i. e.*

dimerization intermediates are more stable to the proteasome than *bona fide* monomers [17]. Taken together, these data suggest that NSP3 becomes a target of proteasome degradation immediately after its synthesis and remain as a target after reaching the dimerization intermediate and stable dimer forms, *i. e.* throughout dimerization. In this study, the ratio of *bona fide* monomers versus dimerization intermediates that blend together to form the corresponding band in WB-ND is not known, however the finding that such band has a relatively long half-life suggests that it is made mostly of dimerization intermediates, considering that this form of the protein is more stable to the proteasome than *bona fide* monomers [17]. Of note, one of the four mutations that affected dimer formation, R187E:K191E, included two mutations that have been tested individually on binding of NSP3 to the cellular protein RoXaN by co-immunoprecipitation; however, the dimerization and stability of these mutant proteins to the proteasome were not determined [14]. The potential effect of the coiled-coil mutations on the dimerization and stability of NSP3 merits caution in the interpretation of co-immunoprecipitation assays suggesting that these mutations affect the interaction of the mutant proteins with RoXaN.

In contrast with four mutations that affected NSP3 dimer formation, another mutation had the opposite effect (Y192A), it increased the level of total NSP3 accumulation by enhancing the yield of both stable dimers and monomers/dimerization intermediates (Figs 4 and 5). Considering that our results and those of others suggest that NSP3 becomes a target of proteasome degradation as soon as it is synthesized and remains as a proteasome target throughout dimerization, the observed effect of the mutation Y192 on the accumulation of all forms of the protein could be obtained if this mutation stabilizes *bona fide* monomers to the proteasome, thus increasing the accumulation of all forms of the protein.

Our mutagenesis approach targeted a segment of the coiled-coil region to affect NSP3 dimerization. The finding that four of the five mutations assayed affected the dimerization phenotype was unexpected considering the length of the coiled-coil region. Compensatory effects of other coiled-coil interactions are likely to render the mutations inconsequential. An alternative mechanism that would undermine stable dimer formation is a defect in the conformational rearrangement that Hsp90 triggers in its client proteins using energy from ATP to drive the process. Further studies are needed to assess whether NSP3 dimers are highly susceptible to single amino acid mutations in their lengthy coiled-coil interface or a conformational rearrangement during the course of dimerization is affected by such mutations.

The level of stable dimeric RRV NSP3 does not correlate with its inhibitory function in host cell translation

We observed variable levels of accumulation of the stable dimeric forms of the five mutants of NSP3 compared with wtNSP3. Four mutants yielded lower levels of stable dimer accumulation, with the extreme case of mutation W170A, which exhibited a nine-fold difference with wtNSP3 and a sixteen-fold difference with NSP3_{Y192A} (Figs 4 and 5). It was surprising that the inhibitory function of NSP3 did not correlate with the level of accumulation of the stable dimeric form, as it was observed by comparison of the effect of mutations Y192A and W170A that inhibited host cell translation similarly in spite of the vast difference in their levels of accumulated stable dimeric protein. Because mutants with severe deficiency to form stable NSP3 dimers were still able to inhibit host cell translation significantly, we hypothesized that at least a fraction of the protein detected by WB-ND as monomers/dimerization intermediates is competent to inhibit host cell translation. In spite that we were unable to determine the ratio of *bona fide* monomers versus dimerization intermediates that blend together to form the corresponding band in WB-ND, the competence of three mutants with severely reduced levels of stable NSP3 dimers (W170A, R173E, and R187E:K191E) to inhibit host cell translation,

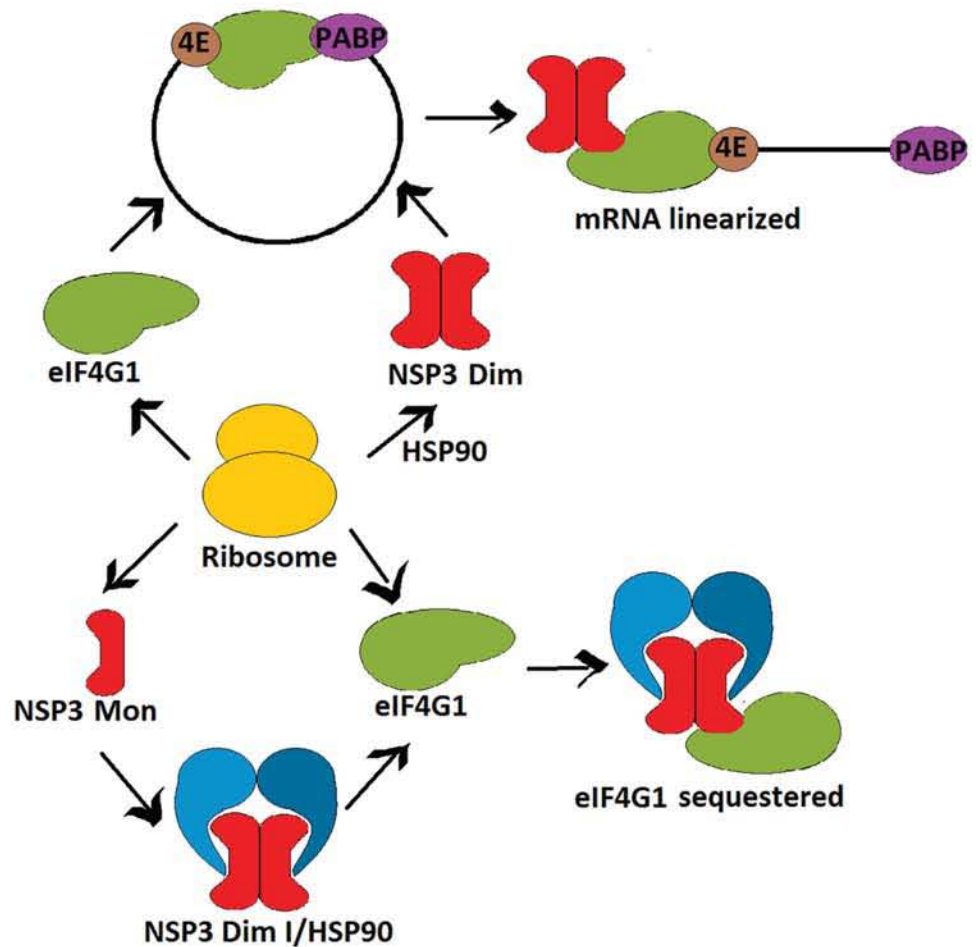


Fig 7. A model of RVA NSP3 translation inhibition prior to stable dimer formation. The current model (above) propose that mature NSP3 dimers engage eIF4F-mRNA-PABP complexes thus disrupting 5' to 3' mRNA interaction. Alternatively, NSP3 dimerization intermediates bound to HSP90 (below) would sequester eIF4G1.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181871.g007>

suggest that a significant fraction of the dimerization intermediates/monomers detected by WB-ND are functional dimerization intermediates. This hypothesis is consistent with observed long half-life of this form of the protein, as opposed to the short-lived *bona fide* monomers [17]. Based on these findings, we hypothesize that NSP3 inhibits host cell translation by sequestering eIF4G1 along with such dimerization intermediates rather than by disrupting the 5' to 3' mRNA interaction (Fig 7).

In this study, we demonstrate that RVA NSP3 acquires its function prior to stable dimer formation and remain as a proteasome target throughout dimerization. Further studies of the macromolecular complexes involved in NSP3 dimerization and in targeting for proteasome degradation are needed to better understand these processes.

Supporting information

S1 Fig. Effect on host cell protein synthesis of wild-type RRV NSP3 and five site-directed NSP3 mutants expressed with recombinant vaccinia viruses using different doses of the inducer IPTG. BSC-1 cells were infected with the parental virus vT7lacOI, or with viruses for

the expression of wild type NSP3 or its mutants with a MOI of five. At two hpi, different doses of IPTG were added. At 17 hpi the infected cells were pulse-labeled with [³⁵S]-methionine plus [³⁵S]-cysteine for one hour and harvested. The cells were then analyzed by SDS-PAGE and autoradiography (A and B). The molecular weights of four predominant vaccinia virus proteins detected in cells infected with vT7lacOI are indicated to the left. The solid triangles indicate the position of the NSP3 bands (34 kDa). Based on densitometry analysis of three independent experiments, the graph bars (C) indicate the percentage of protein synthesis in cells expressing NSP3 or its mutants compared with control cells that do not express NSP3 (vT7). Bars indicate standard deviation.

(TIF)

S2 Fig. Effect on host cell protein synthesis of different times of induction of RRV NSP3 expressed with a recombinant vaccinia virus. BSC-1 cells were mock-infected, infected with the parental virus vT7lacOI, or with vNSP3 for the expression of wild type NSP3 with a MOI of five. At two, 6 or 10 hpi the inducer IPTG was added (0.4 mM). At 17 hpi the infected cells were pulse-labeled with [³⁵S]-methionine plus [³⁵S]-cysteine for one hour and harvested. The cells were then analyzed by SDS-PAGE and autoradiography (A). Mock-infected cells are indicated in the first lane (M). The molecular weights of four predominant vaccinia virus proteins detected in cells infected with vT7lacOI are indicated to the left. The solid triangle indicates the position of the NSP3 band (34 kDa). Based on densitometry analysis of A, the graph bars (B) indicate the percentage of protein synthesis in cells expressing NSP3 compared with control cells that do not express NSP3 (vT7).

(TIF)

Acknowledgments

This study is part of the Ph.D. thesis of Hugo I. Contreras-Treviño, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México. We thank Bernard Moss from the National Institutes of Health for providing plasmid p.VOTE.1 and vaccinia virus vT7lacOI. We thank Verónica Monroy Martínez and María Cecilia Aguilar Zacarías for technical assistance.

Author Contributions

Conceptualization: Luis Padilla-Noriega.

Funding acquisition: Luis Padilla-Noriega.

Investigation: Hugo I. Contreras-Treviño, Edgar Reyna-Rosas, Renato León-Rodríguez.

Resources: Blanca H. Ruiz-Ordaz.

Supervision: Tzvetanka D. Dinkova, Ana M. Cevallos, Luis Padilla-Noriega.

Visualization: Hugo I. Contreras-Treviño, Edgar Reyna-Rosas.

Writing – original draft: Hugo I. Contreras-Treviño, Luis Padilla-Noriega.

Writing – review & editing: Tzvetanka D. Dinkova, Ana M. Cevallos.

References

1. Estes MK, Greenberg HB. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, et al., editors. *Fields Virology*. II. Sixth ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 1347–401.

2. Taraporewala ZF, Patton JT. Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *Virus Res.* 2004; 101(1):57–66. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.006> PMID: 15010217.
3. Patton JT, Vasquez-Del Carpio R, Tortorici MA, Taraporewala ZF. Coupling of rotavirus genome replication and capsid assembly. *Adv Virus Res.* 2007; 69:167–201. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)69004-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)69004-0) PMID: 17222694.
4. Piron M, Delaunay T, Grosclaude J, Poncet D. Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *J Virol.* 1999; 73(7):5411–21. PMID: 10364288;
5. Deo RC, Groft CM, Rajashankar KR, Burley SK. Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. *Cell.* 2002; 108(1):71–81. PMID: 11792322.
6. Groft CM, Burley SK. Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol Cell.* 2002; 9(6):1273–83. PMID: 12086624.
7. 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. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5811> PMID: 9755181;
8. Vende P, Piron M, Castagne N, Poncet D. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J Virol.* 2000; 74(15):7064–71. PMID: 10888646;
9. Gratia M, Sarot E, Vende P, Charpilienne A, Baron CH, Duarte M, et al. Rotavirus NSP3 Is a Translational Surrogate of the Poly(A) Binding Protein-Poly(A) Complex. *J Virol.* 2015; 89(17):8773–82. <https://doi.org/10.1128/JVI.01402-15> PMID: 26063427;
10. Michel YM, Poncet D, Piron M, Kean KM, Borman AM. Cap-Poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation. *J Biol Chem.* 2000; 275(41):32268–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004304200> PMID: 10922367.
11. Padilla-Noriega L, Paniagua O, Guzman-Leon S. Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis. *Virology.* 2002; 298(1):1–7. PMID: 12093167.
12. Gratia M, Vende P, Charpilienne A, Baron HC, Laroche C, Sarot E, et al. Challenging the Roles of NSP3 and Untranslated Regions in Rotavirus mRNA Translation. *PLoS One.* 2016; 11(1):e0145998. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145998> PMID: 26727111;
13. Rubio RM, Mora SI, Romero P, Arias CF, Lopez S. Rotavirus prevents the expression of host responses by blocking the nucleocytoplasmic transport of polyadenylated mRNAs. *J Virol.* 2013; 87(11):6336–45. <https://doi.org/10.1128/JVI.00361-13> PMID: 23536677;
14. Harb M, Becker MM, Vitour D, Baron CH, Vende P, Brown SC, et al. Nuclear localization of cytoplasmic poly(A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN. *J Virol.* 2008; 82(22):11283–93. <https://doi.org/10.1128/JVI.00872-08> PMID: 18799579;
15. Leppek K, Stoecklin G. An optimized streptavidin-binding RNA aptamer for purification of ribonucleoprotein complexes identifies novel ARE-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(2):e13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt956> PMID: 24157833;
16. Lupas AN, Gruber M. The structure of alpha-helical coiled coils. *Adv Protein Chem.* 2005; 70:37–78. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70003-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70003-6) PMID: 15837513.
17. Dutta D, Chattopadhyay S, Bagchi P, Halder UC, Nandi S, Mukherjee A, et al. Active participation of cellular chaperone Hsp90 in regulating the function of rotavirus nonstructural protein 3 (NSP3). *J Biol Chem.* 2011; 286(22):20065–77. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.231878> PMID: 21489987;
18. Ward GA, Stover CK, Moss B, Fuerst TR. Stringent chemical and thermal regulation of recombinant gene expression by vaccinia virus vectors in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(15):6773–7. PMID: 7624318;
19. Elroy-Stein O, Moss B. Gene expression using the vaccinia virus/T7 RNA polymerase hybrid system. *Curr Protoc Mol Biol.* 2001; Chapter 16:Unit16 9. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1619s43> PMID: 18265126.
20. Black EP, Condit RC. Phenotypic characterization of mutants in vaccinia virus gene G2R, a putative transcription elongation factor. *J Virol.* 1996; 70(1):47–54. PMID: 8523560;
21. Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc.* 2006; 1(4):1852–8. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.288> PMID: 17487168;
22. Sievers F, Higgins DG. Clustal omega. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2014; 48:3.13.1–6. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0313s48> PMID: 25501942.
23. Elroy-Stein O, Fuerst TR, Moss B. Cap-independent translation of mRNA conferred by encephalomyocarditis virus 5' sequence improves the performance of the vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86(16):6126–30. PMID: 2548200;

© 2018 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).
TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 21(Supl. 1): 124-133, 2018.
DOI: [10.22201/fesz.23958723e.2018.0.152](https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.152)

REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN MEDIADA POR LA PROTEÍNA NSP3 DE ROTAVIRUS

^{1,2,3a}Hugo I. Contreras-Treviño y ^{2,3b}Luis Padilla-Noriega

¹Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Deleg. Coyoacán, Ciudad de México 04580, México. ²Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. ³Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.
E-mails: ^ahi.contreras.84@gmail.com, ^blpadilla@unam.mx

RESUMEN

El estudio de los mecanismos utilizados por diversos virus para controlar la traducción de la célula hospedera y favorecer la expresión de proteínas virales ha sido muy instructivo para conocer mecanismos celulares fundamentales que regulan la traducción. La proteína NSP3 de los rotavirus de la especie A (RVA) es capaz de inhibir la traducción de los RNAm celulares como consecuencia de su unión al factor de iniciación de la traducción eIF4G y de estimular la traducción de los RNAm virales como consecuencia de su unión a la secuencia UGACC de su extremo 3'. Se ha propuesto que NSP3 inhibe la traducción por interferir con la circularización de los extremos 5'-3' de los RNAm celulares mediada por eIF4E-eIF4G-PABP (proteína de unión a poli-A), y simultáneamente se propone que NSP3 estimula la traducción de los RNAm del RVA circularizándolos de manera análoga a la que realiza PABP en los RNAm celulares. Sin embargo, la importancia de la dimerización de NSP3 asistida por la chaperona HSP90 en su función inhibitoria de la traducción celular se desconoce. Recientemente, se exploró la importancia de los intermediarios de la dimerización de NSP3 sobre su función inhibitoria de la traducción, y se encontró que mutaciones puntuales en la región *coiled-coil* afectan la formación de los dímeros y conservan parcialmente su función inhibitoria de la traducción celular. Además, se detectó que los dímeros de NSP3 se degradan con mayor rapidez que los intermediarios de la dimerización. Estos datos demuestran que la función de NSP3 se adquiere previamente a la aparición de los dímeros, y sugiere que la susceptibilidad al proteasoma de las distintas formas oligoméricas de NSP3 son relevantes en el establecimiento de la función inhibitoria de la traducción celular.

Palabras Clave: NSP3, intermediarios de dimerización, proteostasis, inhibición traduccional.

Regulation of translation mediated by rotavirus protein NSP3

ABSTRACT

The study of the mechanisms used by different viruses to control host cell translation and favor the expression of viral proteins has been very instructive to know fundamental cellular mechanisms that regulate translation. Species A rotavirus (RVA) NSP3 protein is capable of inhibiting the translation of cellular mRNAs as a consequence of its binding to the translation initiation factor eIF4G and of stimulating the translation of viral mRNAs as a consequence of its binding to the UGACC sequence at their 3'-end. It has been proposed that NSP3 inhibits translation by interference with the circularization of the 5'-3'-ends of cellular mRNAs mediated by eIF4E-eIF4G-PABP (poly-A binding protein), and simultaneously it has been proposed that NSP3 stimulates translation of RVA mRNAs by circularization, in a way analogous to that performed by PABP on cellular mRNAs. However, the importance of NSP3 dimerization assisted by chaperone HSP90 in its inhibitory function of cell translation is unknown. Recently, the importance of NSP3 dimerization intermediates on its inhibitory function on host cell translation was explored, and it was found that point mutations in the *coiled-coil* region affect the formation of NSP3 dimers and partially preserve its host cell translation inhibitory function. In addition, it was found that NSP3 dimers degrade more rapidly than dimerization intermediates. These data demonstrate that the function of NSP3 is acquired prior to the appearance of dimers and suggests that the proteasome susceptibility of the different oligomeric forms of NSP3 are relevant in the establishment of the inhibitory function of cell translation.

Key Words: NSP3, dimerization intermediates, proteostasis, translation inhibition.

INTRODUCCIÓN

Rotavirus de la especie A

R Los rotavirus de la especie A (RVA) son la causa más importante de las gastroenteritis virales en mamíferos alrededor del mundo, y en el caso de los RVA en humanos su relevancia en la prevalencia de esta enfermedad es igual en países desarrollados y en vías de desarrollo (Fields, Knipe & Howley, 2013). Durante el año 2000, se estima que los RVA causaron 528,00 muertes en niños menores de 5 años, y tras la aplicación de vacunas (RotaTeq y Rotarix) hubo una reducción a 215,00 muertes estimadas durante el año 2013 (Tate, Burton, Boschi-Pinto & Parashar, 2016). Los RVA pertenecen al género *Rotavirus* dentro de la familia *Reoviridae*, y comparten sus características morfológicas (Matthijnsens, *et al.*, 2011). El genoma viral se divide en 11 segmentos del RNA de doble cadena y codifica para 12 proteínas; seis estructurales (VP 1-4, 6 y 7) y seis no estructurales (NSP 1-6) (Desselberger, 2014). La partícula viral icosaédrica carece de envoltura lipídica y mide 100 nm incluyendo las espículas, está compuesta de tres capas concéntricas de proteínas (TLP, por sus siglas en inglés Triple-Layered Particle), donde la capa externa se compone por VP4 y VP7, la intermedia por VP6 y la interna por VP2 (Jayaram, Estes & Prasad, 2004). El genoma viral se encuentra asociado a VP1 (RNA polimerasa dependiente del RNA) y a VP3 (la guanilil-metil-transferasa) dentro del virión (Desselberger, 2014).

Las TLPs reconocen a los receptores celulares mediante VP4 que previamente es procesada por cortes proteolíticos con tripsina para producir a VP5 y VP8 (Dormitzer *et al.*, 2002a; Dormitzer, Sun, Wagner & Harrison, 2002b). El virus es internalizado por endocitosis o por penetración directa, y la capa más externa se disocia por baja concentración de Ca^{2+} en los endosomas, y se libera la partícula de doble capa (DLP) (Ludert, Michelangeli, Gil, Liprandi & Esparza, 1987). Las DLP libres en el citoplasma son transcripcionalmente activas mediante VP1 y VP3. Los transcritos virales sintetizados emergen de la DLP, y poseen estructura tipo *cap* en el extremo 5', similar a los RNA mensajeros celulares, y en el extremo 3' tienen la secuencia conservada UGACC presente en todos los genes de los RVA (Desselberger, 2014). La proteína NSP3 recluta a los RNA mensajeros virales y se une al factor de inicio de la traducción 4G (eIF4G), lo que resulta en una inhibición de la traducción celular y la facilitación de la síntesis de proteínas virales; esto probablemente por limitar la circularización de los RNAm celulares con *cap* y poliadenilados y favorecer la circularización de los RNAm virales con *cap* y la secuencia UGACC-3' (Piron, Vende, Cohen & Poncet, 1998; Poncet, Aponte & Cohen, 1993; Vende, Piron, Castagné & Poncet, 2000). Además, en el citoplasma de la célula infectada se forman cuerpos de inclusión llamados viroplasmos compuestos por NSP2 y NSP5, en los que se lleva a cabo la replicación del genoma y la morfogénesis viral (Silvestri, Taraporewala & Patton, 2004).

Las partículas virales inmaduras de los viroplasmos migran hacia el retículo endoplásmico, a través de interaccionar con NSP4 (Taylor, O'Brien & Yeager, 1996). Las partículas virales en el retículo endoplásmico adquieren una envoltura lipídica transitoria y se integran a las proteínas externas del virión, VP4 y VP7 (Estes & Greenberg, 2013). La partícula viral completa es liberada por lisis celular o asociada a vesículas procedentes del retículo endoplásmico (Crawford *et al.*, 2017).

VIRUS Y TRADUCCIÓN CELULAR

Los virus se comportan como parásitos intracelulares obligados debido a que utilizan gran variedad de funciones celulares durante la replicación viral. Los virus producen proteínas multifuncionales, pero no han desarrollado una maquinaria de síntesis de proteínas similar a los ribosomas. Durante el ciclo de replicación viral se modula la actividad de los ribosomas para favorecer la traducción de los RNA mensajeros virales y sintetizar las proteínas involucradas en la replicación del genoma y el ensamble de la partícula viral (Walsh *et al.*, 2012). Fallas durante la traducción afectan la replicación viral por lo que los virus han desarrollado estrategias para controlar la actividad de los complejos de la traducción. Además, el control de la traducción celular por los virus ha aportado información muy relevante sobre los mecanismos de regulación de la maquinaria de síntesis de proteínas (Walsh *et al.*, 2012).

La traducción celular es un mecanismo de regulación post-transcripcional de la expresión génica, y altera rápidamente la abundancia espacio-temporal de las proteínas celulares. El proceso de traducción se divide en tres fases: iniciación, elongación y terminación, donde la iniciación es el paso con mayor regulación e involucra el reclutamiento del RNA mensajero a los ribosomas (Hinnebusch & Lorsch, 2012; Iwasaki *et al.*, 2016).

Previo al reclutamiento de los RNA mensajeros en los ribosomas celulares, se forma el complejo de preiniciación 43S compuesto por la subunidad ribosomal menor 40S, factores eucariontes de inicio de la traducción (eIF) eIF1, eIF1A, eIF5, el complejo multiproteico eIF3 y el complejo ternario eIF2-GTP-RNA de transferencia iniciador cargado con metionina (Met-tRNA_i). El RNA mensajero se une a eIF4E mediante el *cap* en el extremo 5', y a PABP mediante el extremo 3' poliadenilado, lo que da como resultado la posible circularización de los RNAm celulares con *cap* y poliadenilados (Wells, Hillner, Vale & Sachs, 1998). El factor eIF4G funciona como andamio entre eIF4E y PABP además de asociarse a una helicasa del RNA (eIF4A) (Jackson, Hellen & Pestova, 2010). Estas interacciones promueven la traducción del RNA mensajero, que por el efecto protector de PABP es menos susceptible a la degradación en el citoplasma celular (Vicens & Westhof, 2014; Wells, Hillner, Vale & Sachs, 1998). También el factor 4G interacciona con eIF3 unido a la subunidad ribosomal menor 40S y se previene

la formación del ribosoma completo 80S, hasta que el codón de inicio de la traducción en el RNA mensajero sea ubicado (Figura 1A) (Hinnebusch, 2014). El reconocimiento del codón inicio da lugar a la hidrólisis de GTP del complejo ternario, promovida por eIF5, liberando así a los factores de inicio de la traducción y permitiendo la unión entre las subunidades ribosomales (40 y 60S) lo que permite el inicio de la síntesis del péptido que luego se regula por factores de la elongación (EF-Elongation Factors). La formación del enlace peptídico es catalizada por el RNA ribosomal (RNAr). La síntesis del péptido concluye cuando algún codón de término (UAA, UAG o UGA) es detectado por el factor eRF1 (Eukaryotic release factor 1), y la unión entre el RNA de transferencia y el péptido sintetizado es hidrolizada (Walsh & Mohr, 2011).

Diversos virus previenen el reclutamiento de los ribosomas hacia los RNA mensajeros celulares, por secuestro y modificación de algunos factores involucrados en la traducción celular. El RVA reduce notablemente la síntesis de proteínas celulares desde tiempos tempranos de la infección, favoreciendo la traducción de los mensajeros virales. NSP3 es el regulador de la expresión génica de los RVA a nivel traduccional debido a que reconoce específicamente a los mensajeros virales, y se une a eIF4G en el mismo sitio y con mayor afinidad que lo hace PABP (Figura 1B) (Fields, Knipe & Howley, 2013; Piron, Vende, Cohen & Poncet, 1998; Poncet, Laurent & Cohen, 1994).

GEN Y ESTRUCTURA DE NSP3 (DOMINIOS)

La proteína no estructural 3 (NSP3, Non Structural Protein 3) es producto del gen 7 de los RVA (cepa SA11), y muestra identidad entre 46 y 85 % para los 12 genotipos propuestos para NSP3 (Ito, Sugiyama, Masubuchi, Mori & Minamoto, 2001;

Matthijnssens *et al.*, 2011; Matthijnssens *et al.*, 2008). En la cepa de RVA SA-11, la longitud del gen es 1,104 pb con regiones no traducidas de 25 y 131 nucleótidos en 5' y 3', respectivamente; y codifica para una proteína de 315 aminoácidos (Ito, Sugiyama, Masubuchi, Mori & Minamoto, 2001). Variantes genéticas de NSP3 presentan mutaciones no conservadas y duplicación de dominios generados por recombinación, posicionados dentro o fuera del marco abierto de lectura (ORF, del inglés Open Reading Frame) de NSP3. La mayoría de estas variaciones se producen *in vitro* por cultivo del virus a elevadas multiplicidades de infección (Arnold, Brownback, Taraporewala & Patton, 2012). La proteína de 315 aminoácidos se divide en tres dominios principales: en el extremo amino terminal (aminoácidos 4-149) se une el RNAm viral, en el extremo carboxilo terminal se une el factor eIF4G (aminoácidos 206-314), y en los aminoácidos 150 al 205 se localiza la región mínima para la dimerización (Piron, Delaunay, Grosclaude & Poncet, 1999). La parte central de la proteína se conforma de una región larga del tipo *coiled coil* (aminoácidos 159-245), y se caracteriza por un patrón hepta-repetido (HPPHPPP)_n con residuos hidrofóbicos (H) y polares (P) (Piron, Delaunay, Grosclaude & Poncet, 1999). Además, en el *coiled coil* se unen dos proteínas celulares: HSP90 y RoXaN (aminoácidos 225-258 y 167-237, respectivamente) (Dutta *et al.*, 2011; Poncet, Laurent & Cohen, 1994). En la Figura 2 se muestran los dominios y regiones de NSP3.

El dominio de unión al RNA viral (aminoácidos 4-164) se cristalizó en conjunto con un hexanucleótido (5-GUACC-3') y se resolvió su estructura a una resolución de 2.45 Å. Así se determinó que el dominio de unión al RNA es un heterodímero asimétrico con una interfaz extensa y características polares que forman un túnel donde se une una sola molécula del RNA

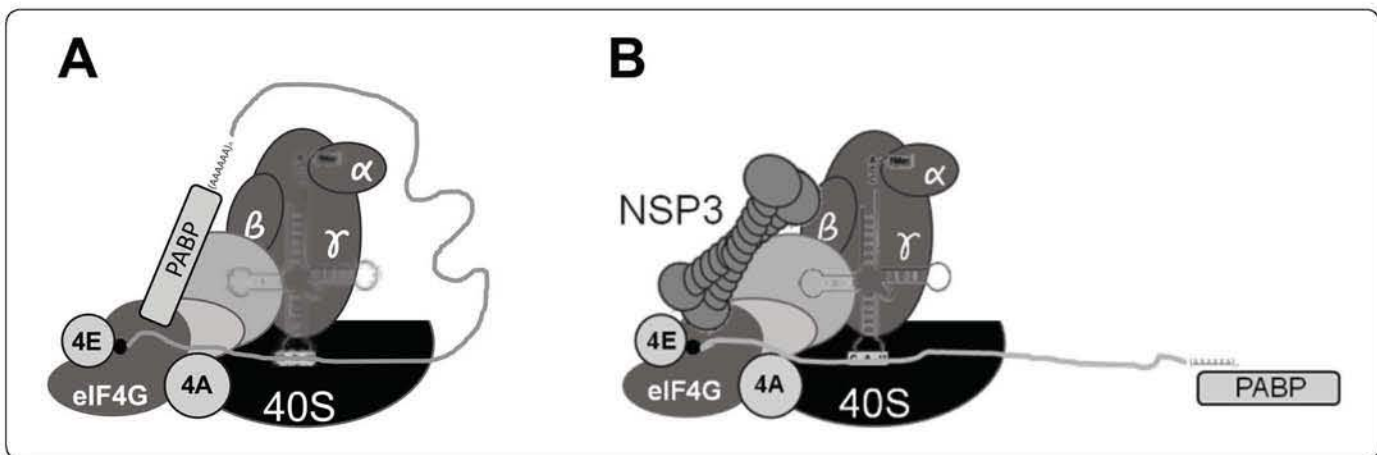


Figura 1. Modelo de la iniciación de la traducción y del efecto de NSP3 para desplazar a PABP. (A) La circularización de los RNA mensajeros celulares se favorece por la unión de eIF4E con el extremo 5' y PABP con el extremo 3', mientras que eIF4G funciona como andamio al unirse a eIF4E y PABP, y además recluta a una helicasa del RNA (eIF4A). Finalmente, eIF4G se une al complejo de preiniciación 43S (subunidad ribosomal 40S, eIF2, eIF3 y eIF5) para la búsqueda del codón de inicio óptimo para la traducción celular. (B) NSP3 se une a eIF4G en el mismo sitio que PABP, lo que linealiza los RNAm mensajeros reduciendo su eficiencia para ser traducidos.

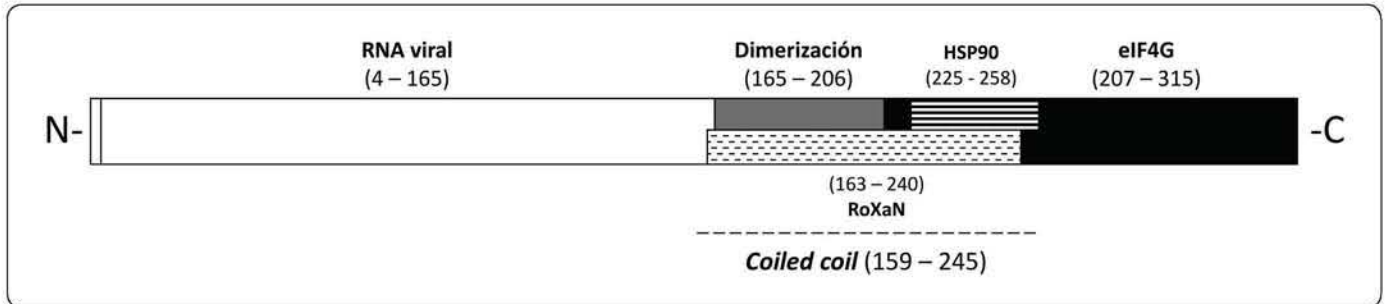


Figura 2. Representación esquemática de NSP3. NSP3 posee 315 residuos y 34 kDa de masa molecular. El extremo amino terminal (4-164) une específicamente al RNAm viral a través de la secuencia conservada en 3' (GACC) y el extremo carboxilo terminal (207-315) se une al factor de inicio de la traducción 4G. La parte central (165-206) corresponde a la región mínima para dimerizar. Los dominios de unión a las proteínas celulares HSP90 (225-258) y RoXaN (163-240) se encuentran inmersas en una región extensa del tipo *coiled coil* (159-245).

viral (Figura 3) (Deo, Groft, Rajashankar & Burley, 2002). Por otro lado, el dominio de unión a eIF4G (aminoácidos 206-315) se cristalizó fusionado a GST con un péptido del factor 4G (aminoácidos 132-160) y se observa como un homodímero simétrico con dos sitios disponibles para unir a eIF4G. El resto de NSP3 no se ha cristalizado, no obstante, en la cristalografía del extremo carboxilo se observa una región larga conformada por alfa hélices que confirman la existencia de una parte de la región *coiled coil* predicha por herramientas bioinformáticas (Figura 4) (Groft & Burley, 2002).

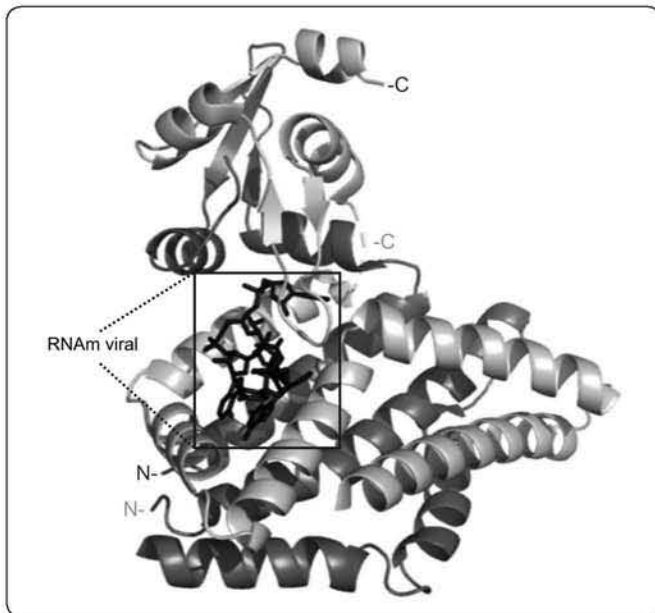


Figura 3. Estructura cristalográfica del extremo amino terminal de NSP3. El dominio de unión al RNA viral (4-164) se muestra co-cristalizado con el hexaribonucleótido consenso (5'-GUGACC-3') presente en el extremo 3' de los mensajeros del RVA. Una sola molécula de RNAm viral estabiliza al homodímero asimétrico. Monómeros de NSP3 (gris). Hexaribonucleótido (negro). PDB 1KNZ.

INTERACCIONES DE NSP3

El dominio de unión al RNA en el extremo amino terminal de NSP3 (NSP3-N) reconoce la secuencia conservada UGACC presente en la región 3' terminal no traducida (UTR, por sus siglas en inglés Untranslated Region) de los RNAm de RVA (Poncet, Laurent & Cohen, 1994). Las interacciones entre NSP3-N/RNAm viral son electrostáticas con los residuos Asp100 y Leu104 en un monómero, así como Ala122' y Leu142' en el otro monómero, y es necesario que el extremo 3' del RNA esté libre. La interacción con los últimos cuatro nucleótidos es indispensable, dado que variaciones de tres nucleótidos pierden afinidad por NSP3. Experimentos de dicroísmo circular (DC) muestran que NSP3 unido al RNA viral es estable por un aumento del contenido de estructuras alfa hélice (Poncet, Laurent & Cohen, 1994). Por ensayos de entrecruzamiento con luz ultravioleta (UV cross-linking, por sus siglas en inglés), se demostró que los extremos del dominio de unión al RNA cooperan con la unión de las moléculas del RNA viral (Piron, Delaunay, Grosclaude & Poncet, 1999). Se piensa que la interacción entre NSP3 y los RNA mensajeros virales es indispensable para la traducción eficiente así como el codón de inicio (AUG), y longitudes mínimas en los extremos UTR 5' y 3' (5 y 11 nucleótidos, respectivamente) (Gratia *et al.*, 2016).

El extremo carboxilo terminal de NSP3 (NSP3-C) interactúa con eIF4G, y evita que PABP sea reclutado en los complejos traduccionales, y esta interacción es 10 veces más afín que PABP-eIF4G, por lo que *in vitro* NSP3 desplaza a PABP de su unión a eIF4G (Groft & Burley, 2002; Piron, Vende, Cohen & Poncet, 1998). La interfaz entre NSP3 y eIF4G se lleva a cabo mediante interacciones hidrofóbicas y polares (Figura 4) (Groft & Burley, 2002). Además, un complejo ternario se forma entre NSP3 con eIF4G y RoXaN, y la proteína PABP es relocalizada en el núcleo celular. Mutaciones que afectan la interacción entre NSP3-eIF4G son incapaces de inhibir la traducción celular y para relocalizar a PABP-C en el núcleo (Harb *et al.*, 2008; Padilla-Noriega, Paniagua & Guzmán-León, 2002). Además,

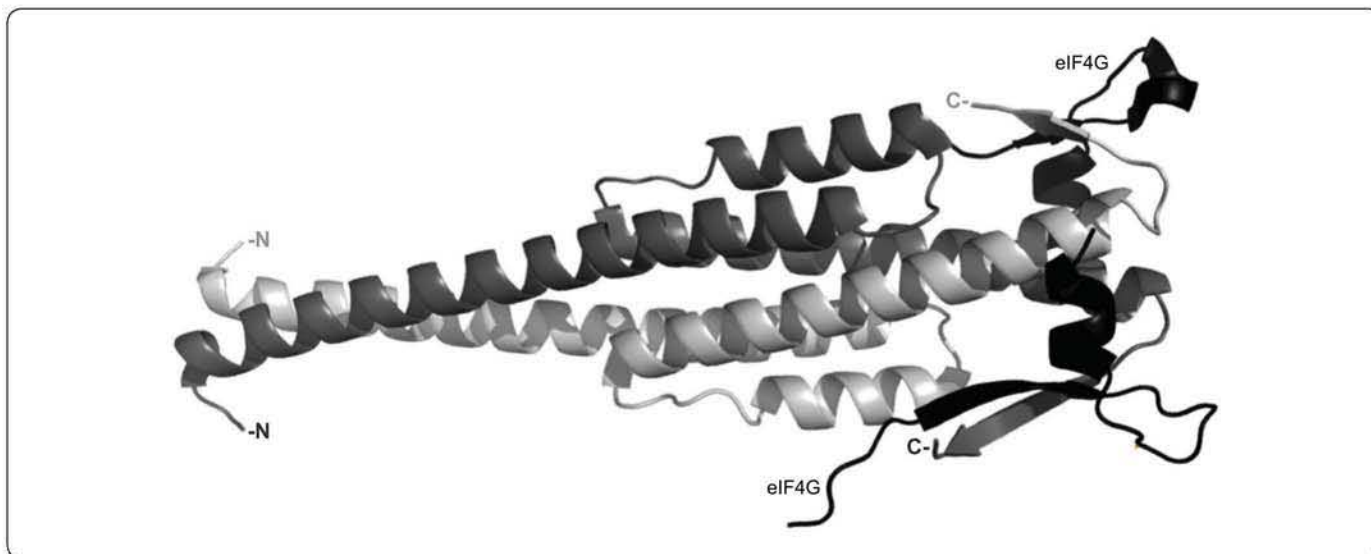


Figura 4. Estructura cristalográfica del extremo carboxilo terminal de NSP3. El dominio de unión al factor eIF4G (206-315) se muestra como homodímero simétrico unido a un fragmento de eIF4G (132-160). El dímero de NSP3 muestra dos posibles sitios de unión a eIF4G. Monómeros de NSP3 (gris). Fragmento de eIF4G (negro). PDB 1CZQ.

la unión de eIF4G hacia NSP3 favorece la traducción de RNA mensajeros celulares y virales (Keryer-Bibens *et al.*, 2009; Vende, Piron, Castagné & Poncet, 2000).

Adicionalmente, la chaperona HSP90 y la proteína celular RoXaN (Rotavirus X Protein Associated to NSP3) interaccionan con la región *coiled coil* en la parte central de NSP3, una región de la proteína que también contiene al dominio mínimo de dimerización (Figura 2). HSP90 se une a los monómeros recién sintetizados y asiste a la dimerización de la proteína tras la hidrólisis de ATP. La interacción de HSP90 con NSP3 produce intermediarios de la dimerización y evita la degradación por el proteasoma. El bloqueo de la actividad ATPasa de HSP90 por 17DMAG inhibe la dimerización y facilita la degradación de NSP3, y se impide la localización nuclear de PABP-C así como la interacción con eIF4G (Dutta *et al.*, 2011). RoXaN es una proteína de unión al RNA, y fue descrita por la interacción con NSP3 mediante dominios LD similar a los presentes en la proteína paxilina. Interacciones entre residuos con carga e hidrofóbicos participan en la interacción entre NSP3 y RoXaN, por lo que cambios en la naturaleza de estos residuos afectan la formación del complejo ternario eIF4G-NSP3-RoXaN, así como la relocalización de PABP-C al núcleo (Harb *et al.*, 2008; Leppek & Stoecklin, 2014; Vitour *et al.*, 2004).

FUNCIÓN INHIBITORIA DE LA TRADUCCIÓN CELULAR DE NSP3

El control de la maquinaria de traducción es indispensable durante el ciclo de replicación de los RVA; esto disminuye la síntesis de proteínas celulares y promueve la traducción de proteínas virales. NSP3 inhibe la traducción celular al interactuar con eIF4G, lo que se piensa que inhibe la

circularización de los extremos 5'-3' de los RNAm celulares mediada por eIF4E-eIF4G-PABP (Figura 1) (Piron, Vende, Cohen & Poncet, 1998; Walsh & Mohr, 2011). La función inhibitoria de NSP3 ha sido evaluada ampliamente con diversas estrategias experimentales. Las proteínas virales se acumulan mientras la infección por RVA progresa, y existe una evidente disminución de la síntesis de proteínas celulares. Ensayos de co-inmunoprecipitación con anticuerpos anti-eIF4G muestran que conforme aumenta la cantidad de NSP3 acumulada, la asociación entre PABP-C y eIF4G disminuye gradualmente, por lo que la inhibición traduccional correlaciona con dicha interacción. Algunas proteasas virales (de picornavirus, poliovirus, HIV-1, etc.) participan en la inhibición de la traducción celular por cortar al factor 4G en los extremos amino y carboxilo terminal, lo que afecta la circularización del RNAm. En infección con RVA no se han detectado productos de corte proteolítico de eIF4G mientras que su asociación con eIF4E y eIF4A no se modifica (Castello, Álvarez & Carrasco, 2011; Novoa & Carrasco, 1999; Piron, Vende, Cohen & Poncet, 1998; Walsh *et al.*, 2012). Adicionalmente, los RVA inducen la fosforilación del factor eIF2 α mediante la cinasa PKR, lo que típicamente se relaciona con un bloqueo general de la síntesis de proteínas, no obstante, en estas condiciones existe traducción preferencial para algunos genes de respuesta a estrés (Montero, Rojas, Arias & López, 2008). Además, se demostró que la expresión de NSP3 es suficiente para inhibir la traducción de RNAm. Ensayos de incorporación de [³⁵S] Metionina + [³⁵S]Cisteína en células BSC-1 infectadas con virus vaccinia recombinantes para expresar a NSP3 silvestre producen un abatimiento mayor al 90% de la traducción celular y de proteínas del virus vaccinia. Asimismo, los dominios de

unión a eIF4G y de dimerización resultan ser indispensables para la inhibición traduccional, mientras que el dominio de unión al RNA viral no afecta la función inhibitoria de NSP3 (Padilla-Noriega, Paniagua & Guzmán-León, 2002). Recientemente se reportó que mutaciones puntuales en la región *coiled coil* afectan la inhibición traduccional, y se relacionan con la acumulación y dimerización de la proteína (Contreras-Treviño *et al.*, 2017).

La relocalización nuclear de PABP-C se relaciona con la función inhibitoria de la traducción de NSP3, y resulta de la formación del complejo ternario (eIF4G-NSP3-RoXaN). La proteína PABP tiene una localización dinámica que se regula por interacciones con los RNA mensajeros y/o otras proteínas celulares (paxilina y eEF1), en particular PABP-C libre del RNA reconoce a la importina-alfa mediante los dominios de reconocimiento del RNA (RRM, por sus siglas en inglés RNA recognition motifs), y causa que PABP-C retorne al núcleo para unirse a los transcritos celulares recién sintetizados (Khacho *et al.*, 2008; Kumar, Shum & Glaunsinger, 2011; Woods, Kantidakis, Sabe, Critchley & Norman, 2005). Una delección del extremo carboxilo terminal (NSP3Δ4G) y mutaciones puntuales que afectan la interacción con RoXaN (R187E y K191E) son incapaces de relocalizar a PABP-C en el núcleo. Además, se observa que en ambos casos NSP3 es completamente incapaz de co-immunoprecipitar con eIF4G y RoXaN, por lo que la formación del complejo ternario es esencial para la relocalización al núcleo de PABP-C (Harb *et al.*, 2008). El reciente hallazgo de que una doble mutante de NSP3, que combina las dos mutaciones que afectan la interacción con RoXaN (R187E:K191E), tiene un nivel de acumulación menor en comparación con la proteína silvestre revela que la dinámica de síntesis y degradación de NSP3 es potencialmente relevante para relocalizar PABP-C al núcleo (Contreras-Treviño *et al.*, 2017). Por otro lado, la relocalización nuclear de PABP-C no se presenta cuando NSP3 se expresa en presencia de 17DMAG, un inhibidor de la chaperona HSP90, lo que indica que los dímeros de NSP3 son necesarios para la función inhibitoria (Dutta *et al.*, 2011). No obstante, una mutación en el residuo triptófano 170 por alanina es incapaz de dimerizar y conserva un 50% de la función inhibitoria de la traducción celular con respecto a la proteína silvestre (Contreras-Treviño *et al.*, 2017). En conjunto los datos anteriores sugieren que dos de las funciones de NSP3, relocalización de PABP-C e inhibición de la traducción celular, no responden de manera idéntica a mutaciones puntuales en la proteína.

La naturaleza del genoma de los RVA y sus estrategias de replicación han permitido obtener rearreglantes genéticas por infecciones consecutivas en cultivos celulares, en particular un virus rearreglante del RVA de la cepa SA11 posee secuencias nucleotídicas duplicadas en el gen que codifica para NSP3 (SA11-4Fg7re) y mantiene la capacidad infecciosa. Esta variante de NSP3 con 533 aminoácidos presenta dominios duplicados (RNA, dimerización, unión a RoXaN), y un peso molecular de

60 kDa, es incapaz de relocalizar a PABP-C mientras que la unión con RoXaN, con eIF4G y la capacidad para dimerizar se mantienen (Arnold, Brownback, Taraporewala & Patton, 2012). La inhibición de la traducción celular durante la infección por los RVA se atribuye a NSP3, debido al efecto que tiene NSP3 recombinante sobre la traducción celular (Padilla-Noriega, Paniagua & Guzmán-León, 2002), y con base en que el uso de interferentes de RNA específicos para NSP3 afectan la inhibición traduccional por RVA, independientemente del estado de fosforilación del factor eIF2α (Montero, Rojas, Arias & López, 2008). Durante el ciclo de replicación de los RVA existe un secuestro nuclear de los transcritos celulares y es atribuido a NSP3, y se revierte cuando se bloquea la expresión de NSP3 por RNA de interferencia, por lo que se ha propuesto que el bloqueo del transporte nuclear-citoplásmico del RNA y proteínas coopera con la función inhibitoria traduccional de NSP3 (Rubio, Mora, Romero, Arias & López, 2013). El exporte nuclear del RNAm depende de modificaciones que suceden en el núcleo y es asistido por la exportina 1 (CMR1), adicionalmente se une a factores de inicio de la traducción celular como eIF4E y PABP-C resguardándolo de la degradación en el citoplasma. La proteína PABP-C emerge del núcleo unida al RNAm, y a la proteína paxilina. Se ha reportado interacción entre PABP-C y RoXaN a través de un intermediario del RNA, además, RoXaN reconoce secuencias del tipo ARE (AU-rich elements, por sus siglas en inglés) que regulan la estabilidad de los RNA mensajeros celulares (Harb *et al.*, 2008; Lepek & Stoecklin, 2014; Vitour *et al.*, 2004). La proteína RoXaN es mayormente nuclear; mientras que PABP-C es citoplásmica, y durante la infección con RVA existe un intercambio del compartimento celular de estas dos proteínas (Harb *et al.*, 2008). En conjunto, estos datos sugieren que NSP3 secuestra en el citoplasma a un factor necesario para el exporte nuclear de los mensajeros celulares, probablemente favoreciendo su localización y degradación.

Recientemente se reportó que la función inhibitoria de la traducción de NSP3 se adquiere previamente a la formación de los dímeros estables, y se propone que esto ocurre por un secuestro de eIF4G desde la síntesis de NSP3 en los ribosomas, y a esta forma funcional se le denomina intermediario de dimerización (Figura 5) (Contreras-Treviño *et al.*, 2017). Este hallazgo implica que la chaperona HSP90, que forma parte de los intermediarios de dimerización, juega un papel central en la adquisición de la función inhibitoria de la traducción de NSP3. Además, la distinción que se hace entre intermediarios de dimerización y dímeros estables de NSP3 abre una nueva avenida de investigación sobre la relevancia de estas formas de la proteína en relación a las distintas funciones que realiza. Adicionalmente, se han encontrado diferencias temporales para cepas distintas de RVA, el efecto inhibitorio requiere 3.5 horas para la cepa RF con un efecto máximo del 90%, mientras que RRV alcanza un máximo del 50% en 6 horas (Gratia *et al.*, 2015).

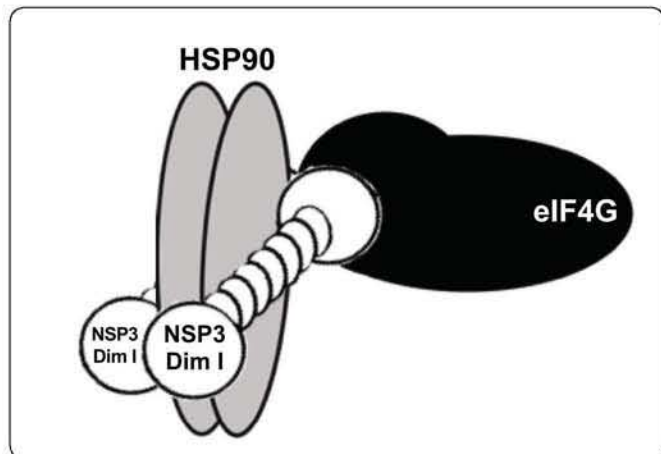


Figura 5. Intermediarios de la dimerización de NSP3. Los intermediarios de la dimerización de NSP3 se definen por su interacción con la chaperona HSP90. El hallazgo de mutantes de NSP3 que no forman dímeros estables, pero contienen el dominio de unión a HSP90 intacto, y la alta afinidad de NSP3 por eIF4G (10 veces mayor que la de PABP), sugieren fuertemente que los intermediarios de dimerización se cuestran a eIF4G recién sintetizado.

ESTIMULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN VIRAL POR NSP3

El ciclo replicativo de los RVA ocurre en el citoplasma celular y particularmente los RNAm virales son sintetizados dentro de la partícula viral por VP1 (polimerasa del RNA). Los transcritos de los RVA poseen en el extremo 5' una estructura tipo *cap* similar a los mensajeros celulares, mientras que el extremo 3' no tiene poliadenilación y en su lugar posee una secuencia conservada en todos los genes de los RVA (UGACC) que es reconocida por NSP3 (Poncet, Laurent & Cohen, 1994). NSP3 estimula la traducción de los mensajeros virales y ha sido debatida por sus funciones aparentemente contrastantes. El contexto de la infección viral enfrenta las funciones opuestas de NSP3 (inhibición y estimulación de la traducción), de las cuales sólo la inhibición de la traducción celular, pero no la estimulación de la traducción viral, es susceptible al nivel de expresión de NSP3 en experimentos de transfección con RNA interferente. No obstante, en estas condiciones aumenta la liberación de partículas virales infecciosas que se relaciona con una mayor síntesis de RNA viral y disminución del efecto citopático (Montero, Arias & López, 2006). Por otro lado, la estimulación traduccional por NSP3 se ha estudiado a través de genes reporteros (Luciferasa) con UTR de los RVA y se encontró que aumenta la actividad de la luciferasa para los mensajeros virales poliadenilados con magnitudes distintas. El reconocimiento del RNAm viral es indispensable para la estimulación traduccional, debido a que deleciones o mutaciones puntuales (W87/A) en el extremo amino terminal de NSP3 afectan la afinidad y por consecuencia disminuye la señal de la luciferasa. La cantidad del RNA inicial introducido por electroporación disminuye conforme el efecto inhibitorio traduccional aumenta, ya que cuando la línea celular

usada en los experimentos (Cb20) expresa constitutivamente a NSP3 favorece la traducción 325 veces de los RNA mensajeros similares al RVA a las 6 horas, a pesar de disminuir siete veces la cantidad del RNA inicial. Es notable que la cantidad de NSP3 acumulada es 6.8 veces menor comparada con la infección del RVA en células MA104 (8 hpi), además en tiempos tempranos de la infección (1 ó 2 hpi) existe una traducción de los RNA mensajeros virales, aunque NSP3 no sea detectable (Gratia *et al.*, 2015; Vende, Piron, Castagné & Poncet, 2000). Los datos anteriores en conjunto sugieren que las funciones antagónicas de NSP3 para inhibir o estimular la traducción son críticamente sensibles al nivel de expresión y tiempo en el que esto ocurre, además de estar ligados de alguna manera a la replicación viral.

OLIGOMERIZACIÓN DE NSP3

El dímero de NSP3 se ha relacionado con la función inhibitoria traduccional, y la chaperona HSP90 asiste en su formación. La parte central de NSP3 tiene una región mínima para dimerizar (residuos 150-206), y fue identificada a través del sistema del doble híbrido en levadura (Piron, Delaunay, Grosclaude & Poncet, 1999). Esta región se encuentra dentro del *coiled coil*, donde además incluye un fragmento del dominio de unión a eIF4G, así como los dominios de unión a RoXaN y HSP90. NSP3 tiende a homo-oligomerizar cuando se expresa en células infectadas por el RVA, células de insecto y en sistemas *in vitro* de traducción (Mattion, Cohen, Aponte & Estes, 1992). HSP90 asiste a NSP3 en la dimerización a través de los residuos 225 al 258 de los monómeros recién sintetizados, y en un sistema de traducción *in vitro* con lisados de reticulocitos los dímeros tardan 15 minutos en completar el proceso. Estas interacciones tempranas entre HSP90 con los monómeros de NSP3 se les denomina intermediarios de la dimerización, debido a que los inmunoprecipitados con anti-HSP90 producidos por traducción *in vitro* se disocian de NSP3 conforme avanza el tiempo (< 15 minutos), y en lisados inmunoprecipitados de células infectadas con los RVA que fueron sometidos a electroforesis en ausencia de un agente reductor (beta-mercaptoetanol), no se detectan dímeros unidos a HSP90. La formación de los dímeros de NSP3 correlaciona con su capacidad para interactuar con eIF4G y relocalizar a PABP-C en el núcleo (Dutta *et al.*, 2011). Los fragmentos amino terminal (residuos 4-164) y carboxilo terminal (residuos 206-315) se han cristalizado por separado, y se observan como un homodímero asimétrico y simétrico, respectivamente (Deo, Groft, Rajashankar & Burley, 2002; Groft & Burley, 2002). La dimerización de NSP3 disminuye con mutaciones en la región *coiled coil*, en particular la mutación en el triptófano 170 por una alanina, modifica una posición importante para la oligomerización y estabilidad de NSP3, y por contraparte al cambiar la tirosina 192 por alanina aumenta la cantidad de dímeros estables de NSP3 (Contreras-Treviño *et al.*, 2017). Además, la variante duplicada de NSP3 producida por el virus SA11-7Fg4re mantiene la capacidad para oligomerizar aunque es incapaz para relocalizar a PABP-C (Arnold, Brownback, Taraporewala & Patton, 2012).

INTERMEDIARIOS DE LA DIMERIZACIÓN CON FUNCIÓN INHIBITORIA DE LA TRADUCCIÓN CELULAR

Las interacciones tempranas de NSP3 con HSP90 dan como resultado a los intermediarios de dimerización, que fueron detectados en ensayos de traducción *in vitro* de lisados de reticulocitos; estas interacciones son inestables frente a bajas concentraciones de SDS (0.02%), y muestran un patrón electroforético similar al monómero (34 kDa) (Contreras-Treviño *et al.*, 2017; Dutta *et al.*, 2011). Además, mutaciones puntuales en el *coiled coil* de NSP3 afectan la formación de dímeros y presentan una función inhibitoria parcial (aprox. 50%), estos cambios están fuera del dominio de unión a HSP90, por lo que estas mutantes de NSP3 deben producir mayoritariamente intermediarios de dimerización, pero no dímeros maduros libres de interacciones con la chaperona HSP90 (Figura 5) (Contreras-Treviño *et al.*, 2017).

ESTABILIDAD DE NSP3

La proteostasis a nivel celular funciona como un mecanismo de regulación para la función de diversas proteínas y comprende desde la síntesis, el plegamiento y la degradación (Hartl, Bracher & Hayer-Hartl, 2011). El tiempo de vida media de NSP3 determinado por ensayos *pulse-chase* es de 200 minutos en el sistema de expresión del virus vaccinia (Piña-Vázquez, De Nova-Ocampo, Guzmán-León & Padilla-Noriega, 2007), y es susceptible a la degradación por la vía del proteasoma cuando se inhibe a HSP90 (Contreras-Treviño *et al.*, 2017; Dutta *et al.*, 2011). Recientemente, se encontró que los dímeros de NSP3 se degradan con mayor rapidez con respecto a los intermediarios de dimerización, con un tiempo de vida media de 60 y 134 minutos, respectivamente (Contreras-Treviño *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

La traducción celular es uno de los procesos génicos con mayor nivel de regulación, por lo que los virus desarrollaron diversas estrategias para utilizarla en su beneficio. NSP3 se ha propuesto como el regulador a nivel traduccional de la expresión génica de los RVA, por su capacidad para interactuar con los mensajeros virales y con proteínas celulares que participan en la traducción celular. Específicamente NSP3 posee la capacidad de estimular la traducción viral e inhibir la síntesis de proteínas celulares, y sus RNA mensajeros carecen de una etiqueta fundamental de los RNAm celulares, la cola de poli-A, por lo que estudiar los mecanismos que regulan ambas funciones es un modelo muy atractivo para conocer funciones celulares de regulación traduccional a detalle.

El mecanismo de inhibición de la traducción celular de NSP3 era atribuido totalmente a la formación de dímeros estables, así como a la interacción con eIF4G y RoXaN. No obstante, en estudios recientes se ha demostrado que la función se adquiere previo a la aparición del dímero y las interacciones del RNA mensajero celular con eIF4G, esto sugiere que la adquisición de la función es un mecanismo más complejo de lo que se

pensaba y que las propiedades intrínsecas de NSP3 y de la chaperona HSP90 que asiste a su plegamiento y dimerización son partícipes de ella.

AGRADECIMIENTOS

Los estudios de Hugo I. Contreras Treviño y Luis Padilla Noriega fueron apoyados financieramente por donativos otorgados a Luis Padilla Noriega por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CB2011/168046) y la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT IN201212). También se otorgó apoyo financiero a Luis Padilla Noriega del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Hugo I. Contreras Treviño fue apoyado con una beca para realizar estudios de doctorado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Agradecemos a Renato León Rodríguez, Verónica Monroy Martínez y María Cecilia Aguilar Zacarías por el apoyo técnico.

REFERENCIAS

- Arnold, M.M., Brownback, C.S., Taraporewala, Z.F. & Patton, J.T. (2012). Rotavirus variant replicates efficiently although encoding an aberrant NSP3 that fails to induce nuclear localization of poly(A)-binding protein. *J. Gen. Virol.*, **93**(Pt 7), 1483–1494. <https://doi.org/10.1099/vir.0.041830-0>
- Castello, A., Álvarez, E. & Carrasco, L. (2011). The multifaceted poliovirus 2A protease: Regulation of gene expression by picornavirus proteases. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2011**, 1-23. <https://doi.org/10.1155/2011/369648>
- Contreras-Treviño, H.I., Reyna-Rosas, E., León-Rodríguez, R., Ruiz-Ordaz, B.H., Dinkova, T.D., Cevallos, A.M. & Padilla-Noriega, L. (2017). Species A rotavirus NSP3 acquires its translation inhibitory function prior to stable dimer formation. *PLoS One*, **12**(7), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181871>
- Crawford, S.E., Ramani, S., Tate, J.E., Parashar, U.D., Svensson, L., Hagbom, M., Franco, M.A., Greenberg, H.B., O’Ryan, M., Kang, G., Desselberger, U. & Estes, M.K. (2017). Rotavirus infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.*, **3**(17083), 1–16. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>
- Deo, R.C., Groft, C.M., Rajashankar, K.R. & Burley, S.K. (2002). Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. *Cell*, **108**(1), 71–81.
- Desselberger, U. (2014). Rotaviruses. *Virus Res.*, **190**, 75–96. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.06.016>
- Dormitzer, P.R., Sun, Z.-Y.J., Blixt, O., Paulson, J.C., Wagner, G. & Harrison, S.C. (2002a). Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8* core. *J. Virol.*, **76**(20), 10512–10517. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.20.10512>
- Dormitzer, P.R., Sun, Z.-Y.J., Wagner, G. & Harrison, S.C. (2002b). The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO J.*, **21**(5), 885–897. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.885>
- Dutta, D., Chattopadhyay, S., Bagchi, P., Halder, U.C., Nandi, S., Mukherjee, A., Kobayashi, N., Taniguchi, K. & Chawla-Sarkar,

- M. (2011). Active participation of cellular chaperone Hsp90 in regulating the function of rotavirus nonstructural protein 3 (NSP3). *J. Biol. Chem.*, **286**(22), 20065–20077. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.231878>
- Estes, M.K. & Greenberg, H.B. (2013). Rotaviruses, in: *Fields Virology*. Vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA., 1347-1401.
- Fields, B.N., Knipe, D.M. & Howley, P.M. (2013). *Fields Virology*, 6th Edition, Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA., 1-2418. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu346>
- Gratia, M., Sarot, E., Vende, P., Charpilienne, A., Baron, C.H., Duarte, M., Pyronnet, S. & Poncet, D. (2015). Rotavirus NSP3 Is a Translational Surrogate of the Poly(A) Binding Protein-Poly(A) Complex. *J. Virol.*, **89**(17), 8773–8782. <https://doi.org/10.1128/JVI.01402-15>
- Gratia, M., Vende, P., Charpilienne, A., Baron, H.C., Laroche, C., Sarot, E., Pyronnet, S., Duarte, M. & Poncet, D. (2016). Challenging the Roles of NSP3 and Untranslated Regions in Rotavirus mRNA Translation. *PLoS One*, **11**(1), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145998>
- Groft, C.M. & Burley, S.K. (2002). Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol. Cell*, **9**(6), 1273–1283.
- Harb, M., Becker, M.M., Vitour, D., Baron, C.H., Vende, P., Brown, S.C., Bolte, S., Arold, S.T. & Poncet, D. (2008). Nuclear localization of cytoplasmic poly(A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN. *J. Virol.*, **82**(22), 11283–11293. <https://doi.org/10.1128/JVI.00872-08>
- Hartl, F.U., Bracher, A. & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, **475**(7356), 324–332. <https://doi.org/10.1038/nature10317>
- Hinnebusch, A.G. (2014). The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu. Rev. Biochem.*, **83**, 779–812. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035802>
- Hinnebusch, A.G. & Lorsch, J.R. (2012). The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**(10), 1–25. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011544>
- Ito, H., Sugiyama, M., Masubuchi, K., Mori, Y. & Minamoto, N. (2001). Complete nucleotide sequence of a group A avian rotavirus genome and a comparison with its counterparts of mammalian rotaviruses. *Virus Res.*, **75**(2), 123–138. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(01\)00234-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00234-9)
- Iwasaki, S., Ingolia, N.T., Morisaki, T., Wu, B., Eliscovich, C., Yoon, Y.J., Singer, R.H., Yan, X., Hoek, T.A., Vale, R.D., Tanenbaum, M.E., Wang, C., Han, B., Zhou, R., Zhuang, X., Ingolia, N.T., Lareau, L.F., Weissman, J.S., Shah, P., Ding, Y., Niemczyk, M., Kudla, G., Plotkin, J.B., Mukherjee, C., Jackson, R.J., Hellen, C.U., Pestova, T. V., Jung, H., Gkogkas, C.G., Sonenberg, N., Holt, C.E. & Shieh, Y.W. (2016). Seeing translation. *Science*, (80-) **352**(6292), 1425–1429. <https://doi.org/10.1126/science.aag1039>
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T. & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**(2), 113–127. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>
- Jayaram, H., Estes, M.K. & Prasad, B.V.V. (2004). Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res.*, **101**(1), 67–81. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.007>
- Keryer-Bibens, C., Legagneux, V., Namanda-Vanderbeken, A., Cosson, B., Paillard, L., Poncet, D. & Osborne, H.B. (2009). The rotaviral NSP3 protein stimulates translation of polyadenylated target mRNAs independently of its RNA-binding domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**(2), 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.115>
- Khacho, M., Mekhail, K., Pilon-Larose, K., Pause, A., Cote, J. & Lee, S. (2008). eEF1A Is a Novel Component of the Mammalian Nuclear Protein Export Machinery. *Mol. Biol. Cell.*, **19**(12), 5296–5308. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-06-0562>
- Kumar, G.R., Shum, L. & Glaunsinger, B.A. (2011). Importin alpha-mediated nuclear import of cytoplasmic poly(A) binding protein occurs as a direct consequence of cytoplasmic mRNA depletion. *Mol. Cell Biol.*, **31**(15), 3113–3125. <https://doi.org/10.1128/MCB.05402-11>
- Leppik, K. & Stoecklin, G. (2014). An optimized streptavidin-binding RNA aptamer for purification of ribonucleoprotein complexes identifies novel ARE-binding proteins. *Nucleic Acids Res.*, **42**(2), 1–15. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt956>
- Ludert, J.E., Michelangeli, F., Gil, F., Liprandi, F. & Esparza, J. (1987). Penetration and Uncoating of rotaviruses in Cultured Cells. *Intervirology*, **27**(2), 95–101. <https://doi.org/10.1159/000149726>
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S.M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J.R., Buesa, J., Esona, M.D., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gómara, M., Johne, R., Kirkwood, C.D., Martella, V., Mertens, P.P.C., Nakagomi, O., Parreño, V., Rahman, M., Ruggeri, F.M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J.T., Desselberger, U. & Van Ranst, M. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.*, **156**(8), 1397–1413. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1006-z>
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Bányai, K., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gómara, M., Kirkwood, C.D., Martella, V., Mertens, P.P.C., Nakagomi, O., Patton, J.T., Ruggeri, F.M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Desselberger, U. & Van Ranst, M. (2008). Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.*, **153**(8), 1621–1629. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>
- Mattion, N.M., Cohen, J., Aponte, C. & Estes, M.K. (1992). Characterization of an oligomerization domain and RNA-binding properties on rotavirus nonstructural protein NS34. *Virology*, **190**, 68–83. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)91193-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)91193-X)
- Montero, H., Arias, C.F. & López, S., 2006. Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J. Virol.*,

- 80(18)**, 9031–9038. <https://doi.org/10.1128/JVI.00437-06>
- Montero, H., Rojas, M., Arias, C.F. & López, S. (2008). Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2 α but prevents the formation of stress granules. *J. Virol.*, **82(3)**, 1496–1504. <https://doi.org/10.1128/JVI.01779-07>
- Novoa, I. & Carrasco, L. (1999). Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4G by exogenously added hybrid proteins containing poliovirus 2Apro in HeLa cells: effects on gene expression. *Mol. Cell. Biol.*, **19(4)**, 2445–2454.
- Padilla-Noriega, L., Paniagua, O. & Guzmán-León, S. (2002). Rotavirus Protein NSP3 Shuts Off Host Cell Protein Synthesis. *Virology*, **298(1)**, 1–7. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1477>
- Piña-Vázquez, C., De Nova-Ocampo, M., Guzmán-León, S. & Padilla-Noriega, L. (2007). Post-translational regulation of rotavirus protein NSP1 expression in mammalian cells. *Arch. Virol.*, **152(2)**, 345–368. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0850-8>
- Piron, M., Delaunay, T., Grosclaude, J. & Poncet, D. (1999). Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *J. Virol.*, **73(7)**, 5411–5421.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J. & Poncet, D. (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.*, **17(19)**, 5811–5821. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5811>
- Poncet, D., Aponte, C. & Cohen, J. (1993). Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *J. Virol.*, **67(6)**, 3159–3165.
- Poncet, D., Laurent, S. & Cohen, J. (1994). Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *EMBO J.*, **13(17)**, 4165–4173.
- Rubio, R.M., Mora, S.I., Romero, P., Arias, C.F. & López, S. (2013). Rotavirus prevents the expression of host responses by blocking the nucleo-cytoplasmic transport of polyadenylated mRNAs. *J. Virol.*, **87(11)**, 6366–6345. <https://doi.org/10.1128/JVI.00361-13>
- Silvestri, L.S., Taraporewala, Z.F. & Patton, J.T. (2004). Rotavirus Replication: Plus-Sense Templates for Double-Stranded RNA Synthesis Are Made in Viroplasm. *J. Virol.*, **78(14)**, 7763–7774. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.14.7763-7774.2004>
- Tate, J.E., Burton, A.H., Boschi-Pinto, C. & Parashar, U.D. (2016). Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000–2013. *Clin. Infect. Dis.*, **62(Suppl. 2)**, S96–S105. <https://doi.org/10.1093/cid/civ1013>
- Taylor, J.A., O'Brien, J.A. & Yeager, M. (1996). The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. *EMBO J.*, **15(17)**, 4469–4476.
- Vende, P., Piron, M., Castagné, N. & Poncet, D. (2000). Efficient Translation of rotavirus mRNA Requires Simultaneous Interaction of NSP3 with the Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4G and the mRNA 3' End. *J. Virol.*, **74(15)**, 7064–7071. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.15.7064-7071.2000>. Updated
- Vicens, Q. & Westhof, E. (2014). Biogenesis of Circular RNAs. *Cell*, **159(1)**, 13–14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.005>
- Vitour, D., Lindenbaum, P., Vende, P., Becker, M., Poncet, D. & Becker, M.M. (2004). RoXaN, a Novel Cellular Protein Containing TPR, LD, and Zinc Finger Motifs, Forms a Ternary Complex with Eukaryotic Initiation Factor 4G and rotavirus NSP3. RoXaN, a Novel Cellular Protein Containing TPR, LD, and Zinc Finger Motifs, Forms a Ternary. *J. Virol.*, **78(8)**, 3851–3862. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.8.3851>
- Walsh, D., Mathews, M.B., Mohr, I., Larsson, O., Tian, B., Sonenberg, N., Hershey, J.W.B., Roux, P.P., Topisirovic, I., Darnell, J.C., Richter, J.D., Pavitt, G.D., Ron, D., Cells, V., Decker, C.J. & Parker, R. (2012). Tinkering with Translation: Protein Synthesis in Virus-Infected Cells. *ColdSpring Harb. Perspect. Biol.*, **5(1)**, 1–28. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012351>
- Walsh, D. & Mohr, I. (2011). Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat. Rev. Microbiol.*, **9(12)**, 860–875. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2655>
- Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D. & Sachs, A.B. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell*, **2(1)**, 135–140.
- Woods, A.J., Kantidakis, T., Sabe, H., Critchley, D.R. & Norman, J.C. (2005). Interaction of Paxillin with Poly (A) -Binding Protein 1 and Its Role in Focal Adhesion Turnover and Cell Migration. *Mol. Cell. Biol.*, **25(9)**, 3763–3773. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.9.3763>